

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.945>

<https://orcid.org/0000-0002-2824-9583>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Ruslan Bikmurzin

Mielių β -gliukanų struktūros tyrimai ir molekulinės sąveikos su Dectin-1 receptoriumi *in silico* analizė

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2026

Disertacija rengta 2016–2025 metais Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre.

Disertacija ginama eksternu

Mokslinė konsultantė – prof. dr. Lilija Kalėdienė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Eglė Lastauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

Dr. Visvaldas Kairys (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010),

Dr. Martynas Talaikis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

Dr. Vaclav Vetvička (Luisvilio universitetas, JAV, gamtos mokslai, biologija – N 010),

Dr. Auksė Zinkevičienė (Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2026 m. birželio mėn. 25 d. 13 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje.
Adresas: Saulėtekio al. 7, R401, Vilnius, Lietuva

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.945>

<https://orcid.org/0000-0002-2824-9583>

VILNIUS UNIVERSITY

Ruslan Bikmurzin

Structural Studies of Yeast β -Glucans
and *In Silico* Analysis of Their Molecular
Interactions with Dectin-1 Receptor

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2026

The dissertation was prepared between 2016 and 2025 at Vilnius University, Life Sciences Center.

The dissertation is defended on an external basis

Academic Consultant – Prof. Dr. Lilija Kalėdienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Eglė Lastauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Dr. Visvaldas Kairys (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010),

Dr. Martynas Talaikis (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Vaclav Vetvička (University of Louisville, USA, Natural Sciences, Biology – N 010),

Dr. Auksė Zinkevičienė (Innovative Medicine Centre, Natural Sciences, Biology – N 010).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13:00 on 25th of June 2026 in Auditorium R401 of the Life Sciences Center.

Address: Saulėtekio al. 7, R401, Vilnius, Lithuania

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS.....	10
MOKSLINIS NAUJUMAS	12
GINAMIEJI TEIGINIAI.....	14
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	15
1.1. β -gliukanų biologinis aktyvumas.....	15
1.1.1. β -gliukanų receptoriai	16
1.1.2. Nuo β -gliukanų priklausoma imunomoduliacija.....	21
1.1.3. β -gliukanų priešvėžinis aktyvumas	23
1.1.4. β -gliukanų poveikis mikrobiotai	25
1.1.5. β -gliukanų pritaikymas	27
1.2. Mieliagyrių β -gliukanų struktūra ir fizikocheminės savybės.....	28
1.2.1. Struktūra ir konformacija	28
1.2.2. Molekulinė masė ir tirpumas.....	31
1.3. β -gliukanų išskyrimas ir analizė	32
1.3.1. β -gliukanų analizė FT-IR spektroskopija.....	35
1.3.2. β -gliukanų analizė naudojant BMR spektroskopiją	38
1.4. β -gliukanų <i>in silico</i> tyrimai.....	41
1.4.1. Molekulinis dokinimas.....	42
1.4.2. Molekulių dinamikos simuliacija.....	42
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	46
2.1. β -gliukanų išskyrimas	46
2.1.1. Mielų biomasės gavimas.....	46
2.1.2. Mielų autolizė	46
2.1.3. β -gliukanų išskyrimas terminiu būdu.....	46
2.1.4. β -gliukanų išskyrimas šarmu	47
2.2. ATR-FTIR spektroskopija	48
2.3. Kietojo kūno branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija	48

2.4. Dectin-1 ir β -gliukanų dokinimas	49
2.4.1. β -gliukanų struktūros paruošimas	49
2.4.2. β -gliukanų ir Dectin-1 dimero dokinimas	50
2.5. β -gliukanų ir Dectin-1 molekulių dinamikos simuliacija.....	50
2.5.1. Struktūrų paruošimas	51
2.5.2. Simuliacijos parametrų nustatymas.....	51
2.5.3. Molekulių dinamikos simuliacijų analizės įrankiai.....	52
3. REZULTATAI.....	54
3.1. β -gliukanų frakcijų išėiga.....	54
3.2. β -gliukanų ATR-FTIR spektro analizė	55
3.3. β -gliukanų ^{13}C BMR spektro analizė	59
3.4. β -gliukanų ir Dectin-1 dimero sąveikos modeliavimas.....	63
3.5. Molekulių dinamikos simuliacijos analizė	69
4. REZULTATŲ APTARIMAS	79
4.1. β -gliukanų struktūros tyrimai.....	80
4.2. β -gliukanų sąveikos su Dectin-1 homodimeru <i>in silico</i> tyrimai	86
IŠVADOS.....	89
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	90
SUMMARY	112
PADĖKA.....	150
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	151
KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS	152
GYVENIMO APRAŠYMAS.....	153
UŽRAŠAMS	154

SANTRUMPOS

Å – angstromas (nesisteminis ilgio matas, atitinkantis 0,1 nm)

AP-1 – aktyvuojantis baltymas 1

ATR-FTIR – pažeistojo vidaus atspindžio Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija (angl. *Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared spectroscopy*)

βGRP – β-1,3-gliukaną atpažįstantis baltymas (angl. *β-1,3-Glucan Recognition Protein*)

β-gliukanų frakcijos: AN – šarmu išskirta, šarme ir vandenyje netirpi, AWS – šarmu išskirta, vandenyje tirpi, HWN – terminiu būdu išskirta, vandenyje netirpi

BMR – Branduolio magnetinis rezonansas

BRM – biologinio atsako keitikliai

CNN – konvoliuciniai neuroniniai tinklai (angl. *Convolutional Neural Network*)

CR3 – komplemento receptorių 3

CRD – angliavandenių atpažinimo domenai (angl. *Carbohydrate Recognition Domain*)

CTLR – C-tipo į lektiną-panašūs receptoriai (angl. *C-type lectin-like receptor*)

DC – dendritinės ląstelės

DMSO – dimetilsulfoksidas

DP – polimerizacijos laipsnis (angl. *degree of polymerization*)

fs – femtosekundė (SI sistemos vienetas atitinkantis 10^{-15} s)

H₂O₂ – vandenilio peroksidas

MW – molekulinis svoris, HMW – aukštas, LMW – žemas

IL – interleukinai

ITAM – imunoreceptoriaus aktyvacijos motyvas (angl. *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*)

MAPK – mitogeno aktyvuota proteinkinazė

MARCO – makrofagų receptorius su kolageno struktūra (angl. *Macrophage Receptor with Collagenous structure*)

MD, MDS – molekulių dinamika, molekulių dinamikos simuliacija

MM/GBSA – molekulinė mechanika su generalizuota Borno elektrostatika ir paviršiaus ploto hidrofobine pataisa

MM/PBSA – molekulinė mechanika su Puasono-Bolcmano (orig. *Poisson-Boltzmann*) elektrostatika ir paviršiaus ploto hidrofobine pataisa.

Mφ – makrofagai

NF-κB – branduolio veiksnys kappa B (angl. *Nuclear Factor kappa B*)

NK – naturalūs kileriai

NLPR3 – NOD-, LRR- ir pirino domenų turintis baltymas 3

NO – azoto oksidas

PAMP – su patogenais susijęs molekulinis šablonas (angl. *Pathogen Associated Molecular Pattern*)

PDB – baltymų duomenų bankas (<http://www.rcsb.org/>) (angl. *Protein Data Bank*); PDB ID – struktūrą žymintis kodas

PI3K – Fosfatidilinozitolio 3-kinazė

PRR – šablono atpažinimo receptorius (angl. *Pattern Recognition Receptors*)

Rg – sukimo spindulys (angl. *Radius of gyration*)

RMSD – šaknis iš vidutinio kvadratinio nuokrypio (angl. *root-mean-square deviation*)

RMSF – šaknis iš vidutinių kvadratinių svyravimų (angl. *root-mean-square fluctuation*)

ROS – reaktyvios deguonies rūšys

SCFA – trumpųjų grandžių riebalų rūgštys (angl. *Short Chains Fatty Acids*)

Syk – Baltymų tirozino kinazė SYK

TLR – Toll-tipo receptorius

TNF – auglių nekrozės faktorius (angl. *Tumor Necrosis Factor*)

XRD – rentgeno spindulių difrakcija (angl. *X-ray diffraction*)

ĮVADAS

Biologiškai aktyvios medžiagos, tokios kaip β -gliukanai, pastaraisiais metais sulaukia vis daugiau mokslininkų dėmesio dėl jų gebėjimo moduluoti imuninės sistemos veiklą. Iš skirtingų šaltinių išskirti β -gliukanai priskiriami biologinio atsako modifikatoriams (BRM), nes jie gali stimuliuoti įvairius imuninės sistemos procesus, įskaitant fagocitozę ir citokinų sintezę. β -gliukanai veikia kaip su patogenų susiję molekuliniai šablonai (PAMP), kurie yra atpažįstami įgimtos imuninės sistemos šablono atpažinimo receptorių (PRR), tokių kaip Dectin-1. Dėl šių savybių β -gliukanai tiriami kaip potencialūs imunoterapijos agentai, funkcinų maisto produktų komponentai bei vakcinų adjuvantai.

Nors β -gliukanai plačiai taikomi kaip imunomoduliuojančios medžiagos, vis dar stokojama išsamių duomenų apie jų struktūrinę įvairovę ir imuninės sistemos receptorių aktyvacijos ryšį. Kadangi β -gliukanų erdvinė struktūra, šakotumas ir konformacija gali lemti skirtingą biologinį atsaką, būtina išsamiai tirti šių molekulių struktūros ir funkcijos sąsajas. β -gliukanai pasižymi plačiu biologinio aktyvumo spektru, tačiau jų savybės priklauso nuo biologinės kilmės ir išskyrimo metodo. Skirtingos β -gliukanų frakcijos gali skirtis savo molekulinio svoriu, struktūra, šakotumo laipsniu, tirpumu bei imunologiniu aktyvumu. Mielių *Saccharomyces cerevisiae* kilmės β -gliukanai yra vieni dažniausiai tiriamų dėl jų gerai žinomos cheminės struktūros, saugumo profilio, o *Candida* genties β -gliukanai svarbūs mediciniui ir imunologiniui požiūriui.

Šioje disertacijoje dėmesys buvo sutelktas į skirtingais metodais iš mielių išgautų β -gliukanų frakcijų struktūrinę analizę taikant spektroskopinius metodus – pažeistojo vidaus atspindžio Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopiją (ATR-FTIR) ir ^{13}C kietojo-kūno branduolių magnetinio rezonanso (BMR) spektroskopiją. Be to, siekiant įvertinti β -gliukanų gebėjimą sąveikauti su Dectin-1 receptoriumi, buvo naudojama receptoriaus dimerinė forma ir pasitelkti *in silico* metodai – molekulinis dokinimas ir molekulinės dinamikos (MD) simuliacija. Šie metodai ne tik leidžia sumažinti eksperimentinių gyvūnų naudojimą, bet ir suteikia detalias įžvalgas apie molekulinę sąveikos mechanizmą.

Darbo tikslas:

Ištirti skirtingais metodais iš mielių išgautų β -gliukanų struktūrinės savybės bei jų sąveiką su dimerine Dectin-1 receptoriaus forma, taikant spektroskopinius ir *in silico* metodus.

Darbo uždaviniai:

1. Išskirti mieliagrybių β -gliukanus ir taikant ATR-FTIR ir ^{13}C kietojo-kūno BMR spektroskopijos metodus, įvertinti išskyrimo metodų poveikį β -gliukanų struktūrai.
2. Išanalizuoti šakotų ir linijinių β -gliukanų sąveiką su Dectin-1 dimeru taikant molekulinį dokinimą.
3. Įvertinti linijinių ir šakotų β -gliukanų gebėjimą sąveikauti su Dectin-1 homodimeru ir tokios sąveikos dinamiką atliekant molekulių dinamikos (MD) simuliacijas.

MOKSLINIS NAUJUMAS

β -gliukanai veikia kaip ligandai įgimtos imuninės sistemos receptoriams, atpažįstantiems patogenams būdingas struktūras. Dėl jų sąveikos su šiais receptoriais mielių β -gliukanai – ląstelės sienelės struktūriniai komponentai, pasižymi imunomoduliaciniu poveikiu. Pagrindinis β -gliukanų atpažinimo receptorius yra Dectin-1, tačiau detalūs šio receptoriaus aktyvacijos mechanizmai iki šiol nėra iki galo išaiškinti. Nors sutariama, kad Dectin-1 atpažįsta β -1,3- ir β -1,3/1,6-gliukanus, literatūroje vis dar pateikiami prieštaringi duomenys apie optimalų ligando dydį, struktūrą ir receptoriaus oligomerizacijos vaidmenį imuniniame atsake. Dėl šios priežasties β -gliukanų kokybinė analizė yra aktuali tiek fundamentiniuose, tiek taikomuosiuose tyrimuose.

β -gliukanų analizė taikant ATR-FTIR spektroskopiją neretai naudojama kaip vienintelis metodas β -gliukanų įvertinimui mokslinėje literatūroje. Šiame darbe buvo atlikti β -gliukanų struktūriniai tyrimai, derinant ATR-FTIR ir kietojo kūno ^{13}C BMR spektroskopiją bei molekulinį dokinimą su molekulinės dinamikos (MD) simuliacijomis. Sistemingai įvertintos ATR-FTIR spektroskopijos galimybės β -gliukanų struktūrinei analizei, skiriant dėmesį skirtingų glikozidinių jungčių tipų (β -1,3; β -1,4; β -1,6) identifikavimui. Nustatyta, kad mišrių ar kompleksinių β -gliukanų atveju skirtingų jungčių absorbcijos juostų persidengimas riboja metodo taikymą patikimai struktūrinei charakteristikai, todėl vien ATR-FTIR analizės nepakanka detaliai struktūrinei analizei ir būtinas derinamas su kitais metodais, pavyzdžiui ^{13}C BMR.

β -gliukanų biologinis aktyvumas dažnai priklauso nuo molekulinės struktūros, šakotumo laipsnio ir tirpumo. Pritaikius mielių β -gliukanų analizei kietojo-kūno ^{13}C BMR spektroskopiją, nustatyti struktūriniai skirtumai tarp skirtingais būdais išgautų β -gliukanų frakcijų iš to paties biologinio šaltinio.

Dauguma tyrimų analizuoja sąveiką su monomerine Dectin-1 forma. Šiame darbe pirmą kartą pritaikyta 100 ns molekulinės dinamikos simuliacija tiriant mielių β -gliukanų sąveiką su dimeriniu receptoriumi, kadangi receptorių dimerizacija dažnai yra būtina funkciniai signalizacijai. Tyrimai leido identifikuoti, kad sąveika tarp Dectin-1 receptoriaus homodimero palankesnė linijiniams β -gliukanams. Darbe parodyta, kad *in silico* modeliuose β -gliukanų šakos ilgis ir sudėtis gali turėti įtakos sąveikos su receptoriumi stabilumui.

Dokinimo ir molekulių dinamikos simuliacijos tyrimai leido identifikuoti aminorūgščių liekanas (Ser148, Gln149, Asp195, Glu243, Lys245)

dalyvaujančias β -gliukano ir Dectin-1 dimero sąveikoje, apibrėžiant galimas ligando prisijungimo sritis tolimesniems tyrimams.

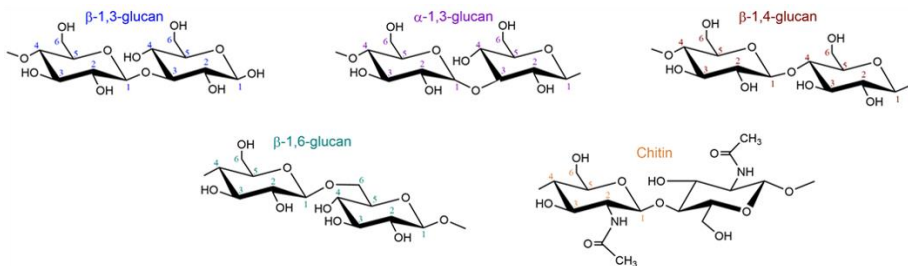
Šio darbo rezultatai turi pritaikymą biotechnologijose, farmacijoje ir imunologijoje. Ypatingai gaminant ar kuriant imunomoduliacinius produktus ar maisto papildus β -gliukanų pagrindu, atrenkant funkcionalias frakcijas konkreitiems taikymams. *In silico* metodų taikymas ne tik mažina gyvūnų naudojimą eksperimentuose ankstyvose tyrimų fazėse, bet ir suteikia galimybę racionaliai projektuoti imunologiškai aktyvius junginius. Tokie metodai gali būti naudojami vakcinų adjuvantų kurime, pasirenkant struktūras su didžiausiu imuninio atsako potencialu.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Iš mielių išskirtų skirtingų β -gliukanų frakcijų struktūra, konformacija ir sudėtis priklauso nuo taikomo išskyrimo metodo;
2. ^{13}C kietojo kūno BMR spektroskopija, lyginant su ATR-FTIR, leidžia detaliau nustatyti skirtingų β -gliukanų frakcijų struktūrinius, konformacinius ir sudėties ypatumus;
3. β -gliukanų ir Dectin-1 dimero sąveiką daugiausiai stabilizuoja elektrostatinės ir van der Valso sąveikos, kuriose dažniausiai dalyvauja receptoriaus Ser148, Gln149, Asp195, Glu243 ir Lys245 aminorūgščių liekanos;
4. Dectin-1 dimero formuojamoje sąveikos kišenėje šoninės grandinės gali riboti optimalų β -gliukano išsidėstymą ir mažinti komplekso stabilumą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

β -gliukanai tai naturalūs heterogeniniai, biologiškai aktyvūs polisacharidai sudaryti iš D-gliukozės monomerų sujungtų β glikozidiniaiis ryšiais (**1.1 pav.**) (Du et al., 2019). β -gliukanai plačiai paplitę ir randami grybuose, augaluose ir įvairiuose mikroorganizmuose įskaitant ir kai kurias bakterijas (Wang et al., 2017). Tačiau pagrindiniai šaltiniai iš kurių jie yra išskiriami yra grybai, mieliagyviai, rudieji dumbliai ir grūdinės kultūros (Jayachandran et al., 2018; Murphy et al., 2020; Novak and Vetvicka, 2008). Priklausomai nuo biologinio šaltinio ir išskyrimo būdo jie pasižymi fizikinių ir biologinių savybių bei struktūrine įvairove (Murphy et al., 2020; Sikora et al., 2013).



1.1 pav. Glikozidinių jungčių tipai gliukanuose ir chitine

β -gliukanų molekulės gali būti sudarytos tik iš vienos pagrindinės grandinės arba iš pagrindinės grandinės tarnaujančios karkasu su prijungtomis šoninėmis grandinėmis. Priklausomai nuo polisacharidų biologinio šaltinio, D-gliukozės monomerai karkase ir šoninėse grandinėse gali būti sujungti β -1,3-, β -1,4-, β -1,6-, β -1,2- glikozidiniaiis ryšiais (Geller et al., 2019). Augaliniai, avižų ir miežių β -gliukanai yra linijiniai polisacharidai sujungti β -1,4-glikozidiniu ryšiu su atskiromis β -1,3-grandinėmis (Du et al., 2019; Jayachandran et al., 2018). Dumblių β -gliukanai pagrinde yra linijiniai β -1,3-gliukanai (Vetvicka and Vetvickova, 2011). Grybų ir mieliagybių β -gliukanai geba formuoti įvairias spirales ir dažnai yra sudaryti iš β -1,3-glikozidinėmis jungtimis sujungtų D-gliukozės monomerų, formuojančių karkasą ir β -1,6-glikozidine jungtimi prijungtų šoninių grandinių (Bashir and Choi, 2017; Fernando et al., 2022; Kang et al., 2018; Synytsya and Novak, 2014).

1.1. β -gliukanų biologinis aktyvumas

β -gliukanai žinomi dėl savo imunostimuliuojančių, priešuždegiminių, priešvėžinių, priešvirusinių savybių. Tokios β -gliukanų savybės kaip jungties

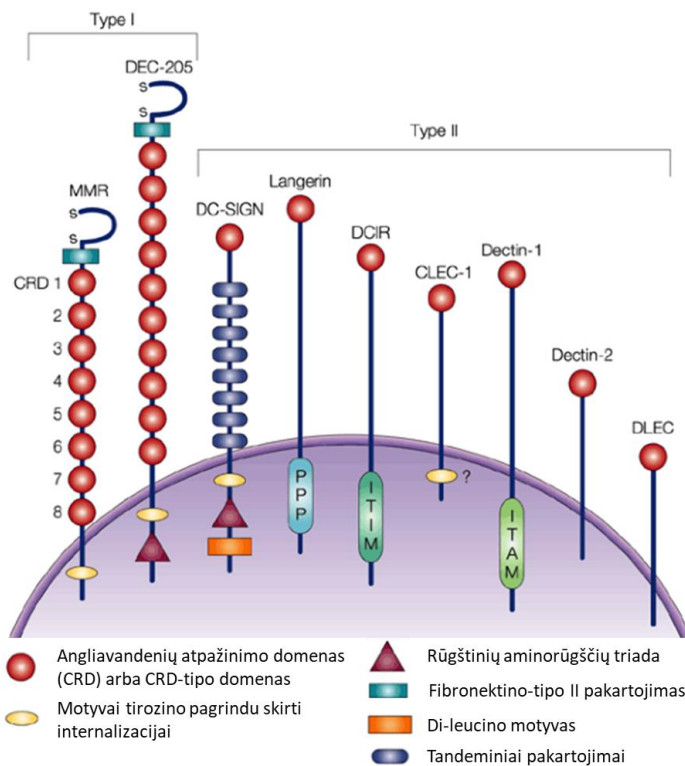
tipas tarp monomerų, šoninių grandinių ilgis, polimerizacijos laipsnis (DP), tirpumas – apsprendžia šių molekulių biologinį aktyvumą (Murphy et al., 2020). Pavyzdžiui, avižų ir miežių β -gliukanai gali sumažinti serume cholesterolio kiekį, palaikyti gliukozės homeostazę, padidinti trumpųjų grandžių riebalų rūgščių (SCFA) ir insulino kiekį (Jayachandran et al., 2018). Grybų ir mieliagybių β -gliukanai dažniau yra siejami su imunomoduliuojančiomis savybėmis, kurios priklauso nuo imuninės sistemos stimuliavimo per specifinius šablono atpažinimo receptorius (PRR), esančius makrofagų, natūralių kilerių (NK), neutrofilų ir dendritinių (DC) ląstelių paviršiuje (Lee et al., 2001; Vetvicka et al., 2019). β -gliukanai dėl išsidėstymo ląstelės sienelėje tarnauja taikiniu imuninės sistemos atsako metu, todėl priklauso su patogenu susijusioms molekulinio šablono molekulėms (PAMP). Imuninė sistema β -gliukanus atpažįsta šablono atpažinimo receptoriais ir aktyvuoja skirtingus atsako kelius, todėl β -gliukanai priskiriami biologinio atsako modifikatoriams (BRM) (Aimanianda et al., 2017; Feng et al., 2022; Lee et al., 2021; Liu et al., 2021; Lowman et al., 2021; Novak and Vetvicka, 2008; Xin et al., 2022). Mieliagybių β -1,3/1,6-gliukanai yra geresni biologinio atsako modifikatoriai lyginant su β -gliukanais iš kitų šaltinių, todėl pasižymi geresnėmis imunitetą aktyvuojančiomis savybėmis (Ikewaki et al., 2022; Murphy et al., 2020; Vetvicka et al., 2021).

1.1.1. β -gliukanų receptoriai

Imuninės sistemos atsakas sukeltas β -gliukanų priklauso nuo jų molekulinės masės, šakotumo, tirpumo, konformacijos ir sąveikos su receptoriais. β -gliukanai veikia kaip su patogenais susiję molekuliniai šablonai (PAMP) ir aktyvuoja imuninį atsaką prisijungdami prie šablono atpažinimo receptorių (PRR): Dectin-1, komplemento receptoriaus 3 (CR3), Toll-tipo receptorių (TLR): TLR2, TLR4, TLR6, tarp kurių pagrindinis ir geriausiai ištirtas yra Dectin-1 (Geller et al., 2019; Wu et al., 2021). Kiti receptoriai, galintys atpažinti β -gliukanus yra laktozilceramidai, NK receptoriaus p30 ir „Scavenger“ šeimos receptoriai (Ikewaki et al., 2022; Murphy et al., 2020). β -gliukanai pasižymi skirtingu afiniškumu receptoriams dėl savo struktūrinės įvairovės. Vis dar nėra iki galo aišku kaip β -gliukanai jungiasi prie savo receptorių ir nuo kurio receptoriaus labiausiai priklauso šių polisacharidų biologinės funkcijos (Vetvicka et al., 2021).

Dectin-1 yra II tipo transmembraninis baltymas, priklausanti C-tipo lektino-panašiams receptoriams (CTLR), kuriems būdingas angliavandenių

atpažinimo domenas (CRD) (platesniame kontekste C-tipo lektino domenas (CTLD) (**1.2 pav.**) ir imunoreceptorių tirozino aktyvacijos motyvas (ITAM).



1.2 pav. Receptoriai, turintys angliavandenių atpažinimo domeną (CRD), pritaikyta pagal (Figdor et al., 2002).

Šis receptorius randamas monocitų, makrofagų, neutrofilų bei dendritinių ląstelių paviršiuje ir aktyvuojamas β -1,3- ir β -1,6-gliukanų (Jayachandran et al., 2018). Nuo Dectin-1 priklausomas grybų ir mieliagybių β -gliukanų atpažinimas lemia PI3K/Akt kelio aktyvaciją, nuo kurios priklauso fagocitozė, mikrobu pašalinimas ir priešgrybelinių efektorinių bei signalinių molekulių gamybą (Geller et al., 2019; Legentil et al., 2015; Wu et al., 2021; Yadav et al., 2012). Sąveikaujant su netirpiais β -gliukanais, ITAM domenas yra fosforilintas. Dvigubai fosforilintas ITAM tarnauja prisijungimo vieta blužnies tirozino kinazei (Syk). Jungiantis β -gliukanams su CRD, tirozino liekana yra fosforilinta ir aktyvuojama Syk kinazė, kuri lemia reaktyvių deguonies formų (ROS) gamybą, branduolio veiksnio (NF)- κ B aktyvaciją ir uždegiminių citokinų gamybą, įskaitant naviko nekrozės veiksnį- α (TNF- α) ir interleukiną 6 (IL-6), IL-12, IL-10. Dectin-1 aktyvacija gali sukelti nuo

Src/Syk priklausomą MAP kinazių, NF- κ B ir NFAT transkripcijos faktoriaus aktyvaciją mieloidinėse ląstelėse (makrofaguose, dendritinėse ląstelėse ir neutrofiluose), todėl yra svarbus įgyto imuniteto vystymuisi (Wu et al., 2021). β -gliukanų priešvėžinis aktyvumas kaip tik priklauso nuo Syk ir NF- κ B signalinių kelių aktyvacijos makrofaguose (Li et al., 2011). Nustatyta, kad mielių β -gliukanai sukelia stiprią interleukino 1 receptorių antagonistą (IL-1Ra) raišką, kuris yra svarbus imuninės sistemos atsako moduliacijai (Herre et al., 2004). Smeekens ir kitų (2015) atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad IL-1Ra raiška nepriklauso nuo Dectin-1 ir CR3 receptorių. Manoma, kad egzistuoja kol kas nenustatytas receptorius, kuris aktyvuoja nuo Akt/PI3K priklausomą priešuždegiminį atsaką (Smeekens et al., 2015).

β -gliukanų prisijungimo prie Dectin-1 receptoriaus tyrimai rodo, kad Asp150, Asp113, Gly106 ir Glu196 aminorūgščių liekanos sudaro negilų griovelį baltymo paviršiuje ir lemia ligando (β -gliukano) prisijungimą (Yadav et al., 2012). Deja, struktūros ir imuninės sistemos aktyvinimo poveikio ryšys nėra iki galo aiškus, kaip ir tai, kaip tiksliai β -gliukanus atpažįsta Dectin-1 (Wu et al., 2021). Dectin-1 gali atpažinti linijinius β -1,3-gliukanus ir šakotus β -1,3/1,6-gliukanus, o surišimo stiprumas priklauso nuo molekulinės masės, jungties tipo ir šakojimosi laipsnio (Brown et al., 2007; Wu et al., 2021). Paprastai CTL sąveikai su galaktozidiniaisiais ar manozidiniaisiais ligandais reikia konservatyvios sekos, sudarytos iš trijų iš eilės einančių aminorūgščių, esančių angliavandenių atpažinimo domene (CRD) C-tipo lektinuose: glutamino-prolino-aspartato arba glutamino-prolino-asparagino. Ši sąveika paprastai priklauso nuo kalcio, nes Ca^{2+} katijonai greičiausiai sudaro kompleksą tiek su peptidinė seka, tiek su galaktozės arba manozės liekanomis. Tačiau, β -gliukanai yra atpažįstami Dectin-1 nepriklausomai nuo Ca^{2+} , o sąveikai reikalingos dvi: triptofano (Trp) ir histidino (His) aminorūgščių liekanos (Brown et al., 2007; Legentil et al., 2015). Nuo šoninių grandinių išsidėstymo gali priklausyti polisacharidų konformacija, todėl šoninės β -1,6-grandinės ir jų padėtis trumpuose oligo β -1,3-gliukanuose gali paveikti ryšio stiprumą su Dectin-1. β -gliukanų sąveikos su Dectin-1 stiprumas padidėja priklausomai nuo polisacharido ilgio (Brown et al., 2007), tačiau spiralinė struktūra nėra būtina sąveikai su Dectin-1 užtikrinti. Trigrandės spiralės β -gliukanai gali būti endocituojami makrofagų (Wu et al., 2021). Dectin-1 atpažinimas su ar be TLR receptorių stipriai priklauso nuo β -gliukanų tipo. Buvo pastebėta, kad avižų β -1,4-gliukanai pasižymi silpnesne sąveika nei grybų ir mieliagybių β -1,3-gliukanai. Dectin-1 sąveikai su β -1,3-gliukanais reikalinga tam tikra konformacija kuri pasiekama kuomet polimero grandinėje yra bent 10 arba 11 gliukozės liekanų, o sąveika atsiranda tarp

hidrofobinės β -gliukano dalies ir hidrofobinio lektino griovelio per histidino ir triptofano aminorūgščių liekanas (Manabe and Yamaguchi, 2021).

Komplemento receptorius 3 (CR3) taip pat žinomas kaip makrofagų 1 antigenas (Mac-1) ir CD11b/CD18 – receptorius priklausantis β 2-integrinų šeimai. Tai yra heterodimerinis transmembraninis glikoproteinas sudarytas iš dviejų nekovalentiškai sujungtų subvienetų α M subvieneto (CD11b) ir β 2 subvieneto (CD18), kurie jungiasi prie CR3 lektino domeno. CR3 yra randamas neutrofilų, monocitų, makrofagų ir NK ląstelių paviršiuje (Ikewaki et al., 2022; Vetvicka et al., 2021). CR3 yra unikalus tuo, kad turi dvi skirtingas ligandų prisijungimo vietas. Pirmasis I-domenas prisijungia užląstelinio matrikso baltymus, iC3b ir viduląstelinės adhezijos molekules kaip ICAM-1. Antra vieta yra angliavandenių prisijungimo lektino-tipo domenas galintis prijungti β -gliukanus (Legentil et al., 2015; Vetvicka et al., 2021). β -gliukanai jungiasi aukštu afiniškumu prie α -grandinės lektino-tipo saito ir persidengiančio CD11b I-domeno (Ikewaki et al., 2022). Dvigubas atpažinimas yra būtinas imuninės sistemos atsakui sukelti. Jis priklauso nuo iC3b-opsonizuotos molekulės ir β -gliukano prisijungimo prie CR3, kas lemia fagocitozę, degranuliaciją ir citotoksiškumą prieš iC3b opsonizuotus taikinius, įskaitant vėžines ląsteles (Geller et al., 2019; Vetvicka et al., 2021). Bose's komanda (2013) parodė, kad 10 kDa tirpūs β -gliukanai jungiasi prie neutrofilų ir monocitų CR3 nuo koncentracijos priklausomu ir receptoriui-specifišku būdu, tačiau smulkūs oligosacharidai (mažiau nei 10 gliukozės vienetų grandinėje) negali prisijungti prie lektino domeno (Bose et al., 2013).

TLR šeimos receptoriai yra reikalingi nuo Dectin-1 priklausomai uždegiminių citokinų gamybai (Brown et al., 2003; Gantner et al., 2003). TLR2, 4, 6 jungiasi su Dectin-1 po β -gliukanų atpažinimo (Murphy et al., 2020). Biologinio atsako stiprumas, sukliamas Dectin-1/ β -glukanų sąveikos, priklauso nuo TLR2 ekspresijos lygio ir Dectin-1 bei TLR2 sąveikos su β -1,3-glukanais (Legentil et al., 2015). Nustatyta, kad *Candida* β -gliukano/Dectin-1/TLR2 komplekso susidarymas svarbus interleukino-1 β gamybai nuo infliamosomos susidarymo priklausomu būdu. Twhe ir kolegų (2019) tyrimo rezultatai parodė, kad β -gliukanai, sąveikaudami su NOD-, LRR- ir pirino domenus turinčiu baltymu 3 (NLRP3), skatina IL-1 β gamybą žmogaus makrofaguose. NLRP3 yra viduląstelinis jutiklis, gebantis atpažinti įvairius mikrobinius šablonus ir aktyvuoti NLRP3 infliamosomą (Swanson et al., 2019; Thwe et al., 2019).

Laktozilceramidas (LacCer) priskiriamas glikosfingolipidams ir yra ekspresuojamas neutrofilų, monocitų, makrofagų ir epitelinių ląstelių paviršiuje. LacCer atpažįsta galaktozės ir ceramido liekanas. LacCer gali

sąveikauti su įvairių mielių ląstelėmis: *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporotrichum schenckii*. Nustatyta, kad LacCer atpažįsta *Candida* sp. β -gliukanų β -1,6-glikozidine jungtimi prijungtas šonines grandines. β -gliukanų ir LacCer sąveika aktyvuoja Src šeimos kinazes, MAPK kelią, ROS gamybą, fagocitozę, TNF- α ir IL-8 sekreciją (Jimenez-Lucho et al., 1990; Sato et al., 2006). Wang ir kiti (2005), parodė, kad alveoliniuose neutrofiluose *Pneumocystis carinii* β -gliukanai skatino makrofagų uždegiminio baltymo-2 (MIP-2) ir TNF- α gamybą per NF- κ B ir baltymų kinazių C (PKC) kelius (Wang et al., 2005).

Scavenger receptoriai (SR), tokie kaip: SR-A (MSR1), MARCO, SR-CL, CD5, taip pat prisideda prie β -gliukanų atpažinimo. SR-A (MSR1) yra ekspresuojamas makrofaguose ir geba tiesiogiai atpažinti β -1,3-gliukanus, o nuo jų priklausoma receptoriaus aktyvacija skatina uždegiminių citokinių, tokių kaip IL-6 ir TNF- α , gamybą. SR-CL, turi C-tipo lektino domeną (CTLD) ir gali atpažinti zimosaną, kaip ir makrofagų receptorių su kolagenine struktūra (MARCO). MARCO sąveikaujant su TLR2 sustiprina opsonizuotų mielių fagocitozę (Józefowski et al., 2012; Thuong et al., 2016). CD5 priklauso cisteinu turtingai Scavenger receptorių (angl. *scavenger receptor cysteine-rich*, *SRCR*) šeimai ir yra ekspresuojamas brandžių T ir B ląstelių limfocitų paviršiuje. Jis pasižymi aukštu afiniškumu β -gliukanui ir skatina IL-8 sekreciją ir MAPK aktyvaciją (Goodridge et al., 2009).

Langerinas (CD207) ir DC-SIGN – priklauso C-tipo lektinams ir yra ekspresuojami antigeną pristatančių – dendritinių (DC) ir Langerhanso (LC) ląstelių paviršiuje. Langerinas specifiskai jungiasi prie manozės, fukozės, GlcNAc ir β -1,3-gliukanų (Legentil et al., 2015). Nustatyta, kad LC Langerinas geba atpažinti įvairių *Candida* rūšių, įskaitant *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, ir *Saccharomyces cerevisiae* β -gliukanus, tačiau sąveika su *Cryptococcus* spp. β -gliukanais yra silpna (de Jong et al., 2010).

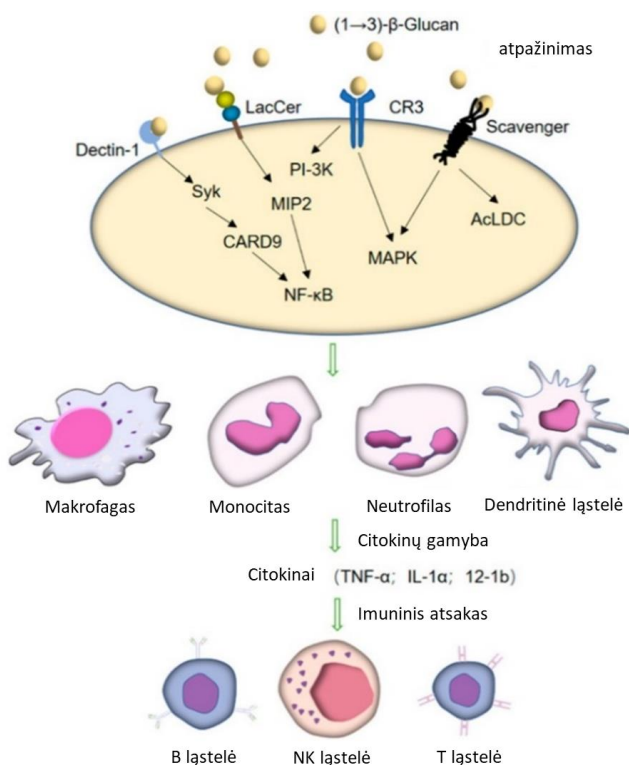
Fikolinai – oligomeriniai lektinai, įgimto imuniteto PRR baltymai, priskiriami β -1,3-gliukanus atpažįstantiems baltymams (β GRP). L-fikolinas, H-fikolinas, Fikolinas-A ir kiti, geba prisijungti prie PAMP, įskaitant lipoteicho rūgštis, GlcNAc ir β -1,3-gliukanus. Prisijungę prie patogenų, fikolinai skatina IL-8 sekreciją, aktyvuoja lektinų kelio komplemento sistemą per MASP-1/2 serino proteazes, bei veikia skysčių cirkuliacijoje ir audiniuose – opsonizuoja patogenus, skatina C3b nusėdimą ir fagocitozę (Bidula et al., 2019; Garlatti et al., 2007; Legentil et al., 2015; Ma et al., 2004).

Nors Dectin-1 ir CR3 yra svarbiausi β -gliukanų atpažinimo receptoriai, kiti receptoriai – LacCer, SR-A, MARCO, CD36, CD5, TLR2/TLR6, L-fikolinas, Langerinas ir kai kurie CLR s – taip pat atlieka svarbius vaidmenis.

Jie veikia tiek nepriklausomai, tiek sinergiškai, perduodami signalus per Syk, MAPK, NF- κ B ir prisideda prie fagocitozės, citokinių gamybos bei imuninio atsako formavimo (**1.3 pav.**). Šie mechanizmai atveria naujas galimybes imunomoduliacinių terapijų, vakcinų bei uždegimo kontrolės srityse (de Jong et al., 2010; Ikewaki et al., 2022; Legentil et al., 2015).

1.1.2. Nuo β -gliukanų priklausoma imunomoduliacija

Zimosanas buvo pirmasis β -gliukanas aprašytas kaip imuninės sistemos modulatorius, kuris aktyvavo nespecifinį imuninį atsaką (**1.3 pav.**). Tai buvo neapdorotas β -gliukanas išskirtas iš mielių ląstelių sienelių ir aprašytas 1941 m. Pillemer ir Ecker (Geller et al., 2019; Pillemer and Ecker, 1941). Atradus β -gliukanų receptorių, Dectin-1 ir CR3, buvo išsiaiškintas stimuliuojančio efekto pagrindas. Kadangi β -gliukanai nėra gaminami žmogaus organizme, imuninė sistema juos atpažįsta kaip svetimus ir inicijuoja įgimtą ir įgytą imuninį atsaką (Vetvicka et al., 2021).



1.3 pav. β -1,3-gliukanų atpažinimas receptoriais, signalo perdavimas, imuninių ląstelių aktyvacija ir imuninio atsako formavimas, pritaikyta pagal (Zhong et al., 2023).

β -gliukanų prisijungimas prie imuninės sistemos receptorių ir dabar aktyviai tiriamas bei naudojamas „imuniteto treniravimui“ (Geller et al., 2019). β -gliukanai užtikrina padidėjusį atsparumą prieš mikroorganizmų sukeltas infekcijas, prieš kai kuriuos su virusais susijusius vėžio tipus, aktyvuojant įgimto ir įgyto imuniteto atsaką, įskaitant uždegiminių citokinų gamybos stimuliaciją, polimorfonuklearinių limfocitų, makrofagų ir DC ląstelių aktyvaciją ir diferenciaciją, T helperių bei NK ląstelių aktyvaciją (Ikewaki et al., 2022; Vetvicka et al., 2021). Nustatytas β -gliukanų efektyvumas prieš tokius mikroorganizmus kaip: *Leishmania donovani*, *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus suis*, *Plasmodium berghei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis* ir kitus (Cisneros et al., 1996; Ikewaki et al., 2022; Murphy et al., 2020). Tačiau su β -gliukanais atliktų tyrimų rezultatai yra nevienareikšmiai, kas gali priklausyti dėl naudojamų skirtingų polisacharidų frakcijų. Tyrimuose naudojami β -gliukanai būna išskirti iš skirtingų šaltinių, atitinkamai skiriasi β -gliukanų struktūra, konformacija, molekulinis svoris, polimerizacijos laipsnis, šoninės grandinės (Vetvicka et al., 2021). Didelis struktūrinis β -gliukanų variabilumas ir prisijungimas prie įvairių PRR receptorių, gali lemti skirtingų signalinių kelių aktyvaciją ir skirtingas imunomoduliacines ir priešvėžines savybes (Bashir and Choi, 2017; Kaur et al., 2012; Murphy et al., 2020). Pavyzdžiui, mieliagybių ir grybų β -1,3-gliukanai su β -1,6-glikozidine jungtimi prijungtomis šoninėmis grandinėmis pasižymi stipriomis imunitetą aktyvuojančiomis savybėmis, o grūdinių β -1,4-gliukanai – stipriomis antioksidacinėmis savybėmis (Jayachandran et al., 2018).

Makrofagai (M ϕ) yra svarbūs įgimto ir įgyto imuniteto funkcionavimui, sekretuoja IL-1, 6, 8, 12 ir TNF- α , uždegiminius mediatorius: NO, H₂O₂. β -gliukanai skatina makrofagų poliarizaciją per NF- κ B/autofagijos kelią, nuo Dectin-1 receptoriaus priklausomu keliu (Vetvicka et al., 2021). β -gliukanų struktūra ir molekulinė masė gali paveikti jų tirpumą vandeniniuose tirpaluose. Tirpūs β -gliukanai, skatina monocitų mieloidinių supresinių ląstelių (M-MDSC) populiacijos diferenciaciją į antigeną pristatančias ląsteles, kurios aktyvuoja T ląstelių atsaką, tokiu būdu aktyvuojant ne tik įgimto bet ir įgyto imuniteto atsaką (Geller et al., 2019). Netirpūs mieliagybių β -gliukanai mažina mieloidinių supresinių ląstelių kiekį, skatinant oksidacinį stresą ir apoptozę šiose ląstelėse, kas svarbu NK ląstelių aktyvacijai ir priešvėžiniam aktyvumui (Murphy et al., 2020; Tumino et al., 2021). β -gliukanai skatina NK ląstelių aktyvumą, stimuliuoja T helperių 1 (Th1) atsaką ir slopina T helperių 2 (Th2) atsaką (Vetvicka et al., 2021). Steimbach ir kitų mokslininkų atliktų tyrimų su grybų β -gliukanais rezultatai parodė NK ląstelių

aktyvumo padidėjimą vėžiu sergančiuose skirtingo amžiaus grupių pacientuose (Steimbach et al., 2021). β -gliukanai taip pat gali veikti kaip ląstelinio imuniteto aktyvatoriai. Stimuliacija tirpiaisiais ir netirpiaisiais β -gliukanais aktyvuoja įvairius signalinius kelius – MAPK, NF- κ B, aktyvuoja inflamomas (pvz. NLRP3). Šie signalai lemia fagocitozę, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α sintezę, neutrofilų migraciją, ROS gamybą. Be to, β -gliukanai skatina epigenetinius pokyčius monocituose („trained immunity“), padidindami jų atsaką į vėlesnius patogenus (Geller et al., 2019; Mahmoud Amer et al., 2021; Moorlag et al., 2020; Plavcová et al., 2019). Įdomu, kad kai kurios tirpios β -gliukanų formos gali skatinti didesnę citokinų gamybą, lyginant su atitinkamomis netirpiomis formomis (Jayachandran et al., 2018; Murphy et al., 2020).

1.1.3. β -gliukanų priešvėžinis aktyvumas

Kai kurie β -gliukanai pasižymi priešuždegiminėmis savybėmis, kurios gali turėti reikšmės vėžio prevencijoje, tačiau tikslūs mechanizmai ir klinikinė nauda dar tiriami (Ikewaki et al., 2022; Steimbach et al., 2021). Uždegimas prisideda prie naviko iniciacijos ir/ar vystymosi. Tam tikrų uždegiminių citokinų, tokių kaip TNF- α , IL-1 β ir IL-6, padidėjusi gamyba gali skatinti vėžio progresiją, tačiau, kai kurie citokinai, pavyzdžiui, IFN- γ , gali veikti dvejopai – tiek skatindami priešnavikinį imuninį atsaką, tiek prisideddami prie uždegimo sukeltų pažeidimų (Mahmoud Amer et al., 2021; Plavcová et al., 2019). Lėtinis uždegimas dėl padidėjusios NF- κ B ir reaktyvių deguonies formų (ROS) gamybos pažeidžia ląstelių mikroaplinką, kas lemia genų pažeidimus, potransliacines modifikacijas signaliniuose baltymuose dalyvaujančiuose ląstelės cikle, DNR reparacijoje ir apoptozėje (Ikewaki et al., 2022; Steimbach et al., 2021).

β -gliukanai nepasižymi tiesioginiu citotoksiškumu, tačiau yra trys galimi β -gliukanų priešvėžinio aktyvumo mechanizmai: uždegimo slopinimas, imunostimuliacija nuo žarnyno mikrobiotos priklausomu keliu ir nuo imuninės sistemos receptorių priklausomu keliu. Pavyzdžiui, β -gliukanai gali slopinti uždegiminių citokinų gamybą ir leukocitų aktyvaciją, tokiu būdu slopinant tiesiosios žarnos naviko augimą (Jayachandran et al., 2018). Priešuždegiminis β -gliukanų poveikis gali būti susijęs su uždegiminių citokinų, tokių kaip TNF- α ir IL-6, moduliacija, tačiau šis mechanizmas priklauso nuo imuninės sistemos būklės ir vis dar yra tiriamas (Murphy et al., 2020; Plavcová et al., 2019; Smeekens et al., 2015).

Imunostimuliuojantis β -gliukanų poveikis apima vėžinių ląstelių supresiją ir apoptozę bei cirkuliuojančių monocitų proliferacijos stimuliaciją. β -gliukanai gali keisti naviko mikroaplinką, kas lemia auglio augimo slopinimą (Ikewaki et al., 2022). Be to, naviko mikroaplinkoje svarbų vaidmenį vaidina makrofagų poliarizacija į M1 ir M2 tipus, kurie pasižymi skirtingais metaboliniais profiliais. M1 tipo uždegiminiai makrofagai ar aktyvuoti makrofagai patenka į naviko mikroaplinką ankstyvose naviko augimo stadijose ir gali persijungti į M2 tipą – priešūždegiminį fenotipą, kas lemia naviko progresiją. Tam tikri netirpūs β -gliukanai gali jungtis prie makrofagų Dectin-1 receptoriaus, skatindami jų perprogramavimą į M1 tipo fenotipą, tačiau β -gliukanų poveikis makrofagams priklauso nuo jų struktūros ir aplinkos sąlygų (Liu et al., 2015, 2023). β -gliukanai moduliuoja naviko mikroaplinką vėžio terapijoje ir dalyvauja fenomene vadinamame treniruotu imunitetu. Treniruotas įgimtas imunitetas – tai epigenetinių pokyčių sukelta įgimtos imuninės sistemos atmintis, kuri gali būti indukuojama subrendusių mieloidinių ląstelių arba jų pirmtakų aktyvacijos. β -gliukanai efektyviai skatina treniruotą įgimtą imunitetą per įgimtos imuninės sistemos ląstelių epigenetinį perprogramavimą (Geller and Yan, 2020). Pavyzdžiui, nuo Dectin-1 priklausomas DC perprogramavimas lemia konversiją Treg į Th17 *in vitro* ir *in vivo* (Osorio et al., 2008), taip pat skatina CD8⁺ T ląstelių, ekspresuojančių CD103, gamybą, kurios kaupiasi navike ir slopina jo progresiją bei skatina nekrozę humanizuotose krūties vėžio pelių modeliuose (Geller et al., 2019; Wu et al., 2014).

Išgryninti β -gliukanai pasižymi ryškiu pleiotropiniu efektu prieš vėžį (Vetvicka and Vetvickova, 2018). β -gliukanai turi potencialą vėžio prevencijoje ir terapijoje, pavyzdžiui, krūties vėžiu sergančiuose pacientuose jie pasižymi komplementariu poveikiu vaistams ir gali būti naudojami kaip adjuvantas, ar imunostimuliatorius priešvėžinėje terapijoje. Tačiau jų veikimo mechanizmai ir klinikinė nauda vis dar tiriama (Ikewaki et al., 2022; Liu et al., 2023; Steimbach et al., 2021).

Mažos molekulinės masės tirpūs mieliagrybių β -gliukanai gali jungtis prie komplemento receptoriaus 3 (CR3), tačiau jų afiniškumas priklauso nuo molekulinės struktūros. CR3, dar kitaip žinomas kaip makrofagų antigenas (Mac-1) ar integrinas α M β 2, ekspresuojamas makrofagų, dendritinių ląstelių, neutrofilų ir NK ląstelių paviršiuje. β -gliukanų ir iC3b prisijungimas prie CR3 skatina efektorinių ląstelių aktyvaciją, kuri lemia iC3b opsonizuotų vėžinių ląstelių lizę (Xia et al., 1999). Netirpūs β -gliukanai gali netiesiogiai skatinti granulocitų aktyvaciją per makrofagus ir dendritines ląsteles (Qi et al., 2011). Dendritinių ląstelių aktyvacija skatina vėžiui specifinių T-helperių ir T-

citotoksinių ląstelių diferenciaciją ir migraciją prie naviko (Li et al., 2010), tačiau šis procesas nėra tiesiogiai priklausomas nuo CR3 (Geller et al., 2019). Per burną ir intraveniniu būdu į organizmą patekę β -gliukanai veikia panašiai. Pasiekę makrofagus, β -gliukanai gali būti skeliami į mažesnius fragmentus (~25 kDa), kurie gali jungtis prie neutrofilų CR3 ir skatinti jų aktyvaciją (Akramiene et al., 2007; Li et al., 2006). Greičiausiai, priešvėžinis β -gliukanų poveikis yra kompleksinis ir priklauso nuo šių polisacharidų struktūros ir patekimo į organizmą būdo.

1.1.4. β -gliukanų poveikis mikrobiotai

Skaidulinės maistinės medžiagos, kaip yra žinoma, teigiamai veikia žmogaus sveikatą mažinant nutukimo, vėžio, širdies ir kraujagyslių ligų, diabeto ir kitų su virškinamuoju traktu susijusių ligų riziką bei turi įtakos žarnyno mikrobiotai. β -gliukanai taip pat yra priskiriami skaidulinėms maistinėms medžiagoms, kadangi yra fermentuojami žarnyno mikroorganizmų ir gali tarnauti prebiotiku. β -gliukanų fermentacija žarnyne lemia naudingų bakterijų kiekio padidėjimą bei metabolitų, įskaitant trumpųjų grandžių riebalų rūgščių (SCFA), pavyzdžiui butirato, gamybą. β -1,3-gliukanų fermentacijos greitis yra didesnis nei β -1,3/1,6-gliukanų. β -gliukanų, sujungtų β -1,4-glikozidinėmis jungtimis, skaidymas *Bifidobacterium bifidum* β -glikozidaze vyksta lėčiausiai (Karimi et al., 2024).

Tyrimai su avižų β -gliukanais praturtintu maistu parodė teigiamą poveikį žarnyno mikrobiotai. Aukštos molekulinės masės avižų β -gliukanai skatina *Bacteroidetes*, kai kurių *Clostridiaceae* šeimos atstovų, *Ruminococcus* sp., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* ir *Bifidobacterium animalis lactis* kiekio padidėjimą ir slopina *Firmicutes* ir *Fusobacteria* bakterijų augimą. Įdomu tai, kad mažos molekulinės masės β -gliukanai neturi poveikio mikrobiotos sąstatui (Jayachandran et al., 2018). Avižų ir miežių β -gliukanai gali sumažinti serumo cholesterolio kiekį, β -gliukanai gali lemti SCFA gamybos ir bakterijų masės pokyčius žarnyne. Padidėjęs propionato santykis su acto rūgštimi (pagrindinis cholesterolio biosintezės substratas) lemia sumažėjusią cholesterolio biosintezę (Du et al., 2019; Karimi et al., 2024; Murphy et al., 2020; Tong et al., 2015; Zhu et al., 2016). Didesnė butirato gamyba, lemia padidėjusią lipolizę adipocituose (Jayachandran et al., 2018).

Daugiausia tyrimų atlikta su avižų ir miežių β -gliukanais, tačiau tyrimų su grybų β -gliukanais rezultatai taip pat rodo padidėjusią SCFA gamybą. Neyrinck ir kt. (2012) *in vivo* tyrime su nutukusiomis pelėmis, taikant daug riebalų turinčią dietą su grybų kilmės chitino-gliukanais, nustatė žarnyno

mikrobiotos pokyčius: atsistatė dėl riebalinės dietos sumažėjęs *Roseburia* spp. bakterijų kiekis, padaugėjo *Bacteroides-Prevotella* spp. ir bifidobakterijų (Karimi et al., 2024; Neyrinck et al., 2012). Kitame tyrime nustatytas butiratą gaminančių bakterijų pagausėjimas ir su nutukimu susijusių bakterijų gausos (*Parabacteroides* ir *Lactococcus*) mažėjimas (Muthuramalingam et al., 2022). Grybų β-gliukanai gali skatinti *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium* populiacijas ir nuo jų priklausomos acetato, propionato, butirato ir valeriono rūgšties gamybos padidėjimą (Singh and Bhardwaj, 2023; Zhao and Cheung, 2011). Mielių β-gliukanai ir zimosanas taip pat gali lemti *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* bei *Prevotella* bakterijų populiacijų ir jų gaminamų SCFA kiekio padidėjimą, bei sumažinti *Escherichia-Shigella* bakterijų kiekį (Pi et al., 2022; Zhao and Cheung, 2011). β-gliukanų poveikis žarnyno mikrobiotai taip pat siejamas su padidėjusiu atsparumu žarnyno patogenams, tokiems kaip *Escherichia* ir *Clostridia* (Karimi et al., 2024). Nors tiesioginio β-gliukanų žudymo ar prisijungimo mechanizmas prie patogenų nėra nustatytas, β-gliukanai pasižymi apsauga nuo bakterijų, virusų ir parazitų stimuliuojant imuninę sistemą ir veikė prieš tokius patogenus kaip *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus suis*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Trypanosoma cruzi*, *Bacillus anthracis* ir kitus (Anwar et al., 2017; Karimi et al., 2024). Mieliagybių β-gliukanų imunostimuliuojantis poveikis nėra tiesiogiai siejamas su mikrobiota, kadangi β-gliukanai geba tiesiogiai jungtis prie imuninės sistemos PRR receptorių. Tačiau, patekę į žarnyną, β-gliukanai yra skaidomi ir fermentuojami ten esančių mikroorganizmų, kas galėtų būti siejama ir su imunomoduliacija. Žarnyno mikroorganizmai gali dalyvauti imuniniame atsake metabolizuojant β-gliukanus iki SCFA, kurios pasižymi biologiniu aktyvumu. Pavyzdžiui, priešuždegiminis butirato poveikis lemia imuninių ląstelių migraciją ir adheziją, citokinų gamybą bei ląstelių apoptozę, kas gali būti svarbu žarnyno vėžio prevencijai. Butiratas skatina IL-10 gamybą dendritinėse ląstelėse ir makrofaguose, o dendritinės ląstelės lemia T-limfocitų diferenciaciją į T-reguliacines ląsteles (Treg), kurios slopina uždegimą ir kancerogenezę, tuo tarpu Th17 ląstelės – priešingai – skatina uždegimą ir vėžinių ląstelių augimą. Padidėjęs SCFA kiekis slopina histonų deacetilazės (HDAC) ekspresiją, o tai skatina apoptozę, vėžinių ląstelių augimo lėtėjimą ir jų imunogeniškumą (Jayachandran et al., 2018; Karimi et al., 2024; Schirbel et al., 2018).

Žmogaus organizmas pasižymi biologiniu suderinamumu ir aukšta tolerancija β-gliukanams, tačiau skirtingi tyrimų su β-gliukanais rezultatai gali priklausyti nuo β-gliukanų molekulinės masės, jungties tipo, šakotumo,

tirpumo ir grynumo. Tyrimuose su mikrobiota, priemaišos gali iškreipti rezultatus, kadangi taip pat gali dalyvauti įvairiuose metaboliniuose keliuose (Karimi et al., 2024; Pi et al., 2022; Singh and Bhardwaj, 2023).

1.1.5. β -gliukanų pritaikymas

β -gliukanų imunomoduliuojančios, priešuždegiminės, priešvėžinės, priešvirusinės savybės yra plačiai žinomos, tiriamos ir pritaikomos. β -gliukanai naudojami kaip maisto papildai ir kaip dalis priešvėžinės bei priešuždegiminės terapijos (Murphy et al., 2020; Waszkiewicz-Robak, 2013), tačiau kai kurių β -gliukanų pritaikymas medicinoje yra apsunkintas jų didelės molekulinės masės ir klampumo (Bashir and Choi, 2017; Du et al., 2019). Dėl β -gliukanų gebėjimo formuoti gelius ir padidinti vandeninių tirpalų klampumą, jie pasitarnauja maisto pramonėje, pavyzdžiui, gaminant duoną, jogurtą, makaronus. Dėl mažo glikeminio indekso, jie yra naudojami kaip emulsikliai ir stabilizatoriai. Taip pat naudojami kaip riebalų mimetikai sumažinto kaloringumo maisto produktuose (Zhu et al., 2016). Dėl vandeni absorbuojančių, antioksidacinių savybių ir imunologinių savybių β -gliukanai naudojami kosmetikos produktuose, pritaikomi gydant žaizdas ir nudegimus (Du et al., 2019; Jayachandran et al., 2018; Majtan and Jesenak, 2018; Zhu et al., 2016).

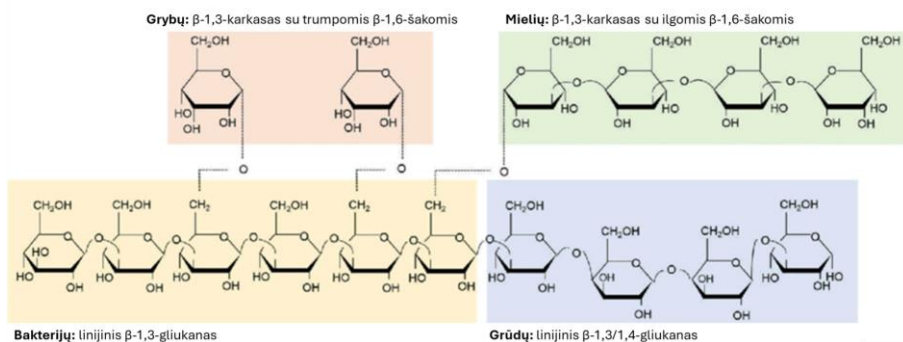
Dėl savo imunomoduliuojančių savybių β -gliukanai aktyviai tiriami kaip vakcinų adjuvantai ir priešvėžinės terapijos komponentai. Tačiau jų veiksmingumas priklauso nuo šaltinio bei išskyrimo būdo (Bashir and Choi, 2017; Majtan and Jesenak, 2018; Ruiz-Herrera and Ortiz-Castellanos, 2019; Vetvicka et al., 2019; Zhang et al., 2017). Mielių *Saccharomyces cerevisiae* β -gliukanai gali būti naudojami kaip adjuvantai ar vaistų nešikliai makrofagams ir dendritinėms ląstelėms (DC). Dėl savo porėtos struktūros šie polisacharidai yra fagocituojami makrofagų, todėl juos galima naudoti įvairių vaistų inkapsuliacijai ir transportavimui. Be to, β -gliukanai gali būti prijungiami prie siRNR, DNR, baltymų ar kitų mažų molekulių, leidžiant juos tiksliai pristatyti į naviko mikroaplinką (Ikewaki et al., 2022; Lin et al., 2024; Steimbach et al., 2021). Prie β -gliukanų prijungus mažai imunogeniškus peptidus, galima sustiprinti jų imunogenines savybes (Geller et al., 2019). Dar viena perspektyvi β -gliukanų taikymo kryptis – priešvėžinės imunoterapijos stiprinimas. β -gliukanai, prijungti prie monokloninių antikūnų, nukreiptų prieš imuninės sistemos reguliacines molekules, tokias kaip užprogramuotos ląstelės mirties baltymas PD-1 ar jo ligandas PD-L1, pasižymi perspektyviu priešvėžiniu aktyvumu (Liu et al., 2023). Be to, iš *Candida* mieliagybių

išskirti β -gliukanai laikomi potencialiais kandidatais įveikti vėžinių ląstelių atsparumą vaistams. Tyrimai rodo, kad β -gliukanai gali turėti stiprų netiesioginį citotoksinį poveikį prieš gydymui atsparias Lewis plaučių karcinomos (LL/2) ląsteles (Ikewaki et al., 2022; Steimbach et al., 2021).

1.2. Mieliagybių β -gliukanų struktūra ir fizikocheminės savybės

1.2.1. Struktūra ir konformacija

Struktūrinė β -gliukanų įvairovė: karkaso ilgis, glikozidiniai ryšiai pagrindinėje ir šoninėse grandinėse, šoninių grandinių kiekis, jų ilgis, pasikartojimų skaičius, kitų molekulių buvimas, priklauso nuo biologinio šaltinio ir išskyrimo būdo (**1.4 pav.**) (Murphy et al., 2020; Sikora et al., 2013).

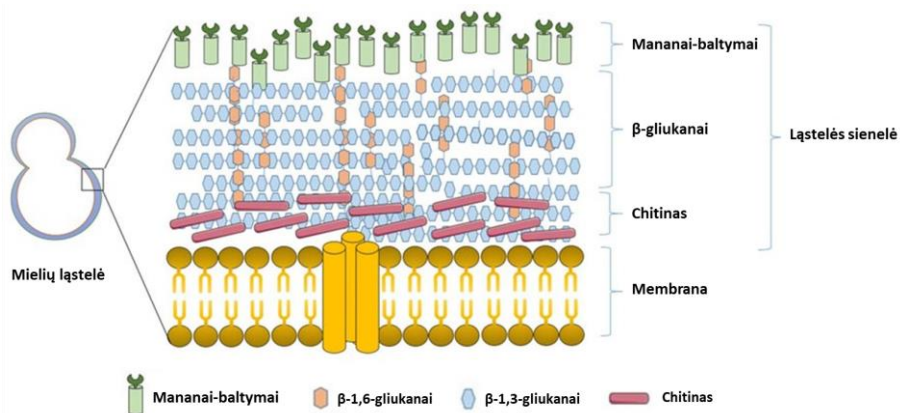


1.4 pav. Skirtingų biologinių šaltinių β -gliukanų struktūra, pritaikyta pagal (Graaff et al., 2018).

β -gliukanai tai heterogeniniai polimerai, nes jų sudėtyje be gliukozės galima rasti kitų monosacharidų, kas lemia jų kompleksškumą. Jų sudėtyje rasta galaktozė, manozė, ksilozė, arabinozė, ramnozė, ribozė, tačiau gliukozė yra pagrindinis monosacharidas. Vidumolekuliniai ir tarpmolekuliniai vandeniliniai ryšiai yra svarbūs β -gliukanų konformacijai (Du et al., 2019), kuri taip pat svarbi jų biologiniam aktyvumui (Bashir and Choi, 2017). Dėl laisvo glikozidinių jungčių sukimosi, β -gliukanų struktūra vandeniniame tirpale yra sunkiai nustatoma (Legentil et al., 2015; Vetvicka et al., 2021) ir gali priklausyti nuo šoninių grandinių, kur β -gliukanai gali įgauti įvairias konformacijas, tačiau dažniausiai formuoja atsitiktines, vienos ar trijų grandinių spirales (Guo et al., 2021; Young et al., 2000; Zhang et al., 2002).

β -1,3-gliukanai yra vienas pagrindinių grybų ir mieliagybių ląstelės sienelės komponentų sudarančių iki 60 % jos biomasės ir iki 30 % sausos ląstelės sienelės masės (Byrtusová et al., 2020; Lowman et al., 2011; Manners

et al., 1973; Yuan et al., 2019). Ląstelės sienelėje β -gliukanai yra sujungti su kitais sienelės komponentais: mananais, chitinu, lipidais ir baltymais per β -1,6-gliukano šonines grandines (**1.5 pav.**) (Fernando et al., 2022; Kang et al., 2018; Lowman et al., 2014; Synytsya and Novak, 2014). Mananai sudaro iki 30 % ląstelės sienelės masės, chitinas nuo 1 % iki 2 %, baltymai – iki 30 %, lipidai – apie 9 % (Aimanianda et al., 2017; Avramia and Amariei, 2021; Bzducha-Wróbel et al., 2014; Kath and Kulicke, 1999). β -1,3-gliukanai tarnauja ląstelės sienelės karkasu ir yra kryžmiškai sujungti su chitinu ir skirtingo ilgio β -1,6-gliukano šoninėmis grandinėmis. Sudėtinga struktūra yra stabilizuojama tarpgrandininiais vandenilniais ryšiais ir tarnauja prisijungimo vieta kitoms molekulėms (Garcia-Rubio et al., 2020; Ibe and Munro, 2021), kurios gali paveikti biologines β -gliukanų savybes.



1.5 pav. Mieliagybių ląstelės sienelės struktūra, pritaikyta pagal (Anwar et al., 2017).

Grybų ir mieliagybių β -gliukanai yra sudaryti iš linijinio arba šakoto β -1,3-gliukano karkaso. Šakotų β -1,3/1,6-gliukanų atveju, karkasas sudarytas iš β -1,3-gliukanų sudaro iki 85 %, o β -1,6-glikozidine jungtimi prijungtos trumpos šoninės grandinės iki 15 % mieliagybių gliukanų (Fernando et al., 2022; Kang et al., 2018). *Candida glabrata* šoninės β -1,6-grandinės yra vidutiniškai 4 ar 5 monomerų ilgio ir jungiasi prie β -1,3-gliukanų karkaso kas 21-ą D-gliukozės pasikartojimą (Lowman et al., 2011). Kitų *Candida* ir *Saccharomyces* genčių atstovų β -gliukanai taip pat yra šakoti. Grybų rūšies *Lentinus edodes* β -gliukanas lentinanas susideda iš β -1,6-gliukanų šoninių grandinių, kurios yra dviejų monomerų ilgio ir sujungtos su kas penkta gliukozės molekule β -1,3-gliukano karkase (Jayachandran et al., 2018; Morales et al., 2020).

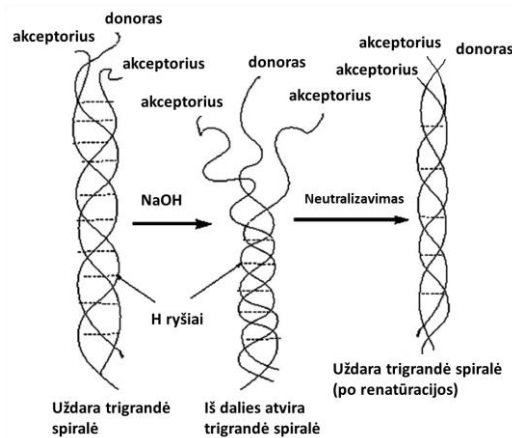
Eksperimentais ir molekulinio modeliavimo metodais nustatyta, kad ilgos β -gliukanų grandinės, pavyzdžiui lentinanas, kurdlanas ar šizofilanas dažnai formuoja spirales, sudarytas iš trijų grandinių sujungtų vandenilniais ryšiais (Lee et al., 2021; Manabe and Yamaguchi, 2021; Zhang et al., 2002).

Mažos molekulinės masės, apie 5 kDa, β -gliukanai dažniausiai įgauna atsitiktinių spiralių konformaciją (Caseiro et al., 2022; Wu et al., 2021; Zhang et al., 2002). β -gliukanų struktūra gali priklausyti nuo tirpiklio: pavyzdžiui, vandenyje tirpus β -1,3-gliukanas yra linijinis, o 0,2 M NaCl tirpale jis įgauna lanksčių grandinių pavidalą. Ištirpintų šarme (pH > 13), DMSO arba aukštesnėje nei 135 °C temperatūroje β -gliukanų grandinės praranda sąveiką, todėl polisacharidai įgauna atsitiktinių spiralių struktūrą (Saitô and Yokoi, 1989; Zhang et al., 2002). Organizuotą struktūrą, sudarytą iš kelių grandinių, galima atstatyti neutralizuojant šarminę aplinką dideliu kiekiu vandens arba rūgštimis. Atstatoma vienos grandinės spiralė gali renaturuoti į trigrandę, kai yra kaitinama arba dializuojama. Sklerogliukanas taip pat gali įgauti iš trijų grandinių sudarytą ciklinę konformaciją. Tokie virsmai gali priklausyti nuo šarminės aplinkos ir prie pagrindinės grandinės C2 anglies esančios OH grupės prieinamumo cheminiam modifikavimui (Guo et al., 2021; Young et al., 2000; Zhang et al., 2002).

β -gliukanų struktūrinių ir fizikocheminių savybių įvairovė gali turėti įtakos jų sąveikai su imuninės sistemos receptoriais. β -gliukanai tirpale gali egzistuoti keliose skirtingose konformacijose vienu metu, kas apsunkina jų funkcionalumo tyrimus. Be to, dėl šios savybės yra sudėtinga gauti β -gliukanų kristalus, reikalingus rentgeno arba branduolių magnetinio rezonanso spektroskopijos tyrimams. Tai kelia didelių iššūkių, siekiant pilnai suprasti fizikines ir chemines β -gliukanų savybes (Feng et al., 2022). Taip pat, vis dar neatsakytas klausimas, kuri konformacija lemia geriausią biologinį aktyvumą, o mokslinių tyrimų informacija dažnai yra kontroversiška. Pavyzdžiui, Mueller ir kolegų atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad viengrandės spiralės konformacija yra mažiau stabili nei trigrandės, kadangi *in vivo* β -1,3-gliukanai įgauna trigrandės spiralės struktūrą grybų ląstelės sienelėje ir yra atpažįstamos imuninės sistemos receptorių (Han et al., 2020; Mueller et al., 2000). Tokia struktūra lemia stipresnę gebėjimą slopinti navikų augimą lyginant su viengrandės spiralės konformacija. Iš kitos pusės, Saito su kolegomis patvirtino, kad atsitiktinių grandinių konformacijos β -gliukanai pasižymi geresniu biologiniu aktyvumu nei spiralinės struktūros (Saitô and Yokoi, 1989). Tai reiškia, kad gali egzistuoti biologinės sistemos gebančios atpažinti skirtingas β -gliukanų konformacijas (Kang et al., 2018; Lamon et al., 2023; Manabe and Yamaguchi, 2021; Zhang et al., 2002).

1.2.2. Molekulinė masė ir tirpumas

β -gliukanų tirpumas tai viena iš problemų su kuria susiduriama analizuojant struktūrą ar vertinant jų biologinį aktyvumą. Polisacharidų stiprus afiniškumas vandens molekulėms priklauso nuo didelio kiekio -OH grupių. Daugelis β -gliukanų yra netirpūs vandeniniuose tirpaluose, įskaitant ir mielių, tačiau, dalis jų yra tirpūs šarmuose (**1.6 pav.**) (Bashir and Choi, 2017; Fernando et al., 2022; Kang et al., 2018).



1.6 pav. β -gliukanų trigrandės spiralės denatūravimo ir renatūravimo schema naudojant NaOH, pritaikyta pagal (Young et al., 2000).

β -1,3-gliukanų tirpumas yra geresnis šarminėje aplinkoje nei neutraliame vandenyje dėl hidroksilo grupių jonizacijos, dėl kurios suyra tvarkinga struktūra. Organiniai tirpikliai galintys formuoti vandenilinius ryšius su polisacharidais, tokie kaip dimetilsulfoksidai (DMSO), dimetilformamidas (DMF), yra geri β -1,3-gliukanų tirpikliai. Pavyzdžiui, DMSO leidžia disocijuoti trigrandę spiralę į atskiras grandines (Miyoshi et al., 2006; Saitō and Yokoi, 1989). Gelį formuojantys β -gliukanai dažniausiai yra tirpūs vandenyje, tokie kaip linijinis laminarinas, šakotas šizofilanas, grifolanas, sklerogliukanas (Bashir and Choi, 2017). Pavyzdžiui, avižų β -gliukanai nors ir yra tirpūs vandenyje bei turi mažą molekulinę masę, pasižymi geresnėmis gelį formuojančiomis savybėmis lyginant su aukštos molekulinės masės polisacharidais (Du et al., 2019).

β -1,3-gliukanų tirpumas priklauso nuo molekulinės masės ir polimerizacijos laipsnio (DP). Nešakotas laminarinas su mažiau nei 20 gliukozės monomerų grandinėje yra tirpus vandenyje. Tačiau, kurdlanas, kurio DP yra didesnis nei 36, yra netirpus vandeniniuose tirpaluose dėl to, kad

sąveika tarp jo grandinių yra stipresnė nei tarp grandinių ir vandens molekulių. Esant prijungtoms β -1,6-šoninėms grandinėms, kaip sklerogliukano ir šizofilano ($DP > 100$), jų tirpumas didėja, bei priklauso nuo šoninių grandinių pasikartojimo dažnio. Pašalinus šonines grandines, šie β -gliukanai tampa netirpiaisi. Mielių ir grybų β -1,3/1,6-gliukanai yra netirpūs vandeniniuose tirpaluose ir pasižymi aukšta molekuline mase (HMW) ($DP > 1000$) (Avramia and Amarici, 2021; Lee et al., 2001; Zhang et al., 2017). Mielių ir grybų β -gliukanų netirpumą taip pat gali lemti prie jų prisijungęs chitinas (Cabib et al., 2012; Hartland et al., 1994). Kurdlanas yra netirpus dėl to, kad pasižymi aukšta molekuline mase ir neturi hidrofilinių šoninių grandinių, kurios lemia β -gliukanų tirpumą. Kurdlanas tampa tirpus kuomet jo molekulinė masė yra mažesnė nei 2 kDa (Miyoshi et al., 2006). Manoma, kad mažos masės β -gliukanai yra neaktyvūs arba pasižymi ribotu biologiniu aktyvumu, o aukštos molekulinės masės, virš 5 kDa, yra biologiškai aktyvūs (Feng et al., 2022; Han et al., 2020; Yuan et al., 2019). Aktyvumas dažnai yra siejamas su β -gliukanų konformacija. Aukštos molekulinės masės β -gliukanai su vienos grandinės molekuline mase didesne nei 32 kDa formuoja tvarkingą trigrandės spiralės struktūrą (Guo et al., 2021). Bendrai, β -gliukanų tirpumas priklauso nuo molekulinės masės, šakotumo, β -1,6-šoninių grandinių ilgio ir chitino. Aukštos molekulinės masės β -gliukanai pasižymi mažesniu tirpumu. Cheminė modifikacija arba fizikiniai metodai gali pagerinti tirpumą sumažinant molekulinę masę arba pakeičiant struktūrą (Du et al., 2019, 2012) kas taip pat gali pagerinti antioksidacinį jų aktyvumą (Vetvicka et al., 2021). Sulfoninimas arba fosforilinimas leidžia padidinti β -gliukanų tirpumą (Bashir and Choi, 2017). Ultragarsas padidina tirpumą sumažindamas molekulinę masę. β -gliukanas taip pat gali degraduoti į smulkesnius fragmentus išlaikydamas savo cheminę struktūrą ir konformaciją (Du et al., 2019).

Iki šiol nėra sutarimo dėl šių polisacharidų aktyvumo sąsajos su molekuline mase, nors literatūroje dažniau įvardijama, kad HMW pasižymi geresnėmis imunomoduliuojančiomis savybėmis, o mažos molekulinės masės (LMW) β -gliukanai pasižymi geresnėmis antioksidacinėmis savybėmis, nors jiems priskiriamas ir imunostimuliuojantis aktyvumas (Guo et al., 2021; Liu et al., 2021; Manabe and Yamaguchi, 2021).

1.3. β -gliukanų išskyrimas ir analizė

Dėl ląstelės sienelės funkcijų molekulės joje yra organizuotos ir tarpusavyje sujungtos, todėl β -gliukanų išskyrimas tampa sudėtingas, laiko ir energijos reikalaujantis procesas (Zechner-Krpan et al., 2010). Gliukanų

išskyrimui taikomi fizikiniai, cheminiai ir fermentiniai metodai bei jų variacijos. Ląstelės lizė ir sienelės suardymas yra svarbiausi išskyrimo žingsniai. Skirtingi išskyrimo ir džiovavimo metodai gali lemti skirtingų frakcijų, pasižyminčių fizikocheminių, struktūrinių bei biologinių savybių įvairove, gavimą (Chakraborty et al., 2021; Han et al., 2020; Liu et al., 2022). Priklausomai nuo tyrimo su β -gliukanais tikslo gali būti naudojamos tokios frakcijos kaip: β -gliukanai, įskaitant zimosaną, β -gliukanų-chitino kompleksas, α -gliukanai ir kitos molekulės, kurios atitinkamai reikalauja skirtingo išskyrimo ir gryninimo technikos (Liu et al., 2022; Manabe and Yamaguchi, 2021; Wang et al., 2017; Xing et al., 2018).

Terminis ir mechaniniai išskyrimo metodai turi pranašumą, nes nereikalauja papildomo gryninimo dėl to, kad nenaudojamos papildomos medžiagos, galinčios lemti naujų funkcinių grupių ar molekulių atsiradimą, kurios gali paveikti cheminę sudėtį. Terminiu būdu gaunami polisacharidai yra neutralūs, pasižymi aukšta molekuline mase ir netirpumu vandeniniuose tirpaluose (Mahmoud Amer et al., 2021; Shi, 2016). Toks išskyrimas pasižymi maža savikaina, paprastumu ir galimybe gauti β -gliukanus pramoniniu mastu. Tačiau mažas efektyvumas ir didelės laiko sąnaudos gali reikalauti papildomų metodų išskyrimo proceso optimizacijai. Cheminiai ir terminiai metodai gali lemti nepageidaujamų mono- ir oligomerų atsiradimą. Išskyrimas šarmais ar rūgštimis gali suardyti glikozidinius ryšius, todėl dalis polisacharidų hidrolizuojama. Papildomai reikia neutralizuoti arba dializuoti gautus polisacharidus, o tirpią frakciją išsodinti etanoliu. Gaunamos skirtingos frakcijos, kurios skiriasi savo chemine sudėtimi, struktūra ir tirpumu (Liu et al., 2022; Manabe and Yamaguchi, 2021; Wang et al., 2017; Xing et al., 2018). Mechaniniai metodai, tokie kaip ultragarsas, dažnai naudojami kartu su kitais metodais. Jie leidžia suardyti sienelę arba sumažinti β -gliukanų molekulinę masę suardant grandines be poveikio struktūrai ir sudėčiai (Huang et al., 2021). Ultragarsas leidžia stabilizuoti β -gliukanus suspensijoje (Zechner-Krpan et al., 2010). γ -spinduliuotė taip pat gali būti naudojama reikšmingai sumažinant gautų β -gliukanų molekulinę masę. Išskyrimas naudojant mikrobangas taikomas kartu su kitais metodais ląstelės sienelės suardymui. Ultragarsas ir mikrobangos leidžia šiek tiek sutrumpinti išskyrimo laiką ir padidinti efektyvumą kai naudojami su kitais išskyrimo metodais: išskyrimas karštu vandeniu (terminis būdas), naudojant šarmus arba fermentine hidrolize (Avramia and Amariei, 2022; Gangopadhyay et al., 2015; Huang et al., 2021; Tam et al., 2013).

β -gliukanų netirpumas gali tapti ribojančiu veiksniu jų analizėje. Atsiranda sunkumai taikant įprastus fermentinės, cheminės ir

chromatografinės analizės metodus nustatant molekulinę masę, sudėtį ir struktūrą. Netirpūs β -gliukanai gali būti tirpinami DMSO, kuris lemia hidrofobinių ir vandenilinių jungčių suardymą. Rezultate trigubos spiralės struktūra išira ir polimerai įgauna atsitiktinių spiralių arba viengrandės spiralės konformacijas (Guo et al., 2021; Saitō and Yokoi, 1989; Zhang et al., 2002).

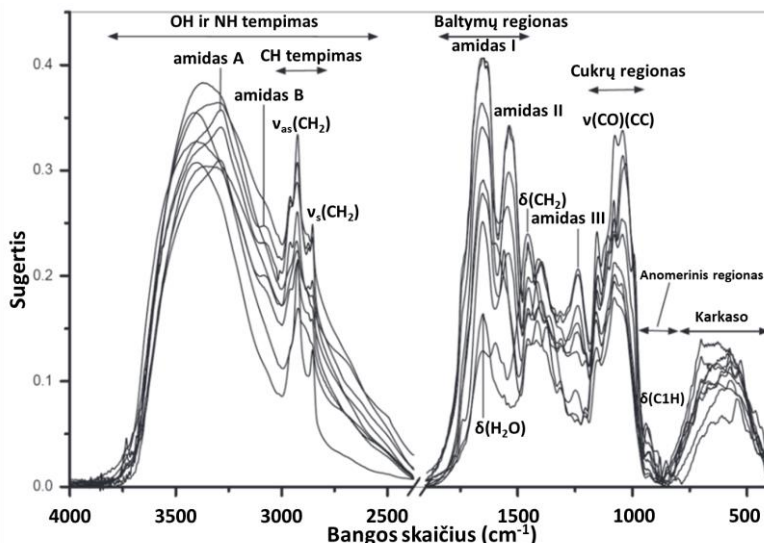
Norint nustatyti molekulinę masę (MW), β -gliukanus taip pat reikia ištirpinti, tačiau jeigu tirpale atsiranda agregatai, tai trukdo šviesos sklaidai ir rezultatai yra netikslūs (Younes and Rinaudo, 2015). Kita problema yra susijusi su β -gliukanų sudėties analize. Pavyzdžiui, nei fenolsulfurinis, nei dinitrosalicilo rūgšties (DNS) metodai neleidžia nustatyti sacharido tipą, todėl nėra nustatomas β -gliukanų grynumas (Plata et al., 2013). Kiti metodai, tokie kaip dujų chromatografija arba skysčių chromatografija ir masės spektrometrija reikalauja mėginio hidrolizės. Tačiau baltymų ir lipidų liekanos gali trukdyti hidrolizės fermentams, taikant fermentinę analizę, lemti sterinius trukdžius arba neefektyvią glikozidinių jungčių hidrolizę. Nei sonikacija, nei cheminė ar fermentinė hidrolizė neužtikrina tinkamo analizei β -gliukano gavimo (Bzducha-Wróbel et al., 2014; Canteri et al., 2019; Thanardkit et al., 2002). Analiziniai metodai, tokie kaip Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių (FT-IR) bei branduolių magnetinio rezonanso (BMR) spektroskopija gali būti naudojami β -gliukanų analizei. FT-IR spektroskopija leidžia analizuoti glikozidinių jungčių poziciją ir anomerinę konfigūraciją aukštos molekulinės masės β -gliukanuose išskirtuose iš biologinių šaltinių, kas leidžia palyginti struktūrinius skirtumus (Thanardkit et al., 2002). BMR gali būti panaudota nustatyti šakų ilgiui (Lowman et al., 2011). Abiem metodais, galima analizuoti β -gliukanus tirpale arba kietoje fazėje. Tačiau, analizuojant β -gliukanus tirpale vėl susiduriama su tirpumo problema. Didinant β -gliukanų tirpumą panaudojant cheminę modifikaciją ar kitus fizikinius metodus galima paveikti jo struktūrą ar konformaciją. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių ir kietojo kūno BMR (angl. *ssNMR*) spektroskopija, Ramano spektroskopija ir X-spindulių kristalografija (XRD) leidžia tirti mėginius kietoje fazėje (Gieroba et al., 2022; Manabe and Yamaguchi, 2021; Plata et al., 2013) kas leidžia analizuoti natyvią aukštos molekulinės masės β -gliukanų struktūrą bei išsprendžia tirpumo problemą (Ehren et al., 2020; Kang et al., 2018; Kremmyda et al., 2021; Synytsya and Novak, 2014). Galima analizuoti natyvią β -gliukanų struktūrą išsaugant analizuojamo polimero 3D struktūrą be tirpiklio poveikio analizuojamai medžiagai, tačiau atsiranda kita problema – artefaktai, triukšmas, spektrinė rezoliucija (Ehren et al., 2020; Kang et al., 2018; Lamon et al., 2023). Šiuo

metu, mokslininkų pagrindinis tikslas yra β -gliukanų analizės ir pirminės struktūros tyrimai. XRD naudojama struktūrai nustatyti, tačiau kaip ir daugumos kitų polisacharidų, dėl prastos kristalizacijos egzistuoja vos keletas β -gliukanų kristalinės struktūros, todėl vis dar trūksta išsamios informacijos apie daugelio jų struktūrą (Wu et al., 2021). Vienas iš galimų šios problemos sprendimų yra *in silico* molekulių sąveikos ir molekulių dinamikos tyrimai, kurie leidžia teoriškai apskaičiuoti ne tik galimas β -gliukanų konformacijas bet ir jų stabilumą bei sąveiką su imuninės sistemos receptoriais (Vetvicka et al., 2021).

1.3.1. β -gliukanų analizė FT-IR spektroskopija

FT-IR spektroskopija yra plačiai taikomas metodas, kuris reikalauja nedidelio arba visai nereikalauja analizuojamo mėginio paruošimo, leidžiantis greitai ir iš mažo kiekio gauti mėginio molekulinį „pirštų antspaudą“ (angl. *fingerprint*) (Ami et al., 2013; Bartošová et al., 2013; Canteri et al., 2019).

Pagal bangos skaičių FT-IR spektrą galima suskirstyti į keletą sričių (**1.7 pav.**). Plati juosta tarp 3600 cm^{-1} ir 3000 cm^{-1} yra būdinga $-\text{OH}$ grupės valentiniams virpesiams. Kadangi gliukozės molekulėje yra penkios hidroksilo ($-\text{OH}$) grupės, ši juosta yra ypač būdinga polisacharidams, įskaitant it β -gliukanus (Du et al., 2012; Hong et al., 2021). Kita sritis tarp $3000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ yra priskiriama karkaso $-\text{CH}$ ir $-\text{CH}_2$ grupių simetriniams ir asimetriniams valentiniams virpesiams (Hong et al., 2021).



1.7 pav. Aukštos molekulinės masės frakcijų, išskirtų iš grybų *Pleurotus streatus* vaisiakūnių FTIR spektras, pritaikyta pagal (Synytsya and Novak, 2014).

Dvigubų ryšių valentinių virpesių sritis tarp 1800-1500 cm^{-1} , įskaitant juostą ties 1719 cm^{-1} , yra būdinga C=O valentiniams virpesiams (Du et al., 2012; Hong et al., 2021). Peptidinio ryšio C=O valentiniai ir N-H lenkimo virpesiai gali suteikti informacijos apie baltymų antrinę struktūrą (Ami et al., 2013). Tačiau tik tuose mėginiuose, kuriuose yra baltymų. Juosta ties 1639 cm^{-1} yra daugiausia siejama su C=O valentiniai virpesiais ir N-H lenkimo virpesiais (Galichet et al., 2001). Priklausomi nuo to kokiu ryšiu yra sujungti sacharidai, ši sritis gali būti priskirta C-O valentiniams virpesiams, kurioms būdingos juostos ties 1740 cm^{-1} ir 1640 cm^{-1} , kas atitinka O-glikozidinių ir N-glikozidinių ryši. Tačiau, šioje srityje taip pat dažnai pasireiškia vandens absorbcijos juosta ties 1635 cm^{-1} , kurios padėtis priklauso nuo molekulių sąveikų stiprumo (Hong et al., 2021). Kadangi vanduo pasižymi stipria absorbcija IR spektre, todėl prieš IR matavimus mėginiai turi būti išdžiovinami, ypač dirbant perdavimo (transmission) režimu. Kaip alternatyvą FT-IR galima naudoti Raman spektroskopiją, kuri pasižymi mažesniu jautrumu vandens absorbcijai (Ami et al., 2013). Juosta yra ties $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ taip pat gali būti priskirta C=O valentinių virpesių absorbcijai, N-glikozidiniu ryšiu prie polisacharido prijungtai acetilo grupei. Be to, N-glikozidinių ryšio C-N valentiniams virpesiams yra priskiriama 1550 cm^{-1} juosta (Hong et al., 2021).

Sritis tarp 1500 cm^{-1} ir 1200 cm^{-1} daugiausia apima deformacinius virpesius būdingus lokalaus simetriškumo grupėms tokioms kaip $-\text{CH}_2$, bei C-OH deformacinius virpesius aptinkamus angliavandeniuose. Dėl skirtingų juostų persidengimo ši sritis yra gana „apkrauta“, todėl tiksli juostų priskyrimo analizė yra sudėtinga (Anderson et al., 2014; Hong et al., 2021).

Angliavandeniams specifinė absorbcija būdinga regionui, vadinamu „pirštų antspaudų“ (angl. *fingerprint*), išsidėsčiusiu tarp 1200 cm^{-1} ir 800 cm^{-1} (Bartošová et al., 2013; Hong et al., 2021). Gliukozei būdingų juostų sugertis charakterizuojama maksimumais ties 1150 cm^{-1} , 1106 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} ir didžiausia sugertimi ties 1029 cm^{-1} (Bartošová et al., 2013). Šioje srityje dėl absorbcijos juostų persidengimo, yra labai sudėtinga konkrečius absorbcijos maksimumus priskirti konkretiems ryšiams ar funkcinėms grupėms (Černá et al., 2003). Visgi, lyginant su monosacharidais, naujų juostų atsiradimas 1175-1140 cm^{-1} srityje siejamas su glikozidinių ryšių formavimusi polisachariduose. Skirtingos glikozidinių jungčių konfigūracijos lemia skirtumus 1000-920 cm^{-1} intervale. Be to, 900-800 cm^{-1} sritis, vadinama anomeriniu regionu, leidžia atskirti α - ir β -anomerines konfigūracijas (Hong et al., 2021; Šandula et al., 1999; Synytsya and Novak, 2014).

Sritis esanti žemiau 800 cm^{-1} yra būdinga angliavandenių molekulinio karkaso (angl. *skeletal*) virpesiams. Vis dėlto struktūrinė informacija apie polisacharidus šioje srityje yra ribota ir literatūroje aptariama retai (Hong et al., 2021).

1.1 lentelė. Dažniausiai polisacharidams ir β -gliukanams priskiriamos juostos. Pritaikyta pagal (Du et al., 2012; Gonzaga et al., 2013).

Bangos skaičius (cm^{-1})	Priskirimas
3600-3000 cm^{-1}, ν (O–H)	
3317-3345, 3411 cm^{-1}	ν (O–H) ir (N–H)
3000-2500 cm^{-1}, ν (C–H) ir (CH₂)	
2929, 2919 cm^{-1}	ν (C–H)
1800-1500 cm^{-1}, ν (C=O)	
1650 cm^{-1}	ν_{as} (COO ⁻)
1645 cm^{-1}	Vidumolekuliniai vandeniliniai ryšiai
1500-1200 cm^{-1}, ν (C–H) ir (CH₂)	
1406 cm^{-1}	ν_s (COO ⁻)
1383, 1305 cm^{-1}	ν (C–H)
1372 cm^{-1}	–CHOH valentiniai virpesiai
1254 cm^{-1}	–CH ₂ OH valentiniai virpesiai
1242 cm^{-1}	Baltymai
1200-800 cm^{-1}, „pirštų anstpaudų“ regionas	
1159, 1149 cm^{-1}	ν (C–O–C)
1076, 1074 cm^{-1}	ν (C–O), ν (C1–H) anomeric carbon
1041, 1028 cm^{-1}	ν (C–O)
933 cm^{-1}	δ C1–H α konfigūracija
890 cm^{-1}	Būdingas β -glikozidiniams ryšiams
852 cm^{-1}	δ C1–H β konfigūracija
< 800 cm^{-1}, karkaso virpesiai	

Mielių β -1,3/1,6-gliukanams, taip pat laminarinui ir kurdlanui būdingos FT-IR spektro juostos (**1.1 lentelė**) yra registruojamos šalia 1160, 1078, 1044, 890 cm^{-1} . Didžiausia sugertis maždaug ties 1153 cm^{-1} ir 1104 cm^{-1} yra būdinga β -1,3-gliukanams, o ties 1075 cm^{-1} ir 889 cm^{-1} – β -1,6-gliukanams (Avramia and Amariei, 2022; Šandula et al., 1999; Synytsya et al., 2023; Synytsya and Novak, 2014). Chitinui būdingos juostos stebimos ties maždaug 1650 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} bei 1561 cm^{-1} . Tačiau mielių β -gliukanuose dažnai pastebimas šių juostų išplitimas iki maždaug 1530 cm^{-1} (Šandula et al., 1999). Polisacharidų O–H valentiniai virpesiai kartu su vandens O–H valentiniais

virpesiais prisideda prie plačios juostos $3317\text{-}3345\text{ cm}^{-1}$ srityje (Synytsya et al., 2023).

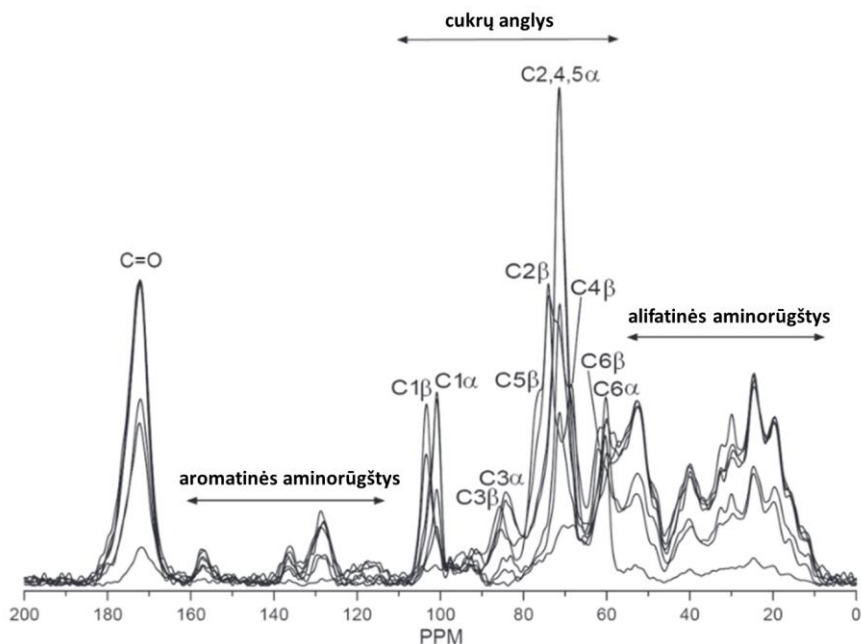
IR spektroskopija plačiai taikoma polisacharidų tipų, pakaitinių grupių, anomerinio anglies atomo konfigūracijos ir kristalinių alotropų identifikavimui. Tačiau dėl polisacharidų didelio struktūrinio panašumo jų kokybinė analizė vien FTIR metodu yra sudėtinga. Spektrinių juostų persidengimas gali maskuoti charakteringą informaciją, todėl analizuojant svarbu naudoti visas būdingas juostas, o chemometriniai metodai leidžia padidinti sudėtingų spektrų kokybinės analizės patikimumą (Hong et al., 2021). Kai kuriais atvejais vien pagrindinių komponentų analizė (PCA) yra pakankamai galingas metodas daugiamatėms FTIR spektrų duomenų analizėms atlikti (Ami et al., 2013).

1.3.2. β -gliukanų analizė naudojant BMR spektroskopiją

Skirtingai nei BMR spektruose, IR spektrinių juostų plotis tiesiogiai neatspindi kiekybinės sudėties. Dėl šios priežasties kiekybinis funkcinių grupių vertinimas iš IR spektrų yra neįmanomas be kalibracijos naudojant medžiagų standartus. Priešingai, kietojo kūno BMR spektroskopija leidžia atlikti kiekybinę funkcinių grupių analizę ir suteikia išsamesnę struktūrinę informaciją (Anderson et al., 2014). Kietojo kūno ^{13}C BMR spektroskopija leidžia identifikuoti skirtingas polimerų konformacines būsenas, pavyzdžiui leidžia atskirti standžias konformacijas nuo lanksčių. Taip pat šio metodo privalumas yra tas, kad galima tirti neapdorotas ląstelių sienelės taip išvengiant struktūrinių pakitimų, atsirandančių mėginių paruošimo metu. Vienas pagrindinių kietojo kūno ^{13}C BMR spektroskopijos ribojančių veiksnių yra metodo jautrumas, susijęs su natūraliai mažu ^{13}C izotopo paplitimu (apie 1,1 %), dėl ko standžios konformacijos polisacharidai gali likti neaptikti (Bootten, 2004). Kietojo kūno branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija yra nedestruktyvus ir didelės skiriamosios gebos metodas, leidžiantis tirti ne tik atskirus biopolimerus bet ir visą ląstelės sienelės organizaciją (Kang et al., 2018).

^{13}C BMR spektruose paprastai išskiriamos keturios cheminių poslinkių sritys apibūdinančios polisacharidus (**1.8 pav.**): anomerinių C1 anglies atomų sritis (98-108 ppm), antrinių anglies atomų C2–C5 cheminių poslinkių sritis (70-80 ppm), pirminių anglies atomų (C6) sritis (~60 ppm) bei rūgštinių grupių sritis (170-180 ppm), kuri siejama su karbonilo grupių buvimu ir yra būdinga, pavyzdžiui chitinui. Be karbonilo anglies atomo (C7), chitinui

būdingas metilo grupės (C8) cheminis poslinkis srityje ties 20-25 ppm (Ehren et al., 2020; Gonzaga et al., 2013; Kang et al., 2018).



1.8 pav. Spektras aukštos molekulinės masės frakcijų, išskirtų iš grybų *Pleurotus striatus* vaisiakūnių ^{13}C BMR spektras, pritaikyta pagal (Synytsya and Novak, 2014).

C1 anomerinės anglies srityje, α -glikozidiniu ryšiu sujungtiems polisacharidams būdingas 99-102 ppm cheminis poslinkis, tuo tarpu β -glikozidinis ryšys apibūdinamas sritimi tarp 103 ppm ir 107 ppm (Ehren et al., 2020; Gonzaga et al., 2013; Synytsya and Novak, 2014). C1 anglies cheminio poslinkio reikšmė taip pat priklauso nuo jungties su kitais atomais su C3 (β -1,3), C4 (β -1,4) ar C6 (β -1,6) (Kremmyda et al., 2021). Specifinio anglies atomo signalo poslinkis mažesnių verčių link maždaug nuo 5 ppm iki 10 ppm paprastai siejamas su glikozidinio ryšio susidarymu arba pakitusia molekuline struktūra, pavyzdžiui šakos atsiradimu (Synytsya and Novak, 2014). C3 anglies atomų cheminis poslinkis link 85-88 ppm yra būdingas β -1,3-glikozidinių ryšių sujungtiems polisacharidams (Aimanianda et al., 2009).

Pirminių anglies atomų (C6) cheminis poslinkis aptinkami maždaug ties 60 ppm, tačiau β -1,6-glikozidiniams ryšiams yra būdingas poslinkis į 66-70 ppm sritį (Ehren et al., 2020; Gopal et al., 1984; Ha et al., 2002). Skirtingų β -gliukanų cheminių poslinkių pavyzdžiai yra pateikti **1.2 lentelėje**.

1.2 lentelė. Dažniausiai mielių ir grybų β -gliukanams priskiriamos juostos. WN – vandenyje netirpus; WS – vandenyje tirpus; AN – šarmuose netirpus, ssAN – kietojo kūno ^{13}C BMR; wAN – ^{13}C BMR skytoje fazėje; AcidS – rūgštyse tirpus.

Mielių β-gliukanai								
	C1	C2	C3	C4	C5	C6		
<i>Candida albicans</i> β -1,3 ¹	104,0	74,4	85,9	69,2	75,1	61,9		
<i>C. albicans</i> β -1,6 ¹	104,2	74,5	76,9	70,7	76,0	70,1		
Reduokuojujantys galai (β -) ¹	97		86					
Mielių WN β -1,3/1,6 ²	104,6	74,6	87,9	70,2	78,2	62,9		
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ssAN β -1,3 ³	102,9	73,9	85,3	68,3	76,6	61,8		
<i>K. marxianus</i> wAN β -1,3 ³	103,5	73,4	86,8	69,1	77,0	61,6		
<i>S. cerevisiae</i> wAN β -1,3 ⁴	104,0	73,9	86,3	72,9	76,5	61,1		
<i>C. albicans</i> AcidS β -1,3/1,6 ⁵	105,0	75,3	78,0	72,1	77,1	71,1		
<i>S. cerevisiae</i> wAN ⁶	103,5	73,3	86,7	68,9	76,8	61,4		
<i>C. glabrata</i> β -1,3 ⁷	102,7	72,5	86,0	68,2	76,1	60,6		
<i>C. glabrata</i> β -1,6 ⁷	103,0	73,2	76,3	69,8	75,2	68,2		
<i>S. cerevisiae</i> wAN β -1,3 ⁸	105,5	76,1	78,3	72,3	75,8	63,5		
<i>S. cerevisiae</i> wAN β -1,3/1,6 ⁸	105,6	75,5	87,2	70,9	77,4	71,6		
Laminarinas β -1,3/1,6 ⁹	103,4	74,1	85,2	69,0	76,5	61,6		
Grybų β-gliukanai								
<i>Aureobasidium pullulans</i> WS β -1,3 ¹⁰	102,7	72,4	86,0	68,2	75,8	60,6		
<i>A. pullulans</i> WS β -1,3/1,6 ¹⁰	102,8	73,4	76,2	70,1	76,4	60,9		
<i>Sclerotium</i> sp. WN β -1,3/1,6 ²	104,6	74,1	88,0	70,0	76,5	70,0		
Lentinanas β -1,3/1,6 ¹¹	103,3	72,9	87,1	68,3	75,8	68,9		
<i>Agaricus blazei</i> β -1,6-glucan ¹²	103,2	73,2	75,8	69,7	75,1	69,0		
<i>Schizophyllum commune</i> ssAN β -1,3 ¹³	106,0	76,7	88,7	70,5	80,5	63,6		
<i>S. commune</i> ssAN β -1,3/1,6 ¹³	103,3	72,1	78,0	71,7	77,2	71,1		
<i>S. commune</i> chitinas ssAN ¹³								
	C7	C8	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	177,7	24,9	106,3	57,3	76,2	85,5	77,1	62,7

¹(Iorio et al., 2008), ²(Kim et al., 2000), ³(Lukondeh et al., 2003), ⁴(Ha et al., 2002), ⁵(Gopal et al., 1984), ⁶(Du et al., 2012), ⁷(Lowman et al., 2011), ⁸(Aimanianda et al., 2009), ¹³(Kollár et al., 1997), ¹⁰(Kono et al., 2017), ¹¹(Li et al., 2019), ¹²(Gonzaga et al., 2013), ¹³(Ehren et al., 2020),

Grybų β -gliukanams dažniausiai yra būdingos trumpos, iš vienos gliukozės liekanos sudarytos šoninės grandinės, tuo tarpu mielių β -gliukanai pasižymi sudėtingesne, įvairaus ilgio ir dažnio β -1,3/ β -1,6-gliukanų šakota struktūra. Dėl šios priežasties, jų apibūdinimui reikalingi sudėtingesni analizės metodai. Tradiciniai β -gliukanų kiekybiniai metodai, paremti rūgštine hidrolize, pasižymi ribotu specifiškumu, ypač esant kitiems gliukozės

polimerams (Boutros et al., 2022). Eksperimentiniai duomenys rodo, kad išskyrimo metodai turi įtakos β -gliukanų struktūrai. Išskiriant β -gliukanus iš kelių *C. glabrata* kamienų, taikant skirtingus metodus, Lowman et al. (2011) nustatė, kad didesnė fosforo rūgšties koncentracija lemia tiek sutrumpėjusį šoninių grandinių ilgį, tiek mažesnę jų kiekį, lyginant su mažesne rūgšties koncentracija. Net ir nedideli išskyrimo metodų skirtumai gali reikšmingai pakeisti β -gliukano struktūrą, o tai savo ruožtu gali turėti įtakos ligando-receptoriaus sąveikos tyrimams bei β -gliukanų biologiniam aktyvumui gyvose sistemose (Lowman et al., 2011).

1.4. β -gliukanų *in silico* tyrimai

Nustatyta, kad β -1,3-gliukanų polimerizacijos laipsnis (DP) turi įtakos jų biologiniam aktyvumui. Tačiau ribota informacija apie β -1,3-gliukanų konformacinius pokyčius ir jų priklausomybę nuo DP lemia, kad molekuliniai atpažinimo mechanizmai ir sąveika tarp β -gliukanų ir jų receptorių nepakankamai išaiškinta (Feng et al., 2022). Viena iš priežasčių yra β -1,3-gliukanų karkaso lankstumas, lemiantis konformacinį sudėtingumą. Nors Dectin-1 receptoriaus β -gliukanų atpažinimo sritis yra gerai apibūdinta, duomenys apie šių molekulių sąveiką yra priešaringi (Brown et al., 2007; Hanashima et al., 2014). Vyrauja prielaida, kad Dectin-1 palankiau sąveikauja su aukštos molekulinės masės trigrandės spiralės konformacijos β -1,3-gliukanais, lyginant su atsitiktinės ar viengrandės spiralės konformacijomis. Mažesnės molekulinės masės β -1,3-gliukanų sąveika su Dectin-1 priklauso nuo grandinės ilgio. Receptorius silpnai prisijungia β -1,3-gliukanus su polimerizacijos laipsniu lygiu 6 (DP=6), vidutiniškai su DP=16 ir stipriai – laminariną, kurio DP yra apie 30. Manoma, kad minimalus polimerizacijos laipsnis, kuris aktyvuoja Dectin-1 receptorių, yra β -1,3-gliukanų grandinė sudaryta iš 9 gliukozės monomerų (Adachi et al., 2004; Brown et al., 2007). Nepaisant šių duomenų, vis dar trūksta išsamaus paaiškinimo, kaip Dectin-1 receptorius atpažįsta skirtingas β -gliukanų konformacijas bei koks jų vaidmuo receptoriaus aktyvacijoje. Šiems klausimams nagrinėti galima pasitelkti kompiuterinius modelius leidžiančius prognozuoti molekulių struktūrą ir jų sąveiką *in silico* (Feng et al., 2022). Molekulinis modeliavimas ir molekulių dinamikos (MD) simuliacijos papildo *in vivo* ir *in vitro* tyrimus, vadovaujantis 3R principu. Šie *in silico* metodai leidžia tirti β -gliukanų konformacijas, jų transformaciją, įvertinti sąveiką su receptoriais atominio lygmeniu (Feng et al., 2015).

1.4.1. Molekulinis dokinimas

Molekulinis dokinimas yra skaičiavimo metodas, skirtas prognozuoti tikėtiną ligando prisijungimo konformaciją ir jos energetinį palankumą. Dokinimo procesą sudaro konformacijų paieška bei vertinimas, dažniausiai remiantis elektrostatinėmis ir van der Valso sąveikomis, vandeniliniiais ryšiais, taip pat atomų persidengimu, ligando deformacija ar sąveikos suvaržymu. Dažniausiai programa ieško globalaus energijos minimumo, derinant paieškos išsamumą ir skaičiavimo trukmę. Dokinimo metu gautos konformacijos leidžia išanalizuoti komplekse susidarnačius vandenilinius ryšius, hidrofobines ir elektrostazines sąveikas. Klasikinių dokinimo metodai yra apriboti vienos baltymo-ligando konformacijos, nors realios sistemos yra dinamiškos, todėl molekulių dinamikos simuliacijos papildo dokinimo metu gautas žinias ir leidžia įvertinti komplekso stabilumą ir konformacinius pokyčius laike (Agu et al., 2023; McNutt et al., 2021; Paggi et al., 2024).

Baltymų-angliavandenių sąveikos paprastai yra silpnos. Daugumos lektinų ir monosacharidų sąveikų disociacijos konstantos yra mM diapazone, o ilgesnių oligosacharidų afiniškumas dažniausiai didėja μM . Tokias sąveikas lemia negilios ir hidrofiliinės prisijungimo vietos, o specifiškumas priklauso nuo vandenilinių ryšių, hidrofobinių ir elektrostatinė sąveikų visumos. Dėl gausaus hidroksilo ($-\text{OH}$) grupių kiekio angliavandeniuose vandeniliniai ryšiai yra vieni pagrindinių lemiančių sąveiką tarp ligando ir baltymo. Formuojant šiuos ryšius dažnai dalyvauja baltymo Asp, Glu, Asn, Gln, Arg ir Ser liekanos. Be to, svarbios yra elektrostatinės sąveikos, druskų tilteliai, kartais ir divalenčiai katijonai (pvz. Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Zhang et al., 2021).

β -gliukanų molekulinis dokinimas pasižymi specifiniais iššūkiiais susijusiais su: β -gliukanų molekulių struktūriniu lankstumu, nulemtu glikozidinių ryšių sukimosi kampų (ϕ ir ψ) variabilumu, šakotumu ir skirtingų jungčių tipais vienoje grandinėje (β -1,3; β -1,6 ar kt.) bei intensyvia sąveika su vandeniu. Dėl to klasikiniai molekulinio dokinimo metodai, optimizuoti santykinai standžioms molekulėms, gali būti netikslūs. Šie apribojimai iš dalies kompensuojami derinant dokinimą su MD simuliacijomis (Sapay et al., 2013).

1.4.2. Molekulių dinamikos simuliacija

Molekulių dinamikos (MD) simuliacijos yra viena iš pagrindinių teorinių biologinių molekulių tyrimo priemonių, leidžiančių aprašyti molekulių sistemų elgesį laike, remiantis klasikine mechanika ir Niutono judėjimo lygtimis (Feng et al., 2015; Rezapour et al., 2019).

MD trajektorijų analizei įprastai naudojami stabilumo ir dinamikos rodikliai, kurie leidžia gauti informaciją apie molekulių judėjimą, vandenilinių jungčių skaičių ir sąveikos energiją, laisvą molekulės judėjimo energiją, šaknį iš molekulių vidutinio kvadratinio nuokrypio ir svyravimų (RMSD ir RMSF) prieš ir po modeliavimo. RMSD leidžia įvertinti bendrą kompleksą ar molekulės stabilumą, RMSF – lokalų lankstumą, o sukimo spindulys R_g (angl. *radius of gyration*) – molekulės kompaktiškumą (Feng et al., 2015; Rampogu et al., 2023).

RMSD fiksuoja konformacijos nukrypimus nuo pradinės struktūros ir apskaičiuojama pagal formulę:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{atomų}} (r_i - r_{ref})^2}{N_{atomų}}} \quad (1.1)$$

kur $N_{atomų}$ tai lyginamų objektų atomų skaičius; r_i yra atomo i padėtis tikrinamoje konformacijoje; r_{ref} yra atomo i padėtis pradinėje ar referentinėje konformacijoje. Paprastai mažesnis nuokrypis reiškia santykinai stabilią struktūrą (Rampogu et al., 2023).

RMSF yra atominės padėties pokyčių vidurkis laike, kuris gali apibūdinti baltymų aminorūgščių lankstumą ir judėjimą modeliavimo proceso metu. RMSF apskaičiuojamas pagal formulę:

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^T (r_i(t) - \langle r_i \rangle)^2}{T}} \quad (1.2)$$

kur T tai užfiksuotas trajektorijos kadrų skaičius; $r_i(t)$ yra atomo padėtis t trajektorijos kadre; $\langle r_i \rangle$ yra vidutinė padėtis per visą simuliaciją.

R_g apibūdina molekulės dydį arba kompaktiškumą modeliavimo proceso metu, kuris ir yra apskaičiuojamas pagal formulę:

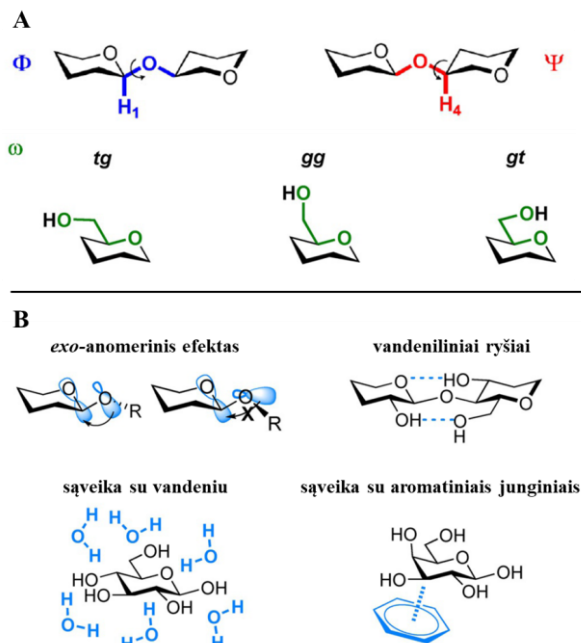
$$r_{RG} = \sqrt{\frac{\sum m_i (r_i - r_{CM})^2}{\sum m_i}} \quad (1.3)$$

kur m_i yra atitinkamai i -ojo atomo masė; r_i padėtis molekulės masės centro atžvilgiu; r_{CM} yra masės centras (Abraham et al., 2024; Park et al., 2019; Rampogu et al., 2023).

MDS leidžia ištirti molekulinės struktūros, judėjimo ir funkcijos ryšį, todėl yra svarbi priemonė tiriant biologinių molekulių struktūrą, dinamiką ir termodinamiką (Ahmed et al., 2023; Feng et al., 2015; Miyoshi et al., 2006).

Nors MD simuliacijos yra efektyvus įrankis, patikimumas priklauso nuo naudojamų jėgų laukų tikslumo. Modeliuojant angliavandenius naudojami jiems pritaikyti jėgų laukai tokie kaip GLYCAM06, CHARMM36, GROMOS53A6 ar AMBER ff14SB, tiksliau aprašantys glikozidinių ryšių geometriją, hidroksilo grupių sąveikas ir tirpiklio poveikį (Huang and MacKerell, 2013; Lin and MacKerell, 2019).

β -gliukanų modeliavimas ir konformacinė analizė yra sudėtingi tiek teoriniu, tiek eksperimentiniu požiūriu dėl molekulės konformacinio lankstumo, susidedančio iš glikozidinės jungties lankstumo (**1.9 pav, A**) ir piranozės žiedo lankstumo bei stereoelektroninių efektų tokių kaip anomerai, kurie yra susiję su konfigūracijos ir konformaciniais pokyčiais (Sapay et al., 2013).



1.9 pav. Sukimo kampai (Φ , Ψ , ω) glikozidiniuose ryšiuose (A). Išorinių veiksnių poveikis sukimo kampams ir gliukanų konformaciniam lankstumui (B), pritaikyta pagal (Yu and Delbianco, 2020).

Glikozidinio ryšio geometrija ir veiksniai turintys jai įtakos pavaizduoti **1.9 pav (B)**. Du sukimo (angl. *torsion*) kampai apibrėžia dviejų monosacharidų, sujungtų glikozidiniu ryšiu, santykinę orientaciją: Φ ($H_1-C_1-O_x-C_x$) ir Ψ ($C_1-O_x-C_x-H_x$). Papildomas sukimo kampas ω ($O_6-C_6-C_5-O_5$) yra reikalingas β -1,6-jungtimis. Šiuos kampus gali paveikti konformacija (egzo-

anomerinis efektas), elektroniniai efektai gali skatinti tam tikras ω geometrijas (Gošė efektas), vandeniliniai ryšiai ar sąveika su aromatiniais junginiais gali stabilizuoti tam tikras konformacines būsenas. Hidroksilo grupių sąveika su vandeniu gali sutrikdyti tarpmolekulinius vandenilinius ryšius, todėl susidaro labai lanksčios konformacijos ir vaidina svarbų vaidmenį gliukanų ir baltymų sąveikoje (Yu and Delbianco, 2020).

Solvatacijos proceso modeliavimas riboja galimybes patikimai numatyti gliukanų konformacijas. Sąveikaujant su baltymu, vandeniliniai ryšiai, sąveika su jonais gali turėti įtakos angliavandenių prisijungimui. Stereoelektroniniai efektai taip pat kelia iššūkių, todėl yra specialiai angliavandeniams optimizuoti jėgų laukai, kurie padaro MD modeliavimą žymiai tikslesniu. Visgi tokie modeliai reikalauja nuolatinio patvirtinimo naudojant sintetinius standartus. Geriausiu sprendimu yra laikomi BMR analizės sukinio-sukinio ir liekamosios dipolinės sąveikos (angl. *residual dipolar coupling*, RDC). Tačiau ir čia gliukanų vidinis lankstumas dažnai lemia vidutinę 3D struktūrą, sujungiant daugelio konformacinių būsenų įnašus (Yu and Delbianco, 2020).

Taip pat, yra ir kitų su MD simuliacijomis susijusių trūkumų, pavyzdžiui, topologijos failų generavimo metodai, jėgos lauko projektavimas ir tikrinimas, daug išteklių ir laiko reikalaujantis programos veikimas (Feng et al., 2015). Vis dėl to molekulių dinamikos simuliacijos ir molekulinis dokinimas yra plačiai taikomi angliavandenių sąveikų su receptoriais tyrimuose (Cui et al., 2018; Feng et al., 2022; Rezapour et al., 2019; Wu et al., 2021) ir gali būti vertingi tiriant β -gliukanų sąveikos su receptoriais mechanizmus.

Literatūroje aprašomų β -gliukanų MD simuliacijos ir dokinimas dažniausiai yra atliekami su Dectin-1 monomeru (PDB ID: 2BPD). Dectin-1 sąveikos su β -gliukanais *in silico* tyrimai yra atlikti su trumpas β -1,3-gliukanų grandines turinčiais kurdlanu, šizofilanu ir trigrandės spiralės lentinanu (Chaturvedi et al., 2017; Feng et al., 2015, 2022; Huo et al., 2025; Wu et al., 2021; Yadav et al., 2012). Ir vos keletas darbų, kuriuose atliktas β -gliukanų molekulinis dokinimas su Dectin-1 dimeru (PDB ID: 2CL8) (D'Souza et al., 2022; Patidar et al., 2020). Yra žinoma, kad Dectin-1 sąveika su β -gliukanais lemia receptoriaus dimerizaciją ir imuninių ląstelių aktyvaciją (Anaya et al., 2023). Todėl šiame darbe įvertinus iš mielių išskirtų β -gliukanų struktūrą ir konformaciją ATR-FTIR ir BMR metodais ir siekiant išplėsti ankstesnių tyrimų ribas ir panagrinėti alternatyvų β -gliukanų bei Dectin-1 receptoriaus sąveiką buvo naudojamos linijinės ir šakotos β -gliukanų molekulės bei dimerinis Dectin-1 modelis.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. β -gliukanų išskyrimas

2.1.1. Mielių biomasės gavimas

Mieliagybiai *Candida guilliermondii* C18, *C. lusitaniae* C64, *Sacharomyces cerevisiae* α '1 buvo gauti iš Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros profesorės Dr. Eglės Lastauskienės. Mieliagybiai *C. guilliermondii* C18, *C. lusitaniae* C64 tai klinikiniai izoliatai išskirti ir aprašyti Dr. E. Lastauskienės nuo paciento sirgusio atopiniu dermatitu odos (Lastauskienė et al., 2014).

Mielių ląstelės buvo inokuliuotos į 500 ml Erlenmejerio kolbą su skysta YPD terpe ir inkubuotos 48 valandas 37 °C temperatūroje, esant 160 aps./min. Biomasė buvo surinkta centrifuguojant 5 min prie 5000 × g ir 4 °C, po to tris kartus praplauta distiliuotu vandeniu (Bzducha-Wróbel et al., 2014).

2.1.2. Mielių autolizė

β -gliukanų išskyrimas buvo atliktas dviem būdais: su šarmu ir terminiu – su karštu vandeniu. Pirmiausia, mielių ląstelės buvo autolizuotos distiliuotame vandenyje su 10 % natrio chloridu, 1:20 svorio/tūrio santykiu, 48 val. prie 60 °C ir 120 aps./min ant magnetinės maišyklės. Autolizatas buvo inkubuotas 15 min 80 °C vandens vonioje, siekiant inaktyvuoti endogeninius fermentus. Toliau, autolizuotos ląstelių sienelės buvo surinktos centrifuguojant 10 min prie 5000 × g. Supernatantas buvo pašalintas, o nuosėdos plautos penkis kartus distiliuotu vandeniu, išdžiovintos ore 60 °C temperatūroje, pasvertos ir saugomos 4 °C šaldytuve (Bzducha-Wróbel et al., 2014; Liu et al., 2008; Pengkumsri et al., 2016; Xing et al., 2018). Išdžiovintos nuosėdos buvo padalintos į dvi dalis ir β -gliukanų išskyrimas buvo vykdytas dviem metodais: terminiu ir šarminiu būdu.

2.1.3. β -gliukanų išskyrimas terminiu būdu

β -gliukanų išskyrimas terminiu būdu, naudojant karštą vandenį, buvo atliktas pagal modifikuotą Liu ir kt. aprašytą protokolą (Liu et al., 2008). Ląstelių sienelės gautos po autolizės buvo suspenduotos distiliuotame vandenyje ir autoklavuotos 4 val. 121 °C temperatūroje. Vėliau suspensija buvo centrifuguota 10 min prie 5000 × g, supernatantas pašalintas, o ląstelių sienelės plautos tris kartus distiliuotu vandeniu ir išdžiovintos karšto oro

krosnyje 60 °C temperatūroje. Gauta autoklavuotų ląstelių sienelių frakcija buvo suspenduota 50 mL distiliuoto vandens santykiu 10:1 (v/w) ir ardyta ultragarsu ledo vonelėje, siekiant pašalinti prie β-gliukanų prijungtas svetimias molekules bei iš dalies suardyti ilgas β-gliukanų grandines ir sumažinti jų molekulinę masę. Ardymas ultragarsu buvo atliktas naudojant 40 % maksimalaus prietaiso Sonics Vibra-Cell™ (*Newtown, CT, JAV*) galigumo, esant 20 kHz dažniui ir 240 W galiai, 15 min ir susidedantis iš 30 s sonikacijos ir 10 s pauzės ciklo (Liu et al., 2008; Varelas et al., 2016; Xing et al., 2018). Po sonikacijos, nuosėdos buvo surinktos centrifuguojant ir tris kartus perplautos distiliuotu vandeniu po 5 min prie 5000 × g 4 °C temperatūroje. Gautos nuosėdos buvo apdorotos 96 % etanoliumi santykiu 1:4 (w/v) 2 val. 80 °C temperatūroje. Apdorotos organiniu tirpikliu nuosėdos buvo surinktos centrifuguojant 10 min prie 7000 × g 4 °C temperatūroje, plaunamos tris kartus acetonu ir penkis kartus distiliuotu vandeniu. Gauta β-gliukanų frakcija, pavadinta HWN, buvo išdžiovinta karšto oro krosnyje 60 °C temperatūroje, sumalta iki miltelių ir laikoma šaldytuve 4 °C temperatūroje. Gautieji β-gliukanų milteliai buvo analizuojami taikant ATR-FTIR ir ¹³C BMR spektroskopiją (Canteri et al., 2019; Kang et al., 2018; Shokri et al., 2008).

2.1.4. β-gliukanų išskyrimas šarmu

Gautos autolizuotos ląstelių sienelės (žr. 2.1.2.) buvo suspenduotos distiliuotame vandenyje santykiu 10:1 (v/w) ir ardamos ultragarsu ledo vonelėje. Sonikacija atlikta taikant 40 % maksimalaus prietaiso Sonics Vibra-Cell™ (*Newtown, CT, JAV*) galingumo 20 kHz dažniu ir 240 W galia. Poveikio ultragarsu trukmė buvo 30 min, kurią sudarė 45 s sonikacijos ciklas ir 15 s pauzės. Po sonikacijos sienelės buvo perplautos tris kartus distiliuotu vandeniu, o gautos nuosėdos apdorotos 1 M natrio hidroksidu 4 val. 90 °C temperatūroje. Po išskyrimo šarmu gautos nuosėdos, kurias sudarė šarme netirpi β-gliukanų frakcija (pažymėta AN), kuri buvo surinkta centrifuguojant 10 min prie 5000 × g 4 °C temperatūroje, praplauta penkis kartus distiliuotu vandeniu ir išdžiovinta 60 °C temperatūroje džiovinimo krosnyje (Pengkumsri et al., 2016; Shokri et al., 2008; Xing et al., 2018). Gautoji AN frakcija buvo sumalta iki miltelių ir saugota 4 °C šaldytuve. Supernatante likusi vandenyje tirpi β-gliukanų frakcija (pažymėta AWS) buvo išskirta neutralizavus supernatantą 2 M acto rūgštimi, o gautos nuosėdos pašalintos centrifuguojant 10 min prie 7000 × g. Vandenyje tirpi β-gliukanų frakcija buvo precipituojama trimis tūriais etanolio (Liu et al., 2021; Shokri et al., 2008). Precipitatas buvo centrifuguojamas, nuosėdos tirpintos vandenyje ir išdžiovintos 60 °C

temperatūroje, procedūrą kartojant tris kartus. Gالياusiai išdziovinta AWS frakcija buvo sumalta iki miltelių ir saugoma 4 °C temperatūroje. Gautos AN ir AWS frakcijos buvo tirtos taikant ATR-FTIR ir ¹³C BMR spektroskopiją.

2.2. ATR-FTIR spektroskopija

Pažeistojo vidaus atspindžio (ATR) infraraudonųjų spindulių (IR) absorbcijos spektrą išmatavo Vilniaus Universiteto, Fizikos fakulteto, Cheminės fizikos instituto doktorantė Rimantė Bandzevičiūtė (dabar Dr. Rimantė Bandzevičiūtė) FT-IR spektrometru Alpha (*Bruker Optic GmbH, Ettlingen, Vokietija*) su ATR moduliu turinčiu vieno atspindžio deimanto kristalą ir vidinį deuteruoto triglicino sulfato (DTGS) detektorių. ATR-FTIR absorbcijos spektras buvo užrašytas regione nuo 400 cm⁻¹ iki 4000 cm⁻¹ su 4 cm⁻¹ spektro rezoliucija. Kiekvienam bandiniui buvo atlikti 64 skenavimai, gauti jų vidurkiai buvo transformuoti į spektrą. Prieš matavimus ATR kristalas buvo nuvalytas distiliuotu vandeniu, po to etanoliu bei pamatuotas foninis aplinkos oro spektras. Matavimo metu bandinio milteliai buvo užberti ant deimanto ir prispausti, kad mėginys visiškai padengtų deimanto plotą.

Gautas spektras buvo normuotas, pakoreguota bazinė linija naudojant antrojo laipsnio išvestines, rankiniu būdu buvo pridėti papildomi taškai. Tuščiame regione nuo 2700 cm⁻¹ iki 1800 cm⁻¹ buvo įterptas lūžis dėl spektrinės informacijos stokos. Spektro analizė atlikta OriginPro® 2023b (versija 10.05) (*Learning Edition*) programa (*OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*).

2.3. Kietojo kūno branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija

Kietojo kūno BMR matavimus atliko dr. Arūnas Maršalka, Vilniaus Universiteto, Fizikos fakulteto, Cheminės fizikos institute, naudojant Bruker AVANCE III HD spektrometrą (*Bruker Biospin GMBH, Ettlingen, Vokietija*) veikiančiu 400 MHz dažniu ¹H branduoliams. Eksperimentas buvo vykdytas 9,4 T magnetiniame lauke. Visi matavimai magišku kampu (angl. *magic angle spinning, MAS*) atlikti naudojant *Bruker 4 mm H/X CP-MAS* zondo galvą. BMR MAS užregistruoti esant 10 kHz sukimo dažniui, naudojant 4 mm cirkonio rotorių 300 K temperatūroje. ¹³C Larmoro dažnis buvo 100,62 MHz, vidiniu standartu buvo naudotas adamantanas. ¹³C MAS spektras buvo užregistruotas atliekant 1024 skenavimus su 3 s uždelsimu.

BMR spektrai buvo apdoroti Topsin 3.2 programa ir perkelti tolesnei analizei į OriginPro® 2023b (versija 10.05) (*Learning Edition*) (*OriginLab Corporation, Northampton, MA, JAV*). Spektras buvo normuotas, ištaisyta

bazinė linija naudojant antrojo laipsnio išvestines ir rankiniu būdu pridėjus papildomus taškus. Išlyginimas atliktas naudojant kaimynystės vidurkių metodą (angl. *adjacency averaging method measurement smoothing window*). Siekiant išskirti juostų sanklotas 54–110 ppm regione, atitinkančiame angliavandenių C1–C6 anglis, buvo atlikta spektro aproksimacija, panaudojant Levenbergo-Marquardto algoritmą su netiesinėmis Gauso ir Voigto kreivių (Gauso funkcijos ir Lorencio funkcijos konvoliucija) pritaikymo funkcijomis. Minimalus skaičius pagrindinių smailių reikalingų konvergencijai ir eksperimentinio spektro atkurimui, buvo parenkamas rankiniu būdu. Gauso smailės buvo nustatytos ryškiausių rezonansų vietose, o juostų priskyrimas atliktas remiantis literatūros analize (Chakraborty et al., 2021; Geminiani et al., 2022; Hanashima et al., 2014; Kremmyda et al., 2021; Lamon et al., 2023; Saitô and Yokoi, 1989; Zhang et al., 2002). Matematinio ir eksperimentinio rezultatų atitikimo skaičiavimai buvo kartojami tol, kol pasiekė konvergenciją ir χ^2 tolerancijos vertę lygią 10^{-9} . Atitikimo indikatoriais naudotos determinacijos koeficiento R^2 ir šaknies iš vidutinės kvadratinės paklaidos kvadratinės (angl. *root-mean-square error, RMSE*) vertės.

2.4. Dectin-1 ir β -gliukanų dokinimas

2.4.1. β -gliukanų struktūros paruošimas

Skirtingos β -gliukanų struktūros buvo paruoštos pasitelkiant CHARMM-GUI platformos (Jo et al., 2008) glikanų skaitymo ir modeliavimo modulį (Jo et al., 2011; Park et al., 2019). Linijinių β -1,3-gliukanų struktūros buvo sudarytos iš: 5, 7, 9, 11 ir 15 gliukozės monomerų (**β gl3**, **7- β gl3**, **9- β gl3**, **11- β gl3**, **15- β gl3**). Šakotų β -gliukanu karkasu pasirinktas 5 monomerų ilgio β -1,3-gliukanas, o šoninėmis grandinėmis: vieno, dviejų, trijų ir keturių monomerų β -1,6-gliukanai (**β gl3/6(1)**, **β gl3/6(2)**, **β gl3/6(3)**, **β gl3/6(4)**) bei β -1,4-glikozidine jungtimi prijungtomis vieno ir dviejų monomerų ilgio chitino liekana (**β gl3/4(1)** ir **β gl3/4(2)**). Trimačiai struktūrų modeliai buvo optimizuoti molekulinės mechanikos metodu AVOGADRO programa (versija 1.2.0) (Hanwell et al., 2012), energiją sumažinant, taikant MFF jėgos lauką. Trigrandė spiralė buvo sukonstruota ir optimizuota AVOGADRO programa bei gauta iš Dr. Chao He (*School of life sciences, Anhui University, Hefei, Anhui, Kinija*).

2.4.2. β -gliukanų ir Dectin-1 dimero dokinimas

Pelių dimerinio Dectin-1 receptoriaus struktūra (PDB ID: 2CL8) (Brown et al., 2007) buvo paruošta PyMOL programą (versija 2.5.4) (Schrödinger, LLC, 2015). Iš 2CL8 struktūros buvo pašalintos vandens molekulės, jonai ir ligandai, pridėtos trūkstamos aminorūgščių sekos bei vandenilio atomai, o energija sumažinta taikant MMFF94s jėgos lauką. Baltymo sąveikos sritys papildomai identifikuotos CASTp 3.0 (Tian et al., 2018) ir ProteinsPlus (<https://proteins.plus>) (Fährrolfes et al., 2017; Schöning-Stierand et al., 2022, 2020). Ši informacija buvo panaudota formuojant Grid dėžutę su atitinkamomis koordinatėmis, $40 \times 40 \times 30$ Å dydžiu (X, Y, Z), naudojant įprastą 0,375 Å atstumo parametą AutodockTools programoje (Morris et al., 2009). Prijungimui pasirinkta GNINA (versija 1.1) (McNutt et al., 2021; Ragoza et al., 2017), naudojant standartinius programų parametrus, išskyrus padidintą iki 16 išsamumo parametą (angl. *exhaustiveness*). RMSD skaičiavimai buvo atlikti AutoDockTools (*The Scripps Research Institute*, <https://ccsb.scripps.edu/projects/docking>) (Morris et al., 2009). Sąveikos modeliavimas atliktas tarp standaus baltymo ir laisvų ligandų, išskyrus trigrandę β -gliukanų molekulę. Kiekvienos grandinės tyrimas buvo kartotas bent tris kartus.

Baltymo ir ligando vandenilinių ryšių ir hidrofobinių sąveikų vertinimui naudota LigPlot+ (versija 2.2) (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) programa (Laskowski and Swindells, 2011) ir ProteinPlus molekulinio modeliavimo įrankis (Schöning-Stierand et al., 2022). Kiekvienam ligandui buvo atsitiktinai atrinktos konformacijos: su atsitiktiniu šoninių grandinių išsidėstymu sąveikos kišenėje ir β -gliukanų karkaso erdviškai artimos kristalografiškai nustatyta konformacijai. Aminorūgščių liekanų sąveikos su skirtingo ilgio ir šakotumo β -gliukanų konformacijomis duomenys buvo apdoroti Microsoft Office Excel (version 1808) (*Microsoft*, JAV) programa ir pateiktas karštųjų taškų žemėlapis (angl. *heatmap*).

2.5. β -gliukanų ir Dectin-1 molekulių dinamikos simuliacija

Molekulių dinamikos (MD) simuliacijos atliktos naudojant operacinę sistemą Ubuntu Linux (versija 22.04.2 LTS) bei GROMACS (versija 2024.4) (Abraham et al., 2024) programą.

2.5.1. Struktūrų paruošimas

MD simuliacijai su ligandais buvo pasirinkti β -gliukanai sudaryti iš penkių monomerų ilgio karkaso, kadangi dokinimo metu nustatyta, jog tokio ilgio β -gliukanas pilnai patenka į baltymo sąveikos kišenę ir nevyksta sąveikos su kitomis baltymo sritimis. Iš viso buvo atrinkti 5 ligandai: linijinis β -1,3-gliukanas (**β gl3**), šakotas β -1,3/1,6-gliukanas su vieno (**β gl3/6(1)**), dviejų (**β gl3/6(2)**), trijų monomerų (**β gl3/6(3)**) ilgio šonine grandine, bei viena N-acetilglikozamino rūgšties liekana (**β gl3/4(1)**), prijungta β -1,4-glikozidine jungtimi. GROMACS įvesties failai baltymui, ligandams ir baltymo-ligando kompleksams buvo parengti pasitelkiant CHARMM-GUI serverį. Remiantis rentgeno difrakcijos metodu nustatyta eksperimentine struktūra (PDB ID: 2CL8), ligandas buvo modifikuotas su CHARMM-GUI vidiniu glikanų konstravimo moduliu, siekiant atkurti dokinimo metu naudotas konformacijas. Šis modulis taip pat buvo panaudotas atskiram β -gliukanų molekulių konstravimui ir molekulinei dinamikai reikalingų įvesties failų generavimui.

2.5.2. Simuliacijos parametrų nustatymas

MD simuliacijos buvo atliktos naudojant CHARMM36m jėgos lauką. Dectin-1 dimero komplekso su ligandu tirpinimui naudotas TIP3P vandens molekulių modelis. Baltymas su ligandu patalpintas į stačiakampio formos periodinę dėžutę taip, kad tarp toliausiai nuo masės centro esančių molekulės atomų ir dėžutės krašto būtų 10 Å atstumas. CHARMM-GUI automatiškai užpildė dėžutę TIP3P vandeniu bei pridėjo reikiamą kiekį Ca^{2+} bei Cl^- jonų, užtikrinant sistemos neutralumą. Pavyzdinė 5 monomerų ilgio linijinio β gl3 ir dimerinio Dectin-1 komplekso dėžutė buvo $79 \times 79 \times 79$ Å dydžio su 39 pridėtais Ca^{2+} ir 81 Cl^- jonais bei 13 890 TIP3P vandens molekulėmis. Van der Valso tipo sąveikos buvo nustatomas atomų poroms, atstumas tarp kurių buvo ne didesnis nei 12 Å. Cheminių ryšių su vandenilio atomais virpesių eliminavimui buvo panaudotas „LINCS“ algoritmas. Dalelių judėjimo lygtys integruotos „šokinėjančios varlės“ (angl. *leap-frog*) algoritmu su 2 fs (10^{-15} s) integravimo žingsnio trukme. Simuliacijos aplinkos sistemų temperatūra buvo kontroliuojama taikant Bussi-Donadio-Parrinello termostatą. Izobariniame–izoterminiame (NPT) ansamblyje buvo naudojamas Parrinello-Rahman barostatas 1 bar slėgio palaikymui.

Molekulinės dinamikos simuliacijos visoms sistemoms buvo vykdytos keturiais žingsniais: 1) atliekamas energijos minimizavimas sudarytas iš 1000 minimizacijos ciklų; 2) atliekama 0,125 ns NVT simuliacija 300 K

temperatūroje; 3) toliau atliekama 0,05 ns NPT simuliacija; 4) pabaigoje atliekama 100 ns trukmės MD simuliacija, registruojant sistemos dalelių judėjimą (*toliau trajektoriją*) ir išsaugant duomenis kas 1 ns.

2.5.3. Molekulių dinamikos simuliacijų analizės įrankiai

Duomenų analizė buvo atlikta panaudojus vidines GROMACS komandas: *hbond* – vandeniliniai ryšiai, *rms* – šaknis iš vidutinio kvadratinio nuokrypio, *rmsf* – šaknis iš vidutinių kvadratinių svyravimų, *energy* – energija, *gyrate* – sukimosi spindulys (Rg), *sasa* – tirpikliui prieinamas paviršiaus plotas. Laisvai ryšymosi energijai apskaičiuoti buvo panaudotas *gmx_MMPBSA* (Valdés-Tresanco et al., 2021) įrankis ir du integruoti metodai: molekulinė mechanika su generalizuota Borno elektrostatika ir paviršiaus ploto hidrofobine pataisa (MM/GBSA) ir molekulinė mechanika su Puasono-Bolcmano (orig. *Poisson-Boltzmann*) elektrostatika ir paviršiaus ploto hidrofobine pataisa (MM/PBSA). *gmx_MMPBSA* laisvos energijos skaičiavimams naudoja lygtį:

$$\Delta G_{\text{prisijungimo}} = \Delta G_{\text{komplekso}} - \Delta G_{\text{receptorius}} - \Delta G_{\text{ligando}} \quad (2.1)$$

Kiekvienos sistemos laisvoji energija apskaičiuojama:

$$\Delta G_x = \Delta E_{MM} + \Delta G_{\text{solv}} - T\Delta S \quad (2.2)$$

kur:

- ΔE_{MM} – molekulinės mechanikos energija vakuume;
- ΔG_{sol} – solvatacijos energija;
- $-\Delta TS$ – entropija po ligando prisijungimo.

Molekulinės mechanikos energija išreiškiama:

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdW}} + \Delta E_{\text{vidinė}} \quad (2.3)$$

kur:

- ΔE_{ele} – elektorstatinės sąveikos energija;
- ΔE_{vdW} – van der Valso sąveikos energija;
- $\Delta E_{\text{vidinė}}$ – ryšių, kampų ir dvikampių (angl. *dihedral*) energijų suma.

Solvatacijos energija apskaičiuojama:

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{polin\acute{e}} + \Delta G_{nepolin\acute{e}} \quad (2.4)$$

kur:

- $\Delta G_{polin\acute{e}}$ – polin\acute{e} solvatacijos energija, apskaičiuojama Puasono-Bolemano arba generalizuoto Borno modeliais;
- $\Delta G_{nepolin\acute{e}}$ – nepolin\acute{e} solvatacijos energija, paprastai vertinama tirpiklio prieinamo paviršiaus plotą (angl. *Solvent Accessible Surface Area, SASA*).

100 ns trajektorijų aprašomoji statistika buvo atlikta Microsoft Excel (version 1808), apskaičiuojant analizuotų duomenų vidurkius ir standartinius nuokrypius. Reminatis gautais rezultatais, diagramos ir paveikslai buvo sukurti naudojant OriginPro® 2023b (v10.05) (*Learning Edition*), Microsoft Excel (v1808) bei PyMOL (v2.5.4) programas.

3. REZULTATAI

3.1. β -gliukanų frakcijų išeiga

Šiame darbe β -gliukanai buvo išskirti iš mielių *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii*, *C. lusitaniae* taikant du metodus: šarminį ir terminį (karšto vandens). Iš kiekvienos mielių rūšies buvo gautos trys β -gliukanų frakcijos. Po išskyrimo terminiu būdu buvo gauta vandenyje netirpi frakcija – HWN, po išskyrimo šarmu buvo gautos dvi frakcijos: vandenyje tirpi – AWS, bei šarme ir vandenyje netirpi – AN frakcija. Kad įvertinti β -gliukanų išeigą, gautų po išskyrimo, frakcijos buvo pasvertos ir svoris palygintas su mielių sausa biomase bei autolizuotų mielių sausa mase (**3.1 lentelė**), laikant, kad po autolizės pašalinti visi viduląsteliniai komponentai, o likusi dalis sudarė tik ląstelės sienelė. Šarminio išskyrimo metu atskira AN ir AWS frakcijų išeiga pateikta **3.2 lentelėje**.

3.1 lentelė. β -gliukanų išeiga po terminio ir šarminio mielių ląstelių apdoravimo. Procentinė dalis nuo užaugintų ląstelių (L) ir ląstelių sienelės (LS) svorio.

Mielės	Terminis		Šarminis	
	% nuo L	% nuo LS	% nuo L	% nuo LS
<i>S. cerevisiae</i>	25,6 ± 2,4	53,8 ± 2,5	13,8 ± 1,7	41,6 ± 3,0
<i>C. guilliermondii</i>	24,8 ± 1,9	46,4 ± 2,0	22,8 ± 0,2	47,0 ± 1,5
<i>C. lusitaniae</i>	20,2 ± 2,7	37,4 ± 2,4	25,0 ± 2,4	42,3 ± 2,1

Pateiktos suvidurkintos trijų pakartojimų vertės; ± standartinis nuokrypis

3.2 lentelė. Šarmu išskirtų β -gliukanų AN ir AWS frakcijų išeiga. Procentinė dalis nuo užaugintų ląstelių (L) ir ląstelių sienelės (LS) svorio.

Mielės	AN frakcija		AWS frakcija	
	% nuo L	% nuo LS	% nuo L	% nuo LS
<i>S. cerevisiae</i>	5,4 ± 0,5	16,3 ± 1,1	8,4 ± 1,4	25,3 ± 3,3
<i>C. guilliermondii</i>	10,0 ± 2,3	27,3 ± 3,0	9,6 ± 1,4	19,7 ± 3,0
<i>C. lusitaniae</i>	13,2 ± 1,5	16,9 ± 3,5	15,0 ± 1,4	25,4 ± 2,0

AN – šarme ir vandenyje netirpi, AWS – vandenyje tirpi frakcija

Pateiktos suvidurkintos trijų pakartojimų vertės; ± standartinis nuokrypis.

Mažiausias terminiu būdu išskirtų β -gliukanų (HWN) kiekis lyginant su ląstelių svoriu ir ląstelių sienelių svoriu buvo išskirtas iš mielių *C. lusitaniae* ir atitinkamai sudarė 20,2 % ± 2,7 % bei 37,4 % ± 2,4 %. Iš mielių *S. cerevisiae* ir *C. guilliermondii* terminiu būdu išskirtų β -gliukanų kiekis lyginant su ląstelių svoriu buvo panašus – apie 25 %. Tačiau lyginant iš *Candida* mieliagybių ir *S. cerevisiae* gautų HWN frakcijos β -gliukanų kiekį su ląstelių

sienelių svorių, daugiausia, beveik 54 % buvo gauta iš *S. cerevisiae*, mažiau – apie 46 % iš *C. guilliermondii*.

Šarminiu būdu išskirtų β -gliukanų iš *S. cerevisiae* ląstelių išėiga lyginant su ląstelių svoriu buvo mažiausia tarp tirtų mielių ir beveik dvigubai mažesnė nei išskyrimas terminiu būdu ir siekė 13,8 % \pm 1,7 %. Tačiau lyginant su ląstelių sienelių svoriu skirtumas nebuvo toks didelis ir išėiga sudarė 41,6 % \pm 3,0 %. *C. guilliermondii* terminiu ir šarminiu būdais gautų β -gliukanų kiekis buvo panašus – apie 47 % nuo užaugintų ląstelių ir ląstelių sienelių svorio. Šarminiu būdu išskirtų β -gliukanų iš *C. lusitaniae* procentinė dalis nuo užaugintų ląstelių sudarė 25,0 % \pm 2,4 % ir ląstelių sienelės svorio 42,3 % \pm 2,1 %.

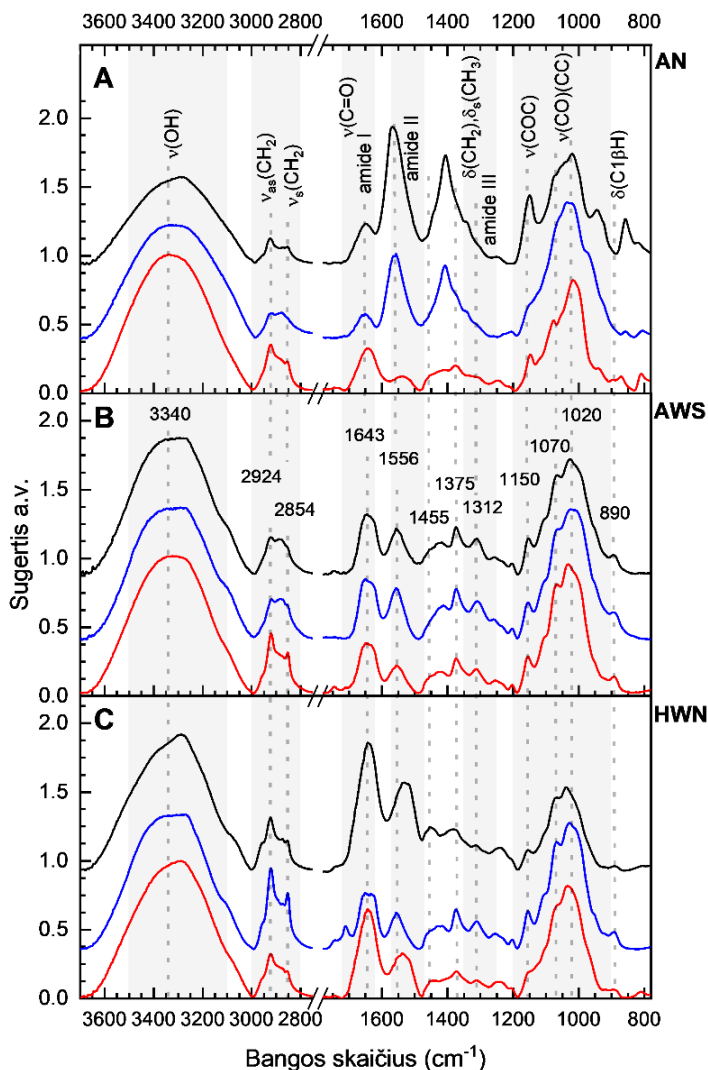
Mažiausias šarminiu būdu išskirtų AN ir AWS frakcijų kiekis lyginant su ląstelių svoriu buvo gautas iš *S. cerevisiae*, didžiausias – iš *C. lusitaniae*. Iš *S. cerevisiae* išskirtų AN frakcijos β -gliukanų procentinė dalis lyginant su ląstelių svoriu sudarė 5,4 % \pm 0,5 %, AWS frakcijos – apie 8 %. Iš *C. guilliermondii* išskirtų AN ir AWS frakcijų β -gliukanų procentinė dalis lyginant su ląstelių svoriu sudarė apie 10 %. Iš *C. lusitaniae* išskirtų AN frakcijos β -gliukanų procentinė dalis lyginant su ląstelių svoriu sudarė apie 13 %, AWS frakcijos – apie 15 %.

Didžiausia procentinė dalis lyginant šarmu išskirtų AN frakcijų β -gliukanų išėiga su ląstelių sienelių svoriu buvo gauta iš *C. guilliermondii* ir sudarė apie 27 %. Iš *S. cerevisiae* bei *C. lusitaniae* šarmu išskirtų AN frakcijų β -gliukanų išėiga lyginant su ląstelių sienelių svoriu sudarė maždaug po 16 %. Lyginant AWS frakcijų išėigą, β -gliukanų procentinė dalis lyginant su ląstelių sienelės svoriu *C. guilliermondii* atveju sudarė apie 20 %, o *S. cerevisiae* bei *C. lusitaniae* maždaug po 25 %.

β -gliukanai ląstelės sienelėje sudaro iki 60 % jos sausos masės, tačiau pati ląstelės sienelė sudaro iki 30 % sausos ląstelės masės, todėl teorinė β -gliukanų išėiga, lyginant su ląstelių svoriu, neturėtų būti didesnė nei 18 %. Iš visų frakcijų tik AN gauta iš *S. cerevisiae* patenka į šias ribas, todėl galime daryti prielaidą, kad β -gliukanai gauti iš kitų frakcijų turi didesnę kiekį priemaišų.

3.2. β -gliukanų ATR-FTIR spektro analizė

Iš mielių išskirtos terminiu ir šarminiu būdais β -gliukanų frakcijos buvo tiriamos pažeistojo visiško vidaus atspindžio (angl. *attenuated total reflection* – *ATR*) infraraudonųjų spindulių spektroskopijos metodu. Skirtingų β -gliukanų frakcijų ATR-FTIR sugerties spektrai pateikti **3.1 paveiksle**.



3.1 pav. Skirtingų β -gliukanų frakcijų ATR-FTIR spektrai su atliktu spektrų normavimu ir bazinės linijos korekcija. A – šarminiu būdu išskirta netirpi (AN) frakcija, B – šarminiu būdu išskirta tirpi (AWS) frakcija, C – terminiu būdu išskirta netirpi (HWN) frakcija; juodos spalvos spektras – *C. guilliermondii*, mėlynos spalvos – *C. lusitaniae*, raudonos spalvos – *S. cerevisiae*.

Analizuojant ATR-FTIR sugerties spektrą, išskiriamos kelios svarbios sugerties sritys. Pirmoji, nuo 3600 cm^{-1} iki 2600 cm^{-1} būdinga OH ryšiui, kurioje taip pat galima išskirti N–H ir C–H ryšiams būdingas sritis atitinkamai nuo 3500 cm^{-1} iki 3100 cm^{-1} ir nuo 3000 cm^{-1} iki 2800 cm^{-1} . Kelios sritys būdingos amidams ties $1720\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$, $1570\text{--}1470\text{ cm}^{-1}$ ir $1350\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$

(Bzducha-Wróbel et al., 2014; Hong et al., 2021; Yuan et al., 2019). Angliavandeniams būdinga sritis specifiška C–O–C ir C–O ryšiams yra išsidėsčiusi srityje nuo 1200 cm^{-1} iki 900 cm^{-1} ir vadinama „pirštų atspaudų sritimi“ (Climova et al., 2021; Fusté et al., 2019; Gieroba et al., 2020; Liu et al., 2022).

Literatūroje skelbiamų β -gliukanams būdingų spektrinių sričių intensyvumas stebimas ties 3000–3500 cm^{-1} , 2800–3000 cm^{-1} , 1700–1600 cm^{-1} , bei 890 cm^{-1} ir „pirštų atspaudų sritimi“, kurios atitinkamai yra būdingos –OH (hidroksilo grupei), C–H (alkilų C–H valentiniai virpesiai), C=O (karbonilo grupei), bei β -glikozidiniam ryšiui, C–H deformacijai ir C–O–C ir C–O ryšių valentiniais virpesiams (Gonzaga et al., 2013; Kędzierska-Matysek et al., 2018; Suraiya et al., 2024). β -1,3-gliukanams būdingos spektrinės juostos stebimos ties 2920 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} , 1023 cm^{-1} ir 890 cm^{-1} (Klähn et al., 2005; Ruiz-Herrera and Ortiz-Castellanos, 2019; Suraiya et al., 2024; Synytsya et al., 2023; Thanardkit et al., 2002).

Pirštų atspaudų srityje išsidėsčiusios persidengiančios juostos apsunkina spektro analizę. Vis dėl to, β -1,3-glikozidiniam ryšiui būdinga anomerinė angliavandenių spektrinė juosta ties 890 cm^{-1} , kuri turi stipriausią intensyvumą šarmu išskirtoje, tirpių β -gliukanų frakcijoje AWS. Šią juostą taip pat matome ir frakcijoje išskirtoje terminiu būdu (HWN). Šarmu išskirtoje netirpių β -gliukanų frakcijoje ši sugerties juosta turi labai mažą intensyvumą *S. cerevisiae* mėginyje ir yra užmaskuota *Candida* β -gliukanų spektruose šalia esančios juostos, ties 860 cm^{-1} ir 944 cm^{-1} .

Netirpių, šarminiu būdu išskirtos AN frakcijos β -gliukanai, ypač *C. guilliermondii*, išsiskiria nuo kitų spektrine juosta ties 860 cm^{-1} , kuri yra siejama su C–H lenkimo ir deformaciniais virpesiais ir šiuo atveju rodo mėginio užterštumą. Spektrinė juosta šalia 1023 cm^{-1} randama visuose mėginiuose su nedideliais poslinkiais, kas gali būti dėl to, kad ATR-FTIR spektroskopijos rezoliucija yra nuo 4 cm^{-1} iki 8 cm^{-1} arba dėl galimų struktūrinių skirtumų ir kitų molekulių. AN, AWS ir HWN frakcijų β -gliukanų C–O ir C–O–C valentiniai virpesiai atitinkamai stebimos prie 1020 cm^{-1} ir 1075 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} ir 1069 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} ir 1071 cm^{-1} . Polisacharidų C–O–C glikozidinio ryšio valentiniai virpesiai ties 1150 cm^{-1} matomos visuose išskirtuose mėginiuose, tačiau labiausiai išsiskiria AN frakcijos β -gliukanai iš AN *C. guilliermondii*, kurios intensyvumas yra didžiausias iš visų frakcijų. CH_3 deformacijai ir CH_2 virpesiams priskiriama 1373 cm^{-1} juosta išreikšta visuose mėginiuose, išskyrus AN frakcijos β -gliukanus iš *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii*, kuriuose ji persidengia su spektrine juosta ties 1405 cm^{-1} . Kitos CH_2 grupei būdingos juostos ties

2924 cm^{-1} ir 2854 cm^{-1} matomos visose frakcijose. Šių juostų intensyvumas tarp lygintų β -gliukanų frakcijų yra mažiausias *Candida* AN β -gliukanų frakcijose ir didžiausias – HWN *C. lusitaniae* frakcijoje. Mažas 2924 cm^{-1} ir 2854 cm^{-1} spektrinių juostų intensyvumas yra būdingas polisacharidams (Suraiya et al., 2024). Visi β -gliukanų spektrai pasižymi plačia juosta srityje nuo 3600 cm^{-1} iki 3000 cm^{-1} , kuri būdinga O–H ryšio valentiniams virpesiams dėl didelio kiekio hidroksilo grupių. Juostos centras dažniausiai randasi ties 3340–3420 cm^{-1} , tačiau smailės ties 3260 cm^{-1} gali reikšti chitino N–H ryšio valentinius virpesius (Zhu et al., 2018). Šios srities smailėjimas stebimas AN ir AWS frakcijų β -gliukanuose išskirtose iš *C. guilliermondii*, AWS frakcijos β -gliukanų iš *C. lusitaniae* bei HWN frakcijų visų mielių β -gliukanų spektruose. Kitos chitinui būdingos juostos matomos visuose mėginiuose ir yra išsidėsčiusios amidų srityje bei persidengia su baltymų juostomis. Juostos ties 1649 cm^{-1} , ~1550 cm^{-1} , ~1315 cm^{-1} bei 1375 cm^{-1} yra atitinkamai būdingos chitino C=O, N–H, C–N bei N-acetyl –CH₃ grupėms (Adeosun et al., 2019; Poerio et al., 2021; Šandula et al., 1999). Juostos ties 1568 cm^{-1} , 1556 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} taip pat gali priklausyti chitinui (Byrtusová et al., 2020; Hong et al., 2021). Didelis intensyvumas HWN frakcijos *Candida guilliermondii* ties 1643 cm^{-1} ir 1535 cm^{-1} taip pat buvo priskirtas chitinui. Kitos chitino juostos persidengia su β -gliukanų juostomis ir yra plačioje O–H ryšio valentinių virpesių srityje nuo 3400 cm^{-1} iki 3200 cm^{-1} (Lozano et al., 2017; Piotrowska and Masek, 2015; Zhang et al., 2017).

Mielių β -gliukanai pasižymi β -1,3-glikozidine jungtimi sujungtu karkasu ir β -1,6-glikozidine jungtimi prijungtomis trumpomis šoninėmis grandinėmis. Dėl spektrinių juostų sanklotos įvertinti ir atskirti β -1,6-gliukanų kiekį nėra įmanoma. β -1,6-gliukanams ir mananams būdingos juostos randamos ties 920 cm^{-1} ir 911 cm^{-1} (Galichet et al., 2001; Thanardkit et al., 2002). Kita būdinga β -1,6-gliukanų spektrinė juosta yra ties 1730 cm^{-1} (Thanardkit et al., 2002), tačiau mūsų frakcijose jos nepastebėta. Ši juosta gali būti klaidingai interpretuojama kaip juosta ties 1743 cm^{-1} , kuri reiškia C=O ryšio valentinius virpesius ir paprastai priskiriama lipidams (Byrtusová et al., 2020; Zimmermann et al., 2015), tačiau, remiantis kitais autoriais, gali būti priskiriama ir chitinui (Ami et al., 2013; Hong et al., 2021; Lozano et al., 2017; Stagner et al., 2019).

Visų frakcijų β -gliukanai pasižymi β -1,3-gliukanams būdinga struktūra ir turi chitino priemaišų. Mažiausiu priemaišu kiekiu pasižymi AN frakcijos β -gliukanai išskirti iš *S. cerevisiae*. Potencialiai išskirti polisacharidai gali turėti ir baltymų priemaišų, tačiau dėl stipraus chitino ir baltymų juostų persidengimo, galutinės išvados apie baltymų buvimą padaryti negalime.

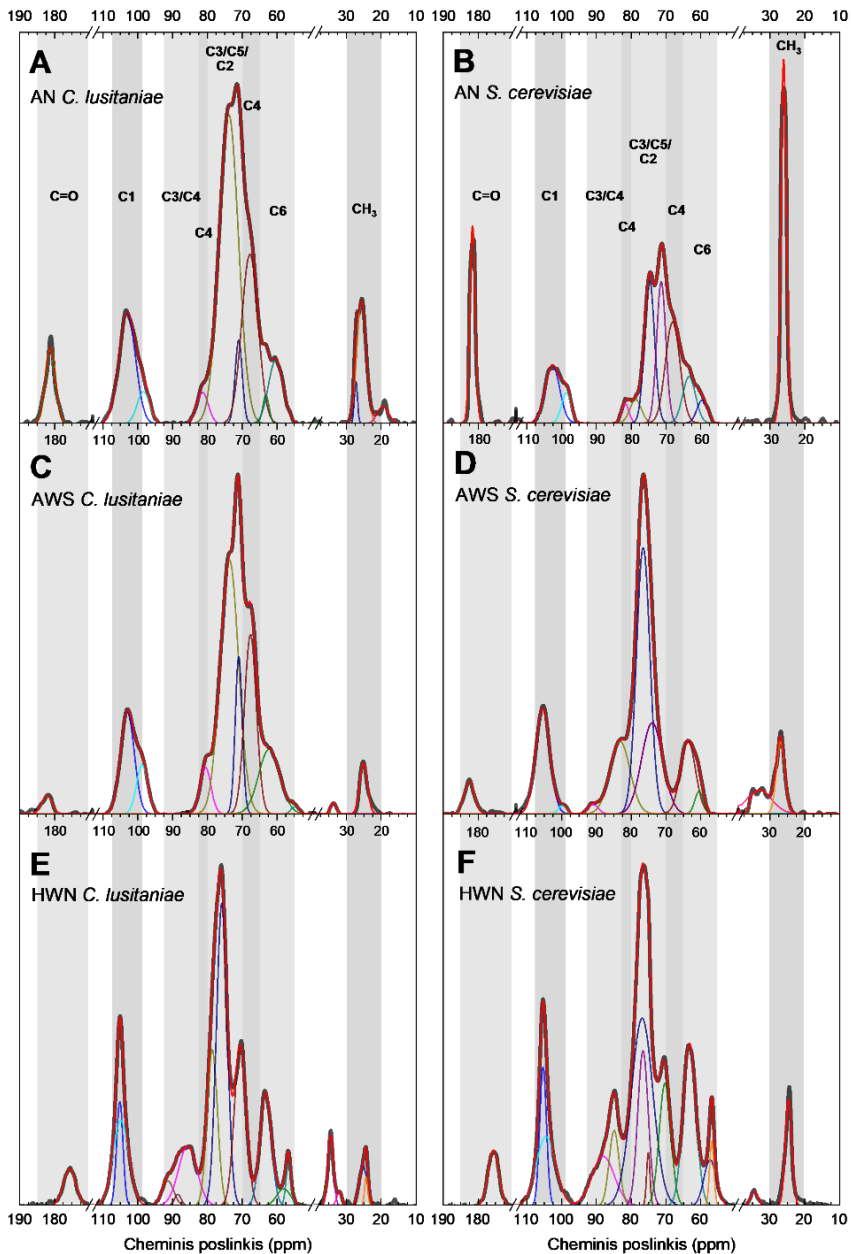
C. guilliermondii AN ir HWN frakcijų spektrų skirtumus galėjo lemti išskyrimo klaidos, kurie galėjo lemti didesnę kiekį priemaišų šiose frakcijose. Gauti duomenys koreliuoja su apskaičiuota β -gliukanų išėiga.

3.3. β -gliukanų ^{13}C BMR spektro analizė

BMR spektrai buvo registruoti β -gliukanų frakcijoms išskirtoms iš mielių *Saccharomyces cerevisiae* ir *Candida lusitanae*. Pagrindinės β -gliukanams būdingos spektrinės sritys yra C1 anglies cheminiai poslinkiai nuo 105 ppm iki 99 ppm, C3 būdinga plati sritis nuo 92 iki 82 ppm, C6 anglies ir chitino cheminiai poslinkiai regione tarp 68 ppm ir 55 ppm (Kang et al., 2018; Saitō and Yokoi, 1989). β -gliukanų ir kitų polisacharidų anglies spektrinių juostų sanklota, ypač C2, C3, C5 anglies atomų, lemia sunkumus analizuojant ir interpretuojant gautus rezultatus. Tačiau BMR spektro aproksimacija iš dalies leido nustatyti paslėptas spektrines juostas ir simuliuoti individualias C1–C6 anglių spektrines juostas svarbiame regione nuo 50 ppm iki 110 ppm. Atlikta aproksimacija visiems gautiems spektrams (**3.2 pav.**) buvo pasiekta aukštu tikslumu, vertinant determinacijos koeficientą R^2 ir šaknies iš vidutinės kvadratinės paklaidos (RMSE) reikšmes (**3.3 lentelė**), kurios rodo gerą matematinio bei eksperimentinio spektrų sutapimą (Gan et al., 2020).

3.3 lentelė. Skirtingų β -gliukanų frakcijų spektrinių duomenų aproksimavimo Gauso funkcijomis kokybės įverčiai: determinacijos koeficientas (R^2) ir šaknies iš vidutinės kvadratinės paklaidos (RMSE). AN – išskirta šarmu netirpi frakcija, AWS – išskirta šarmu vandenyje tirpi frakcija, HWN – išskirta terminiu būdu netirpi frakcija.

Frakcija \ Kokybės įverčiai	R^2	RMSE
AN <i>C. lusitanae</i>	0,9985	0,0066
AN <i>S. cerevisiae</i>	0,9867	0,0140
AWS <i>C. lusitanae</i>	0,9987	0,0056
AWS <i>S. cerevisiae</i>	0,9986	0,0051
HWN <i>C. lusitanae</i>	0,9985	0,0055
HWN <i>S. cerevisiae</i>	0,9981	0,0069



3.2 pav. Skirtingų β -gliukanų frakcijų eksperimentiniai ^{13}C BMR spektrai ir jų aproksimavimas naudojant Gauso funkcijas. Paryškintas pilkos spalvos spektras – eksperimentinis, raudonas – suminės aproksimacijos, kitomis spalvomis – atskirų spektrinių juostų Gauso aproksimacijos. β -gliukanų frakcijos: AN – išskirta šarmu netirpi, AWS – išskirta šarmu vandenyje tirpi, HWN – išskirta terminiu būdu netirpi.

β -gliukanams ir chitinui būdingų C1–C6 anglies ir kitų atomų cheminiai poslinkiai aproksimuotuose spektruose buvo priskirti remiantis literatūros analize (**3.4 lentelė**) (Aimanianda et al., 2017; Kang et al., 2018; Lowman et al., 2011; Morales et al., 2020; Usui et al., 1975). β -gliukanų ir chitino anglies atomų spektrinės juostos persidengia daugelyje diapozonų, tačiau yra išskiriamos kelios chitinui bei β -1,6-gliukanams būdingos juostos, kurios leidžia įvertinti šių molekulių buvimą β -gliukanų mėginiuose. Gauti spektrai yra tipiniai β -1,3-gliukanams su šoninėmis β -1,6-glikozidine jungtimis prijungtomis šoninėmis grandinėmis ir chitinu.

3.4 lentelė. Anglies atomams priskirtos cheminio poslinkio vertės skirtingų β -gliukanų frakcijų ^{13}C BMR spektruose, aproksimuotuose taikant Gauso funkciją. AN – išskirta šarmu netirpi frakcija, AWS – išskirta šarmu vandenyje tirpi frakcija, HWN – išskirta terminiu būdu netirpi frakcija, CL – išskirta iš *Candida lusitanae*, SC – išskirta iš *Saccharomyces cerevisiae*, p – persidengimas su kitomis juostomis.

Frakcija Atomas	AN CL	AN SC	AWS CL	AWS SC	HWN CL	HWN SC
C=O	181,2	181,5	182,2	182,4	175,6	175,5
C1	103,0	102,5	102,9	105,2	105,2/104,8	105,2/104,3
C1 (anom.)	98,3	98,5	98,7	99,5	-	-
C2	73,8	74,5	73,6	73,9	75,8	76,4/74,9
C3	-	-	-	90,8	91,3/88,5/ 85,6	87,8/ 84,7
C3	81,3	81,5	80,4	83,0	-	-
C4	70,9	71,1	70,9	p	70,5	70,0
C5	p	78,5	p	76,3	78,5	76,6
C6 (β -1,6)	67,7	67,8	67,5	p	-	-
C6 (β -1,3)	63,1	63,1	62,1	63,4	63,2	63,0
C6 (β -1,4)	60,2	59,4	p	60,2	58,0	57,1
C2 (β -1,4)	-	-	54,8	-	56,6	56,6
CH ₃	27,2/25,5	25,9	25,0	26,8	25,1/24,2	24,5
Priemaišos	19,4	-	33,6	37,0/32,9	34,4/32,0	34,3

Visų frakcijų anomerinio C1 anglies atomo spektrinės juostos randasi srityje tarp 102 ppm ir 107 ppm, kas patvirtina β -glikozidinių ryšių buvimą. Ši sritis yra būdinga β -1,3-gliukanams ir chitinui. Kita C1 anomerinio anglies atomo sritis tarp 99 ppm ir 97 ppm gali būti priskirta terminalinei gliukozei arba būti susijusi su alternatyviomis β -gliukanų konformacijomis. Taip pat, ši sritis persidengia su α -gliukanams būdinga sritimi, randama tarp 102 ppm ir 98 ppm. C1 anglies spektrinės juostos yra specifinės šarmu išskirtoms β -

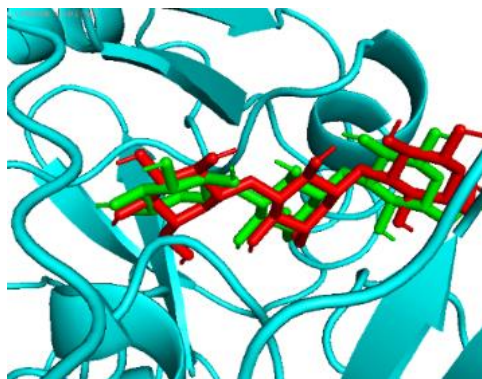
gliukanų frakcijoms, kas gali rodyti struktūrinius molekulių skirtumus, priklausomus nuo išskyrimo būdo. Linijiniams β -gliukanams būdinga C3 anglies atomo sritis tarp 92 ppm ir 82 ppm matoma terminiu būdu išskirtoje β -gliukanų frakcijoje. Šarminiu būdu išskirtų β -gliukanų kitas C3 signalas priskirtas sričiai tarp 83 ppm ir 80 ppm. Sritis tarp 80 ppm ir 70 ppm priskiriama C2, C3, C4 ir C5, o sritis tarp 70 ppm ir 60 ppm – C6 anglies atomams. Priklausomai nuo išgaunamų β -gliukanų šakotumo, skirtumai ypač matomi C6 būdingoje srityje. Dėl stipraus juostų persidengimo būna sudėtinga atskirti individualias C2, C3, C4 ir C5 juostas, todėl AN CL ir AWS CL frakcijose atitinkamos juostos ties 81,3 ppm ir 80,4 ppm yra priskirtos C3 ir C5 anglies atomams. AWS SC frakcijoje nepavyko apskaičiuoti individualios C4 juostos, kadangi ji persidengia su C2 juosta ties 73,9 ppm. BMR spektrų C6 juostos leidžia nustatyti, kad visos frakcijos turi β -1,3-gliukanų, pagal priskirtą juostą ties ~63 ppm. Šarmu išskirtose frakcijose yra β -1,6-glikozidiniam ryšiui būdingų juostų ~67-68 ppm srityje, išskyrus AWS SC frakciją, kurioje šios juostos nėra, kas galėtų reikšti mažą kiekį β -1,6-gliukanų arba jų nebuvimą. Terminiu būdu išskirtose frakcijose β -1,6-glikozidiniam ryšiui būdingų juostų taip pat nėra. Chitino arba kitų β -1,4-gliukanams C6 anglies būdinga juosta randasi maždaug ties 60 ppm ir randama visose frakcijose. Kita β -1,4-glikozidinio ryšio C2 anglies atomui būdinga juosta randasi maždaug ties 56 ppm ir randama AWS CL bei terminiu būdu išskirtose frakcijose. Vertinant β -1,4-glikozidiniam ryšiui būdingas sritis, svarbu atkreipti dėmesį į karbonilo (C=O) ir metilo (CH₃) grupių juostas, atitinkamai 185-170 ppm ir 30-20 ppm srityse. Kadangi visų frakcijų mėginiai turi šias juostas, galima daryti išvadą, kad skirtingais būdais išskirti β -gliukanai turi chitino priemaišų. Šarminiu būdu išskirtų netirpios frakcijos β -gliukanų chitino juostų intensyvumas yra didesnis, lyginant su kitomis frakcijomis, atitinkamai ir chitino kiekis šiose frakcijose yra didesnis, kas galėtų paaiškinti jų netirpumą vandeniniuose tirpaluose. Nors baltymams būdingų juostų ties 160-110 ppm nėra, visgi visos frakcijos pasižymi nedideliu kiekiu baltymų, lipidų ar kitų molekulių priemaišų dėl esamų juostų šalia 34 ppm.

Iš mielių išskirtų skirtingų frakcijų molekulės, pagrinde yra β -1,3-gliukanai su β -1,6-glikozidine jungtimi prijungtomis šoninėmis grandinėmis, chitinu ir nedidelėmis priemaišomis baltymų, lipidų ar kitų molekulių. Skirtingais metodais ir iš skirtingų mielių išskirti β -gliukanai pasižymi tam tikrais spektrinių juostų ir jų intensyvumo skirtumais. Vertinant karbonilo ir metilo grupių juostų intensyvumą, panašu, kad β -gliukanai išskirti iš mielių *S. cerevisiae* turi šiek tiek didesnę chitino kiekį, lyginant su *C. lusitaniae*.

Tačiau turimų duomenų nepakanka, kad šiuos skirtumus būtų galima įvardinti kaip rūšiai būdingus.

3.4. β -gliukanų ir Dectin-1 dimero sąveikos modeliavimas

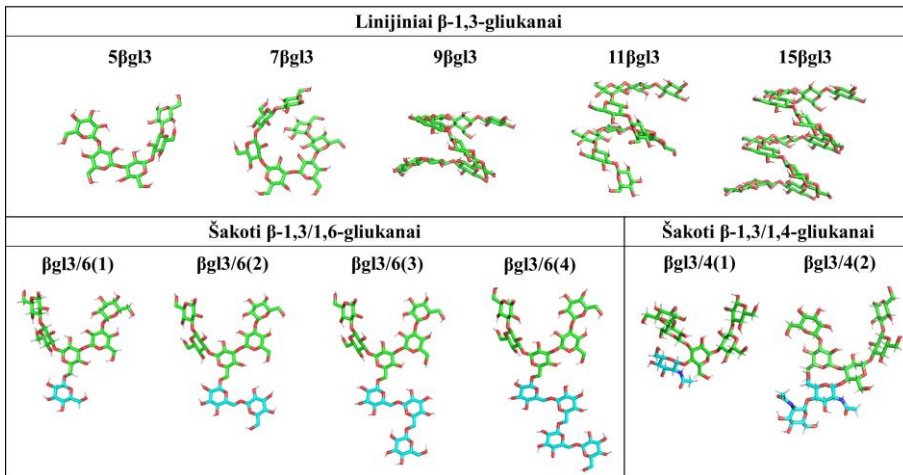
Validavimo etape buvo paskaičiuotas RMSD nuokrypis tarp kristalografiškai nustatyto ligando – trimerinio β -1,3-gliukano ($3\beta\text{gl3}$) molekulės, prisijungimo konformacijos ir tarp to paties ligando, dokinto su GNINA (v1.1). Geriausias prijungimo rezultato, labiausiai panašaus į kristalografinę prisijungimo konformaciją RMSD buvo lygus 1,318 Å (**3.3 pav.**).



3.3 pav. Dectin-1 dimero ir trimerinio β -1,3-gliukano ($3\beta\text{gl3}$) molekulinio dokimo GNINA programa gauta geriausia ligando konformacija (žalia spalva), kurios RMSD nuokrypis nuo kristalografinės konformacijos (raudona spalva) yra 1,318 Å.

Toliau buvo atliktas modeliavimas su skirtingo ilgio ir šakotumo β -gliukanais (**3.4 pav.**). Linijinių β -1,3-gliukanų (βgl3): 5, 7, 9, 11 ir 15 gliukozės monomerų ilgio ($5\beta\text{gl3}$, $7\beta\text{gl3}$, $9\beta\text{gl3}$, $11\beta\text{gl3}$, $15\beta\text{gl3}$), bei šakoto lankstaus ligando sąveikos su standžiu baltymu modeliavimas. β -gliukanų su šoninėmis grandinėmis sąveikos vertinimui buvo pasirinktas 5 monomerų ilgio β -1,3-gliukano karkasas. Šakotos molekulės šoninė grandinė pasirinktos: β -1,6-glikozidine jungtimi sujungtos vieno ($\beta\text{gl3}/6(1)$), dviejų ($\beta\text{gl3}/6(2)$), trijų ($\beta\text{gl3}/6(3)$) ir keturių ($\beta\text{gl3}/6(4)$) gliukozės monomerų ilgio molekulės bei β -1,4-glikozidiniu ryšiu prijungtos vieno ($\beta\text{gl3}/4(1)$) ir dviejų ($\beta\text{gl3}/4(2)$) monomerų ilgio N-acetilgliukozamino molekulės.

Mažiausiai trys konformacijos atrinktos kiekvienam ligandui, apskaičiuoti jų VINA ir CNN (angl. *Convolutional Neural Network*) afiniškumo vidurkiai, o vertės pateiktos **3.5 lentelėje**.



3.4 pav. Molekuliniame dokinime ir MD simuliacijose naudotų β -gliukanų modeliai, sudaryta naudojant CHARMM GUI platformą. Žalia spalva – karkasas, mėlyna spalva – šoninė grandinė.

3.5 lentelė. Skirtingo ilgio ir šakotumo β -gliukanų Vina afiniškumo (kcal/mol) ir CNN afiniškumo (pKd) vertės, gautos atlikus jų molekulinį dokinimą prie Dectin-1 receptoriaus dimero GNINA programa (versija 1.1).

Ligandas	Vina afiniškumas (kcal/mol)	CNN afiniškumas (pKd)
lankstus linijinis β-1,3-gliukanas		
validavimas (3 β gl3)	-9,9	3,8
5 β gl3	-11,4 \pm 0,5	4,3 \pm 0,1
7 β gl3	-11,6 \pm 0,4	4,5 \pm 0,3
9 β gl3	-11,5 \pm 0,2	4,6 \pm 0,1
11 β gl3	-11,1 \pm 0,3	4,6 \pm 0,2
15 β gl3	-10,3 \pm 1,3	4,7 \pm 0,4
lankstus 5 monomerų ilgio šakotas β-1,3-gliukanas		
β gl3/6(1)	-12,9 \pm 0,4	4,8 \pm 0,2
β gl3/6(2)	-12,8 \pm 0,1	4,7 \pm 0,3
β gl3/6(3)	-12,9 \pm 0,4	4,7 \pm 0,2
β gl3/6(4)	-13,3 \pm 0,4	4,8 \pm 0,3
β gl3/4(1)	-12,1 \pm 0,2	4,8 \pm 0,1
β gl3/4(2)	-12,0 \pm 0,1	4,8 \pm 0,2

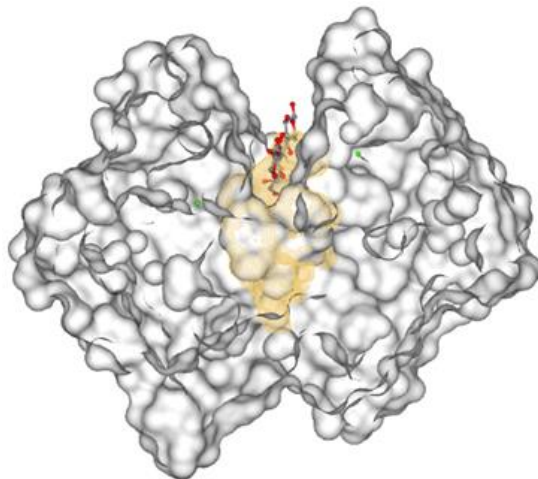
Vertės suvidurkintos iš trijų pakartojimų, naudojant atsitiktinai atrinktas konformacijas; \pm standartinis nuokrypis

Molekulinio dokinimo metu buvo gauti du skirtingi afiniškumo rodikliai. Vina afiniškumas ar tarpmolekulinės sąveikos energija apskaičiuojamas naudojant supaprastintą jėgų lauko (angl. *force-field*) modelį ir vertina van der

Valso sąveikas, vandenilinius ryšius, elektrostatinę bei hidrofobinę sąveikas ir parodo sąveikos tendenciją. CNN afiniškumo vertės gaunamos naudojant giliojo mašininio mokymosi modelį, apmokyta su kristalinėmis baltymo-ligando kompleksų struktūromis.

Lyginant tarpusavyje skirtingo ilgio linijinių β -gliukanų afiniškumą, pastebėjome, kad didžiausias nuspėjamų verčių skirtumas yra tarp validuojamų trijų monomerų ilgio β -gliukanų ir ilgesnių grandinių. Tai galėtų būti paaškinta, tuo, kad pagal LigPlot+ analizę, sąveika baltymo kišenėje vyksta su 5 arba 6 monomerais. Kuo ilgesnė yra β -gliukanų grandinė, tuo daugiau laisvų sukimosi kampų ji turi. Molekulė esanti baltymo kišenėje neturi visiškos judėjimo laisvės, todėl 7 monomerų ir ilgesnių ligandų atveju atsiranda konformacijos, kur trys ar daugiau monomerų gali atsidurti už baltymo sąveikos kišenės ribų. Šios liekanos gali laisvai judėti ir neturi įtakos analizuojamai sąveikai. Dėl šios priežasties ir todėl, kad daugelis įgautų konformacijų, nepriklausomai nuo ligando dydžio, buvo panašios, o sąveikos analizė LigPlot+ parodė panašius rezultatus, šakotų β -1,3-gliukanų karkasu buvo pasirinkta 5 monomerų ilgio molekulė.

Atlikus sąveikos modeliavimą daugelis konformacijų parodė, kad vieno ir dviejų monomerų ilgio šoninės grandinės išsidėsto baltymo kišenėje, kartu su karkasu. Sąveikos kišenės dydis ir struktūra, įvertinta PyMOL (v2.5.4) bei patikrinta CASTp 3.0 (Tian et al., 2018) ir ProteinsPlus (<https://proteins.plus>) (3.5 pav.), leidžia daryti prielaidą, kad dimerinis Dectin-1 galėtų prisijungti ir linijinius, ir šakotus β -gliukanus.



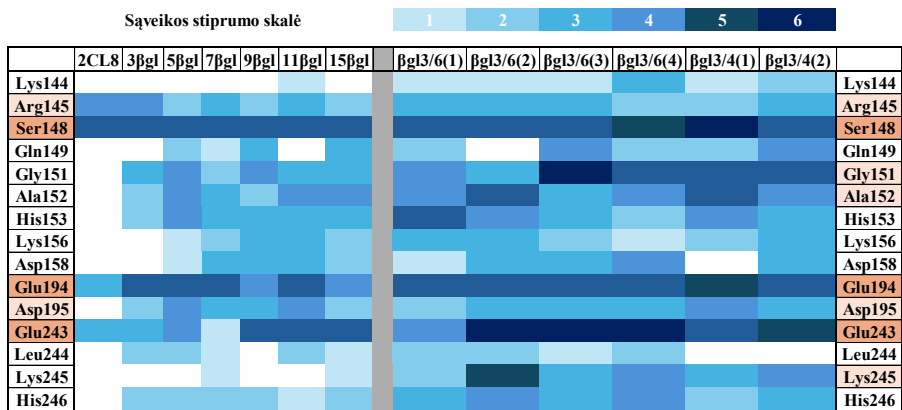
3.5 pav. Dectin-1 dimero formuojamos 1520 Å dydžio kišenės (PDB ID: 2CL8) receptoriaus ir β -gliukano komplekse vaizdas, sudarytas ProteinPlus platformoje <https://proteins.plus>.

Naudojant rentgeno spindulių difrakcijos būdu nustatytą Dectin-1 dimero ir β -gliukano komplekso struktūrą (PDB ID: 2CL8), PyMOL (v2.5.4) programa įvertintos aminorūgščių liekanos, esančios 3,5 Å, 5 Å ir 6 Å atstumu nuo ligando. Nustatyta, kad 6 Å atstumu nuo ligando esančios aminorūgščių liekanos formuoja 1520 Å dydžio kišenę, kuri buvo patvirtinta CASTp3.0 ir ProteinPlus platformose (3.4 pav.). Analizuojant kristalografinę struktūrą nustatyta, kad 3,5 Å atstumu tarp trimerinio β -1,3-gliukano molekulės ir Dectin-1 dimero formuojasi vandeniliniai ryšiai su recetoriaus A grandinės Arg145, Ala152 ir Glu194, bei abiejų grandinių Ser148 (**3.6 lentelė**).

3.6 lentelė. PyMOL (v2.5.4) programa nustatytos aminorūgščių liekanos, esančios 3,5 Å, 5 Å ir 6 Å atstumu nuo ligando komplekse su Dectin-1 (PDB ID: 2CL8).

3,5 Å	5 Å	6 Å
		Lys144A
Arg145A	Arg145A	Arg145A
		Cys147A
Ser148AB	Ser148B	Ser148AB
	Gln149A	Gln149AB
	Gly151AB	Gly151AB
Ala152A	Ala152AB	Ala152AB
	His153AB	His153AB
		Leu154A
		Asp158B
		Lys156B
Glu194A	Glu194AB	Glu194AB
	Asp195AB	Asp195AB
	Glu243AB	Glu243AB
		Leu244B

Atlikus analizę LigPlot+ su numatytais parametrais, kuomet didžiausias vandenilinių jungčių atstumas iki 3,35 Å, o hidrofobinės sąveikos iki 3,9 Å, vandenilinės jungtys susidarė tarp β -gliukano grandinės bei Arg145A, Ser148AB, o hidrofobinė sąveika tarp Glu194AB ir Glu243AB. Atstumai taip pat buvo panašūs, todėl tolimesnei analizei pasirinkta LigPlot+ programa. Buvo vertinama, su kokiomis aminorūgščių liekanomis vyksta β -gliukanų sąveika, norint palyginti skirtingo ilgio ir šakotumo β -gliukanų sąveiką su dimeriniu Dectin-1 receptoriumi. Rezultatų vaizdavimui pasirinktas karštųjų taškų žemėlapis (**3.6 pav.**), kuris buvo sudarytas remiantis hidrofobinių sąveikų ir vandenilinių ryšių skaičiumi tarp β -gliukanų ir atitinkamų Dectin-1 dimero aminorūgščių liekanų.



3.6 pav. Dectin-1 dimero aminorūgščių liekanų ir β-gliukanų sąveikos karštųjų taškų žemėlapis sudarytas remiantis LigPlot+ analize. Sąveikos stiprumo skalė: 1 – hidrofobinė sąveika su viena iš Dectin-1 grandinių, A arba B, 2 – hidrofobinė sąveika su abiem receptoriaus grandinėmis, – vandenilinis ryšys su viena iš Dectin-1 grandinių A arba B, 4 – vandenilinis ryšys ir hidrofobinė sąveika su Dectin-1 grandinėmis, 5 – vandenilinis ryšys su abiem grandinėmis, 6 – daugiau nei du vandeniliniai ryšiai.

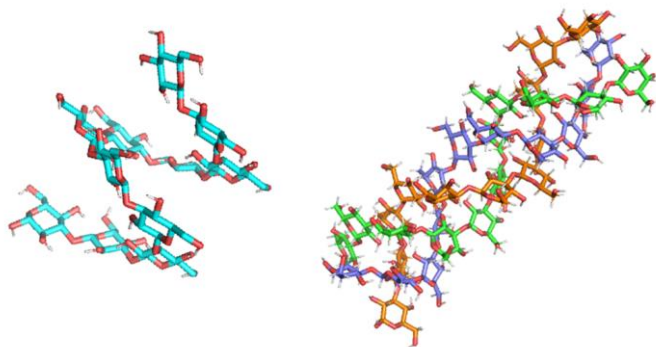
Nepriklausomai nuo konformacijos, ilgio ir šakotumo, dažniausiai sąveika vyksta su abiejų Dectin-1 dimero grandinių Ser148, Glu194 ir Glu243 aminorūgščių liekanos. Kitos aminorūgščių liekanos: Arg145, Gln149, Gly151, Ala152, His153 bei Asp195, gali būti svarbios Dectin-1 ir β-gliukanų sąveikos susiformavimui. Skirtumo tarp šakotų ir linijinių β-gliukanų sąveikos su receptoriumi beveik nėra, kadangi šoninės grandinės sąveikauja su tomis pačiomis Dectin-1 dimero aminorūgščių liekanomis kaip ir karkasas, tokiu būdu, padidinant sąveikos stiprumą. Vertinant atrinktų konformacijų sąveiką, išsiskiria šakotų β-gliukanų dažnesnė sąveika su Gly151, Lys245 ir His246 dėl polisacharido konformacijos. Dažnesnė sąveika su Gly151, greičiausiai, nulemta karkaso su visa šonine grandine išsidėstymo baltymo sąveikos kišenėje. Sąveika su Lys245 ir His246 gali būti paaiškinta atsitiktinai atrinktų β-gliukanų konformacijų ypatumais. Atskiros konformacijos gali lemti β-gliukanų sąveika su Lys128, Ser129, Lys156, Lys242, His246 bei kitomis aminorūgščių liekanomis. Tačiau, šios sąveikos yra atsitiktinės ir yra svarbios tik konkrečioms β-gliukanų įgautoms konformacijoms, taigi nėra būtinos ir dalis jų, dėl šios priežasties nebuvo įtrauktos į karštųjų taškų žemėlapi.

Iš gautų rezultatų išsiskiria β-gliukanai su trijų ir keturių monomerų ilgio β-1,6-gliukanų šonine grandine. Dėl pakankamai ilgos šoninės grandinės, ji gali patekti į baltymo kišenę vietoje karkaso, dėl ko gaunamos alternatyvios

konformacijos. Tačiau, tokiu atveju, didžioji dalis β -1,3-gliukanų karkaso molekulių sąveikauja su baltymo paviršiumi. Tai galėtų reikšti, jog tokių šakotų β -gliukanų atpažinimas gali vykti per karkasą, pakankamai ilgas šakas, arba gali būti apsunkintas dėl jų sudėtingų konformacijų. Imuninio atsako metu, sąveikoje greičiausiai dalyvaus mieliagybių ląstelės sienelės linijinių ir trumpesnių šoninių grandžių šakoti β -gliukanai.

Sąveikos modeliavimo rezultatai parodė, kad β -gliukanų ir Dectin-1 dimero sąveika yra energetiškai naudinga ir vyksta su 3-6 gliukozės monomerais β -gliukano karkase. Pagal gautus rezultatus, β -1,3-gliukanų šakotumas beveik neturėjo įtakos apskaičiuotam afiniškumui. Pagrindinė sąveika tarp šakotų ir linijinių polisacharidų vyksta su tomis pačiomis aminorūgščių liekanomis, nepriklausomai nuo šakos ilgio. Vis dėlto β -gliukanai, turintys trimerines ar tetramerines šonines grandines, dažniau sąveikauja su receptoriumi tik per karkasą arba tik per šonines grandines. Tokios molekulės, kaip ir dimerinė chitino šoninė grandinė, sudaryta iš dviejų liekanų, retai įgauna energetiškai palankią sąveikos konformaciją. Dėl šios priežasties β -1,6-glikozidine jungtimi prijungtos tetramerinės gliukozės grandinės bei β -1,4-glikozidine jungtimi prijungtos dimerinio chitino šoninės grandinės nebuvo įtrauktos į molekulinės dinamikos simuliacijas.

Atlikti β -1,3-gliukanų trigrandės spiralės (3.7 pav.) sąveikos modeliavimo su dimerine Dectin-1 receptoriaus forma nepavyko, nei pasirinkta GNINA programa, nei su kitomis programomis ar internete prieinamomis dokimo platformomis (Z-Dock, SwissDock, AutodockVina, VinaCPL). Programos neatpažindavo struktūros arba panaudodavo tik vieną β -gliukanų grandinę iš trijų. Todėl trigrandės spiralės imitacijai buvo atliktas standaus β -gliukanų spiralės dokimas, kuris imituotų standžią trigrandę spiralę.



3.7 pav. Viengrandė 11 monomerų ilgio β -1,3-gliukano viengrandė spiralė (sudaryta naudojant CHARMM GUI platformą) ir trigrandė spiralė (sudaryta naudojant AVOGADRO 1.2.0 programą). Spalvos žymi skirtingas grandines.

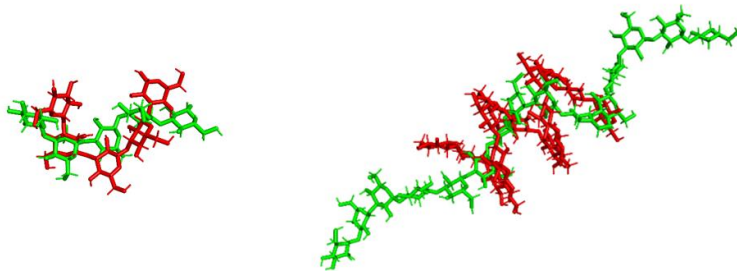
Atlikus sąveikos modeliavimą su nelanksčia β -1,3-gliukano grandine, sąveika su Dectin-1 homodimeru β -gliukanų atpažinimo vietoje nevyksta, kadangi ligando konformacija neleidžia jam patekti į baltymo kišenę. Todėl mažai tikėtina, kad Dectin-1 dimero sąveikos kišenėje galėtų išsidėstyti trigrandės spiralės konformacijos β -gliukanai, kurie dėl trijų grandinių praranda lankstumą. Tačiau, atlikus standžios β -gliukanų spiralės su lanksčiomis šoninėmis grandinėmis sąveikos modeliavimą, pastebėta, kad Dectin-1 gali sąveikauti su bent 3 monomerų ilgio β -1,6-šoninėmis grandinėmis, o standus β -1,3-karkasas lieka baltymo išorėje, už surišimo vietos ribų. Panašius rezultatus gavo ir X. Wu su kolegomis (Wu et al., 2021). Tokiu būdu, galima teigti, jog Dectin-1 homodimeras sąveikauja su atsitiktinėmis β -1,3-, β -1,6- ir β -1,3/1,6-gliukanų grandinėmis arba aukštesnės organizacijos β -gliukanų karkaso atvirais galais arba jų šoninėmis grandinėmis.

LigPlot+ atlikta sąveikos analizė parodė, kad susidaro bent trys vandeniliniai ryšiai tarp β -gliukano karkaso patenkančio į kišenę. Vandenilinius ryšius dažniausiai formuoja abiejų Dectin-1 dimero grandinių aminorūgščių liekanos Ser148, Glu194 ir Glu243, rečiau, bet taip pat svarbi ir Arg145. Šios aminorūgščių liekanos yra apie 3 Å nutolusios nuo β -gliukanų, todėl yra esminės molekulių sąveikai (Jeffrey, 1997).

3.5. Molekulių dinamikos simuliacijos analizė

Siekdami suprasti β -gliukanų ir Dectin-1 receptoriaus sąveiką bei patvirtinti dokimimo metu gautus rezultatus buvo atlikta molekulių dinamikos (MD) simuliacija. Visi failai reikalingi MD simuliacijai buvo paruošti CHARMM-GUI platformoje kristalografinės Dectin-1 ir trimerinio β -gliukano (PDB ID: 2CL8) komplekso pagrindu, modifikuojant patį ligandą.

Pradžioje buvo atliktos atskiros 10 ns, o vėliau ir 100 ns ligandų ir receptoriaus MD simuliacijos. Dectin-1 dimero simuliacija be ligando buvo reikalinga įvertinti homodimero struktūros stabilumą, o gauti duomenys panaudoti tolimesnėje analizėje palyginant receptoriaus-ligando kompleksų struktūros stabilumą. β -gliukanų MD simuliacijos metu nustatyta, kad grandinė įgauna spiralės struktūrą ir išlaiko ją stabilią per visą simuliacijos trukmę (**3.8 pav.**).



3.8 pav. Viengrandžių β -1,3-gliukano spiralių, sudarytų naudojant CHARMM GUI platformą, erdvinės konformacijos prieš ir po 100 ns MD simuliacijos. Raudona spalva pažymėta pradinė molekulės konformacija gauta CHARMM-GUI, žalia spalva – konformacija po 100 ns MD simuliacijos. Kairėje 5-monomerų, dešinėje 15-monomerų ilgio β -1,3-gliukanų struktūra.

Toliau buvo atliktos 10 ns Dectin-1 ir β -gliukanų kompleksų molekulių dinamikos simuliacijos. Molekulinis dokinimas neparodė reikšmingų skirtumų tarp trumpesnės ir ilgesnės grandinės, o baltymo kišenėje sąveika vyksta su 3-6 β -gliukano monomerais. Dėl šių priežasčių Dectin-1 ir β -gliukanų grandinių MD simuliacijai buvo pasirinktas 5 monomerų ilgio β -1,3-gliukanų grandinės karkasas. 10 ns simuliacijų metu kompleksas buvo stabilus, todėl simuliacijos pratęstos iki 100 ns, o rezultatai pateikti **3.7 lentelėje**.

3.7 lentelė. Receptoriaus ir ligando komplekso stabilumo rodikliai skirtinguose molekulinės dinamikos (MDS) etapuose: NVT (pastovi temperatūra (T) ir tūris (V)), NPT (pastovi temperatūra ir slėgis (P)), MD (pagrindinė simuliacija). Pateikti 1 ns NVT ir NPT bei 100 ns MD simuliacijos vidurkiai; \pm standartinis nuokrypis.

Etapas	Matavimo vienetai	β g13	β g13/6(1)	β g13/6(2)	β g13/6(3)	β g13/4(1)
NVT	T (K)	298,2 \pm 8,3	297,9 \pm 8,6	299,6 \pm 3,4	299,8 \pm 3,3	299,6 \pm 3,5
	P (bar)	13,3 \pm 250,8	14,8 \pm 166,1	1,2 \pm 166,9	-5,9 \pm 166,4	6,1 \pm 166,6
NPT	D (kg/m ³)	1046,7 \pm 13,2	1048,8 \pm 4,0	1049,8 \pm 4,5	1050,1 \pm 4,6	1049,7 \pm 4,6
	T (K)	300,0 \pm 1,5	300,0 \pm 1,5	300,0 \pm 1,5	300,0 \pm 1,5	300,0 \pm 1,5
MD	P (bar)	0,9 \pm 136,0	-0,0 \pm 135,3	0,6 \pm 135,4	1,2 \pm 134,0	0,5 \pm 135,2
	D (kg/m ³)	1050,3 \pm 2,4	1050,4 \pm 2,4	1051,2 \pm 2,3	1051,4 \pm 2,3	1050,8 \pm 2,4

Kanoniniame (NVT) ansamblyje Dectin-1 dimero su skirtingais ligandais kompleksų temperatūra yra stabili ir svyruoja apie 300 K. Slėgio svyravimus NPT ansamblyje galima paaiškinti molekulių judėjimu ir tarpusavio sąveika mažoje sistemoje. Visgi, modeliuojamų sistemų tankis yra stabilus ir yra artimas 1050 kg/m³, todėl buvo tęsiama MD simuliacija. Simuliacijų metu visų modeliuojamų sistemų temperatūros ir tankiai buvo stabilūs ir svyravo nežymiai. Slėgio svyravimai taip pat sumažėjo ir priartėjo 1 bar tikslinei vertei.

Siekiant įvertinti β-gliukano ir Dectin-1 kompleksų struktūrinį stabilumą, lankstumą ir erdvinę organizaciją, buvo atliktos RMSD, RMSF ir sukimo spindulio (Rg) analizės. Atitinkamai, RMSD analizė parodo baltymo-ligando komplekso struktūros stabilumą ir nukrypimus nuo pradinės konformacijos, RMSF – atskirų aminorūgščių liekanų lankstumą, o Rg – molekulių ir jų kompleksų erdvinį kompaktiškumą.

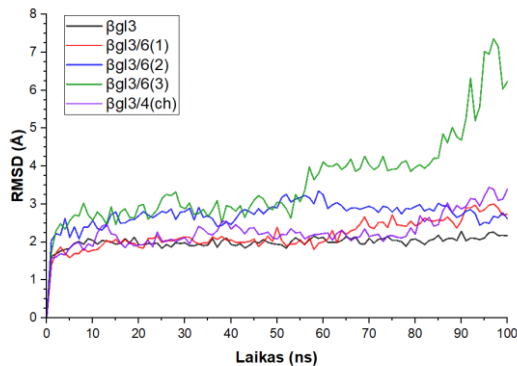
RMSD analizė (**3.8 lentelė**), parodė, kad linijinio β-gliukano ir jo komplekso su Dectin-1 dimeru struktūriniai nukrypimai molekulinės dinamikos trajektorijos metu buvo nežymūs, palyginti su šakotais β-gliukanais. Šį skirtumą galima paaiškinti tuo, kad šakotuose β-gliukanuose yra daugiau laisvų sukimosi kampų, kurie lemia didesnę molekulių lankstumą ir konformacinį variabilumą.

3.8 lentelė. Molekulių dinamikos (MD) simuliacijų metu nustatytas β-gliukanų, Dectin-1, bei jų kompleksų struktūrinis stabilumas. β-gliukanų, Dectin-1 dimero ir jų kompleksų 100 ns MD simuliacijų nuokrypiai nuo pradinės konformacijos – RMSD vertės (Å), vidurkis ± standartinis nuokrypis. **BGLC** – β-gliukanas, **DECTIN** – Dectin-1 dimeras, **CMPLX** – β-gliukano ir Dectin-1 receptoriaus kompleksas.

Atskirų molekulių RMSD			Kompleksų RMSD		
DECTIN	BGLC		BGLC	DECTIN	CMPLX
0,20 ± 0,02	1,8 ± 0,7	βgl3	1,6 ± 0,3	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,2
	3,6 ± 0,6	βgl3/6(1)	2,4 ± 0,5	2,0 ± 0,3	2,2 ± 0,4
	4,0 ± 0,9	βgl3/6(2)	3,1 ± 0,6	2,4 ± 0,3	2,7 ± 0,4
	4,5 ± 1,1	βgl3/6(3)	3,9 ± 1,2	2,5 ± 0,3	3,6 ± 1,2
	4,1 ± 0,5	βgl3/4(1)	2,3 ± 0,5	2,1 ± 0,3	2,6 ± 0,9

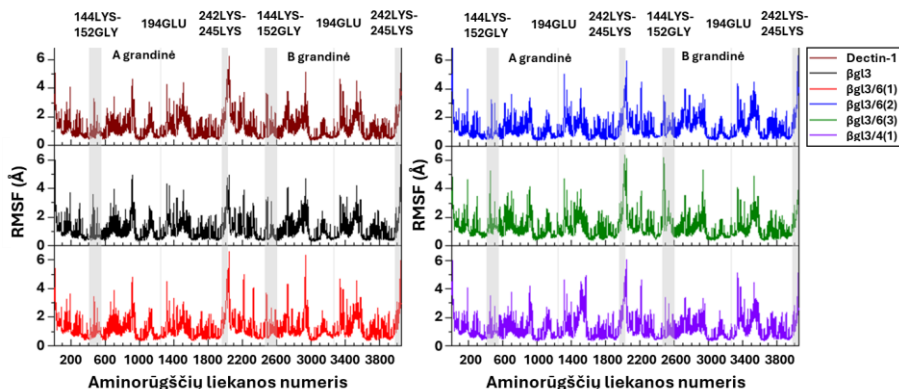
Baltymo ir β-gliukano kompleksų, turinčių vieno monomero šoninę grandinę RMSD vertės buvo artimos 2 Å, o skirtumus galima sieti su pačių β-gliukanų molekulių lankstumu ir reikšmingu nuokrypiu nuo pradinės konformacijos. Dviejų ir trijų monomerų šoninę grandinę turintys β-gliukanai, buvo lanksčiausi ir dėl to lėmė viso komplekso nukrypimą ir aukštas RMSD vertes. Nuo pat simuliacijos pradžios šių ligandų RMSD vertės buvo artimos

3 Å, o simuliacijos pabaigoje ilgiausią šoninę grandinę turinčių ligandų kompleksas su baltymu RMSD svyravo apie 7 Å (**3.9 pav.**). Tuo tarpu RMSD vertės Dectin-1 komplekso su β-gliukanu turinčiu savo šakoje vieną chitino molekulę iki 80 ns svyravo apie 2 Å ir iki simuliacijos pabaigos padidėjo iki 3 Å. Šie rezultatai gali rodyti sumažėjusi kai kurių kompleksų struktūrinį stabilumą atsiradusi dėl šakotų β-gliukanų padidėjusio konformacinio variabilumo.



3.9 pav. β-gliukanų ir dimerinio Dectin-1 kompleksų RMSD vertės 100 ns MD simuliacijos metu.

Naudojant GROMACS *rmsf* įrankį buvo atlikta ligando gliukozės molekulių ir receptoriaus aminorūgščių liekanų svyravimų analizė (**3.10 pav.**). Kad atskirti nežymius skirtumus, buvo vertinamas kiekvienos aminorūgšties RMSF reikšmės, o tos kurios skyrėsi daugiau nei 0,5 Å lyginant su baltymu be ligando buvo pažymėtos spalva (**3.9 lentelė**).



3.10 pav. β-gliukanų ir dimerinio Dectin-1 kompleksų RMSF vertės 100 ns MD simuliacijos metu.

Rezultatai atskleidė, kad β -gliukanų lankstumas didėja priklausomai nuo šakos ilgio. Kaip ir RMSD rezultatų atveju, tai yra susiję su papildomais laisvais sukimosi kampais šakotose struktūrose. Kompleksuose su linijiniu β -gliukanu bei šakotais fragmentais, turinčiais vieną ar du šoninius monomerus, RMSF reikšmės buvo panašios. Tuo tarpu komplekso su trijų monomerų šakotu β -gliukanu RMSF vertės buvo reikšmingai didesnės. Iš vienos pusės, tai priklauso nuo pačių β -gliukanų padidėjusio lankstumo. Iš kitos pusės, didesnis ligando lankstumas gali turėti įtakos sąveikos su receptoriumi stabilumui ir sukelti konformacinius pokyčius. Siekiant detalesnės analizės, buvo įvertintos receptoriaus aminorūgščių liekanų, su kuriomis dažniausiai dokinimo metu sąveikavo β -gliukanai, RMSF.

3.9 lentelė. Dectin-1 dimero be ligando ir komplekse su β -gliukanais aminorūgščių liekanų, dažniausiai dalyvavusių sąveikose dokinimo metu, RMSF pokyčiai.

	Dectin-1	β gl3	β gl3/6(1)	β gl3/6(2)	β gl3/6(3)	β gl3/4(1)
<i>Arg145 A</i>	0,9	1,5	0,8	0,7	2,4	1,6
<i>Ser148 A</i>	0,9	0,7	1,0	0,7	1,3	0,9
<i>Gln149A</i>	1,2	1,2	1,4	1,4	1,9	1,5
<i>Glu194 A</i>	0,9	0,9	0,6	0,9	1,3	1,1
<i>Asp195 A</i>	0,9	0,7	0,8	0,9	1,1	0,9
<i>Glu243 A</i>	1,7	1,3	1,5	1,6	2,0	1,8
<i>Lys245 A</i>	3,6	3,1	3,7	3,1	4,7	3,5
<i>Arg145 B</i>	1,6	1,4	1,8	1,7	3,6	0,8
<i>Ser148 B</i>	1,0	0,6	1,0	1,2	1,6	0,9
<i>Gln149B</i>	1,4	1,2	1,4	1,3	2,4	1,5
<i>Glu194 B</i>	1,0	0,5	1,0	1,0	1,2	0,9
<i>Asp195 B</i>	0,8	0,6	0,9	0,8	1,0	0,8
<i>Glu243 B</i>	1,7	1,4	1,6	1,6	1,6	1,5
<i>Leu244 B</i>	1,7	1,1	1,8	1,7	1,9	1,6
<i>Lys245 B</i>	3,8	3,9	4,1	4,7	3,1	3,3

Linijinio β -gliukano prisijungimas prie Dectin-1 dimero, lyginant su šakotais β -gliukanais lėmė sumažėjusius dalies baltymo aminorūgščių liekanų, dalyvavusių sąveikose dokinimo metu, svyravimus. Tai gali būti susiję su erdvinio ligando išsidėstymu sąveikos kišenėje kas lemia baltymo lankstumo sumažėjimą ir sąveikos stabilizavimą, tačiau šis vertinimas yra subjektyvus ir reikalauja tolimesnio patvirtinimo. Vieno ir dviejų monomerų ilgio šakotų β -gliukanai įtakos receptoriaus aminorūgščių lankstumui sąveikos srityje praktiškai neturėjo, lyginant su baltymu be ligando. Visgi trijų

monomerų šakotas ligandas sukėlė didesnius svyravimus, kas gali būti susiję su sumažėjusiu kompleksu stabilumu.

Sukimo spindulys (Rg) leido įvertinti molekulių ir jų kompleksų erdvinį kompaktiškumą (**3.10 lentelė**). Visi kompleksų kompaktiškumas yra panašus į Dectin-1 dimero be ligando. Esantys skirtumai labai maži ir priklauso nuo β-gliukanų grandinės ilgio.

3.10 lentelė. Dectin-1 baltymo ir Dectin-1-β-gliukanų kompleksų sukimo spindulio vertės Rg (Å) po 100 ns MD simuliacijos, vidurkis ± standartinis nuokrypis (). **BGLC** – β-gliukanas, **DECTIN** – receptoriaus Dectin-1 dimeras, **CMPLX** – β-gliukano ir Dectin-1 receptoriaus kompleksas.

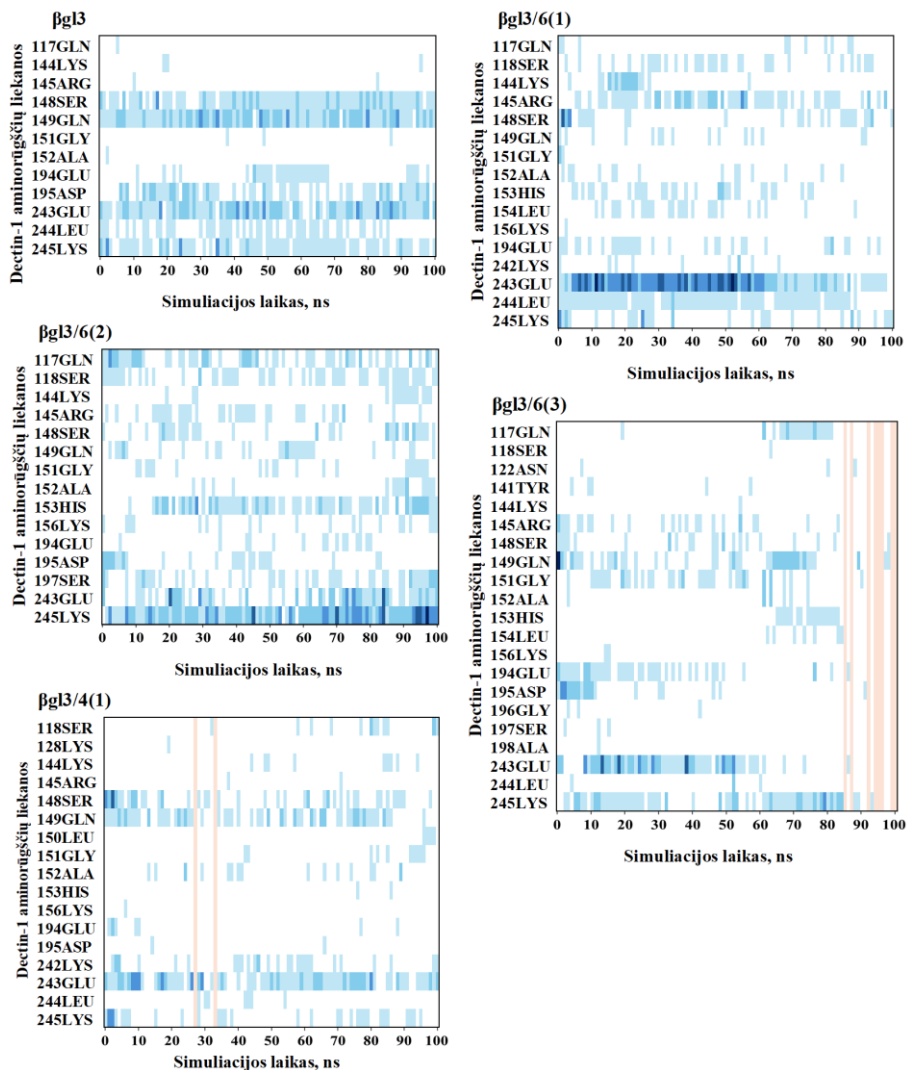
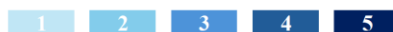
Dectin-1 dimero be ligando Rg	Kompleksų Rg	CMPLX	DECTIN	BGLC
		βgl3	18,6 ± 0,1	18,7 ± 0,1
18,9 ± 0,1	βgl3/6(1)	18,8 ± 0,1	18,9 ± 0,1	7,4 ± 0,1
	βgl3/6(2)	19,0 ± 0,1	19,1 ± 0,1	7,7 ± 0,3
	βgl3/6(3)	19,3 ± 0,3	19,3 ± 0,3	8,3 ± 0,4
	βgl3/4(1)	18,9 ± 0,2	19,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2

RMSD ir RMSF vertės tarpusavyje papildo vienas kitą ir leidžia daryti prielaidą, jog β-gliukano šakojimosi laipsnis turi tiesioginę įtaką jo lankstumui, o tuo pačiu ir kompleksų stabilumui bei galimam konformaciniam prisitaikymui sąveikos metu.

Norint įvertinti Dectin-1 ir skirtingų β-gliukano fragmentų sąveikų dinamiką, buvo atlikta vandenilinių jungčių (*h bond*) analizė, kurios rezultatai vizualizuoti karštųjų taškų žemėlapiais (**3.11 pav.**) Šie žemėlapiai parodo, kurios aminorūgščių liekanos dažniausiai formavo vandenilines jungtis su β-gliukanais per 100 ns trukmės simuliaciją. Vandenilinių jungčių analizė parodė, kad tik linijiniai β-gliukanai palaikė pastovų vandenilinių jungčių skaičių visos simuliacijos metu, kas rodo stabilų prisijungimą prie baltymo.

3.11 lentelėje pateiktos atitinkamos aminorūgščių liekanos ir trukmė procentais simuliacijos laiko atžvilgiu. Į lentelę nebuvo įtrauktos aminorūgščių liekanos, kurios formavo trumpalaikius kontaktus tik su vienu ar dviem ligandais. Pagrindinės sąveikose dalyvavusios aminorūgščių liekanos buvo Ser148, Gln149, Asp195, Glu243 ir Lys245, kurios sudarė nuosekliai, ilgalaikes jungtis (vidutiniškai 6,5 H-ryšių per 100 ns MD simuliaciją). Šios sąveikos sutampa su kontaktų trukmės analizės duomenimis, kuriose tos pačios aminorūgščių liekanos pasižymėjo ilga sąveikos trukme ir yra suderinamos su RMSF analize, parodžiusia jų struktūrinį stabilumą.

Vandenilinių ryšių skaičius



3.11 pav. Vandenilinių ryšių (*h bond*) karštųjų taškų žemėlapis, vaizduojantis kurios Dectin-1 dimero aminorūgščių liekanos dažniausiai formavo vandenilinius ryšius su β -gliukanais per 100 ns trukmės MD simuliaciją. Spalvų intensyvumas atspindi formuojamų vandenilinių ryšių skaičių. Oranžine spalva pažymėtas laikas kuomet sąveika nevyko.

3.11 lentelė Vandenilinių ryšių tarp skirtingų β -gliukanų ir Dectin-1 aminorūgščių liekanų trukmė, išreikšta procentais nuo visos 100 ns molekulinės dinamikos simuliacijos trukmės. Žalia spalva pažymėti langeliai žymi sąveikas, kurios buvo išlaikytos daugiau nei 50 % viso simuliacijos laiko, t. y. bent 50 ns.

	β gl3	β gl3/6(1)	β gl3/6(2)	β gl3/6(3)	β gl3/4(1)
Gln117	1	10	55	19	
Ser118		34	50	1	12
Arg145	2	60	34	23	1
Ser148	87	37	31	21	47
Gln149	97	15	27	42	25
Gly151	3	2	19	34	4
Ala152	1	14	13	6	12
His153		31	67	17	6
Glu194	32	32	14	39	27
Asp195	60		23	18	6
Glu243	91	95	57	56	43
Leu244	47	80		3	11
Lys245	77	27	97	62	59

Simuliacijos su β gl3/6(1) ir Dectin-1 pabaigoje formavosi tik 2 vandeniliniai ryšiai tarp receptoriaus ir ligando, nors visos 100 ns MD simuliacijos metu vidutiniškai formavo 6,6 vandenilinius ryšius. Ligandas β gl3/6(2), turintis dvi šonines grandines, simuliacijos pabaigoje sudarė net 11 vandenilinių ryšių, dėl to padidėjo vidutiniškai formuojamų vandenilinių ryšių skaičius (7,7). Tačiau, šiuo atveju, buvo pastebėtas reikšmingas sąveikų persiskirstymas – tokios liekanos kaip Ser148, Gln149, Asp195 ir Glu243 sąveikose dalyvavo daug rečiau arba visai nebedalyvavo, o stipriausia sąveika buvo su Lys245. Likusių ligandų – β gl3/6(3) ir chitino liekaną turinčio β gl3/4(1) – kompleksai iširo. β gl3/6(3) prarado sąveiką su baltymu ties 87 ns, o β gl3/4(1) ligandas jau po 27 ns nebesudarė nė vieno vandenilinio ryšio, nors prieš tai buvo stebėtos alternatyvios sąveikos. Šie pokyčiai leidžia daryti prielaidą, kad šakotumas gali trikdyti optimalią β -gliukano prisijungimo konformaciją ir geometriją prie Dectin-1 dimero. Ligando β gl3/6(2) sąveikų skaičius simuliacijos pabaigoje padidėjo. Šį efektą daugiausiai lėmė stipri ir ilgalaikė sąveika su Lys245, kas gali rodyti į pereinamą būseną komplekso irimo metu. Norint patvirtinti šio ligando ir alternatyvių sąveikų stabilumą, reikalinga ilgesnė MD simuliacija.

Apibendrinant, molekulių dinamikos simuliacijos parodė, kad sąveikos kišenėje susidarancio komplekso stabilumas priklauso nuo β -gliukano

struktūros. MD trajektorijų analizė parodė, kad linijinio β -1,3-gliukano kompleksas su Dectin-1 dimeru pasižymėjo mažesniais RMSD svyravimais ir pastovesniu vandenilinių ryšių bei kontaktų su aminorūgščių liekanų išlaikymu, lyginant su šakotais β -gliukanais. Šie rezultatai rodo didesnę linijinio β -1,3-gliukano konformacinę suderinamumą su Dectin-1 sąveikos kišene ir leidžia manyti, kad receptorius atpažįsta linijinius β -1,3-gliukanus arba β -1,3/1,6-gliukanų linijines sritis. Tikėtina, kad šakotumas gali riboti optimalų ligando orientavimą sąveikos kišenėje ir stabilaus komplekso susidarymą

Galiausiai *gmx_MMPBSA* įrankiu linijinio β -1,3-gliukano ir Dectin-1 homodimero kompleksui buvo apskaičiuota laisva rišimosi energija (ΔG) naudojant du molekulinės mechanikos metodus: su generalizuota Borno elektrostatika ir paviršiaus ploto hidrofobine pataisa (MM/GBSA) bei su Puasono-Bolcmano (orig. *Poisson–Boltzmann*) elektrostatika ir paviršiaus ploto hidrofobine pataisa (MM/PBSA). Dectin-1 homodimero ir linijinio β -gliukano komplekso laisva rišimosi energija ir jos sudedamosios pateikti **3.12 lentelėje**.

3.12 lentelė. Penkių monomerų ilgio linijinio β -gliukano ir Dectin-1 laisva rišimosi energija (ΔG) apskaičiuota *gmx_MMPBSA* įrankiu naudojant du molekulinės mechanikos metodus: generalizuota Borno elektrostatiką ir paviršiaus ploto hidrofobinę pataisą (MM/GBSA) bei Puasono-Bolcmano elektrostatiką ir paviršiaus ploto hidrofobinę pataisą (MM/PBSA).

Energija	MM/PBSA (kcal/mol)	MM/GBSA (kcal/mol)
Elektrostatinė (EEL/Coul)	-76,04	
van der Valso (VDW/LJ)	-51,95	
Solvatacija – Polinė	120,31 (Δ EPB)	97,01 (Δ EGB)
Solvatacija – Nėpolinė	-6,36	-8,80
Viso ΔG (kcal/mol)	-14,04	-39,78
Viso ΔG (kJ/mol)	-58,74	-166,44

Abu metodai vienodai apskaičiuoja elektrostatinės (EEL arba Coulomb) ir van der Valso (vdW arba Lennard-Jones) sąveikų energijas. Elektrostatinė sąveika komplekse yra energetiškai naudinga (-76,04 kcal/mol) ir vyksta tarp β -gliukano hidroksigrupės ir receptoriaus aminorūgščių šoninių grandinių. vdW atspindi tarpmolekulines sąveikas, įskaitant hidrofobinę sąveiką, kuri taip pat yra energetiškai naudinga (-51,95 kcal/mol). Polinė solvatacijos

energija, kuri atspindi molekulių sąveiką su vandens dipoliais, mažina komplekso stabilumą. MM/PBSA metodu polinė solvatacijos energija siekė +120,31 kcal/mol, o MM/GBSA metodu buvo šiek tiek mažesnė, +97,01 kcal/mol. Nėpolinė solvatacijos energija atspindi hidrofobinių paviršiaus sričių sąveikas su tirpikliu ir dažniausiai vertinama kaip proporcinga sąveikos paviršiaus plotui. Kadangi hidrofobiniai paviršiai komplekso susidarymo metu yra paslepiami nuo tirpiklio, ši energija dažniausiai yra neigiama ir termodinamiškai palanki. MM/PBSA metodu ji siekė -6,36 kcal/mol, o MM/GBSA -8,80 kcal/mol. Tai rodo, kad hidrofobinis efektas prisideda prie β -gliukano ir Dectin-1 receptoriaus komplekso stabilumo. Tai patvirtina, kad β -gliukano prisijungimą prie Dectin-1 stabilizuoja pirmiausia elektrostatinės ir van der Valso sąveikos, o destabilizuojantis polinės solvatacijos poveikis yra tik iš dalies kompensuojamas hidrofobinėmis sąveikomis. Bendra apskaičiuota prisijungimo laisvoji energija (ΔG) yra visų minėtų komponentų suma ir rodo bendrą komplekso termodinaminį stabilumą. Apskaičiuotas MM/PBSA metodu ji siekė -14,04 kcal/mol (-58,74 kJ/mol), o MM/GBSA -39,78 kcal/mol (-166,44 kJ/mol). Reikia pažymėti, kad MM/GBSA metodas yra mažiau tikslus nei MM/PBSA, todėl dažnai rezultatas rodo stipresnę sąveiką. Apskaičiuota β -gliukano ir Dectin-1 komplekso laisvoji jungimosi energija rodo stipresnę sąveiką nei molekulinio dokimo metu gautas Vina afiniškumas (-12 kcal/mol).

Apibendrinant galima teigti, kad didėjantis β -gliukanų šakotumo laipsnis koreliuoja su sumažėjusiu prisijungimo stabilumu, kas atsispindi ne tik vandenilinių jungčių analizėje, bet ir RMSD bei RMSF duomenyse, kur stebėti struktūriniai kompleksų pokyčiai. Šie rezultatai leidžia daryti išvadą, kad β -gliukanų struktūra – ypač šakų skaičius ir ilgis – turi reikšmingą įtaką Dectin-1 atpažinimo efektyvumui ir prisijungimo stabilumui, o dimerinė Dectin-1 forma greičiausiai atpažįsta tik linijinius β -gliukanus arba linijinius šakotų β -gliukanų fragmentus.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

β -gliukanai yra plačiai tiriami dėl savo imunomoduliacinių, priešnavikinių, priešuždegiminių, cholesterolio bei gliukozės kiekį reguliuojančių savybių (Li et al., 2010; Liu et al., 2023; Tong et al., 2015). Tačiau informacija apie neigiamą β -gliukanų poveikį ir augantis jų taikymas funkciniam maiste ir maisto papilduose kelia klausimų dėl saugumo.

Nedaug yra žinoma apie saugias β -gliukanų imunostimuliuojančio poveikio dozes. Žmonėms imuninei sistemai stimuliuoti dažniausiai tiriamos nuo 100 mg iki 500 mg paros dozės, o cholesterolio mažinimui rekomenduojama apie 3 g β -gliukanų per parą. Palyginimui, lentinano medianinė letali dozė (LD_{50}) yra didesnė nei 2,5 g (Moriyuki and Ichimura, 1980; Vetvicka et al., 2019).

β -gliukanus galima panaudoti „imuniteto treniravimui“ (Heng et al., 2021; Moorlag et al., 2020; Wang et al., 2023). Tačiau, dar labai nedaug yra žinoma apie visus galimus imuninės sistemos aktyvacijos kelius, todėl gali atsirasti ir nepageidaujami efektai. Pavyzdžiui, įvairūs infekciniai agentai, įskaitant bakterijas, virusus ir grybus, gali inicijuoti autoimuninių ligų, tokių kaip reumatoidinis artritas ar išsėtinė sklerozė (IS), eigą. Pavyzdžiui, bakterijų ląstelės sienelės lipopolisacharidai (LPS), skatina uždegimą ir nuo jo priklausomą savų antigenų pateikimą, kuris gali lemti autoreaktyvių T ląstelių aktyvaciją. Manoma, kad panašų poveikį gali turėti ir β -gliukanai, kurie naudojami kaip adjuvantai, gali skatinti autoimuninį atsaką (Hida et al., 2005). Sato ir kitų (2022) tyrimų duomenys rodo, kad β -gliukanų imunomoduliacinis poveikis priklauso nuo ligos konteksto. β -gliukanas kurdlanas eksperimentiniuose IS modeliuose sukėlė skirtingą poveikį: autoimuniniuose modeliuose paaštrino ligos eigą, o virusiniame modelyje veikė apsaugančiai, mažindamas aksonų degeneraciją (Sato et al., 2022). Šie rezultatai parodė, kad β -gliukanų gali lemti skirtingą poveikį, priklausomai nuo veikiamos ligos etiologijos, stadijos bei imuninės aplinkos. Kitų mokslininkų atlikti treniruoto imuniteto tyrimai parodė, kad β -gliukanai taip pat pasižymėjo dvigubu poveikiu, vienu atveju – sustiprinant imuniteto atsaką, kitų – skatinant autoimunitetą. Be to, gauti rezultatai leidžia sieti β -gliukano sukeltą treniruotą imunitetą su padidėjusia autoimuninio/autouždegiminio sindromo, sukulto adjuvantų, rizika (Haacke et al., 2025).

Tyrimai rodo, kad β -gliukanai gali turėti ir nepageidaujamų poveikių, tačiau, jų struktūrinės savybės (ilgis, šakotumas, tirpumas) dažnai nėra žinomi ar rimtai vertinami. Atsižvelgiant į šiuos aspektus, tampa akivaizdu, kad norint saugiai ir efektyviai taikyti β -gliukanus sveikatinimo ar terapiniais tikslais,

būtina detaliai charakterizuoti jų struktūrą ir sąveiką su imunoreceptoriais. Tai leistų suprasti, kokios konformacijos, ilgio ar šakotumo β -gliukanai suteikia teigiamą ar neigiamą efektą. Eksperimentiniai tyrimai reikalauja daug išteklių, įskaitant ir gyvūnų modelius, tačiau kai kuriems eksperimentams būtų galima pritaikyti 3R principus, mažinant gyvūnų naudojimą. *In silico* metodai, tokie kaip molekulinis dokimas ar molekulių dinamikos simuliacijos, leidžia sistemiškai tirti β -gliukanų sąveikas su imunoreceptoriais. Šiame darbe atliktas β -1,3-gliukanų dokimas ir molekulinės dinamikos analizės su Dectin-1 receptoriaus dimeru atskleidžia ne tik struktūrinius skirtumus tarp linijinių ir šakotų β -gliukanų, bet ir jų potencialų poveikį struktūriniam stabilumui bei sąveikų trukmei.

Literatūroje šiuo metu yra labai mažai tyrimų, nagrinėjančių β -gliukanų sąveiką su Dectin-1 receptoriais *in silico*. Šis darbas yra pirmasis, kuriame aprašyta β -gliukanų sąveiką su dimerine Dectin-1 forma bei įvertintas šakotų ir nešakotų β -gliukanų su receptoriu kompleksų stabilumas. Gauti rezultatai reikšmingai papildo žinias šioje srityje ir leidžia tobulinti supratimą, kaip β -gliukanų molekulinė struktūra lemia jų biologinį aktyvumą.

4.1. β -gliukanų struktūros tyrimai

Grybų ir mieliagrybių ląstelių sienelių β -1,3-gliukanai yra esminis komponentas sudarantis iki 30 % sausos mielių sienelės masės, o β -1,3/1,6-gliukanai, manoma, formuoja standų tinklą (Kang et al., 2018; Lamon et al., 2023; Zhang et al., 2002). Nors β -gliukanų sujungimas su kitais ląstelės sienelės komponentas dar prastai suprantamas (Aimanianda et al., 2017), kelios mokslinių grupės atrado, kad α -1,3-gliukanas su chitinu gali formuoti standžią hidrofobinę šerdį vietoje šakotų β -1,3/1,6-gliukanų *Aspergillus fumigatus* (Chakraborty et al., 2021; Fernando et al., 2022; Kang et al., 2018) ir *Schizophyllum commune* sienelėse (Ehren et al., 2020). Naujos išvalgos apie *Aspergillus fumigatus* ir *Schizophyllum commune* ląstelės sienelės struktūrą atskleidė, kad ląstelės sienelės šerdis susideda iš β -gliukanų, mananų ir chitino, palaikomų kovalentinių ryšių (Fernando et al., 2022; Kang et al., 2018). *Candida albicans* ląstelės sienelės šerdis taip pat sudaryta iš β -1,3-gliukano ir chitino komplekso (Garcia-Rubio et al., 2020), kur chitinas yra prijungtas β -1,4-glikozidiniu ryšiu, kas daro šerdį netirpia (Ehren et al., 2020; Lowman et al., 2021). Tirpumas taip pat priklauso nuo polimero molekulinės masės ir šakotumo. Kuo šakotesnė ir sunkesnė β -gliukanų grandinė, tuo ji labiau tirpi (Avramia and Amariei, 2022; Lowman et al., 2021). β -gliukanų β -1,3-šakos lemia prisijungimą kitų ląstelės sienelės komponentų tokių kaip

chitinas, manoproteinai, kas daro β -1,3-gliukanus svarbiais palaikant kryžminius ryšius ir šakojimąsi ląstelės sienelėje (Aimanianda et al., 2017; Avramia and Amariei, 2022; Fernando et al., 2022; Garcia-Rubio et al., 2020).

Išskyrimo iš mieliagybių ląstelių sienelių metu gautos trys β -gliukanų frakcijos pasižymėjo tipiška β -1,3-gliukano struktūra. Gauti duomenys sutampa su pateikiamais literatūroje duomenimis (Liu et al., 2022; Šandula et al., 1999; Synytsya et al., 2023; Zhang et al., 2017). β -gliukanų frakcijose išskirtose tuo pačiu metodu iš skirtingų mielių spektrinės savybės buvo panašios, todėl nuo rūšies priklausomų skirtumų nepastebėta. Remiantis ATR-FTIR sugerties spektrine analize, HWN frakcijoje baltymų kiekis buvo šiek tiek didesnis, palyginti su kitomis frakcijomis. Nors skyrėsi išskyrimo metodai ir biologinis šaltinis, tačiau reikšmingų skirtumų gautuose spektruose nepastebėta. Tikslios mėginių sudėties ir juose esančių priemaišų nustatyti vien ATR-FTIR ir BMR metodais negalima dėl β -gliukanų mėginių specifikos. Polisacharidų, baltymų ir lipidų kiekio apskaičiavimas iš spektrinių juostų pločio (%) gali būti netikslus dėl šių medžiagų persidengiančių spektrinių juostų ir ryšių regionų, pavyzdžiui, chitino ir baltymų arba mananų ir β -1,6-gliukanų spektrinių juostų persidengimo. Spektrinių juostų persidengimas gali turėti įtakos jų intensyvumui, priklausomai nuo santykinio polisacharidų ar baltymų kiekio ir apsunkinti rezultatų interpretavimą. Toks skaičiavimas gali būti naudingas tik tuo atveju, kai analizuojami aukšto grynumo β -gliukanai. Visgi tokių junginių gryninimas reikalauja papildomų laiko ir materialinių sąnaudų, todėl jis turėtų būti atliekamas tik esant konkrečiam eksperimentiniam poreikiui. Kitas aspektas, norint išsaugoti natūralią β -gliukano struktūrą, pirmenybė teikiama analizei kietoje fazėje, kas gali sumažinti spektro rezoliuciją. Todėl detalesnei β -gliukanų kietoje fazėje struktūrinei analizei buvo atliktos ATR-FTIR ir BMR spektroskopija.

ATR-FTIR. BMR ir ATR-FTIR spektrų interpretaciją apsunkina skirtingoms molekulėms ir funkcinėms grupėms būdingų sugerties juostų persidengimas (Plata et al., 2013). Pavyzdžiui, ATR IR spektrinė juosta ties 1155 cm^{-1} nors ir priskiriama α -gliukanams, tačiau taip pat gali būti priskirta linijiniams β -1,3-gliukanams arba šakotiems β -1,3/1,6-gliukanams, ypač kai kartu yra sugerties juosta ties 1070 cm^{-1} (Fusté et al., 2019). Kita problematiška sritis yra tarp 3000 cm^{-1} ir 2840 cm^{-1} , siejama su CH valentiniais virpesiais, būdingais lipidams. Tačiau, tiek asimetriški (2925 cm^{-1} ir 2953 cm^{-1}), tiek simetriški (2853 cm^{-1} ir 2875 cm^{-1}) CH_2 ir CH_3 grupių virpesiai gali būti aptinkami polisachariduose (Bzducha-Wróbel et al., 2014; Shi et al., 2014). Todėl šios spektrinės juostos β -gliukanų mėginiuose

nebūtinai reiškia lipidų priemaišas. Be to, remiantis literatūroje randamais duomenimis, tiek gryna gliukozė, tiek išgryninti β -1,3/1,6-gliukanai turi spektrines juostas, kurios paprastai priskiriamos lipidams tiek BMR spektruose, tiek ATR-FTIR sugerties spektruose, iš kurių galime daryti išvadą, kad lipidų kiekio identifikavimas β -gliukanų spektruose yra apsunkintas. Vis dėlto, be papildomo gryninimo etapo, išskirtuose β -gliukanų mėginiuose gali būti tam tikras kiekis lipidų.

Baltymams būdingos amidinės juostos ties 1643, 1547 ir 1228 cm^{-1} taip pat yra būdingos ir chitinui. Literatūroje žymima, kad juostos ties 1649 cm^{-1} , $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1315 \text{ cm}^{-1}$ bei 1375 cm^{-1} yra atitinkamai būdingos chitino C=O, N–H, C–N bei N-acetyl –CH₃ grupėms (Adeosun et al., 2019; Poerio et al., 2021; Šandula et al., 1999). Todėl vertinant galimas baltymų ar lipidų priemaišas svarbu atsižvelgti į tiriamo mėginio prigimtį ir taikytą išskyrimo metodą. β -gliukanų išskyrimas iš mielių dažniausiai apima autolizės procesą, aukštų temperatūrų poveikį, apdorojimą šarmais ar rūgštimis. Tokiomis sąlygomis baltymai yra ardomi proteolitinių fermentų, denatūruoja, dauguma ryšių tarp β -gliukanų ir baltymų yra suardomi. Dėl to reikšminga dalis baltymų yra pašalinama arba degradoja iki mažos molekulinės masės fragmentų. Vis dėlto negalima atmesti, kad nedideli baltymų ar lipidų likučiai, kurie buvo struktūriškai integruoti į ląstelės sienelę, lieka išskirtose β -gliukanų frakcijose. Todėl papildomų metodų, tokių kaip BMR ar cheminė sudėties analizė gali papildyti ATR-FTIR spektroskopijos duomenis ir padėti tiksliau įvertinti galimas priemaišas.

BMR. β -gliukanų heterogeniškumas ir konformacija gali turėti įtakos spektrinių juostų intensyvumui bei pločiui. Literatūroje minima, kad heterogeninių β -gliukanų BMR spektrai pasižymi platesnėmis juostomis (Chakraborty et al., 2021; Kolbe et al., 2021; Lee et al., 2021). Todėl siaura ir intensyvi C1 anglies spektrinė juosta HWN frakcijoje gali būti siejama su β 1,3-gliukanų struktūra, kurioje yra mažas kiekis β -1,6-šoninių grandinių ir chitino. Priešingai, šarmu išskirtos AN ir AWS frakcijos, ypač *C. lusitaniae* AWS frakcija, pasižymėjo platesnėmis ir mažesnio intensyvumo C1 juostomis. Tai rodo, kad jose dominuoja šakoti β -1,3/1,6-gliukanai. Siauros, žemo intensyvumo juostos gali reikšti mažą kiekį homogeninio β -1,3-gliukano (Ehren et al., 2020; Kang et al., 2018; Lamon et al., 2023; Vaithanomsat et al., 2022). Tikėtina, kad AWS ir AN frakcijos β -1,3-gliukanai yra heterogeniniai ir yra sujungti su kitomis molekulėmis, pvz. α -gliukanais, β -1,6-gliukanais ir chitinu. Reikšmingas α -gliukanams būdingo C1 anomerinės anglies rezonansas stebimas ties ~ 99 ppm šarmu išskirtose

frakcijose, ypač AWS. Tai gali reikšti didesnę kiekį α -gliukanų šioje frakcijoje (Chakraborty et al., 2021; Fernando et al., 2022; Kremmyda et al., 2021).

Linijiniai β -gliukanai gali būti atskirti nuo šakotų pagal skirtumus regione tarp 60 ppm ir 80 ppm, kuris yra būdingas C1, C3 ir kitų atomų signalams. Šis regionas priskiriamas β -1,3/1,6-gliukanams, β -1,4-prijungtam chitinui ir α -gliukanams (Chakraborty et al., 2021; Fairweather et al., 2004; Kremmyda et al., 2021; Zhang et al., 2002). HWN frakcijoje, remiantis C1 – C6 anglių cheminiais poslinkiais, turime β -1,3-gliukanų karkasą sujungtą su β -1,6-gliukanais ir chitino molekulėmis (Usui et al., 1975). C1 anglies cheminio poslinkio reikšmių skirtumai gali priklausyti nuo β -gliukanų susijungimo su kitomis molekulėmis (Kremmyda et al., 2021). Didesnis kiekis β -1,6-šoninių granginių arba β -1,4-gliukanų gali lemti C1 rezonanso poslinkį link mažesnių verčių. Tačiau priešingai, β -1,3-gliukano–chitino kompleksas lemia C1 anglies cheminį poslinkį didesnių verčių link (Ehren et al., 2020; Hanashima et al., 2014; Kremmyda et al., 2021). Mėginio hidratacija ir molekulinė masė taip pat gali paveikti cheminį poslinkį. Pavyzdžiui, mažesnis vandens kiekis mėginyje lemia cheminį poslinkį didesnių verčių link (Kono et al., 2017; Kremmyda et al., 2021).

Galiausiai, C1 signalų padėtys ir jų pokyčiai frakcijose leidžia daryti prielaidą apie β -glikozidinių jungčių tipą. HWN frakcijoje didesnis C1 poslinkis gali būti susijęs su $\rightarrow 3$)- β -GlcP-(1 \rightarrow jungtimis, o mažesnis poslinkis AWS ir AN frakcijose – su $\rightarrow 3,6$)- β -GlcP-(1 \rightarrow šakotais segmentais. Pastarieji gali atsirasti, kai β -1,6-glikozidinis ryšys susidaro tarp β -1,3-gliukano neredukuojančio galo ir β -1,6-gliukano redukuojančio galo (Aimanianda et al., 2017; Kollár et al., 1997; Lowman et al., 2011; Zhang et al., 2002). Tai galėtų paaiškinti C3 būdingo β -1,3-gliukanų rezonanso nebuvimą 82-92 ppm regione AWS ir AN frakcijose, nes šakotumas ar kompleksai su kitomis molekulėmis gali slopinti šį signalą. C3 angliai būdingas signalas 82-92 ppm regione yra siejamas su linijiniais, trigrandę spiralę formuojančiais β -1,3-gliukanais ir stebimas tik HWN frakcijoje (Kremmyda et al., 2021; Lowman et al., 2011; Saitô and Yokoi, 1989). Tokia β -1,3-gliukanų karkaso formuojama organizuota struktūra yra palaikoma tarpmolekulinių ir vidumolekulinių vandenilinių jungčių ir užtikrina stabilią konformaciją (Du et al., 2012; Garcia-Rubio et al., 2020; Guo et al., 2021; Kang et al., 2018; Okobira et al., 2008; Saitô and Yokoi, 1989). Panašūs rezultatai buvo gauti Gopal (Gopal et al., 1984) ir kitų mokslininkų (Du et al., 2012; Zhang et al., 2002), kurie taip pat nurodė, kad šakoto β -1,3-gliukano struktūra su β -1,3- ir β -1,6-šoninėmis grandinėmis stokoja ^{13}C signalo β -1,3-glikozidinei jungčiai

tarp 82 ppm ir 92 ppm. Šarmu išskirtos frakcijos greičiausiai formavo atsitiktines spirales (Young et al., 2000).

AN ir AWS β -gliukanų C6 anglies signalai šalia 68 ppm galėtų būti siejami su papildoma jungtimi tarp C1 ir C6 anglies, kas duoda kryžminį signalą C6 pozicijoje ir patvirtina šių frakcijų šakotą β -gliukanų struktūrą (Ehren et al., 2020). Kiti C6 anglies β -1,3-gliukanų ir chitino signalai išsidėstę atitinkamai ties 63 ppm ir 60 ppm (Vaithanomsat et al., 2022). Anglies spektrinė juosta ties 71 ppm persidengia su C4 anglimi pagrinde iš β -1,3-gliukanų su keleta kitų signalų. Jis taip pat galėtų būti priskirtas chitino ir β -1,4-gliukano C4 angliui (Chakraborty et al., 2021; Usui et al., 1975; Zhang et al., 2002) bei β -1,6-gliukanų O pakeistai C6 (Saitō and Yokoi, 1989) arba persidengimui C3 anglies su β -1,4-prijungtu chitinu ir β -1,6-gliukanų C4 anglimi (Kang et al., 2018; Saitō and Yokoi, 1989; Usui et al., 1975). HWN frakcijos apriksimuotuose spektruose specifinės β -1,6-gliukanams būdingos juostos nėra, tačiau β -1,3-gliukano C6 anglies juostose žemesnės vertės galėjo atsirasti dėl karkaso ir šakų juostų persidengimo. Tačiau, net ir tokiu atveju šoninių grandinių kiekis HWN frakcijose yra labai mažas. Be to, spektrinė juosta ties 70,0 ppm gali priklausyti C4 anglies dalyvaujančios β -1,4-glikozidinėje jungtyje rezonansui (Chakraborty et al., 2021; Usui et al., 1975; Zhang et al., 2002). Rezonanso intensyvumo bei pločio skirtumai siejami su gautų frakcijų sudėties skirtumais. Duomenys rodo β -1,6-šoninių grandinių buvimą šarmu išskirtose frakcijose su didžiausiu β -1,6-gliukanų kiekiu AWS frakcijoje ir mažiausiu HWN.

Chitinui būdingos juostos aptinkamos ties 174 ppm, 130 ppm, 34 ppm ir 24 ppm (Lowman et al., 2021). Panašūs karbonilo grupės (C=O) signalai stebimi ties 175,5 ppm HWN, 181,2 ppm AN ir 182,2 ppm AWS frakcijose. Karbonilo grupių ir alifatinų anglių signalai siejami su baltymu buvimu. Karbonilo grupės rezonanso poslinkis į aukštesnes vertes AN ir AWS frakcijose lyginant su HWN galėjo įvykti dėl cheminės modifikacijos, struktūrinių pokyčių, chitino degradacijos ar kitų molekulių prisijungusiu prie β -gliukanų buvimo vietų (Ehren et al., 2020). Kitų cukrų buvimas paaiškintų dalį cheminio poslinkio variacijų mūsų mėginiuose (Lamon et al., 2023). Gautuose β -gliukanų spektruose aromatinėms aminorūgštims būdingas regionas tarp 120 ppm ir 140 ppm nesuteikia išsamios informacijos. Visgi, šarmu išskirtose frakcijose, ypač AN matomos kelios smailės srityje tarp 160 ppm ir 110 ppm. Jos priklauso aromatinėms aminorūgštims, o tarp 50 ppm ir 10 ppm – alifatinėms aminorūgštims (Synytsya and Novak, 2014). Spektrinės juostos ties ~33 ppm gali priklausyti lipidams, ne aromatinėms aminorūgštims, riebalų rūgščių liekanoms ar kitoms medžiagoms, likusioms

po išskyrimo (Bikmurzin et al., 2022; Camacho et al., 2019; Feás et al., 2020; Fernando et al., 2022; Lamon et al., 2023). Spektrinė juosta ties 25 ppm, priskiriama chitino metilo (CH₃) grupei arba melanino metileno (CH₂) grupei, randama visose frakcijose. Kiti signalai, pavyzdžiui, rezonansas ties 80-83 ppm AWS ir AN frakcijose, gali būti priskirtas β-1,4-glikozidinei jungčiai tarp chitino ir β-1,3-gliukano (Fairweather et al., 2004; Usui et al., 1975). Papildomai, rezonansai ties 56,6 ppm HWN bei 54,8 ppm AWS frakcijose gali būti priskirti C2 ir C6 anglių turinčiai aceto grupei (Chakraborty et al., 2021; Kang et al., 2018; Kremmyda et al., 2021; Qu et al., 2021; Spěváček and Brus, 2008). Duomenys rodo, kad visose frakcijose yra β-1,4-glikozidinė jungtimi prijungtų chitino liekanų, ypač šarmu išskirtose frakcijose. Taip pat visose frakcijose yra baltymų priemaišų. Tai koreliuoja su duomenimis, gautais ATR-FTIR spektroskopijos būdu.

Kitos molekulės, kurios galėjo likti po išskirimo, yra melaninas ir glikogenas. Mokslininkai parodė, kad grybų melaninas turi stiprų rezonansą ties 30 ppm bei 175 ppm (Camacho et al., 2019; Chatterjee et al., 2015). Hidrofobinis melaninas su chitinu formuoja kompleksą mielėse (Nosanchuk et al., 2015; Walker et al., 2010). Skirtingų frakcijų β-gliukanai pasižymi gelsvai ruda spalva, dėl ko galime daryti prielaidą, jog spektrinių juostų intensyvumas ir poslinkis šiose srityse galėjo atsirasti dėl pigmento. Glikogenas tai α-1,4-gliukanas naudojamas kaip gliukozės atsargos, dažnai išskiriamas iš mielių kartu su β-gliukanais (Boutros et al., 2022; Lowman et al., 2021). Mokslininkai praneša apie keletą *Candida* rūšių, tokių kaip *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. haemulonii* ir *C. auris*, kurios turi glikogeno kompleksą, prijungtą prie β-1,3/1,6-gliukanų glikozidiniu ryšiu (Lowman et al., 2021). Tai galėtų paaiškinti α-gliukanų signalus mėginiuose išskirtuose iš *Candida* genties mielių. Esminis α-gliukanų C1 anglies signalas, randamas tarp 98 ppm ir 101 ppm, stipriai skiriasi tarp išgautų frakcijų. Kita svarbi sritis ties 72 ppm priskiriama β-gliukanų C2 ir C5 anglims. Tačiau ši sritis persidengia su β-gliukanų ir chitino signalais (Feás et al., 2020). Lowman su kolegomis nustatė, kad dauguma β-1,3/1,6-gliukanų *C. albicans* ląstelės sienelėje egzistuoja kaip makromolekulinis kompleksas su glikogenu (Lowman et al., 2021). Papildomai, nustatyta, kad *A. fumigatus* α-1,3-gliukanai jungiasi su chitinu ir vaidina svarbų vaidmenį ląstelės sienelės organizacijoje ir yra išskiriami terminiu būdu (Chakraborty et al., 2021; Fernando et al., 2022; Kang et al., 2018). Iš turimų duomenų negalime daryti patikimos išvados. Todėl norint nustatyti kokio tipo α-gliukanai išgaunami skirtingais išskirimo metodais, reikalingi tolimesni tyrimai.

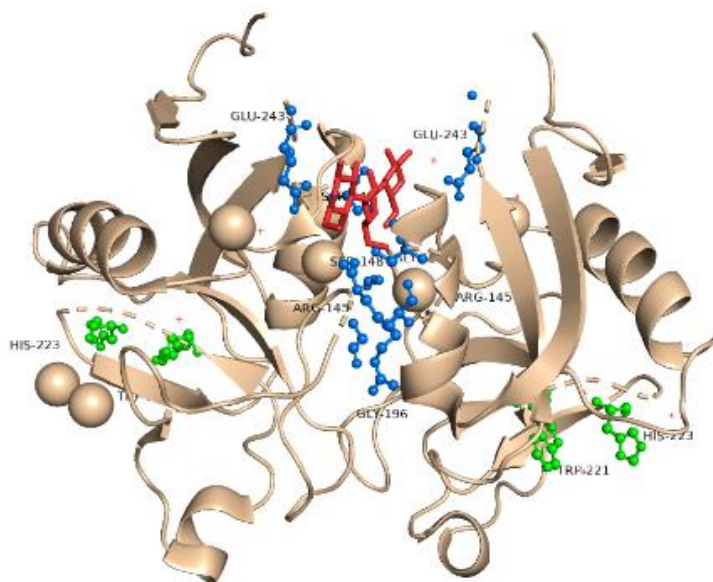
Šarmu ir terminiu būdu išskirtos β -gliukanų frakcijos yra konformaciškai ir struktūriškai skirtingos. Išskyrimas šarmu leidžia gauti skirtingo dydžio β -gliukanų grandines, kurios greičiausiai yra atsitiktinių grandinių pavidalu. Išskiriant β -gliukanus terminiu būdu, gaunamos linijinio β -1,3-gliukanų molekulės, greičiausiai formuojančios trigubą spiralę. HWN frakcijos gali turėti didesnę molekulinę masę, nes nėra veikiamos šarmų, kurie gali suardyti β -glikozidinius ryšius. Gautų β -gliukanų ATR-IR bei ^{13}C BMR spektrų skirtumai parodė sąsają tarp išskyrimo metodo ir β -gliukanų struktūros. Skirtingi metodai naudoja skirtingus išskyrimo procesus arba apdorojimą, kuris lemia struktūrinę ir sudėtinę β -gliukanų frakcijų įvairovę.

4.2. β -gliukanų sąveikos su Dectin-1 homodimeru *in silico* tyrimai

Brown et al. (2007) pirmasis nustatė kristalinę Dectin-1 receptoriaus struktūrą ir aprašė jo dimerinės formos sąveiką su iš trijų monomerų sudarytu β -gliukanu. Monomerinėje receptoriaus formoje buvo identifikuotas svarbus paviršiaus griovelis tarp Trp221 ir His223, atsakingas už β -gliukano atpažinimą (Brown et al., 2007; Feng et al., 2022). Šiame griovelyje β -gliukanų prisijungimą užtikrina hidrofobinės ir elektrostatinės sąveikos. Mutacijos Trp221 ir His223 žymiai sumažina ligandų prisijungimą, patvirtindamos šio griovelio reikšmę ligandų atpažinimui. Receptoriaus dimerizaciją lemia didelės (1520 Å) hidrofiliinės kišenės, su hidrofobinėmis sritimis (pvz., Gly151, Asp195, Glu243) susiformavimą. Buvo nustatyta, kad šią sritį formuoja aminorūgščių liekanos Ser129A, Tyr131A, Leu154A, Asp158AB, Glu162AB, Glu194AB, Asp195AB, Glu241AB ir Glu243AB. Kadangi ši sritis buvo nutolusi nuo Trp221/His223 griovelio (4.1 pav.), o mutacija Glu194Ala neturėjo įtakos ligandų prisijungimui *in vitro*, buvo iškelta prielaida, kad toks prisijungimas galėjo būti kristalizacijos artefaktas ir nėra esminis tiesioginiam β -gliukano atpažinimui (Adachi et al., 2004; Brown et al., 2007). Todėl dauguma *in silico* tyrimų buvo vykdoma su monomerine receptoriaus forma.

Molekulinis modeliavimas parodė, kad paviršiaus griovelis tarp Trp221 ir His223 efektyviai prisijungia ilgesnius β -gliukanus ($\text{DP} \geq 10$). Detalesni molekulinės dinamikos tyrimai su trigrande spirale parodė, kad lentinanas jungiasi prie Dectin-1 monomero 4-8 vandenilinėmis jungtimis, o MM/PBSA analizė parodė aukštą afiškumą, su laisva jungimosi energija $-53,7$ kcal/mol. Vandenilinės jungtys ir hidrofobinė sąveika vyko su Trp221, His223, Tyr228 ir kitomis aminorūgščių liekanomis (Asn233, Glu230, Trp228, His217 ir kt.) (Feng et al., 2022; Wu et al., 2021). Atlikta linijinių β -

gliukanų ir Dectin-1 komplekso MM/GBSA analizė parodė, kad mažiausia laisva jungimosi energija (ΔG) siekė $-128,5$ kJ/mol arba $-30,7$ kcal/mol, patvirtindama stiprią baltymo-ligando sąveiką (Feng et al., 2022).



4.1 pav. Dectin-1 receptoriaus ir β -gliukano kompleksas (PDB ID: 2CL8). Žalia spalva pažymėtos Trp221 ir His223 aminorūgščių liekanos, raudona spalva – β -gliukanas, mėlyna spalva – aminorūgščių liekanos hidrofobinėje kišenėje.

Pastaraisiais metais atsirado keletas publikacijų, kuriose aprašomi tyrimai su dimeriniu Dectin-1. Patidar ir kt. (2020) atliktame tyrime, naudojant molekulinį dokinimą, buvo nustatyta, kad dimerinės Dectin-1 receptoriaus formos afiniškumas β -gliukanui ($-7,9$ kcal/mol) ir zimozanui ($-8,5$ kcal/mol) yra aukštesnis nei TLR2 receptoriaus šiems ligandams ($-6,5$ kcal/mol) (Patidar et al., 2020). Molekulinio dokininimo tyrimai papildomai patvirtina Dectin-1 ir β -gliukano sąveikos specifiką bei stiprumą. Kitame tyrime, Souza ir kt. (2022) nustatė, kad iš keturių monomerų sudaryto kurdilano prisijungimo prie Dectin-1 energija yra lygi $-7,5$ kcal/mol, o sąveika vyksta formuojantis 18 vandenilinių jungčių (donorai: Ala152, Glu194, Gly151, Leu244, Lys245, Ser148; akceptorai: Glu194, Arg145, Glu243) (D'Souza et al., 2022).

Šiame darbe buvo nustatyta, kad šakotų ir linijinių β -gliukanų spėjamas afiniškumas dokininimo metu buvo panašus ir svyravo nuo -11 kcal/mol iki -13 kcal/mol pagal Vina afiniškumą arba nuo 4,3 iki 4,8 pKd pagal CNN

afiniškumą. Dokinimo metu nustatyta, kad β -1,6-šoninės grandinės sąveikavo su tomis pačiomis aminorūgščių liekanomis kaip ir karkaso molekulės: Arg145A, Ser148A,B, Glu194A,B, Glu243A,B, Lys245B. Visgi, molekulinė dinamika nepatvirtino šakotų β -gliukanų ir receptoriaus kompleksų stabilumo. Tik linijiniai β -1,3-gliukanai ir dimerinė Dectin-1 forma formavo stabilų kompleksą 100 ns MD simuliacijos metu, su $\Delta G = -14,04$ kcal/mol, vidutiniškai su 6 vandenilinėmis jungtimis, iš kurių svarbiausios buvo tarp β -gliukano ir Arg145, Ser148, Gln149, Asp195 Glu243, Lys245.

Anaya ir kt. (2023) atliktas *in vivo* tyrimas parodė, kad ramybės būsenoje Dectin-1 receptoriaus išlieka monomerinis, bet, esant β -gliukanams, ypač aukštesnės struktūros, jis oligomerizuojasi ir agreguojasi į mažas <15 nm grupes. Toks susitelkimas taip pat pastebėtas Dectin-1 kontaktuojant su mieliagyrbiais (Anaya et al., 2023). Nors tiesioginių *in vivo* duomenų apie Dectin-1 oligomerizaciją trūksta, kai kurių CTLD šeimos baltymų oligomerizacija aprašyta tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. Esant patogenui su ilgomis β -gliukanų grandinėmis, receptoriaus avidiškumas gali padidėti per oligomerizaciją, sukeltiant klasterių susidarymą ir inicijuojant signalų perdavimą (Anaya et al., 2023). Atsižvelgiant į tai, kad β -gliukanų prisijungimas prie Dectin-1 receptoriaus yra susijęs su jo oligomerizacija, stipresnė sąveika gali būti būtina pradiniam receptoriaus aktyvavimui, o jau aktyvuoto receptoriaus sąveikos palaikymui gali pakakti ir silpnėsių sąveikų. Šią prielaidą papildomai patvirtina eksperimentiniai tyrimai, parodę, jog mutacijos Trp221Ala, His223Ala ir Tyr228Ala visiškai panaikino receptoriaus oligomerų susidarymą (Dulal et al., 2018). Vis dėlto, galutiniam šių išvadų patvirtinimui reikalingi tolimesni eksperimentiniai ir molekulinio modeliavimo tyrimai.

Taigi, apibendrinant, svarbu pažymėti, kad darbe aprašytas β -gliukanų molekulinis dokinimas prie dimerinio Dectin-1 ir atlikta receptoriaus-ligando MD simuliacija yra labai svarbūs receptorių signalizacijos supratimui. Remiantis atliktais tyrimais, patikimai nustatyta, kad tik linijiniai β -gliukanai formuoja stabilius kompleksus su Dectin-1 dimeru ir tai turi realų pritaikymą imunoterapijoje.

IŠVADOS

1. Remiantis ^{13}C BMR spektro C3 anglies atomui būdingu signalu 82-92 ppm regione ir C6 anglies atomui būdingais signalais 60-70 ppm regione nustatyta, kad karštu vandeniu (termiškai) išskirtoje frakcijoje vyrauja linijinės trigrandės spiralės β -1,3-gliukanų struktūra, šarmu išskirtoje frakcijoje atsitiktinės spirales formuojantys šakoti β -1,3/1,6-gliukanai. Remiantis ^{13}C BMR ir ATR-FTIR spektrų analize, visose frakcijose pagrindines priemaišas sudaro chitinas.
2. Molekulinio dokinimo rezultatų analizė parodė, kad sąveika tarp linijinių ir šakotų β -1,3-gliukanų su Dectin-1 dimeru vyksta ir su linijiniais, ir su šakotais β -1,3/1,6-gliukanais. GNINA apskaičiuotas CNN afiniškumas svyruoja nuo $-4,3$ pKd iki $-4,8$ pKd priklausomai nuo grandinės ilgio. Dažniausiai sąveika vyksta su abiejų Dectin-1 dimero grandinių Ser148, Glu194 ir Glu243 aminorūgščių liekanomis, tačiau papildomai gali dalyvauti Arg145, Gln149, Gly151, Ala152 bei Asp195.
3. Atliktų 100 ns molekulių dinamikos simuliacijų rezultatai parodė, kad linijinio β -1,3-gliukanų–Dectin-1 komplekso nukrypimas nuo pradinės konformacijos visos simuliacijos metu buvo pastovus ir siekė 2 Å. Pagrindinės sąveikose dalyvavusių aminorūgščių liekanos buvo Ser148, Gln149, Asp195, Glu243 ir Lys245, kurios sąveikoje dalyvavo bent 50 ns. MM/PBSA metodu apskaičiuota laisvoji jungimosi energija siekė $-14,04$ kcal/mol ir yra didesnė nei apskaičiuota molekulinio dokinimo metu (-12 kcal/mol). Darbe tirtų šakotų β -1,3/1,6-gliukanų bei β -1,3/1,4-gliukanų kompleksų su Dectin-1 homodimeru sąveika buvo ribota. Šoninės grandinės lėmė sąveikų su aminorūgščių liekanomis pertvarkas, kas gali lemti sąveikos su receptoriu praradimą, todėl Dectin-1 homodimero sąveikos kišenėje orientacija yra labiau palanki linijiniams β -gliukanams.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abraham, M., Alekseenko, A., Basov, V., Bergh, C., Briand, E., Brown, A., Doijade, M., Fiorin, G., Fleischmann, S., Gorelov, S., Gouaillardet, G., Grey, A., Irrgang, M.E., Jalalypour, F., Jordan, J., Kutzner, C., Lemkul, J.A., Lundborg, M., Merz, P., Miletic, V., Morozov, D., Nabet, J., Pall, S., Pasquadibisceglie, A., Pellegrino, M., Santuz, H., Schulz, R., Shugaeva, T., Shvetsov, A., Villa, A., Wingbermuehle, S., Hess, B., Lindahl, E., 2024. GROMACS 2024.4 Manual. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14016613>
2. Adachi, Y., Ishii, T., Ikeda, Y., Hoshino, A., Tamura, H., Aketagawa, J., Tanaka, S., Ohno, N., 2004. Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1. *Infect Immun* 72, 4159–4171. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4159-4171.2004>
3. Adeosun, S., Cletus, O., Gbenebor, O., Sekunowo, O., 2019. Extraction, Characterization and Properties of Chitin and Chitosan of Nigerian Origin, in: *Contributed Papers from MS&T19*. Presented at the MS&T19, TMS, pp. 298–305. https://doi.org/10.7449/2019/MST_2019_298_305
4. Agu, P.C., Afiukwa, C.A., Orji, O.U., Ezech, E.M., Ofoke, I.H., Ogbu, C.O., Ugwuja, E.I., Aja, P.M., 2023. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Sci Rep* 13, 13398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>
5. Ahmed, M., Maldonado, A.M., Durrant, J.D., 2023. From Byte to Bench to Bedside: Molecular Dynamics Simulations and Drug Discovery.
6. Aimanianda, V., Clavaud, C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., Latgé, J.-P., 2009. Cell Wall β -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: *STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND IN SITU SYNTHESIS*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 13401–13412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807667200>
7. Aimanianda, V., Simenel, C., Garnaud, C., Clavaud, C., Tada, R., Barbin, L., Mouyna, I., Heddergott, C., Popolo, L., Ohya, Y., Delepierre, M., Latgé, J.-P., 2017. The Dual Activity Responsible for the Elongation and Branching of β -(1,3)-Glucan in the Fungal Cell Wall. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00619-17>
8. Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J., Kevelaitis, E., 2007. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 43, 597–606.
9. Ami, D., Mereghetti, P., Maria, S., 2013. Multivariate Analysis for Fourier Transform Infrared Spectra of Complex Biological Systems and Processes, in: Freitas, L. (Ed.), *Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences*. InTech: London, UK. <https://doi.org/10.5772/53850>

10. Anaya, E.U., Amin, A.E., Wester, M.J., Danielson, M.E., Michel, K.S., Neumann, A.K., 2023. Dectin-1 multimerization and signaling depends on fungal β -glucan structure and exposure. *Biophys J* 122, 3749–3767. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.07.021>
11. Anderson, J.M., Johnson, R.L., Schmidt-Rohr, K., Shanks, B.H., 2014. Solid state NMR study of chemical structure and hydrothermal deactivation of moderate-temperature carbon materials with acidic SO₃H sites. *Carbon* 74, 333–345. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.03.041>
12. Anwar, M.I., Muhammad, F., Awais, M.M., Akhtar, M., 2017. A review of β -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *World's Poultry Science Journal* 73, 651–661. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000241>
13. Avramia, I., Amariei, S., 2022. Formulation, Characterization and Optimization of β -Glucan and Pomegranate Juice Based Films for Its Potential in Diabetes. *Nutrients* 14, 2142. <https://doi.org/10.3390/nu14102142>
14. Avramia, I., Amariei, S., 2021. Spent Brewer's Yeast as a Source of Insoluble β -Glucans. *IJMS* 22, 825. <https://doi.org/10.3390/ijms22020825>
15. Bartošová, A., Soldán, M., Sirotiak, M., Blinová, L., Michalíková, A., 2013. Application of FTIR-ATR Spectroscopy for Determination of Glucose in Hydrolysates of Selected Starches. *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology* 21, 116–121. <https://doi.org/10.2478/rput-2013-0019>
16. Bashir, K.M., Choi, J.-S., 2017. Clinical and Physiological Perspectives of β -Glucans: The Past, Present, and Future. *IJMS* 18, 1906. <https://doi.org/10.3390/ijms18091906>
17. Bidula, S., Sexton, D.W., Schelenz, S., 2019. Ficolins and the Recognition of Pathogenic Microorganisms: An Overview of the Innate Immune Response and Contribution of Single Nucleotide Polymorphisms. *J Immunol Res* 2019, 3205072. <https://doi.org/10.1155/2019/3205072>
18. Bikmurzin, R., Bandzevičiūtė, R., Maršalka, A., Maneikis, A., Kalėdienė, L., 2022. FT-IR Method Limitations for β -Glucan Analysis. *Molecules* 27, 4616. <https://doi.org/10.3390/molecules27144616>
19. Bootten, T.J., 2004. Solid-state ¹³C-NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary cell walls of mung bean (*Vigna radiata* L.) occur in different domains: a new model for xyloglucan-cellulose interactions in the cell wall. *Journal of Experimental Botany* 55, 571–583. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh065>
20. Bose, N., Chan, A.S.H., Guerrero, F., Maristany, C.M., Qiu, X., Walsh, R.M., Ertelt, K.E., Jonas, A.B., Gorden, K.B., Dudney, C.M., Wurst, L.R., Danielson, M.E., Elmasry, N., Magee, A.S., Patchen, M.L., Vasilakos, J.P., 2013. Binding of Soluble Yeast β -Glucan to Human

- Neutrophils and Monocytes is Complement-Dependent. *Front Immunol* 4, 230. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00230>
21. Boutros, J.A., Magee, A.S., Cox, D., 2022. Comparison of structural differences between yeast β -glucan sourced from different strains of *saccharomyces cerevisiae* and processed using proprietary manufacturing processes. *Food Chemistry* 367, 130708. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130708>
 22. Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S.J., Gordon, S., 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 197, 1119–1124. <https://doi.org/10.1084/jem.20021890>
 23. Brown, J., O’Callaghan, C.A., Marshall, A.S.J., Gilbert, R.J.C., Siebold, C., Gordon, S., Brown, G.D., Jones, E.Y., 2007. Structure of the fungal β -glucan-binding immune receptor dectin-1: Implications for function. *Protein Science* 16, 1042–1052. <https://doi.org/10.1110/ps.072791207>
 24. Byrtusová, D., Shapaval, V., Holub, J., Šimanský, S., Rapta, M., Sztokowski, M., Kohler, A., Márová, I., 2020. Revealing the Potential of Lipid and β -Glucans Coproduction in Basidiomycetes Yeast. *Microorganisms* 8, 1034. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071034>
 25. Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Kawarska, A., Stasiak-Róžańska, L., Gientka, I., Majewska, E., 2014. Evaluation of the Efficiency of Different Disruption Methods on Yeast Cell Wall Preparation for β -Glucan Isolation. *Molecules* 19, 20941–20961. <https://doi.org/10.3390/molecules191220941>
 26. Cabib, E., Blanco, N., Arroyo, J., 2012. Presence of a large β (1-3)glucan linked to chitin at the *Saccharomyces cerevisiae* mother-bud neck suggests involvement in localized growth control. *Eukaryot Cell* 11, 388–400. <https://doi.org/10.1128/EC.05328-11>
 27. Camacho, E., Vij, R., Chrissian, C., Prados-Rosales, R., Gil, D., O’Meally, R.N., Cordero, R.J.B., Cole, R.N., McCaffery, J.M., Stark, R.E., Casadevall, A., 2019. The structural unit of melanin in the cell wall of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem* 294, 10471–10489. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008684>
 28. Canteri, M.H.G., Renard, C.M.G.C., Le Bourvellec, C., Bureau, S., 2019. ATR-FTIR spectroscopy to determine cell wall composition: Application on a large diversity of fruits and vegetables. *Carbohydrate Polymers* 212, 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.021>
 29. Caseiro, C., Dias, J.N.R., de Andrade Fontes, C.M.G., Bule, P., 2022. From Cancer Therapy to Winemaking: The Molecular Structure and Applications of β -Glucans and β -1, 3-Glucanases. *Int J Mol Sci* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23063156>
 30. Černá, M., Barros, A.S., Nunes, A., Rocha, S.M., Delgadillo, I., Čopíková, J., Coimbra, M.A., 2003. Use of FT-IR spectroscopy as a

- tool for the analysis of polysaccharide food additives. *Carbohydrate Polymers* 51, 383–389. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00259-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00259-X)
31. Chakraborty, A., Fernando, L.D., Fang, W., Dickwella Widanage, M.C., Wei, P., Jin, C., Fontaine, T., Latgé, J.-P., Wang, T., 2021. A molecular vision of fungal cell wall organization by functional genomics and solid-state NMR. *Nat Commun* 12, 6346. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26749-z>
 32. Chatterjee, S., Prados-Rosales, R., Itin, B., Casadevall, A., Stark, R.E., 2015. Solid-state NMR Reveals the Carbon-based Molecular Architecture of *Cryptococcus neoformans* Fungal Eumelanins in the Cell Wall. *J Biol Chem* 290, 13779–13790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618389>
 33. Chaturvedi, N., Yadav, B.S., Pandey, P.N., Tripathi, V., 2017. The effect of β -glucan and its potential analog on the structure of Dectin-1 receptor. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 74, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.04.014>
 34. Cisneros, R.L., Gibson, F.C. 3rd, Tzianabos, A.O., 1996. Passive transfer of poly-(1-6)-beta-glucotriosyl-(1-3)-beta-glucopyranose glucan protection against lethal infection in an animal model of intra-abdominal sepsis. *Infect Immun* 64, 2201–2205. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2201-2205.1996>
 35. Climova, A., Ibrahim, M.N.G., Salamahina, A., Savin, A.M., Dukhinova, M.S., Barakova, N.V., Krivoshapkina, E.F., 2021. Application of extracted β -glucan from oat for β -carotene encapsulation. *J Food Sci Technol* 58, 2641–2650. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04770-2>
 36. Cui, J., Zhao, T., Zou, L., Wang, X., Zhang, Y., 2018. Molecular dynamics simulation of *S. cerevisiae* glucan destruction by plasma ROS based on ReaxFF. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 51, 355401. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aad4ec>
 37. de Jong, M.A.W.P., Vriend, L.E.M., Theelen, B., Taylor, M.E., Fluitsma, D., Boekhout, T., Geijtenbeek, T.B.H., 2010. C-type lectin Langerin is a beta-glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi. *Mol Immunol* 47, 1216–1225. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.12.016>
 38. D'Souza, S., Du Plessis, S.M., Egieyeh, S., Bekale, R.B., Maphasa, R.E., Irabin, A.F., Sampson, S.L., Dube, A., 2022. Physicochemical and Biological Evaluation of Curdlan-Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles as a Host-Directed Therapy Against Mycobacterium Tuberculosis. *J Pharm Sci* 111, 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.09.012>
 39. Du, B., Meenu, M., Liu, H., Xu, B., 2019. A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of β -Glucan. *IJMS* 20, 4032. <https://doi.org/10.3390/ijms20164032>

40. Du, L., Zhang, X., Wang, C., Xiao, D., 2012. Preparation of Water Soluble Yeast Glucan by Four Kinds of Solubilizing Processes. *ENG* 04, 184–188. <https://doi.org/10.4236/eng.2012.410B048>
41. Dulal, H.P., Adachi, Y., Ohno, N., Yamaguchi, Y., 2018. β -Glucan-induced cooperative oligomerization of Dectin-1 C-type lectin-like domain. *Glycobiology* 28. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy039>
42. Ehren, H.L., Appels, F.V.W., Houben, K., Renault, M.A.M., Wösten, H.A.B., Baldus, M., 2020. Characterization of the cell wall of a mushroom forming fungus at atomic resolution using solid-state NMR spectroscopy. *The Cell Surface* 6, 100046. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2020.100046>
43. Fährrolfes, R., Bietz, S., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Otto, T., Volkamer, A., Rarey, M., 2017. ProteinsPlus: a web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Research* 45, W337–W343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx333>
44. Fairweather, J.K., Him, J.L.K., Heux, L., Driguez, H., Bulone, V., 2004. Structural characterization by ^{13}C -NMR spectroscopy of products synthesized in vitro by polysaccharide synthases using ^{13}C -enriched glycosyl donors: application to a UDP-glucose:(1 \rightarrow 3)- β -D-glucan synthase from blackberry (*Rubus fruticosus*). *Glycobiology* 14, 775–781. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh097>
45. Feás, X., Vázquez-Tato, M.P., Seijas, J.A., Pratima G. Nikalje, A., Fraga-López, F., 2020. Extraction and Physicochemical Characterization of Chitin Derived from the Asian Hornet, *Vespa velutina* Lepeletier 1836 (Hym.: Vespidae). *Molecules* 25, 384. <https://doi.org/10.3390/molecules25020384>
46. Feng, T., Li, M., Zhou, J., Zhuang, H., Chen, F., Ye, R., Campanella, O., Fang, Z., 2015. Application of molecular dynamics simulation in food carbohydrate research—a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 31, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.06.015>
47. Feng, X., Li, F., Ding, M., Zhang, R., Shi, T., Lu, Y., Jiang, W., 2022. Molecular dynamic simulation: Study on the recognition mechanism of linear β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan by Dectin-1. *Carbohydrate Polymers* 286, 119276. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119276>
48. Fernando, L.D., Dickwella Widanage, M.C., Shekar, S.C., Mentink-Vigier, F., Wang, P., Wi, S., Wang, T., 2022. Solid-state NMR analysis of unlabeled fungal cell walls from *Aspergillus* and *Candida* species. *Journal of Structural Biology: X* 6, 100070. <https://doi.org/10.1016/j.yjsbx.2022.100070>
49. Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Adema, G.J., 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nature Reviews Immunology* 2, 77–84. <https://doi.org/10.1038/nri723>
50. Fusté, N.P., Guasch, M., Guillen, P., Anerillas, C., Cemeli, T., Pedraza, N., Ferrezuelo, F., Encinas, M., Moralejo, M., Garí, E., 2019. Barley β -

- glucan accelerates wound healing by favoring migration versus proliferation of human dermal fibroblasts. *Carbohydrate Polymers* 210, 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.090>
51. Galichet, A., Sockalingum, G.D., Belarbi, A., Manfait, M., 2001. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS Microbiology Letters* 197, 179–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10601.x>
 52. Gan, F., Wu, K., Ma, F., Du, C., 2020. In Situ Determination of Nitrate in Water Using Fourier Transform Mid-Infrared Attenuated Total Reflectance Spectroscopy Coupled with Deconvolution Algorithm. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25245838>
 53. Gangopadhyay, N., Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., 2015. Optimisation of yield and molecular weight of β -glucan from barley flour using response surface methodology. *Journal of Cereal Science* 62, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.10.007>
 54. Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., Underhill, D.M., 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 197, 1107–1117. <https://doi.org/10.1084/jem.20021787>
 55. Garcia-Rubio, R., De Oliveira, H.C., Rivera, J., Trevijano-Contador, N., 2020. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front. Microbiol.* 10, 2993. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>
 56. Garlatti, V., Belloy, N., Martin, L., Lacroix, M., Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T., Fontecilla-Camps, J.C., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., Gaboriaud, C., 2007. Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *EMBO J* 26, 623–633. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601500>
 57. Geller, A., Shrestha, R., Yan, J., 2019. Yeast-Derived β -Glucan in Cancer: Novel Uses of a Traditional Therapeutic. *IJMS* 20, 3618. <https://doi.org/10.3390/ijms20153618>
 58. Geller, A., Yan, J., 2020. Could the Induction of Trained Immunity by β -Glucan Serve as a Defense Against COVID-19? *Front Immunol* 11, 1782. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01782>
 59. Geminiani, L., Campione, F., Corti, C., Luraschi, M., Motella, S., Recchia, S., Rampazzi, L., 2022. Differentiating between Natural and Modified Cellulosic Fibres Using ATR-FTIR Spectroscopy. *Heritage* 5, 4114–4139. <https://doi.org/10.3390/heritage5040213>
 60. Gieroba, B., Sroka-Bartnicka, A., Kazimierczak, P., Kalisz, G., Lewalska-Graczyk, A., Vivcharenko, V., Nowakowski, R., Pieta, I.S., Przekora, A., 2022. Surface Chemical and Morphological Analysis of Chitosan/1,3- β -d-Glucan Polysaccharide Films Cross-Linked at 90 °C. *IJMS* 23, 5953. <https://doi.org/10.3390/ijms23115953>

61. Gieroba, B., Sroka-Bartnicka, A., Kazimierczak, P., Kalisz, G., Lewalska-Graczyk, A., Vivcharenko, V., Nowakowski, R., Pieta, I.S., Przekora, A., 2020. Spectroscopic studies on the temperature-dependent molecular arrangements in hybrid chitosan/1,3- β -D-glucan polymeric matrices. *International Journal of Biological Macromolecules* 159, 911–921. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.155>
62. Gonzaga, M.L.C., Menezes, T.M.F., de Souza, J.R.R., Ricardo, N.M.P.S., Soares, S. de A., 2013. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2, 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.10.005>
63. Goodridge, H.S., Wolf, A.J., Underhill, D.M., 2009. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev* 230, 38–50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x>
64. Gopal, P.K., Shepherd, M.G., Sullivan, P.A., 1984. Analysis of Wall Glucans from Yeast, Hyphal and Germ-tube Forming Cells of *Candida albicans*. *Microbiology* 130, 3295–3301. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-12-3295>
65. Graaff, P., Govers, C., Wichers, H., Debets, R., 2018. Consumption of β -glucans to spice up T cell treatment of tumors: a review. *Expert opinion on biological therapy* 18. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1523392>
66. Guo, X., Kang, J., Xu, Z., Guo, Q., Zhang, L., Ning, H., Cui, S.W., 2021. Triple-helix polysaccharides: Formation mechanisms and analytical methods. *Carbohydrate Polymers* 262, 117962. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117962>
67. Ha, C.H., Lim, K.H., Kim, Y.T., Lim, S.T., Kim, C.W., Chang, H.I., 2002. Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 370–377. <https://doi.org/10.1007/s002530100824>
68. Haacke, N., Wang, H., Yan, S., Barovic, M., Li, X., Nagai, K., Botezatu, A., Hatzioannou, A., Gercken, B., Trimaglio, G., Shah, A.U., Wang, J., Ye, L., Jaykar, M.T., Rauner, M., Wielockx, B., Chung, K.-J., Netea, M.G., Kalafati, L., Hajishengallis, G., Chavakis, T., 2025. Innate immune training of osteoclastogenesis promotes inflammatory bone loss in mice. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2025.02.001>
69. Han, B., Baruah, K., Cox, E., Vanrompay, D., Bossier, P., 2020. Structure-Functional Activity Relationship of β -Glucans From the Perspective of Immunomodulation: A Mini-Review. *Front. Immunol.* 11, 658. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00658>
70. Hanashima, S., Ikeda, A., Tanaka, H., Adachi, Y., Ohno, N., Takahashi, T., Yamaguchi, Y., 2014. NMR study of short β (1-3)-glucans provides

- insights into the structure and interaction with Dectin-1. *Glycoconj J* 31, 199–207. <https://doi.org/10.1007/s10719-013-9510-x>
71. Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R., 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics* 4, 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
 72. Hartland, R.P., Vermeulen, C.A., Klis, F.M., Sietsma, J.H., Wessels, J.G., 1994. The linkage of (1-3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1591–1599. <https://doi.org/10.1002/yea.320101208>
 73. Heng, Y., Zhang, X., Borggrewe, M., van Weering, H.R.J., Brummer, M.L., Nijboer, T.W., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Boddeke, E.W.G.M., Laman, J.D., Eggen, B.J.L., 2021. Systemic administration of β -glucan induces immune training in microglia. *Journal of Neuroinflammation* 18, 57. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02103-4>
 74. Herre, J., Marshall, A.S.J., Caron, E., Edwards, A.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S., Brown, G.D., 2004. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 104, 4038–4045. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1140>
 75. Hida, S., Miura, N.N., Adachi, Y., Ohno, N., 2005. Effect of *Candida albicans* cell wall glucan as adjuvant for induction of autoimmune arthritis in mice. *Journal of Autoimmunity* 25, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2005.06.002>
 76. Hong, T., Yin, J.-Y., Nie, S.-P., Xie, M.-Y., 2021. Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective. *Food Chemistry: X* 12, 100168. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100168>
 77. Huang, G., Chen, F., Yang, W., Huang, H., 2021. Preparation, deproteinization and comparison of bioactive polysaccharides. *Trends in Food Science & Technology* 109, 564–568. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.038>
 78. Huang, J., MacKerell, A.D.J., 2013. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem* 34, 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
 79. Huo, R., Wuhanqimuge, Zhang, M., Sun, M., Miao, Y., 2025. Molecular dynamics modeling of different conformations of beta-glucan, molecular docking with dectin-1, and the effects on macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules* 293, 139382. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.139382>
 80. Ibe, C., Munro, C.A., 2021. Fungal Cell Wall Proteins and Signaling Pathways Form a Cytoprotective Network to Combat Stresses. *JoF* 7, 739. <https://doi.org/10.3390/jof7090739>

81. Ikewaki, N., Dedeepiya, V.D., Raghavan, K., Rao, K.-S., Vaddi, S., Osawa, H., Kisaka, T., Kurosawa, G., Srinivasan, S., Kumar, S.R.B., Senthilkumar, R., Iwasaki, M., Preethy, S., Abraham, S.J.K., 2022. β -glucan vaccine adjuvant approach for cancer treatment through immune enhancement (B-VACCIEN) in specific immunocompromised populations (Review). *Oncol Rep* 47, 14. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8225>
82. Iorio, E., Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., Ferretti, A., Giannini, M., Cassone, A., Podo, F., 2008. *Candida albicans* cell wall comprises a branched β -d-(1 \rightarrow 6)-glucan with β -d-(1 \rightarrow 3)-side chains. *Carbohydrate Research* 343, 1050–1061. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.02.020>
83. Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S.S.M., Xu, B., 2018. A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 61, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.010>
84. Jeffrey, G.A., 1997. *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Topics in Physical Chemistry - Oxford University Press. Oxford University Press.
85. Jimenez-Lucho, V., Ginsburg, V., Krivan, H.C., 1990. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal beta 1-4Glc beta 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts. *Infect Immun* 58, 2085–2090. <https://doi.org/10.1128/iai.58.7.2085-2090.1990>
86. Jo, S., Kim, T., Iyer, V.G., Im, W., 2008. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry* 29, 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
87. Jo, S., Song, K.C., Desaire, H., MacKerell Jr., A.D., Im, W., 2011. Glycan reader: Automated sugar identification and simulation preparation for carbohydrates and glycoproteins. *Journal of Computational Chemistry* 32, 3135–3141. <https://doi.org/10.1002/jcc.21886>
88. Józefowski, S., Yang, Z., Marcinkiewicz, J., Kobzik, L., 2012. Scavenger receptors and β -glucan receptors participate in the recognition of yeasts by murine macrophages. *Inflamm Res* 61, 113–126. <https://doi.org/10.1007/s00011-011-0395-5>
89. Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M.C.D., Chen, A., Azadi, P., Wang, P., Mentink-Vigier, F., Wang, T., 2018. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat Commun* 9, 2747. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05199-0>
90. Karimi, R., Homayoonfal, M., Malekjani, N., Kharazmi, M.S., Jafari, S.M., 2024. Interaction between β -glucans and gut microbiota: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 64, 7804–7835. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2192281>

91. Kath, F., Kulicke, W.-M., 1999. Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 268, 59–68. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-9505\(19990701\)268:1<59::AID-APMC59>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-9505(19990701)268:1<59::AID-APMC59>3.0.CO;2-F)
92. Kaur, K., Dattajirao, V., Shrivastava, V., Bhardwaj, U., 2012. Isolation and Characterization of Chitosan-Producing Bacteria from Beaches of Chennai, India. *Enzyme Research* 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/421683>
93. Kędzierska-Matyssek, M., Matwijczuk, Arkadiusz, Florek, M., Barłowska, J., Wolanciuk, A., Matwijczuk, Alicja, Chruściel, E., Walkowiak, R., Karcz, D., Gładyszewska, B., 2018. Application of FTIR spectroscopy for analysis of the quality of honey. *BIO Web Conf.* 10, 02008. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20181002008>
94. Kim, Y.-T., Kim, E.-H., Cheong, C., Williams, D.L., Kim, C.-W., Lim, S.-T., 2000. Structural characterization of b-D-(1 → 3, 1 → 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 11.
95. Klähn, M., Schlitter, J., Gerwert, K., 2005. Theoretical IR Spectroscopy Based on QM/MM Calculations Provides Changes in Charge Distribution, Bond Lengths, and Bond Angles of the GTP Ligand Induced by the Ras-Protein. *Biophysical Journal* 88, 3829–3844. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.058644>
96. Kolbe, F., Ehren, H.L., Kohrs, S., Butscher, D., Reiß, L., Baldus, M., Brunner, E., 2021. Solid-state NMR spectroscopic studies of ¹³C,¹⁵N,²⁹Si-enriched biosilica from the marine diatom *Cyclotella cryptica*. *Discov Mater* 1, 3. <https://doi.org/10.1007/s43939-020-00003-7>
97. Kollár, R., Reinhold, B.B., Petráková, E., Yeh, H.J.C., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., Cabib, E., 1997. Architecture of the Yeast Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry* 272, 17762–17775. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17762>
98. Kono, H., Kondo, N., Hirabayashi, K., Ogata, M., Totani, K., Ikematsu, S., Osada, M., 2017. Two-dimensional NMR data of a water-soluble β-(1→3, 1→6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* and schizophyllan from *Schizophyllum commune*. *Data in Brief* 15, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.09.067>
99. Kremmyda, A., MacNaughtan, W., Arapoglou, D., Eliopoulos, C., Metafa, M., Harding, S.E., Israilides, C., 2021. The detection, purity and structural properties of partially soluble mushroom and cereal β-D-glucans: A solid-state NMR study. *Carbohydrate Polymers* 266, 118103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118103>
100. Lamon, G., Lends, A., Valsecchi, I., Wong, S.S.W., Duprès, V., Lafont, F., Tolchard, J., Schmitt, C., Mallet, A., Grélard, A., Morvan, E., Dufourc, E.J., Habenstein, B., Guijarro, J.I., Aïmanianda, V., Loquet, A., 2023. Solid-state NMR molecular snapshots of *Aspergillus*

- fumigatus* cell wall architecture during a conidial morphotype transition. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 120, e2212003120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2212003120>
101. Laskowski, R.A., Swindells, M.B., 2011. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. J Chem Inf Model 51, 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
 102. Lastauskienė, E., Zinkevičienė, A., Girkontaitė, I., Kaunietis, A., Kvedarienė, V., 2014. Formic Acid and Acetic Acid Induce a Programmed Cell Death in Pathogenic Candida Species. Curr Microbiol 69, 303–310. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0585-9>
 103. Lee, C., Verma, R., Byun, S., Jeun, E.-J., Kim, G.-C., Lee, S., Kang, H.-J., Kim, C.J., Sharma, G., Lahiri, A., Paul, S., Kim, K.S., Hwang, D.S., Iwakura, Y., Speciale, I., Molinaro, A., De Castro, C., Rudra, D., Im, S.-H., 2021. Structural specificities of cell surface β -glucan polysaccharides determine commensal yeast mediated immunomodulatory activities. Nat Commun 12, 3611. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23929-9>
 104. Lee, J.-N., Lee, D.-Y., Ji, I.-H., Kim, G.-E., Kim, H.N., Sohn, J., Kim, S., Kim, C.-W., 2001. Purification of Soluble β -Glucan with Immune-enhancing Activity from the Cell Wall of Yeast. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 65, 837–841. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.837>
 105. Legentil, L., Paris, F., Ballet, C., Trouvelot, S., Daire, X., Vetvicka, V., Ferrières, V., 2015. Molecular Interactions of β -(1→3)-Glucans with Their Receptors. Molecules 20, 9745–9766. <https://doi.org/10.3390/molecules20069745>
 106. Li, B., Allendorf, D.J., Hansen, R., Marroquin, J., Ding, C., Cramer, D.E., Yan, J., 2006. Yeast beta-glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. J Immunol 177, 1661–1669. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1661>
 107. Li, B., Cai, Y., Qi, C., Hansen, R., Ding, C., Mitchell, T.C., Yan, J., 2010. Orally administered particulate beta-glucan modulates tumor-capturing dendritic cells and improves antitumor T-cell responses in cancer. Clin Cancer Res 16, 5153–5164. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0820>
 108. Li, J., Cai, C., Zheng, M., Hao, J., Wang, Y., Hu, M., Fan, L., Yu, G., 2019. Alkaline Extraction, Structural Characterization, and Bioactivities of (1→6)- β -d-Glucan from Lentinus edodes. Molecules 24, 1610. <https://doi.org/10.3390/molecules24081610>
 109. Li, X., Utomo, A., Cullere, X., Choi, M.M., Milner, D.A.J., Venkatesh, D., Yun, S.-H., Mayadas, T.N., 2011. The β -glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote Candida albicans clearance. Cell Host Microbe 10, 603–615. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.009>

110. Lin, F.-Y., MacKerell, A.D.J., 2019. Force Fields for Small Molecules. *Methods Mol Biol* 2022, 21–54. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9608-7_2
111. Lin, Y.-J., Zimmermann, J., Schülke, S., 2024. Novel adjuvants in allergen-specific immunotherapy: where do we stand? *Frontiers in Immunology* 15, 1348305. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1348305>
112. Liu, J., Zhang, X., Zhang, J., Yan, M., Li, D., Zhou, S., Feng, J., Liu, Y., 2022. Research on Extraction, Structure Characterization and Immunostimulatory Activity of Cell Wall Polysaccharides from *Sparassis latifolia*. *Polymers* 14, 549. <https://doi.org/10.3390/polym14030549>
113. Liu, M., Luo, F., Ding, C., Albeituni, S., Hu, X., Ma, Y., Cai, Y., McNally, L., Sanders, M.A., Jain, D., Kloecker, G., Bousamra, M. 2nd, Zhang, H., Higashi, R.M., Lane, A.N., Fan, T.W.-M., Yan, J., 2015. Dectin-1 Activation by a Natural Product β -Glucan Converts Immunosuppressive Macrophages into an M1-like Phenotype. *J Immunol* 195, 5055–5065. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501158>
114. Liu, X., Lv, K., Wang, J., Lin, C., Liu, H., Zhang, H., Li, H., Gu, Y., Li, R., He, H., Xu, J., 2023. C-type lectin receptor Dectin-1 blockade on tumour-associated macrophages improves anti-PD-1 efficacy in gastric cancer. *Br J Cancer* 129, 721–732. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02336-5>
115. Liu, X., Wang, Q., Cui, S., Liu, H., 2008. A new isolation method of β -d-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids* 22, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.11.008>
116. Liu, Y., Wu, Q., Wu, X., Algharib, S.A., Gong, F., Hu, J., Luo, W., Zhou, M., Pan, Y., Yan, Y., Wang, Y., 2021. Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 173, 445–456. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.125>
117. Lowman, D.W., Greene, R.R., Bearden, D.W., Kruppa, M.D., Pottier, M., Monteiro, M.A., Soldatov, D.V., Ensley, H.E., Cheng, S.-C., Netea, M.G., Williams, D.L., 2014. Novel Structural Features in *Candida albicans* Hyphal Glucan Provide a Basis for Differential Innate Immune Recognition of Hyphae Versus Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 289, 3432–3443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529131>
118. Lowman, D.W., Sameer Al-Abdul-Wahid, M., Ma, Z., Kruppa, M.D., Rustchenko, E., Williams, D.L., 2021. Glucan and glycogen exist as a covalently linked macromolecular complex in the cell wall of *Candida albicans* and other *Candida* species. *The Cell Surface* 7, 100061. <https://doi.org/10.1016/j.tcsu.2021.100061>
119. Lowman, D.W., West, L.J., Bearden, D.W., Wempe, M.F., Power, T.D., Ensley, H.E., Haynes, K., Williams, D.L., Kruppa, M.D., 2011.

- New Insights into the Structure of (1→3,1→6)-β-D-Glucan Side Chains in the *Candida glabrata* Cell Wall. *PLoS ONE* 6, e27614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027614>
120. Lozano, M., Rodríguez-Ulibarri, P., Echeverría, J.C., Beruete, M., Sorolla, M., Beriain, M.J., 2017. Mid-Infrared Spectroscopy (MIR) for Simultaneous Determination of Fat and Protein Content in Meat of Several Animal Species. *Food Anal. Methods* 10, 3462–3470. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0879-1>
 121. Lukondeh, T., Ashbolt, N.J., Rogers, P.L., Hook, J.M., 2003. NMR confirmation of an alkali-insoluble glucan from *Kluyveromyces marxianus* cultivated on a lactose-based medium 349–355.
 122. Ma, Y.G., Cho, M.Y., Zhao, M., Park, J.W., Matsushita, M., Fujita, T., Lee, B.L., 2004. Human Mannose-binding Lectin and I-Ficolin Function as Specific Pattern Recognition Proteins in the Lectin Activation Pathway of Complement*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 25307–25312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400701200>
 123. Mahmoud Amer, E., Saber, S.H., Abo Markeb, A., Elkhawaga, A.A., Mekhemer, I.M.A., Zohri, A.-N.A., Abujamel, T.S., Harakeh, S., Abd-Allah, E.A., 2021. Enhancement of β-Glucan Biological Activity Using a Modified Acid-Base Extraction Method from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules* 26. <https://doi.org/10.3390/molecules26082113>
 124. Majtan, J., Jesenak, M., 2018. β-Glucans: Multi-Functional Modulator of Wound Healing. *Molecules* 23, 806. <https://doi.org/10.3390/molecules23040806>
 125. Manabe, N., Yamaguchi, Y., 2021. 3D Structural Insights into β-Glucans and Their Binding Proteins. *IJMS* 22, 1578. <https://doi.org/10.3390/ijms22041578>
 126. Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C., 1973. The Structure of a P-(1-3)-D-Glucan from Yeast Cell Walls. *Biochem. J.* 135, 12.
 127. McNutt, A.T., Francoeur, P., Aggarwal, R., Masuda, T., Meli, R., Ragoza, M., Sunseri, J., Koes, D.R., 2021. GNINA 1.0: molecular docking with deep learning. *J Cheminform* 13, 43. <https://doi.org/10.1186/s13321-021-00522-2>
 128. Miyoshi, K., Uezu, K., Sakurai, K., Shinkai, S., 2006. Molecular Dynamics Simulation for β-1,3-D-Glucan in Aqueous Solutions: Attachment of One Side Chain Induces an Entire Structural Change.
 129. Moorlag, S.J.C.F.M., Khan, N., Novakovic, B., Kaufmann, E., Jansen, T., van Crevel, R., Divangahi, M., Netea, M.G., 2020. β-Glucan Induces Protective Trained Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* Infection: A Key Role for IL-1. *Cell Rep* 31, 107634. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107634>
 130. Morales, D., Rutckeviski, R., Villalva, M., Abreu, H., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Iacomini, M., Smiderle, F.R., 2020. Isolation and comparison of α- and β-D-glucans from shiitake mushrooms (*Lentinula*

- edodes) with different biological activities. *Carbohydrate Polymers* 229, 115521. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115521>
131. Moriyuki, H., Ichimura, M., 1980. [Acute toxicity of lentinan in mice and rats (author's transl)]. *J Toxicol Sci* 5 Suppl, 1–9. https://doi.org/10.2131/jts.5.supplement_1
 132. Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30, 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
 133. Mueller, A., Raptis, J., Rice, P.J., Kalbfleisch, J.H., Stout, R.D., Ensley, H.E., Browder, W., Williams, D.L., 2000. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1-->3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology* 10, 339–346. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.4.339>
 134. Murphy, E.J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N.J., Laffey, J.G., 2020. β -Glucan Metabolic and Immunomodulatory Properties and Potential for Clinical Application. *JoF* 6, 356. <https://doi.org/10.3390/jof6040356>
 135. Muthuramalingam, K., Kim, Y., Cho, M., 2022. β -glucan, “the knight of health sector”: critical insights on physiochemical heterogeneities, action mechanisms and health implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62, 6908–6931. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1908221>
 136. Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Verstraete, W., De Backer, F., Cani, P.D., Delzenne, N.M., 2012. Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin–glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.10.008>
 137. Nosanchuk, J.D., Stark, R.E., Casadevall, A., 2015. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? *Front Microbiol* 6, 1463. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01463>
 138. Novak, M., Vetvicka, V., 2008. β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *Journal of Immunotoxicology* 5, 47–57. <https://doi.org/10.1080/15476910802019045>
 139. Okobira, T., Miyoshi, K., Uezu, K., Sakurai, K., Shinkai, S., 2008. Molecular Dynamics Studies of Side Chain Effect on the β -1,3- D - Glucan Triple Helix in Aqueous Solution. *Biomacromolecules* 9, 783–788. <https://doi.org/10.1021/bm700511d>
 140. Osorio, F., LeibundGut-Landmann, S., Lochner, M., Lahl, K., Sparwasser, T., Eberl, G., Reis e Sousa, C., 2008. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur J Immunol* 38, 3274–3281. <https://doi.org/10.1002/eji.200838950>

141. Paggi, J.M., Pandit, A., Dror, R.O., 2024. The Art and Science of Molecular Docking. *Annual Review of Biochemistry* 93, 389–410. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030222-120000>
142. Park, S.-J., Lee, Jumin, Qi, Y., Kern, N.R., Lee, H.S., Jo, S., Joung, I., Joo, K., Lee, Jooyoung, Im, W., 2019. CHARMM-GUI Glycan Modeler for modeling and simulation of carbohydrates and glycoconjugates. *Glycobiology* 29, 320–331. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz003>
143. Patidar, A., Mahanty, T., Raybarman, C., Sarode, A.Y., Basak, S., Saha, B., Bhattacharjee, S., 2020. Barley beta-Glucan and Zymosan induce Dectin-1 and Toll-like receptor 2 co-localization and anti-leishmanial immune response in *Leishmania donovani* -infected BALB/c mice. *Scand J Immunol* 92, e12952. <https://doi.org/10.1111/sji.12952>
144. Pengkumsri, N., Sivamaruthi, B.S., Sirilun, S., Peerajan, S., Kesika, P., Chaiyasut, K., Chaiyasut, C., 2016. Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Science and Technology* 37, 124–130. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.10716>
145. Pi, X., Yu, Z., Yang, X., Du, Z., Liu, W., 2022. Effects of Zymosan on Short-Chain Fatty Acid and Gas Production in in vitro Fermentation Models of the Human Intestinal Microbiota. *Front Nutr* 9, 921137. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.921137>
146. Pillemer, L., Ecker, E.E., 1941. ANTICOMPLEMENTARY FACTOR IN FRESH YEAST. *Journal of Biological Chemistry* 137, 139–142. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)72984-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)72984-0)
147. Piotrowska, M., Masek, A., 2015. *Saccharomyces Cerevisiae* Cell Wall Components as Tools for Ochratoxin A Decontamination. *Toxins* 7, 1151–1162. <https://doi.org/10.3390/toxins7041151>
148. Plata, M.R., Koch, C., Wechselberger, P., Herwig, C., Lendl, B., 2013. Determination of carbohydrates present in *Saccharomyces cerevisiae* using mid-infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Anal Bioanal Chem* 405, 8241–8250. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7239-9>
149. Plavcová, Z., Šalamúnová, P., Saloň, I., Štěpánek, F., Hanuš, J., Hošek, J., 2019. Curcumin encapsulation in yeast glucan particles promotes its anti-inflammatory potential in vitro. *Int J Pharm* 568, 118532. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118532>
150. Poerio, A., Girardet, T., Petit, C., Fleutot, S., Jehl, J.-P., Arab-Tehrany, E., Mano, J.F., Cleymand, F., 2021. Comparison of the Physicochemical Properties of Chitin Extracted from *Cicada orni* Sloughs Harvested in Three Different Years and Characterization of the Resulting Chitosan. *Applied Sciences* 11, 11278. <https://doi.org/10.3390/app112311278>

151. Qi, C., Cai, Y., Gunn, L., Ding, C., Li, B., Kloecker, G., Qian, K., Vasilakos, J., Saijo, S., Iwakura, Y., Yannelli, J.R., Yan, J., 2011. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β -glucans. *Blood* 117, 6825–6836. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-339812>
152. Qu, Y., Zhao, X., Guo, H., Meng, Y., Wang, Y., Zhou, Y., Sun, L., 2021. Structural analysis and macrophage activation of a novel β -glucan isolated from *Cantharellus cibarius*. *Int J Mol Med* 47, 50. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4883>
153. Ragoza, M., Hochuli, J., Idrobo, E., Sunseri, J., Koes, D.R., 2017. Protein-Ligand Scoring with Convolutional Neural Networks. *J Chem Inf Model* 57, 942–957. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00740>
154. Rampogu, S., Shaik, B., Kim, J.H., Jung, T.S., Ha, M.W., Lee, K.W., 2023. Explicit molecular dynamics simulation studies to discover novel natural compound analogues as *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors. *Heliyon* 9, e13324. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13324>
155. Rezapour, N., Rasekh, B., Mofradnia, S.R., Yazdian, F., Rashedi, H., Tavakoli, Z., 2019. Molecular dynamics studies of polysaccharide carrier based on starch in dental cavities. *Int J Biol Macromol* 121, 616–624. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.027>
156. Ruiz-Herrera, J., Ortiz-Castellanos, L., 2019. Cell wall glucans of fungi. A review. *The Cell Surface* 5, 100022. <https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2019.100022>
157. Saitô, H., Yokoi, M., 1989. High-Resolution ^{13}C NMR Study of (1 \rightarrow 3)- β -d-Glucans in the Solid State: DMSO-Induced Conformational Change and Conformational Characterization by Spin-Relaxation Measurements. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 62, 392–398. <https://doi.org/10.1246/bcsj.62.392>
158. Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., Machová, E., 1999. Microbial (1 \rightarrow 3)- β -d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers* 38, 247–253. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00099-X)
159. Sapay, N., Nurisso, A., Imberty, A., 2013. Simulation of carbohydrates, from molecular docking to dynamics in water. *Methods Mol Biol* 924, 469–483. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_18
160. Sato, F., Nakamura, Y., Katsuki, A., Khadka, S., Ahmad, I., Omura, S., Martinez, N.E., Tsunoda, I., 2022. Curdlan, a Microbial β -Glucan, Has Contrasting Effects on Autoimmune and Viral Models of Multiple Sclerosis. *Front Cell Infect Microbiol* 12, 805302. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.805302>
161. Sato, T., Iwabuchi, K., Nagaoka, I., Adachi, Y., Ohno, N., Tamura, H., Seyama, K., Fukuchi, Y., Nakayama, H., Yoshizaki, F., Takamori, K., Ogawa, H., 2006. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched

- beta-glucan. *J Leukoc Biol* 80, 204–211. <https://doi.org/10.1189/jlb.0106069>
162. Schirbel, A., Shouval, D.S., Hebecker, B., Hube, B., Sturm, A., Werner, L., 2018. Intestinal epithelial cells and T cells differentially recognize and respond to *Candida albicans* yeast and hypha. *European Journal of Immunology* 48, 1826–1837. <https://doi.org/10.1002/eji.201847586>
163. Schöning-Stierand, K., Diedrich, K., Ehrh, C., Flachsenberg, F., Graef, J., Sieg, J., Penner, P., Poppinga, M., Ungethüm, A., Rarey, M., 2022. ProteinsPlus: a comprehensive collection of web-based molecular modeling tools. *Nucleic Acids Research* 50, W611–W615. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac305>
164. Schöning-Stierand, K., Diedrich, K., Fährrolfes, R., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Steinegger, R., Rarey, M., 2020. ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Research* 48, W48–W53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa235>
165. Schrödinger, LLC, 2015. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
166. Shi, F., Shi, J., Li, Y., 2014. Mechanochemical Phosphorylation and Solubilisation of b-D-Glucan from Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Its Biological Activities. *PLoS ONE* 9, e103494.
167. Shi, L., 2016. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *Int J Biol Macromol* 92, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100>
168. Shokri, H., Asadi, F., Khosravi, A.R., 2008. Isolation of β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Natural Product Research* 22, 414–421. <https://doi.org/10.1080/14786410701591622>
169. Sikora, P., Tosh, S.M., Brummer, Y., Olsson, O., 2013. Identification of high β -glucan oat lines and localization and chemical characterization of their seed kernel β -glucans. *Food Chem* 137, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.007>
170. Singh, R.P., Bhardwaj, A., 2023. β -glucans: a potential source for maintaining gut microbiota and the immune system. *Front Nutr* 10, 1143682. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1143682>
171. Smeekens, S.P., Gresnigt, M.S., Becker, K.L., Cheng, S.-C., Netea, S.A., Jacobs, L., Jansen, T., van de Veerdonk, F.L., Williams, D.L., Joosten, L.A.B., Dinarello, C.A., Netea, M.G., 2015. An anti-inflammatory property of *Candida albicans* β -glucan: Induction of high levels of interleukin-1 receptor antagonist via a Dectin-1/CR3 independent mechanism. *Cytokine* 71, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.013>
172. Spěvák, J., Brus, J., 2008. Solid-State NMR Studies of Polysaccharide Systems. *Macromolecular Symposia* 265, 69–76. <https://doi.org/10.1002/masy.200850508>

173. Stagner, W.C., Gaddam, S., Parmar, R., Ghanta, A.K., 2019. Chapter Five - Sucrose octaacetate, in: Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Academic Press: Cambridge, MA, USA, pp. 267–291.
174. Steimbach, L., Borgmann, A.V., Gomar, G.G., Hoffmann, L.V., Rutckeviski, R., de Andrade, D.P., Smiderle, F.R., 2021. Fungal beta-glucans as adjuvants for treating cancer patients – A systematic review of clinical trials. *Clinical Nutrition* 40, 3104–3113. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.11.029>
175. Suraiya, S., Jang, W.J., Haq, M., Kong, I.-S., 2024. Isolation and Characterization of β -Glucan Containing Polysaccharides from *Monascus* spp. Using *Saccharina japonica* as Submerged Fermented Substrate. *Polysaccharides* 5, 435–449. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides5030027>
176. Swanson, K.V., Deng, M., Ting, J.P.-Y., 2019. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology* 19, 477–489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
177. Synytsya, A., Bleha, R., Skrynnikova, A., Babayeva, T., Čopíková, J., Kvasnička, F., Jablonsky, I., Klouček, P., 2023. Mid-Infrared Spectroscopic Study of Cultivating Medicinal Fungi *Ganoderma*: Composition, Development, and Strain Variability of Basidiocarps. *J Fungi (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/jof10010023>
178. Synytsya, A., Novak, M., 2014. Structural analysis of glucans. *Annals of Translational Medicine*, 17 2, 14. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07>
179. Tam, T.M., Duy, N.Q., Minh, N.P., Dao, D.T.A., 2013. Optimization Of Beta-Glucan Extraction from Waste Brewer's Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Using Autolysis, Enzyme, Ultrasonic And Combined Enzyme – Ultrasonic Treatment. *American Journal of Research Communication* 1, 149–158.
180. Thanardkit, P., Khunrae, P., Suphantharika, M., Verduyn, C., 2002. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18, 527–539.
181. Thuong, N.T.T., Tram, T.T.B., Dinh, T.D., Thai, P.V.K., Heemskerk, D., Bang, N.D., Chau, T.T.H., Russell, D.G., Thwaites, G.E., Hawn, T.R., Caws, M., Dunstan, S.J., 2016. MARCO variants are associated with phagocytosis, pulmonary tuberculosis susceptibility and Beijing lineage. *Genes Immun* 17, 419–425. <https://doi.org/10.1038/gene.2016.43>
182. Thwe, P.M., Fritz, D.I., Snyder, J.P., Smith, P.R., Curtis, K.D., O'Donnell, A., Galasso, N.A., Sepaniac, L.A., Adamik, B.J., Hoyt, L.R., Rodriguez, P.D., Hogan, T.C., Schmidt, A.F., Poynter, M.E., Amiel, E., 2019. Syk-dependent glycolytic reprogramming in dendritic

- cells regulates IL-1 β production to β -glucan ligands in a TLR-independent manner. *J Leukoc Biol* 106, 1325–1335. <https://doi.org/10.1002/JLB.3A0819-207RR>
183. Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., Liang, J., 2018. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research* 46, W363–W367. <https://doi.org/10.1093/nar/gky473>
 184. Tong, L.-T., Zhong, K., Liu, L., Zhou, X., Qiu, J., Zhou, S., 2015. Effects of dietary hull-less barley β -glucan on the cholesterol metabolism of hypercholesterolemic hamsters. *Food Chem* 169, 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.157>
 185. Tumino, N., Besi, F., Martini, S., Di Pace, A.L., Munari, E., Quatrini, L., Pelosi, A., Fiore, P.F., Fison, G., Paci, P., Scordamaglia, F., Covesnon, M.G., Bogina, G., Mingari, M.C., Moretta, L., Vacca, P., 2021. Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Abundant in Peripheral Blood of Cancer Patients and Suppress Natural Killer Cell Anti-Tumor Activity. *Front Immunol* 12, 803014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803014>
 186. Usui, T., Yamaoka, N., Matsuda, K., Tuzimura, K., Sugiyama, H., Seto, S., 1975. ¹³C and ¹H Nuclear Magnetic Resonance for Structural Investigation of Some Glucans. *Agricultural and Biological Chemistry* 39, 1071–1076. <https://doi.org/10.1080/00021369.1975.10861726>
 187. Vaithanomsat, P., Boonlum, N., Trakunjae, C., Apiwatanapiwat, W., Janchai, P., Boondaeng, A., Phalinphattharakit, K., Nimitkeatkai, H., Jarerat, A., 2022. Functionality of Yeast β -Glucan Recovered from *Kluyveromyces marxianus* by Alkaline and Enzymatic Processes. *Polymers* 14, 1582. <https://doi.org/10.3390/polym14081582>
 188. Valdés-Tresanco, M.S., Valdés-Tresanco, M.E., Valiente, P.A., Moreno, E., 2021. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *Journal of Chemical Theory and Computation* 17, 6281–6291. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645>
 189. Varelas, V., Tataridis, P., Liouni, M., Nerantzis, E.T., 2016. Application of different methods for the extraction of yeast β -glucan. *e-Journal of Science & Technology* 15.
 190. Vetvicka, V., Tepljakova, T.V., Shintyapina, A.B., Korolenko, T.A., 2021. Effects of Medicinal Fungi-Derived β -Glucan on Tumor Progression. *J Fungi (Basel)* 7. <https://doi.org/10.3390/jof7040250>
 191. Vetvicka, V., Vannucci, L., Sima, P., Richter, J., 2019. Beta Glucan: Supplement or Drug? From Laboratory to Clinical Trials. *Molecules* 24, 1251. <https://doi.org/10.3390/molecules24071251>
 192. Vetvicka, V., Vetvickova, J., 2018. Glucans and Cancer: Comparison of Commercially Available β -glucans - Part IV. *Anticancer Res* 38, 1327–1333. <https://doi.org/10.21873/anticanres.12355>
 193. Vetvicka, V., Vetvickova, J., 2011. β (1-3)-D-glucan affects adipogenesis, wound healing and inflammation. *Oriental Pharmacy and*

- Experimental Medicine 11, 169–175. <https://doi.org/10.1007/s13596-011-0024-4>
194. Walker, C.A., Gómez, B.L., Mora-Montes, H.M., Mackenzie, K.S., Munro, C.A., Brown, A.J.P., Gow, N.A.R., Kibbler, C.C., Odds, F.C., 2010. Melanin externalization in *Candida albicans* depends on cell wall chitin structures. *Eukaryot Cell* 9, 1329–1342. <https://doi.org/10.1128/EC.00051-10>
 195. Wang, G., Li, Z., Tian, M., Cui, X., Ma, J., Liu, S., Ye, C., Yuan, L., Qudus, M.S., Afaq, U., Wu, K., Liu, X., Zhu, C., 2023. β -Glucan Induces Training Immunity to Promote Antiviral Activity by Activating TBK1. *Viruses* 15. <https://doi.org/10.3390/v15051204>
 196. Wang, J., Gigliotti, F., Maggirwar, S., Johnston, C., Finkelstein, J.N., Wright, T.W., 2005. *Pneumocystis carinii* activates the NF-kappaB signaling pathway in alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 73, 2766–2777. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2766-2777.2005>
 197. Wang, Q., Sheng, X., Shi, A., Hu, H., Yang, Y., Liu, L., Fei, L., Liu, H., 2017. β -Glucans: Relationships between Modification, Conformation and Functional Activities. *Molecules* 22, 257. <https://doi.org/10.3390/molecules22020257>
 198. Waszkiewicz-Robak, B., 2013. Spent Brewer's Yeast and Beta-Glucans Isolated from Them as Diet Components Modifying Blood Lipid Metabolism Disturbed by an Atherogenic Diet, in: Valenzuela Baez, R. (Ed.), *Lipid Metabolism*. InTech: London, UK. <https://doi.org/10.5772/51530>
 199. Wu, T.-C., Xu, K., Banchereau, R., Marches, F., Yu, C.I., Martinek, J., Anguiano, E., Pedroza-Gonzalez, A., Snipes, G.J., O'Shaughnessy, J., Nishimura, S., Liu, Y.-J., Pascual, V., Banchereau, J., Oh, S., Palucka, K., 2014. Reprogramming tumor-infiltrating dendritic cells for CD103+ CD8+ mucosal T-cell differentiation and breast cancer rejection. *Cancer Immunol Res* 2, 487–500. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0217>
 200. Wu, X., Zheng, Z., Guo, T., Wang, K., Zhang, Y., 2021. Molecular dynamics simulation of lentinan and its interaction with the innate receptor dectin-1. *International Journal of Biological Macromolecules* 171, 527–538. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.032>
 201. Xia, Y., Vetvicka, V., Yan, J., Hanikýrová, M., Mayadas, T., Ross, G.D., 1999. The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsinized target cells. *J Immunol* 162, 2281–2290.
 202. Xin, Y., Ji, H., Cho, E., Roh, K.-B., You, J., Park, D., Jung, E., 2022. Immune-enhancing effect of water-soluble beta-glucan derived from enzymatic hydrolysis of yeast glucan. *Biochemistry and Biophysics Reports* 30, 101256. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101256>

203. Xing, Y., Chen, C., Sun, W., Zhang, B., Sang, Y., Xiu, Z., Dong, Y., 2018. An environment-friendly approach to isolate and purify glucan from spent cells of recombinant *Pichia pastoris* and the bioactivity characterization of the purified glucan. *Engineering in Life Sciences* 18, 227–235. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700125>
204. Yadav, B.S., Tripathi, V., Kumar, Ajeet, Khan, M.F., Barate, A., Kumar, Ajay, Sharma, B., 2012. Molecular modeling and docking characterization of Dectin-1 (PAMP) receptor of *Bubalus bubalis*. *Exp Mol Pathol* 92, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.09.018>
205. Younes, I., Rinaudo, M., 2015. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs* 13, 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
206. Young, S.-H., Dong, W.-J., Jacobs, R.R., 2000. Observation of a Partially Opened Triple-helix Conformation in 1→3-β-Glucan by Fluorescence Resonance Energy Transfer Spectroscopy*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 11874–11879. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11874>
207. Yu, Y., Delbianco, M., 2020. Conformational Studies of Oligosaccharides. *Chemistry A European J* 26, 9814–9825. <https://doi.org/10.1002/chem.202001370>
208. Yuan, H., Lan, P., He, Y., Li, C., Ma, X., 2019. Effect of the Modifications on the Physicochemical and Biological Properties of β-Glucan—A Critical Review. *Molecules* 25, 57. <https://doi.org/10.3390/molecules25010057>
209. Zechner-Krpan, V., Petravi, V., Gospodari, I., Sajli, L., 2010. Characterization of β-Glucans Isolated from Brewer’s Yeast and Dried by Different Methods. *Food Technology and Biotechnology* 48, 189–197.
210. Zhang, L., Li, X., Zhou, Q., Zhang, X., Chen, R., 2002. Transition from Triple Helix to Coil of Lentinan in Solution Measured by SEC, Viscometry, and ¹³C NMR. *Polym J* 34, 443–449. <https://doi.org/10.1295/polymj.34.443>
211. Zhang, S., Chen, K.Y., Zou, X., 2021. Carbohydrate-protein interactions: advances and challenges. *Communications in Information and Systems* 21, 147–163. <https://doi.org/10.4310/CIS.2021.v21.n1.a7>
212. Zhang, Z.-P., Shen, C.-C., Gao, F.-L., Wei, H., Ren, D.-F., Lu, J., 2017. Isolation, Purification and Structural Characterization of Two Novel Water-Soluble Polysaccharides from *Anredera cordifolia*. *Molecules* 22, 1276. <https://doi.org/10.3390/molecules22081276>
213. Zhao, J., Cheung, P.C.K., 2011. Fermentation of β-glucans derived from different sources by bifidobacteria: evaluation of their bifidogenic effect. *J Agric Food Chem* 59, 5986–5992. <https://doi.org/10.1021/jf200621y>
214. Zhong, X., Wang, G., Li, F., Fang, S., Zhou, S., Ishiwata, A., Tonevitsky, A.G., Shkurnikov, M., Cai, H., Ding, F., 2023.

- Immunomodulatory Effect and Biological Significance of β -Glucans. *Pharmaceutics* 15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061615>
215. Zhu, F., Du, B., Xu, B., 2016. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids* 52, 275–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.003>
216. Zhu, K., Chen, X., Yu, D., He, Y., Song, G., 2018. Preparation and characterisation of a novel hydrogel based on *Auricularia polytricha* β -glucan and its bio-release property for vitamin B(12) delivery. *J Sci Food Agric* 98, 2617–2623. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8754>
217. Zimmermann, B., Tkalčec, Z., Mešić, A., Kohler, A., 2015. Characterizing Aeroallergens by Infrared Spectroscopy of Fungal Spores and Pollen. *PLoS ONE* 10, e0124240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124240>

SUMMARY

List of abbreviations

Å – angstrom (equals 0,1 nm)

ATR-FTIR – Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared spectroscopy

β-glucan fractions: AN – alkali extracted, alkali and water insoluble, AWS – alkali extracted water-soluble, HWN – hot-water extracted, water insoluble

BRM – biological response modifier

DP – degree of polymerization

MW – molecular weight, HMW – high, LMW – low

MD, MDS – molecular dynamics, molecular dynamics simulation

MM/GBSA – Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area

MM/PBSA – Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area

NMR – nuclear magnetic resonance

PAMP – Pathogen Associated Molecular Pattern

PDB – Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>)

PRR – Pattern Recognition Receptors

R_g – Radius of gyration

RMSD – root-mean-square deviation

RMSE – root-mean-square error

RMSF – root-mean-square fluctuation

INTRODUCTION

Biologically active molecules such as β -glucans have attracted increasing attention due to their ability to modulate immune system activity. β -glucans act as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) of the innate immune system, such as Dectin-1. β -glucans isolated from different sources are classified as biological response modifiers (BRMs) because they can stimulate various immune system processes, including phagocytosis and cytokine synthesis. Due to these properties, β -glucans are being investigated as potential immunotherapeutic agents, functional food components, and vaccine adjuvants. However detailed data on the relationship between their structural diversity and immune receptor activation are still lacking. Since the spatial structure, branching, and conformation of β -glucans can lead to different biological responses, it is necessary to study the structure–function relationships of these molecules in detail. β -glucans properties depend on the biological origin and the isolation method. Different β -glucan fractions can differ in their molecular weight, structure, branching, solubility and immunological activity. β -glucans from *Saccharomyces cerevisiae* yeasts are among the most studied due to their well-known chemical structure and safety profile, while β -glucans from the genus *Candida* are medically and immunologically important.

This dissertation focused on the structural analysis of β -glucan fractions extracted from yeasts by different methods and analyzed using spectroscopic methods: ATR-FTIR and ^{13}C solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR) spectroscopy. In addition, ability of β -glucans to interact with the dimeric form of Dectin-1 receptor was assessed using *in silico* methods: molecular docking and molecular dynamics (MD) simulations. These methods not only allow to reduce the use of experimental animals, but also provide detailed insights into the mechanism of molecular interaction.

Thesis objective:

To investigate the structural properties of β -glucans extracted from yeasts using different methods through spectroscopic techniques and assess their interaction with the dimeric form of Dectin-1 receptor using *in silico* methods.

Thesis tasks:

1. To isolate yeast β -glucans and evaluate the effect of different isolation methods on their structure using ATR-FTIR and ^{13}C solid-state NMR spectroscopy.

2. To analyze the interaction of branched and linear β -glucans with Dectin-1 dimer using molecular docking.

3. To evaluate the ability of linear and branched β -glucans to interact with Dectin-1 homodimer and the dynamics of such interactions through molecular dynamics (MD) simulations.

SCIENTIFIC NOVELTY AND PRACTICAL SIGNIFICANCE

β -glucans act as ligands for receptors of the innate immune system that recognize structures characteristic of pathogens. Due to β -glucans (the structural component of the yeast cell wall) interaction with these receptors, immunomodulatory effects appear. The main receptor for recognizing β -glucans is Dectin-1, but the detailed mechanisms of activation of this receptor have not yet been fully elucidated. Although it is agreed that Dectin-1 recognizes β -1,3- and β -1,3/1,6-glucans, the literature still provides conflicting data on the optimal ligand size, structure, and the role of receptor oligomerization in the immune response. For this reason, the qualitative analysis of β -glucans is relevant in both fundamental and applied research.

Analysis of β -glucans using ATR-FTIR spectroscopy is often used as the only method for evaluating β -glucans in the scientific literature. In this work, structural studies of β -glucans were performed by combining ATR-FTIR and solid-state ^{13}C NMR spectroscopy, as well as molecular docking with molecular dynamics (MD) simulations. The capabilities of ATR-FTIR spectroscopy for the structural analysis of β -glucans were systematically evaluated, focusing on the identification of different types of glycosidic bonds (β -1,3; β -1,4; β -1,6). It was found that in the case of mixed or complex β -glucans, the absorption bands of different bonds overlap and limit the application of the method for reliable structural characterization. Therefore, ATR-FTIR alone is not sufficient for detailed structural analysis of β -glucans and must be combined with other methods, such as ^{13}C NMR.

The biological activity of β -glucans often depends on the molecular structure, degree of branching and solubility. Structural differences between β -glucan fractions extracted from the same biological source using solid-state ^{13}C NMR spectroscopy have been identified.

Most studies analyze the interaction with the monomeric form of Dectin-1. In this work, for the first time, 100 ns molecular dynamics simulations were applied to study the interaction of β -glucans with Dectin-1 homodimer, since receptor dimerization is often necessary for functional signaling. The studies allowed us to identify that the interaction between the

Dectin-1 receptor homodimer occurs with the unbranched region of the β -glucan molecule, forming a stable complex. The work shows that in *in silico* models, the length and composition of the β -glucan branch can affect the stability of the interaction with the receptor.

Docking and molecular dynamics simulation studies allowed to identify amino acid residues (Ser148, Gln149, Asp195, Glu243, Lys245) involved in the interaction of linear β -glucan and Dectin-1 dimer, defining possible ligand binding sites for further studies.

The results of this work have applications in biotechnology, pharmacy and immunology. In particular, in the production or development of immunomodulatory products or food supplements based on β -glucans, selecting functional fractions for specific applications. The application of *in silico* methods not only reduces the use of animals in experiments in the early phases of research but also provides an opportunity to rationally design immunologically active compounds. Such methods can be used in the development of vaccine adjuvants, selecting structures with the highest immune response potential.

Statements to be defended:

1. The structure, conformation and composition of different β -glucan fractions isolated from yeasts depend on the isolation method;
2. ^{13}C solid-state NMR spectroscopy, compared to ATR-FTIR, allows for more detailed determination of the structural, conformational and compositional features of different β -glucan fractions;
3. The interaction between β -glucans and Dectin-1 dimer is mainly stabilized by electrostatic and van der Waals interactions, which mainly involve amino acids Ser148, Gln149, Asp195, Glu243 and Lys245.
4. Side chains can limit the optimal arrangement of β -glucan in the interaction pocket formed by Dectin-1 dimer, which can reduce the stability of the complex.

MATERIALS AND METHODS

β -glucan extraction procedure

Yeasts *Candida guilliermondii* C18, *C. lusitaniae* C64, *Sacharomyces cerevisiae* α '1 were obtained from Prof. Dr. Eglė Lastauskienė, Vilnius University, Life Sciences Center, Microbiology and biotechnology department. Yeasts *C. guilliermondii* C18, *C. lusitaniae* C64 were previously

isolated from the skin of patients with atopic dermatitis and identified by 26S rDNA sequence analysis (Lastauskienė et al., 2014).

Yeasts were grown in YPD media for 48 h at 37 °C and 160 rpm. Yeast cells were obtained by centrifugation for 5 min at 5000 × g and washed three times with distilled water (Bzducha-Wróbel et al., 2014). Next, yeasts were autolysed in 10 % sodium chloride solution 1:20 weight/volume ratio for 24 h at 60 °C and 120 rpm. Autolyzed cell walls were collected by centrifugation for 5 min at 5000 × g, supernatant was discarded, cell walls weighed and dried at 60 °C (Bzducha-Wróbel et al., 2014; Liu et al., 2008; Pengkumsri et al., 2016; Xing et al., 2018). The dried cell walls were divided into two parts in order to extract β-glucans by hot-water and alkali methods.

Hot-water fractions (HWN) were extracted using a modified protocol originally described by Liu et al. (2008). Autolysed cell walls were suspended in distilled water and autoclaved for 4 h at 121 °C. Subsequently, the suspension was centrifuged for 10 min at 5000 × g, the supernatant removed, sediments were washed three times with distilled water. Autoclaved cell walls were resuspended in 50 mL of distilled water at a ratio of 10:1 (v/w) and ultrasonicated using 40 % of the maximum Sonics Vibra-Cell™ (Newtown, CT, USA) device power, at a frequency of 20 kHz and a power of 240 W, for 15 min (30:10 s, sonication:pause cycle) (Liu et al., 2008; Varelas et al., 2016; Xing et al., 2018). After sonication, sediments were collected by centrifugation for 5 min at 5000 × g, washed three times and treated with 96 % ethanol at a ratio of 1:4 (w/v) for 2 h at 80 °C. The organic solvent-treated sediments were collected by centrifugation for 10 min at 7000 × g and 4 °C, washed three times with acetone and five times with distilled water. The resulting HWN β-glucan fraction was dried in a hot air oven at 60 °C, ground to a powder, and stored at 4 °C (Canteri et al., 2019; Kang et al., 2018; Shokri et al., 2008).

Alkali fractions were extracted from autolysed yeast cell walls using combination of ultrasound and alkali treatment. Autolysed cell walls were suspended in distilled water (10:1 (v/w) ratio) and sonicated for 30 min (45:15 s, sonication:pause cycle) using same Sonics Vibra-Cell™ device power as before. Next, cell walls were washed three times with distilled water and treated with 1 M NaOH for 4 h at 90 °C temperature. After alkali treatment alkali-insoluble (AN) fraction was collected by centrifugation for 10 min at 5000 × g and 4 °C. Sediments were washed five times with distilled water, dried at 60 °C, ground to a powder, and stored at 4 °C (Pengkumsri et al., 2016; Shokri et al., 2008; Xing et al., 2018). The water-soluble fraction

(AWS) remaining in supernatant was further isolated. Supernatant was neutralized with 2 M acetic acid and precipitate removed by centrifugation for 10 min at $7000 \times g$. The water-soluble β -glucan fraction was precipitated with three volumes of ethanol (Liu et al., 2021; Shokri et al., 2008). The precipitate was centrifuged, dissolved in water and dried at 60°C temperature, repeating the procedure three times. Finally, dried AWS fraction was ground to powder and stored at 4°C temperature.

Obtained HWN, AN and AWS fractions were analyzed by ATR-FTIR and ^{13}C NMR spectroscopy.

ATR-FTIR spectroscopy

Attenuated total reflection (ATR) IR absorption spectra were measured by Dr. Rimantė Bandzevičiūtė, at Vilnius University, Physics Faculty, Institute of Chemical Physics. Measurements were carried out at room temperature by using FT-IR spectrometer Alpha (*Bruker Optic GmbH*, Ettlingen, Germany) with an ATR module with a single reflection diamond crystal attached and equipped with an internal deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector. ATR-FTIR absorption spectra were recorded in the $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ spectral region with 4 cm^{-1} spectral resolution. Sixty-four interferograms were averaged and Fourier transformed into spectra. 3-Term Blackman-Harris apodization function, Power Spectrum phase correction mode and zero filling factor of 2 were applied for Fourier transformation. Before the measurement of spectra of each sample, the ATR crystal was cleaned with distilled water and ethanol and the background spectrum of ambient air was measured. Spectra were linear baseline corrected, normalized and the break between 2700 cm^{-1} and 1800 cm^{-1} was introduced due to the absence of spectral information using OriginPro® 2023b (version 10.05) (Learning Edition) software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

^{13}C solid state NMR spectroscopy

Solid state NMR spectroscopy measurements were done by dr. Arūnas Maršalka at Vilnius University, Physics Faculty, Institute of Chemical Physics. The experiments were performed, on a Bruker AVANCE III HD spectrometer (*Bruker Biospin GMBH*, Ettlingen, Germany), operating at the resonance frequencies of 400 MHz for ^1H in a 9.4 T magnetic field using an Ascend-wide bore-superconducting magnet. NMR MAS measurements were performed at the spinning rate of 10 kHz using a 4 mm zirconia rotor at a 300 K temperature, using a *Bruker 4 mm H/X CP-MAS probe-head*. The Larmor

frequency for ^{13}C was 100,62 MHz, and chemical shifts were referenced to adamantane. ^{13}C MAS spectra were accumulated using 1024 scans with a repetition delay of 3 s. A rectangular variable contact time pulse (1 ms) for ^{13}C and a ramped 50–100 % pulse for ^1H were used in CP MAS experiments in order to fulfill one of Hartmann–Hahn’s matching conditions. Spectra were analyzed using OriginPro® 2023b (v10.05) software. The spectra were normalized and baseline-corrected using second derivatives. Smoothing was applied using the adjacent averaging method with a defined smoothing window. Spectral deconvolution was performed using the Levenberg–Marquardt algorithm with Gaussian fitting functions.

The minimum number of peaks required for convergence and reconstruction of the experimental spectrum was selected manually. Gaussian peaks were positioned at the locations of the most prominent resonances, and band assignments were made based on literature analysis (Chakraborty et al., 2021; Geminiani et al., 2022; Hanashima et al., 2014; Kremmyda et al., 2021; Lamon et al., 2023; Saitô and Yokoi, 1989; Zhang et al., 2002). The fitting between mathematical and experimental data was repeated until convergence was achieved and the χ^2 tolerance value reached 10^{-9} . The coefficient of determination (R^2) and the root-mean-square error (RMSE) were used as indicators of the fit quality.

Molecular docking of β -glucans and Dectin-1 dimer

Molecular docking experiments were done with different β -glucan structures, which were prepared using CHARMM-GUI platform (Jo et al., 2008) glycan reader and modelling module (Jo et al., 2011; Park et al., 2019). Linear β -1,3-glucan structures consisted of 5, 7, 9, 11 and 15 glucose monomers (**βgl3** , **$7\beta\text{gl3}$** , **$9\beta\text{gl3}$** , **$11\beta\text{gl3}$** , **$15\beta\text{gl3}$**). The branched β -glucan backbone was selected as 5 monomer long β -1,3-glucan, and the side chains were: one, two, three and four-monomer β -1,6-glucans (**$\beta\text{gl3/6(1)}$** , **$\beta\text{gl3/6(2)}$** , **$\beta\text{gl3/6(3)}$** , **$\beta\text{gl3/6(4)}$**) and one- and two-monomer long chitin residues (**$\beta\text{gl3/4(1)}$** and **$\beta\text{gl3/4(2)}$**) connected by a β -1,4-glycosidic bond. Three-dimensional structural models were optimized using the molecular mechanics method using the MFF force field in AVOGADRO (version 1.2.0) (Hanwell et al., 2012), The three-stranded helix was constructed and optimized using the AVOGADRO program and obtained from Dr. Chao He (School of life sciences, Anhui University, Hefei, Anhui, China).

The structure of murine Dectin-1 homodimer (PDB ID: 2CL8) (Brown et al., 2007) was prepared using PyMOL (version 2.5.4) (Schrödinger, LLC, 2015). Water molecules, ions and ligands were removed from the 2CL8

structure, missing amino acid sequences and hydrogen atoms were added, and the energy was minimized using the MMFF94s force field. Protein interaction domains were additionally identified using CASTp 3.0 (Tian et al., 2018) and *ProteinsPlus* (<https://proteins.plus>) (Fährrolfes et al., 2017; Schöning-Stierand et al., 2022, 2020). This information was used to generate a Grid box with corresponding coordinates, $40 \times 40 \times 30$ Å in size (X, Y, Z), using the default distance parameter of 0,375 Å in AutoDockTools software (Morris et al., 2009). GNINA (version 1.1) (McNutt et al., 2021; Ragoza et al., 2017) was selected for molecular docking, using standard parameters, exhaustiveness was increased to 16. RMSD calculations were performed in AutoDockTools. Interaction modeling was performed between the rigid protein and free ligands, except for the triple β -glucan helix. The docking study was repeated at least three times for each chain.

The LigPlot+ (version 2.2) (Laskowski and Swindells, 2011) and *ProteinPlus* molecular modeling tool were used to evaluate protein-ligand hydrogen bonds and hydrophobic interactions. For each ligand, the following conformations were randomly selected: with the lowest interaction and/or intramolecular energy, random arrangement of side chains in the interaction pocket, and spatially close to the crystallographically determined conformation of the β -glucan backbone. The interaction data was presented as heatmap using Microsoft Office Excel (version 1808) (Microsoft, USA).

Molecular dynamics simulations of β -glucan and Dectin-1 dimer complex

MD simulations were performed using GROMACS software (version 2024.4) (Abraham et al., 2024) installed on UBUNTU LINUX (version 22.04.2 LTS) OS. For MD simulations with ligands, β -glucans consisting of a five-monomer long backbone were chosen based on docking data. This ligand fits completely into the protein interaction pocket and does not interact with other protein parts. In total, 5 ligands were selected for MDS: linear β -1,3-glucan (β gl3), branched β -glucans with a side chain of: one (β gl3/6(1)), two (β gl3/6(2)), three (β gl3/6(3)) monomers connected by β -1,6-glycosidic bond; and one N-acetylglucosamic acid residue (β gl3/4(1)) connected by β -1,4-glycosidic bond. The input files of the protein and protein-ligand complexes for MDS were generated using CHARMM-GUI server and experimental Dectin-1 homodimer structure (PDB ID: 2CL8). The ligand was modified using CHARMM-GUI internal glycan construction module in order to reproduce the conformations used during docking. MD simulations were performed using the CHARMM36m force field. The TIP3P water molecule model was

used to solvate the complex of Dectin-1 homodimer with the ligand. The rectangular periodic box was constructed so that the distance between the farthest atoms of the complex and the box edge, measured from the center of mass, was 10 Å. CHARMM-GUI filled the TIP3P box with water and added the necessary amounts of Ca²⁺ and Cl⁻ ions to ensure the neutrality of the system. The exemplary box of a 5-monomer long linear β gl3 and Dectin-1 dimer complex was 79 Å × 79 Å × 79 Å in size with added 39 Ca²⁺, 81 Cl⁻ ions and 13,890 TIP3P water molecules. Van der Waals interactions were calculated for atom pairs separated by no more than 12 Å. The LINCS algorithm was applied to constrain bond vibrations involving hydrogen atoms. The equations of motion were integrated using the „leap-frog“ algorithm with a time step of 2 fs (10⁻¹⁵ s). The simulation was controlled using Bussi-Donadio-Parrinello thermostat. In the isothermal-isobaric (NPT) ensemble pressure was maintained at 1 bar using the Parrinello-Rahman barostat.

Molecular dynamics simulations for all systems were performed in four steps: 1) 1000 energy minimization cycles; 2) 0,125 ns NVT simulation at 300 K temperature; 3) 0,05 ns NPT simulation; 4) 100 ns MD simulation with trajectory recorded every 1 ns.

Data analysis of 100 ns trajectories was performed using an internal GROMACS commands: *hbond* – hydrogen bonds, *rms* – root mean square deviation, *rmsf* – root mean square fluctuations, *energy* – energy calculations, *gyrate* – radius of gyration (Rg), *sasa* – solvent accessible surface area, and *Mi*. The *gmx_MMPBSA* (Valdés-Tresanco et al., 2021) tool and two integrated methods were used to calculate the binding free energy. First, molecular mechanics with generalized Born electrostatics and surface area hydrophobic correction (MM/GBSA), second, molecular mechanics with Poisson–Boltzmann electrostatics and surface area hydrophobic correction (MM/PBSA).

Descriptive statistics of 100 ns trajectories was performed using Microsoft Excel (version 1808) and the results were visualized via diagrams and figures using OriginPro® 2023b (v10.05) (*Learning Edition*), Microsoft Excel (v1808) and PyMOL (v2.5.4) software.

RESULTS

β -glucan yield

Three β -glucan fractions were obtained from each yeast (*S. cerevisiae*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*) species: water-insoluble fraction – HWN

extracted by hot-water (**thermal**), and two fractions obtained by **alkali**: water-soluble – AWS, and alkali and water-insoluble – AN fraction. To assess the yield of β -glucans, all fractions were weighed and the weight was compared with the dry biomass of yeasts (grown cells) and dry mass of autolyzed yeasts (cell walls) (**Table 1**). Separate yields of AN and AWS fractions after alkaline extraction are presented in **Table 2**.

Table 1. β -glucan yield after hot-water (thermal) and alkali extraction from yeasts. Percentage of the weight of grown cells (C) and cell wall (CW).

Yeasts	Hot-water		Alkali	
	% from C	% from CW	% from C	% from CW
<i>S. cerevisiae</i>	25,6 \pm 2,4	53,8 \pm 2,5	13,8 \pm 1,7	41,6 \pm 3,0
<i>C. guilliermondii</i>	24,8 \pm 1,9	46,4 \pm 2,0	22,8 \pm 0,2	47,0 \pm 1,5
<i>C. lusitaniae</i>	20,2 \pm 2,7	37,4 \pm 2,4	25,0 \pm 2,4	42,3 \pm 2,1

The average values of three replicates; \pm standard deviation

Table 2. β -glucan yield of alkali extracted AN and AWS fractions. Percentage of the weight of grown cells (C) and cell wall (CW).

Yeasts	AN fraction		AWS fraction	
	% from C	% from CW	% from L	% from LS
<i>S. cerevisiae</i>	5,4 \pm 0,5	16,3 \pm 1,1	8,4 \pm 1,4	25,3 \pm 3,3
<i>C. guilliermondii</i>	10,0 \pm 2,3	27,3 \pm 3,0	9,6 \pm 1,4	19,7 \pm 3,0
<i>C. lusitaniae</i>	13,2 \pm 1,5	16,9 \pm 3,5	15,0 \pm 1,4	25,4 \pm 2,0

AN – alkali and water-insoluble, AWS – water-soluble fraction

The average values of three replicates; \pm standard deviation

The lowest amount of β -glucans extracted by hot-water (HWN) compared to cell weight (C) (~20 %) and cell wall weight (CW) (~37 %) was isolated from *C. lusitaniae*. Yield from *S. cerevisiae* and *C. guilliermondii* compared to cell weight was similar – about 25 %. Yield of HWN fraction compared to cell wall weight for *S. cerevisiae* was almost 54 % and for *C. guilliermondii* about 46 %.

The yield of alkali extracted β -glucans from *S. cerevisiae* and *C. lusitaniae* compared to cell weight was around 14 % and 25 %, respectively; and compared to cell wall weight – almost 42 %, each. Yield of alkali and hot-water extracted β -glucans from *C. guilliermondii* compared to cell wall weight was similar – about 47 %.

The yield of *S. cerevisiae* AN fraction β -glucans compared to cell weight was about 5 %, and AWS fraction – about 8 %. The yield of *C. guilliermondii* AN and AWS β -glucans compared to cell weight was about 10 %, each. The

yield of *C. lusitaniae* AN and AWS fractions compared to cell weight was about 13 % and about 15 %, respectively.

The yield of AN fraction compared to cell wall weight from *C. guilliermondii* was 27 %, from *S. cerevisiae* and *C. lusitaniae* about 16 %, each. The yield of AWS β -glucan compared to the cell wall weight obtained from *C. guilliermondii* was 20 %, and from *S. cerevisiae* and *C. lusitaniae* about 25 % each.

Theoretical yield of β -glucans, compared to the cell weight, should not exceed 18 %. Only AN fraction β -glucans obtained from *S. cerevisiae* falls within these limits, so we can assume that other β -glucan fractions contain higher amount of impurities.

Analysis of ATR-FTIR spectra

The ATR-FTIR absorption spectra of different β -glucan fractions are presented in **Figure 1**.

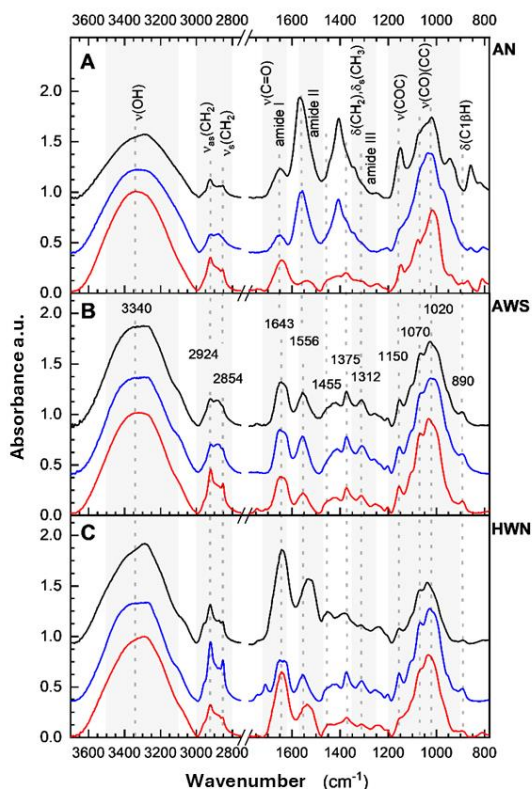


Figure 1. Normalized and baseline corrected ATR-FTIR spectra of different β -glucan fractions. A – alkali extracted insoluble (AN), B – alkali extracted soluble (AWS), C – hot-water extracted insoluble (HWN) fraction; black spectra – *C. guilliermondii*, blue – *C. lusitaniae*, red – *S. cerevisiae*.

The intensity of the spectral regions characteristic of β -glucans reported in literature are observed at 3000–3500 cm^{-1} (–OH group), 2800–3000 cm^{-1} (alkyl C–H stretching vibration), 1700–1600 cm^{-1} (C=O group), 1200–900 cm^{-1} („fingerprint region“) and 890 cm^{-1} (β -glycosidic bond, C–H deformation, C–O–C and C–O stretching vibration) (Gonzaga et al., 2013; Kędzierska-Matysek et al., 2018; Suraiya et al., 2024).

Spectral bands in ATR-FTIR absorption spectrum, characteristic of β -1,3-glucan were observed at 2920 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} , 1023 cm^{-1} ir 890 cm^{-1} (Klähn et al., 2005; Ruiz-Herrera and Ortiz-Castellanos, 2019; Suraiya et al., 2024; Synytsya et al., 2023; Thanardkit et al., 2002). Overlapping in „fingerprint region“ makes the spectral analysis difficult. The anomeric carbohydrate spectral band at 890 cm^{-1} , is characteristic of β -1,3-glycosidic bond and present in AWS and HWN fractions, however in AN fractions it is masked by the adjacent bands. Spectral band at 860 cm^{-1} in *C. guilliermondii* AN fraction is associated with C–H bending and deformation vibrations, which indicate β -glucan contamination with other molecules.

The C–O ir C–O–C stretching vibrations in alkali (AN, AWS) and HWN fractions are observed at 1020 cm^{-1} and 1075 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} and 1069 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} and 1071 cm^{-1} , respectively. Small spectra shifts between fractions could be adjusted to ATR-FTIR spectral resolution (from 4 cm^{-1} to 8 cm^{-1}), structural differences or presence of other molecules. The stretching vibrations of C–O–C glycosidic bond at 1150 cm^{-1} were present in all fractions. The band at 1373 cm^{-1} assigned to CH_3 deformation and CH_2 vibration observed in all fractions, except from *C. lusitaniae* and *C. guilliermondii* AN fractions. Low intensity of CH_2 group attributed bands at 2924 cm^{-1} and 2854 cm^{-1} is characteristic of polysaccharides (Suraiya et al., 2024). The highest intensity of these bands were observed in HWN fraction from *C. lusitaniae*, and the lowest – in AN from *Candida* β -glucans.

All β -glucan spectra are characterized by a broad band in 3600 cm^{-1} to 3000 cm^{-1} region, attributed to O–H bond stretching vibration due to the large number of hydroxyl groups. Peak at 3260 cm^{-1} could be attributed to stretching vibration of chitin N–H bond (Zhu et al., 2018). Other chitin characteristic bands at 1649 cm^{-1} , ~1550 cm^{-1} , ~1315 cm^{-1} and 1375 cm^{-1} are characteristic of C=O, N–H, C–N and N-acetyl – CH_3 group, respectively (Adeosun et al., 2019; Poerio et al., 2021; Šandula et al., 1999).

Yeast β -glucans are characterized as β -glucans with β -1,3-glycosidic backbone and short β -1,6-side chains. Due to the overlap of spectral bands, it was not possible to estimate and distinguish the amount of β -1,6-glucans. The characteristic bands for β -1,6-glucans and mannans are found at 920 cm^{-1} and

911 cm^{-1} (Galichet et al., 2001; Thanardkit et al., 2002). β -1,6-glucans characteristic band at 1730 cm^{-1} (Thanardkit et al., 2002) was absent in all fractions. This band can be misinterpreted as 1743 cm^{-1} band and attributed to lipids (Byrtusová et al., 2020; Zimmermann et al., 2015), however most likely in correspond to chitin based on the source (Ami et al., 2013; Hong et al., 2021; Lozano et al., 2017; Stagner et al., 2019).

The β -glucans from different fractions have a structure typical of β -1,3-glucans, containing β -1,6-glucan side chains and chitin impurities. The lowest amount of impurities was observed in the β -glucans of *S. cerevisiae* AN fraction. AN and HWN fractions of *C. guilliermondii* could potentially have protein impurities, however due to signal overlap it cannot be concluded. Differences in obtained fractions could be due to isolation errors. The obtained data correlate with the calculated yield of β -glucans.

Analysis of ^{13}C NMR spectra

The key regions in β -glucans NMR spectra include chemical shifts of carbon atoms C1 (105–99 ppm), C3 (92–82 ppm), C6 and chitin (68–55 ppm) (Kang et al., 2018; Saitô and Yokoi, 1989). Overlapping carbon signals from different polysaccharides, especially C2, C3, C5, complicate results interpretation. However, spectral approximation enabled partial identification and simulation of individual C1–C6 carbon chemical shifts. The approximation (Figure 2) showed high accuracy, supported by coefficient of determination R^2 and root mean square error (RMSE) values (Table 3), indicating good fit between the mathematical and experimental spectra (Gan et al., 2020).

Table 3. Quality metrics: coefficient of determination (R^2) and root mean square error (RMSE), for different β -glucan fractions spectra fit using Gaussian functions. AN – alkali-insoluble; AWS – soluble; HWN –insoluble fraction.

Fraction \ Quality metrics	R^2	RMSE
AN <i>C. lusitaniae</i>	0,9985	0,0066
AN <i>S. cerevisiae</i>	0,9867	0,0140
AWS <i>C. lusitaniae</i>	0,9987	0,0056
AWS <i>S. cerevisiae</i>	0,9986	0,0051
HWN <i>C. lusitaniae</i>	0,9985	0,0055
HWN <i>S. cerevisiae</i>	0,9981	0,0069

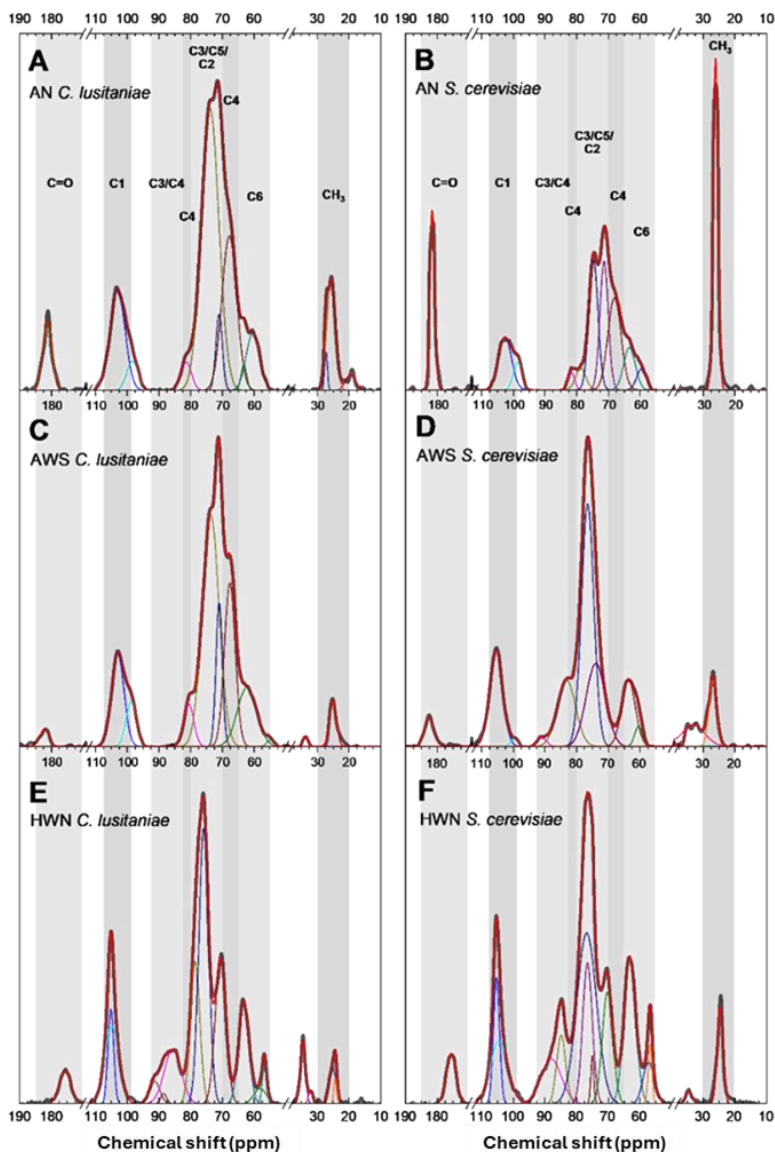


Figure 2. Experimental ^{13}C NMR spectra of different β -glucan fractions and their approximations using Gaussian curve-fitting. The bold grey spectrum – experimental data; red – total Gaussian fit; other colors – individual spectral band approximations using Gaussian functions. AN – alkali-insoluble; AWS – alkali soluble; HWN – hot-water insoluble fraction.

The chemical shifts of C1–C6 carbons atoms characteristic of β -glucans and chitin in the approximated spectra (Table 4) were assigned based on literature analysis (Aimanianda et al., 2017; Kang et al., 2018; Lowman et al.,

2011; Morales et al., 2020; Usui et al., 1975). Chemical shifts of β -glucans and chitin carbon atoms overlap in many ranges. However several chitin and β -1,6-glucan characteristic bands are distinguished. The obtained spectra are typical of β -1,3-glucans with β -1,6-glucan side chains and chitin.

Table 4. Chemical shift values assigned for carbon atoms in ^{13}C NMR spectra of different β -glucan fractions, fitted using Gaussian function. AN – alkali-insoluble fraction, AWS – alkali soluble, HWN – hot-water insoluble fraction, CL – isolated from *Candida lusitanae*, SC – isolated from *Saccharomyces cerevisiae*, ov – overlap with other bands.

Fraction Atom	AN CL	AN SC	AWS CL	AWS SC	HWN CL	HWN SC
C=O	181,2	181,5	182,2	182,4	175,6	175,5
C1	103,0	102,5	102,9	105,2	105,2/104,8	105,2/104,3
C1 (anom.)	98,3	98,5	98,7	99,5	-	-
C2	73,8	74,5	73,6	73,9	75,8	76,4/74,9
C3	-	-	-	90,8	91,3/88,5/ 85,6	87,8/ 84,7
C3	81,3	81,5	80,4	83,0	-	-
C4	70,9	71,1	70,9	p	70,5	70,0
C5	p	78,5	p	76,3	78,5	76,6
C6 (β -1,6)	67,7	67,8	67,5	p	-	-
C6 (β -1,3)	63,1	63,1	62,1	63,4	63,2	63,0
C6 (β -1,4)	60,2	59,4	p	60,2	58,0	57,1
C2 (β -1,4)	-	-	54,8	-	56,6	56,6
CH ₃	27,2/25,5	25,9	25,0	26,8	25,1/24,2	24,5
Impurities	19,4	-	33,6	37,0/32,9	34,4/32,0	34,3

C1 carbon chemical shifts in β -glycosidic bonds appear between 107–102 ppm, and are typical for β -1,3-glucans and chitin. Shifts at 99–97 ppm can be assigned to terminal glucose or alternative β -glucan conformations. C1 chemical shift variations may indicate structural differences of β -glucans extracted by different methods. Hot-water isolated β -glucans have linear or closed triple helix structure due to presence of specific C3 chemical shifts at 92–82 ppm. Other C3 signals between 83–80 ppm are found in AN and AWS β -glucan fractions. Some of the C2, C4, C5 and C6 carbon chemical shifts could not be assigned due to overlapping. According to chemical shift ~63 ppm, all fractions contain β -1,3-glucans. Chemical shifts characteristic of C6 carbon atom indicate branching differences in β -glucan fractions. The alkali-extracted fractions contain bands characteristic of β -1,6-glycosidic linkages in the region of ~67–68 ppm, except for the AWS SC fraction. Hot-water

extracted fractions do not contain bands characteristic of β -1,6-glycosidic linkages. Presence of β -1,4-glycosidic linkage was confirmed by appearance of carbonyl (C=O) and methyl (CH₃) regions at 185–170 ppm and 30–20 ppm, respectively. The intensity of chitin bands could indicate higher chitin content in AN β -glucan fractions compared to AWS and HWN. Therefore, this could explain AN fraction insolubility in aqueous solutions. Insolubility of HWN fractions depend on molecular weight and conformation rather than chitin side chains. Although there are no bands characteristic of proteins at 160–110 ppm, all fractions are characterized by a small amount of protein, lipid or other molecular impurities due to signal near 34 ppm.

Different fractions consist mainly of β -1,3-glucans with β -1,6-glycosidic side chains, chitin and minor impurities of proteins, lipids or other molecules. β -glucans isolated by different methods and from different yeasts are characterized by certain differences in spectral bands and their intensities. Results of this study indicate that β -glucans from yeast *S. cerevisiae* have a slightly higher chitin content compared to *C. lusitaniae*. However, the available data are insufficient to identify these differences as species-specific.

Analysis of β -glucan and Dectin-1 homodimer docking

The best docking result of trimeric β -1,3-glucan (3β gl3) molecule, during validation compared to crystallographic binding conformation, is shown in **Figure 3**. The RMSD between the crystallographically determined ligand and docked conformation of the same ligand was 1,318 Å. The affinity of –9.89 kcal/mol, and the intermolecular energy of –1.48 kcal/mol, indicate moderately strong electrostatic interaction between protein and ligand as well as energetically favorable conformation of the ligand (Jeffrey, 1997).

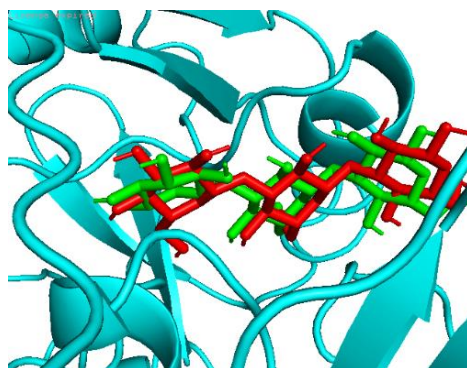


Figure 3. Dectin-1 dimer and three monomer β -1,3-glucan (3β gl3) docking using GNINA. Best ligand pose (green) with RMSD of 1,318 Å compared to crystallographic ligand pose (red).

Docking studies were performed with rigid protein and flexible ligands: linear β -1,3-glucans (β gl3) with varying backbone lengths of 5, 7, 9, 11 and 15 glucose monomers (**5 β gl3**, **7 β gl3**, **9 β gl3**, **11 β gl3**, **15 β gl3**); branched β -1,3/1,6-glucans with 5 monomer backbone and varying side chain length 1, 2, 3, 4 glucose monomers (**β gl3/6(1)**, **β gl3/6(2)**, **β gl3/6(3)**, **β gl3/6(4)**); and β -1,3/1,4-glucans with 1 or 2 N-acetylglucosamine as the side chain (**β gl3/4(1)**, **β gl3/4(2)**) (**Fig. 4**).

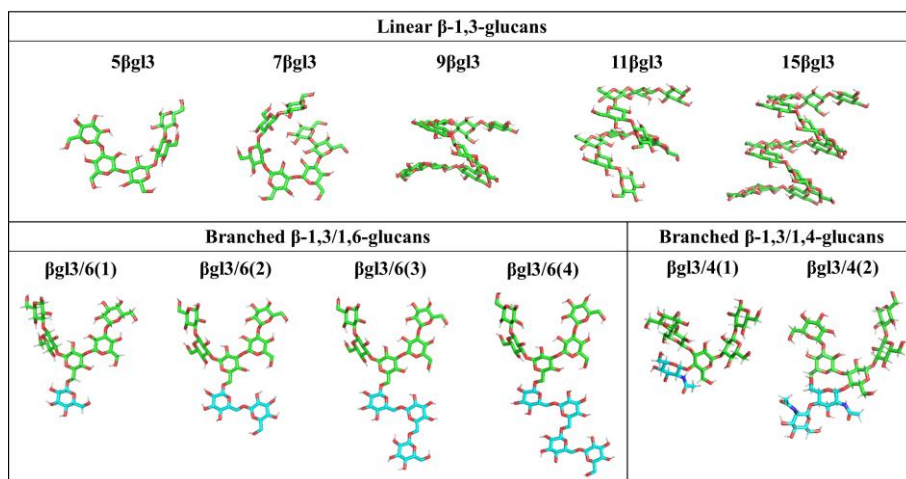


Figure 4. β -glucan models used in molecular docking and MD simulations, constructed using the CHARMM-GUI platform. Green color – backbone, blue color – side chain.

At least three conformations after three different runs were selected for each ligand, their average Vina (kcal/mol) and CNN (Convolutional Neural Network) affinity (pKd) were calculated, and the values presented in **Table 5**.

After molecular docking two affinity values were obtained: Vina and CNN (*Convolutional Neural Network*). Vina affinity uses force-field to estimate interaction by evaluating van der Waals interactions, hydrogen bonds, electrostatic and hydrophobic interactions. CNN affinity values are obtained by deep machine learning algorithm, which was trained with crystal structures of protein-ligand complexes.

According to LigPlot+ analysis, the interaction in the binding pocket (**Fig. 5**) occurs with 5 or 6 glucose residues of linear β -glucan. This explains lower affinity of the 3-mer β -glucan compared to longer chains. The reduced affinity of the 15-mer β -glucan could be due to interaction of 9 residues with the protein surface, which could affect the calculated affinity values.

Table 5. Vina affinity (kcal/mol) and CNN affinity (pKd) values of β -glucans of varying lengths and branching, obtained from molecular docking with the Dectin-1 receptor homodimer using GNINA (version 1.1).

Ligand	Vina affinity (kcal/mol)	CNN affinity (pKd)
Flexible linear β-1,3-glucan		
validation (3 β gl3)	-9,9	-3,8
5 β gl3	-11,4 \pm 0,5	-4,3 \pm 0,1
7 β gl3	-11,6 \pm 0,4	-4,5 \pm 0,3
9 β gl3	-11,5 \pm 0,2	-4,6 \pm 0,1
11 β gl3	-11,1 \pm 0,3	-4,6 \pm 0,2
15 β gl3	-10,3 \pm 1,3	-4,7 \pm 0,4
Flexible branched 5-mer β-1,3-glucan		
5 β gl3/6(1)	-12,9 \pm 0,4	-4,8 \pm 0,2
5 β gl3/6(2)	-12,8 \pm 0,1	-4,7 \pm 0,3
5 β gl3/6(3)	-12,9 \pm 0,4	-4,7 \pm 0,2
5 β gl3/6(4)	-13,3 \pm 0,4	-4,8 \pm 0,3
5 β gl3/4(ch1)	-12,1 \pm 0,2	-4,8 \pm 0,1
5 β gl3/4(ch2)	-12,0 \pm 0,1	-4,8 \pm 0,2

Average of three random conformations from independent runs; \pm standard deviation

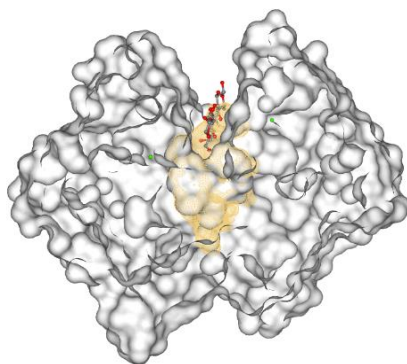


Figure 5. Protein binding pocket of 1520 Å formed by Dectin-1 homodimer (PDB ID: 2CL8), created using ProteinPlus platform <https://proteins.plus>.

The longer the β -glucan chain the higher number of rotatable bonds it possess. Conformational freedom of ligands within the protein binding pocket is limited and in longer β -glucan chains greater number of glucose residues remain outside the binding pocket and can rotate freely. Because most of the docking conformations, regardless of the ligand size, were similar, and interaction analysis using LigPlot+ showed consistent results, because of that

a 5-monomer long molecule was chosen as the backbone for branched β -1,3-glucans.

Docking results confirmed that the side chains consisting of one or two glucose units could be accommodated within the protein binding pocket alongside the β -glucan backbone. The size (1520 Å) and structure of the binding pocket, estimated using PyMOL (v2.5.4) and validated in CASTp 3.0 (Tian et al., 2018) and ProteinsPlus (Fig. 5), support the assumption that binding pocket formed by Dectin-1 dimerization could accommodate both linear and branched β -glucans. Amino acids located at a distance of 3,5 Å, 5 Å and 6 Å from the ligand were determined using PyMOL (v2.5.4) (**Table 6**).

Table 6. Amino acids located at distances of 3,5 Å, 5 Å and 6 Å from the ligand in complex with Dectin-1 (PDB ID: 2CL8) were identified using PyMOL (v2.5.4).

3,5 Å	5 Å	6 Å
		Lys144A
Arg145A	Arg145A	Arg145A
		Cys147A
Ser148AB	Ser148B	Ser148AB
	Gln149A	Gln149AB
	Gly151AB	Gly151AB
Ala152A	Ala152AB	Ala152AB
	His153AB	His153AB
		Leu154A
		Asp158B
		Lys156B
Glu194A	Glu194AB	Glu194AB
	Asp195AB	Asp195AB
	Glu243AB	Glu243AB
		Leu244B

LigPlot+ was selected for analysis to identify amino acid interactions with β -glucans of varying lengths and branching. A heat map (**Fig. 6**) was generated using a scoring system: 1 – hydrophobic interaction with one Dectin-1 chain (A or B), 2 – hydrophobic interaction with both chains, 3 – hydrogen bond with one chain, 4 – hydrogen bond and hydrophobic interaction, 5 – hydrogen bonds with both chains.

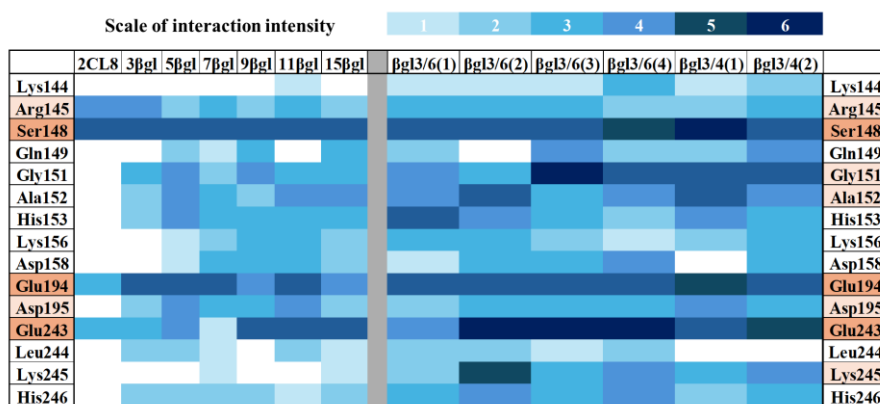


Figure 6. The heat map of β -glucan interactions with amino acids from Dectin-1 dimer, generated based on LigPlot+ analysis. Interaction intensity scale: 1 – hydrophobic interaction with one of the Dectin-1 chains, A or B; 2 – hydrophobic interaction with both chains; 3 – hydrogen bond with one of the Dectin-1 chains; 4 – hydrogen bond and hydrophobic interaction with Dectin-1 chains; 5 – hydrogen bond with both chains; 6 – more than two hydrogen bonds.

Regardless of conformation, length, or branching, the most frequent interactions were observed with amino acids Ser148, Glu194, and Glu243 from both chains of the Dectin-1 dimer. Other residues, such as Arg145, Gln149, Gly151, Ala152 and Asp195, also contributed to β -glucan binding. Branched and linear β -glucans interacted with the same amino acids, however side chains of branched molecules strengthened the interaction by forming additional hydrogen bonds. Interaction with other amino acids were due to specific spatial conformations of side chains. β -glucans with three- or four β -1,6-side chain units can adopt alternative conformations, as side chain enters the binding pocket and β -1,3-glucan backbone remains outside, potentially limiting recognition by the receptor. This suggests that, during an immune response, Dectin-1 likely interacts with linear β -glucans or branched β -glucans with short side chain from the yeast cell wall.

Docking results showed that the interaction between β -glucans and the Dectin-1 dimer is energetically favorable and typically involves 3–6 glucose units of the backbone. Branching had minimal effect on the calculated binding affinity, as both branched and linear polysaccharides interacted with the same key residues, regardless of branch length. However, β -glucans with three or four side chain units tended to bind either through the backbone or the side chain exclusively. Molecules with tetrameric β -1,6-glucan or dimeric β -1,4-linked chitin side chains rarely adopted energetically favorable conformations and were thus excluded from molecular dynamics simulations.

It was not possible to perform a simulation of the interaction of the β -1,3-glucan triple helix (**Fig. 7**) with the dimeric form of the Dectin-1 receptor, neither with the selected GNINA, nor with other software or docking platforms available on the Internet (Z-Dock, SwissDock, AutodockVina, VinaCPL). Software did not recognize the triple helix structure or used only one of the three β -glucan chains. Therefore, triple helix was simulated by docking of a rigid single β -glucan helix, which revealed its inability to bind into homodimer formed binding pocket. However, docking of a rigid β -glucan single helix with flexible side chains showed that Dectin-1 can interact with at least 3 monomer-long β -1,6-side chains, while the β -1,3-backbone remains outside of the binding pocket. Similar results were obtained by X. Wu and colleagues (Wu et al., 2021).

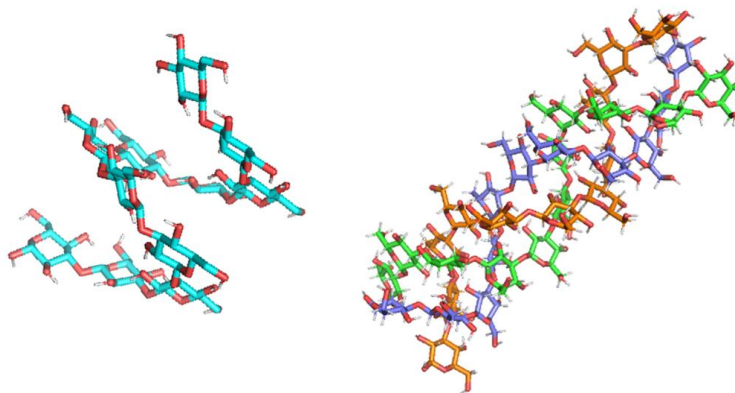


Figure 7. 11 monomer length β -1,3-glucan single helix (created using CHARMM GUI) and β -1,3-glucan triple helix (created using AVOGADRO, version 1.2.0). Different color indicate different chains.

Thus, it can be stated that Dectin-1 can interact with random β -1,3-, β -1,6- and β -1,3/1,6-glucan chains or the open ends of the higher-order β -glucan backbone or their side chains. LigPlot+ interaction analysis showed that at least three hydrogen bonds are formed between the β -glucan backbone and amino acids Ser148, Glu194 and Glu243 of Dectin-1 dimer. These amino acids are located about 3 Å away from the β -glucans and therefore are essential for the interaction of the molecules (Jeffrey, 1997).

Analysis of molecular dynamics simulations (MDS).

In order to understand and confirm docking data on β -glucan interaction with Dectin-1 dimer molecular dynamics simulation of 10 ns and later

extended to 100 ns were performed. MD of β -glucans confirmed stable helical conformation of the polysaccharides during 100 ns simulation (**Fig. 8**).

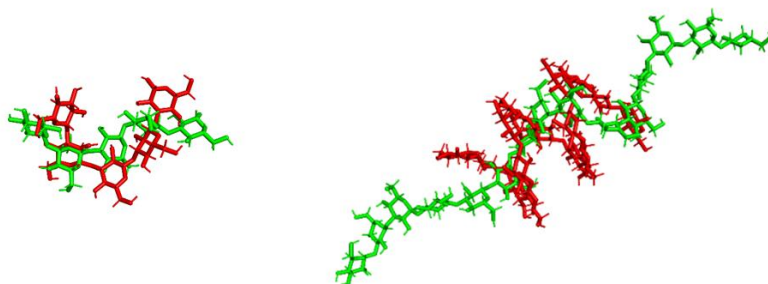


Figure 8. Spatial conformation of single β -1,3-glucan helices, created using CHARMM GUI platforma, before and after 100 ns MD simulation. Red – initial conformation created by CHARMM-GUI, green – conformation after 100 ns MD simulation. Left – 5 glucose units, right – 15 glucose unit length β -1,3-glucan structure.

During the initial 10 ns of MD simulations, the complexes of Dectin-1 with linear and branched β -glucans with 5 glucose units backbone remained stable, and MD simulations were extended to 100 ns (**Table 7**).

Table 7. Stability parameters of the receptor–ligand complex at different stages of molecular dynamics simulations: NVT (constant temperature (T) and volume (V)), NPT (constant T and pressure (P)), and MD (production run). The values represent the averages of three replicates for each stage \pm standard deviation.

Step	Units	β g13	β g13/6(1)	β g13/6(2)	β g13/6(3)	β g13/4(1)
NVT	T (K)	298,2 \pm 8,3	297,9 \pm 8,6	299,6 \pm 3,4	299,8 \pm 3,3	299,6 \pm 3,5
	P (bar)	13,3 \pm 250,8	14,8 \pm 166,1	1,2 \pm 166,9	-5,9 \pm 166,4	6,1 \pm 166,6
NPT	D (kg/m ³)	1046,7 \pm 13,2	1048,8 \pm 4,0	1049,8 \pm 4,5	1050,1 \pm 4,6	1049,7 \pm 4,6
	T (K)	300,0 \pm 1,5	300,0 \pm 1,5	300,0 \pm 1,5	300,0 \pm 1,5	300,0 \pm 1,5
MD	P (bar)	0,9 \pm 136,0	-0,0 \pm 135,3	0,6 \pm 135,4	1,2 \pm 134,0	0,5 \pm 135,2
	D (kg/m ³)	1050,3 \pm 2,4	1050,4 \pm 2,4	1051,2 \pm 2,3	1051,4 \pm 2,3	1050,8 \pm 2,4

In canonical (NVT) ensemble temperature was stable and around 300 K. In NPT ensemble system density was stable (\sim 1050 kg/m³), despite pressure

fluctuations, which could be addressed to molecule movement in the small system. In MD simulations temperature, density and even pressure of all systems were stable.

To assess structural stability, flexibility and spatial organization of β -glucan and Dectin-1 complexes after 100 ns MD simulation, RMSD, RMSF and radius of gyration (Rg) analyses were performed (**Table 8**). RMSD analysis shows the stability of the protein–ligand complex structure and deviation from the initial conformation, RMSF shows the flexibility of individual amino acid residues, and Rg shows the spatial compactness of molecules and their complexes.

Table 8. RMSD values (Å) from 100 ns molecular dynamics simulations of β -glucans, Dectin-1 dimer and their complexes. Deviations from the initial conformation expressed as mean \pm standard deviation of 100 ns MDS. **BGLC** – β -glucan, **DECTIN** – Dectin-1 dimer, **CMPLX** – β -glucan and Dectin-1 dimer complex.

Single molecule MDS RMSD values			Complex MDS RMSD values		
DECTIN	BGLC		BGLC	DECTIN	CMPLX
0,20 \pm 0,02	1,8 \pm 0,7	βgl3	1,6 \pm 0,3	1,9 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2
	3,6 \pm 0,6	βgl3/6(1)	2,4 \pm 0,5	2,0 \pm 0,3	2,2 \pm 0,4
	4,0 \pm 0,9	βgl3/6(2)	3,1 \pm 0,6	2,4 \pm 0,3	2,7 \pm 0,4
	4,5 \pm 1,1	βgl3/6(3)	3,9 \pm 1,2	2,5 \pm 0,3	3,6 \pm 1,2
	4,1 \pm 0,5	βgl3/4(1)	2,3 \pm 0,5	2,1 \pm 0,3	2,6 \pm 0,9

RMSD analysis showed that structural deviations of the linear β -glucan and its complex with the Dectin-1 dimer during the molecular dynamics trajectory were minimal compared to branched β -glucans. This difference can be explained by the increased number of rotatable bonds in branched β -glucans, leading to greater flexibility and conformational variability. Complexes with the ligand having three glucose monomers in its side chain fluctuated the most (**Fig. 9**). The flexibility of the ligand increased conformational instability and reduced structural stability of the whole complex.

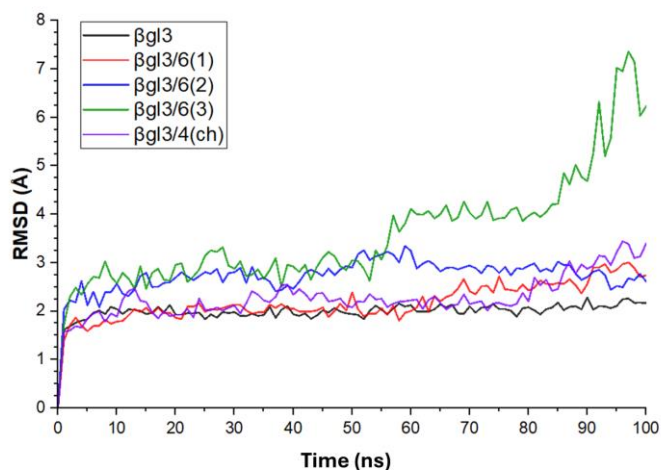


Figure 9. RMSD values of β -glucan and Dectin-1 homodimer complexes during 100 ns MD simulation.

The root mean square fluctuation (RMSF) analysis revealed that β -glucan flexibility increased with branch length, due to additional rotatable bonds. RMSF values of the protein didn't reveal as strong fluctuations as were expected after RMSD analysis. Complexes with linear β -glucans or short side chains (one or two monomers) had similar values. As with RMSD, β -glucans with longer side chain or chitin residues exhibited higher RMSF values, indicating increased flexibility. A detailed analysis of RMSF values was performed to assess the mobility of the receptors amino acid residues which were identified during docking as interacting with β -glucans (**Fig. 10**).

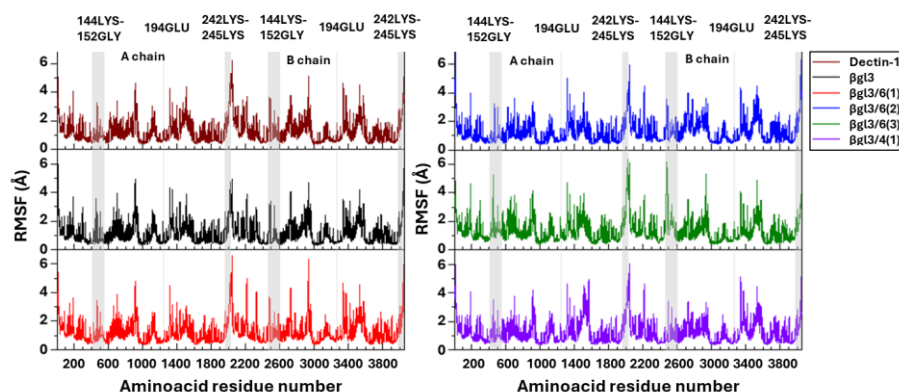


Figure 10. RMSF values of β -glucan and Dectin-1 homodimer complexes during 100 ns MD simulation.

RMSF values of key interacting residues, identified via docking, were analyzed. Residues differing by more than 0,5 Å compared to the unbound protein were color-marked (**Table 9**).

Table 9. RMSF changes of the amino acids most frequently involved in interactions during docking of the ligand-free Dectin-1 dimer and the complex with β -glucans.

	Dectin-1	β gl3	β gl3/6(1)	β gl3/6(2)	β gl3/6(3)	β gl3/4(1)
<i>Arg145 A</i>	0,9	1,5	0,8	0,7	2,4	1,6
<i>Ser148 A</i>	0,9	0,7	1,0	0,7	1,3	0,9
<i>Gln149A</i>	1,2	1,2	1,4	1,4	1,9	1,5
<i>Glu194 A</i>	0,9	0,9	0,6	0,9	1,3	1,1
<i>Asp195 A</i>	0,9	0,7	0,8	0,9	1,1	0,9
<i>Glu243 A</i>	1,7	1,3	1,5	1,6	2,0	1,8
<i>Lys245 A</i>	3,6	3,1	3,7	3,1	4,7	3,5
<i>Arg145 B</i>	1,6	1,4	1,8	1,7	3,6	0,8
<i>Ser148 B</i>	1,0	0,6	1,0	1,2	1,6	0,9
<i>Gln149B</i>	1,4	1,2	1,4	1,3	2,4	1,5
<i>Glu194 B</i>	1,0	0,5	1,0	1,0	1,2	0,9
<i>Asp195 B</i>	0,8	0,6	0,9	0,8	1,0	0,8
<i>Glu243 B</i>	1,7	1,4	1,6	1,6	1,6	1,5
<i>Leu244 B</i>	1,7	1,1	1,8	1,7	1,9	1,6
<i>Lys245 B</i>	3,8	3,9	4,1	4,7	3,1	3,3

The results revealed that the flexibility of β -glucans increases with branch length. As in the case of RMSD results, this is related to additional free rotation angles in branched structures. In complexes with linear β -glucan and branched fragments containing one or two side monomers, the RMSF values were similar. Meanwhile, the RMSF values of the complex with three monomer branched β -glucan were significantly higher. On the one hand, this depends on the increased flexibility of the β -glucans themselves. On the other hand, the greater flexibility of the ligand may affect the stability of the interaction with the receptor and cause conformational changes. For a more detailed analysis, the RMSF of the receptor amino acid residues with which β -glucans most often interacted during docking were evaluated.

The binding of linear β -glucan to the Dectin-1 dimer, compared to branched β -glucans, resulted in reduced fluctuations of some of the protein amino acids involved in the interactions during docking. This may be related to the spatial arrangement of the ligand in the interaction pocket, which leads to a decrease in protein flexibility and stabilization of the interaction, but this assessment is subjective and requires further confirmation. One- and two-

monomer-long branched β -glucans had practically no effect on the flexibility of the receptor amino acids in the interaction area, compared to the protein without ligand. However, the three-monomer branched ligand caused greater fluctuations, which may be related to reduced stability of the complex.

The radius of gyration (Rg) estimates the spatial compactness of the molecules (**Table 10**). All complexes have a compactness similar to that of the Dectin-1 dimer without a ligand. The differences are very small and depend on the length of the β -glucan chain.

Table 10. Radius of gyration Rg values (Å) of Dectin-1 dimer and Dectin-1 dimer- β -glucans complexes, mean \pm standard deviation of 100 ns MD simulation. BGLC – β -glucan, DECTIN – Dectin-1 dimer, CMPLX – β -glucan and Dectin-1 dimer complex.

Rg of Dectin-1 dimer	Rg of complex	CMPLX	DECTIN	BGLC
18,9 \pm 0,1	β gl3	18,6 \pm 0,1	18,7 \pm 0,1	7,3 \pm 0,2
	β gl3/6(1)	18,8 \pm 0,1	18,9 \pm 0,1	7,4 \pm 0,1
	β gl3/6(2)	19,0 \pm 0,1	19,1 \pm 0,1	7,7 \pm 0,3
	β gl3/6(3)	19,3 \pm 0,3	19,3 \pm 0,3	8,3 \pm 0,4
	β gl3/4(1)	18,9 \pm 0,2	19,0 \pm 0,2	7,0 \pm 0,2

The RMSD, RMSF parameters complement each other and allow to preliminary conclude that the degree of β -glucan branching has an impact on its flexibility, stability of Dectin-1- β -glucan complexes and possible conformational adaptation during interaction.

To assess the interaction dynamics between Dectin-1 and different β -glucans, hydrogen bond (*h bond*) analysis was performed and visualized as heat maps (**Fig. 11**). These maps show which amino acid residues most often formed hydrogen bonds with β -glucans during a 100 ns simulation.

The results showed, that only linear β -glucans maintained a constant number of hydrogen bonds throughout the 100 ns simulation, indicating stable binding to the receptor. Table 10 lists the corresponding amino acids and their duration in percent over the simulation time. Amino acids that formed short-term contacts with only one or two ligands are not included in the table.

The main residues involved in the interactions were Ser148, Gln149, Asp195, Glu243 and Lys245, which formed consistent bonds. These results are consistent with contact time analysis data (**Table 11**), where the same amino acid residues exhibited long interaction, and are consistent with RMSF analysis, which showed their structural stability.

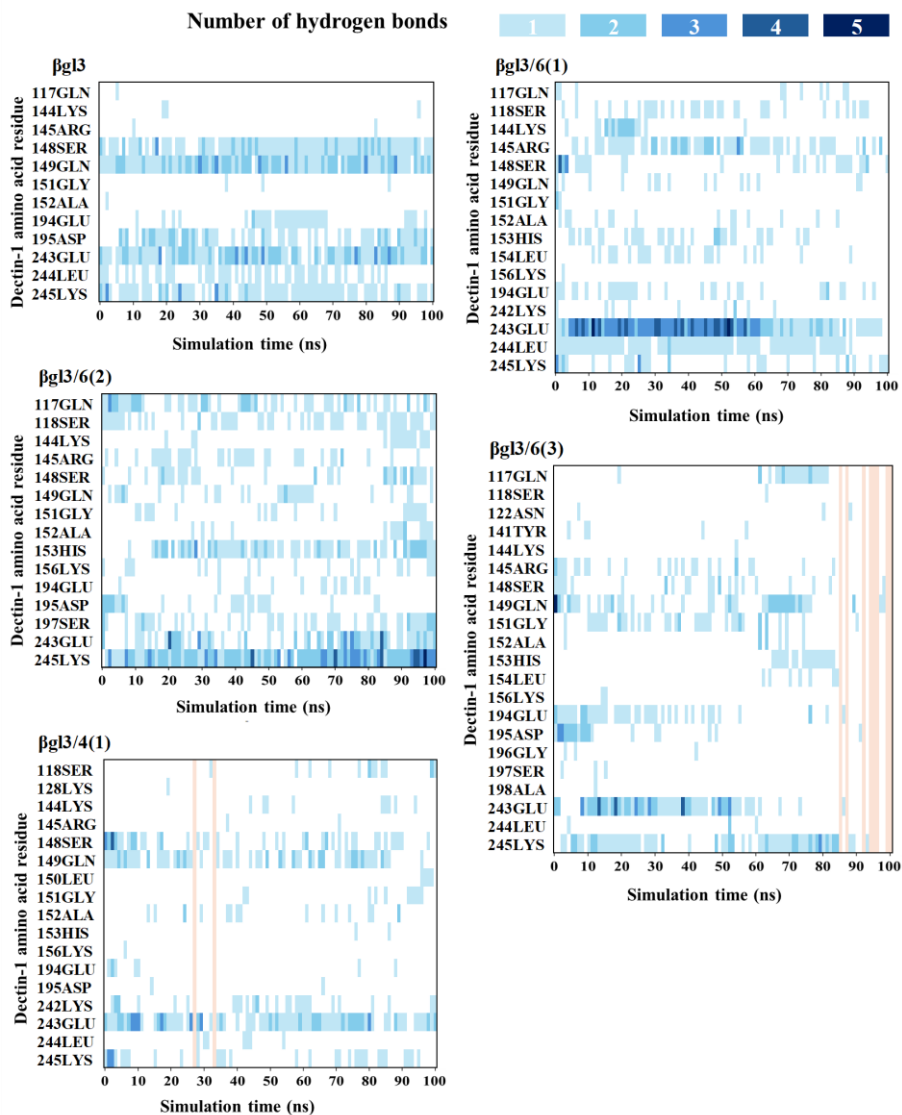


Figure 10. Heatmap of hydrogen bonds (*h bond*) between β -glucan and specific amino acid residues of Dectin-1 dimer during 100 ns MD simulation. The color intensity reflects the number of hydrogen bonds formed. The time when no interaction occurred is marked in orange.

Table 11. The duration of hydrogen bonds between different β -glucans and Dectin-1 amino acid residues, expressed as a percentage of the total 100 ns molecular dynamics simulation time. Cells highlighted in green indicate interactions that were maintained for more than 50% of the total simulation time, i.e., at least 50 ns.

	β gl3	β gl3/6(1)	β gl3/6(2)	β gl3/6(3)	β gl3/4(1)
Gln117	1	10	55	19	
Ser118		34	50	1	12
Arg145	2	60	34	23	1
Ser148	87	37	31	21	47
Gln149	97	15	27	42	25
Gly151	3	2	19	34	4
Ala152	1	14	13	6	12
His153		31	67	17	6
Glu194	32	32	14	39	27
Asp195	60		23	18	6
Glu243	91	95	57	56	43
Leu244	47	80		3	11
Lys245	77	27	97	62	59

β gl3/6(2) formed 11 hydrogen bonds at the end of the 100 ns simulation. However, a significant redistribution of interactions was observed forming especially strong interaction with Lys245. MD simulation with other branched β -glucans resulted in ligand dissociation from the binding pocket. β gl3/6(3) lost interaction with the receptor at 87 ns, while the β gl3/4(1) ligand lost all hydrogen bonds after 27 ns. These results suggest that branching may disrupt the optimal conformation and geometry for β -glucan binding.

Finally, the binding free energy (ΔG) for linear β -glucan and Dectin-1 complex was calculated using the *gmx_MMPBSA* tool using two molecular mechanics methods: Poisson-Boltzmann surface area (MM/PBSA) and generalized Born surface area (MM/GBSA) (**Table 12**).

Both methods calculate the electrostatic (EEL or Coulomb) and van der Waals (vdW or Lennard-Jones) interaction energies in the same way. All energies, except polar solvation are energetically favorable. The electrostatic interactions ($-76,04$ kcal/mol) occur between the β -glucan hydroxyl group and the receptor amino acid residues. vdW reflects intermolecular interactions, including hydrophobic interactions (-51.95 kcal/mol). The polar solvation energy, which reflects the interaction of molecules with water dipoles, reduces the stability of the complex. The nonpolar solvation energy reflects the interactions of hydrophobic surface regions with the solvent and

is usually estimated as proportional to the surface area of the interaction. Since hydrophobic surfaces are hidden from the solvent during complex formation, this energy is usually negative and thermodynamically favorable ($-6,36$ kcal/mol for MM/PBSA and $-8,80$ kcal/mol for MM/GBSA). This suggests that the hydrophobic effect contributes to the stability of the β -glucan–Dectin-1 receptor complex.

Table 12. Binding free energy (ΔG) of 5 monomer length linear β -glucan and Dectin-1 homodimer complex, computed using *gmx_MMPBSA* tool and two molecular mechanics methods: Poisson-Boltzmann surface area (MM/PBSA) and generalized Born surface area (MM/GBSA).

Energy	MM/PBSA (kcal/mol)	MM/GBSA (kcal/mol)
Electrostatics (EEL/Coul)	-76,04	
van der Waals (VDW/LJ)	-51,95	
Solvation – Polar	120,31 (Δ EPB)	97,01 (Δ EGB)
Solvation – Non-polar	-6,36	-8,80
Total ΔG (kcal/mol)	-14,04	-39,78

Total binding free energy calculated by MM/PBSA was $-14,04$ kcal/mol. It shows stronger interaction than that calculated VINA interaction in molecular docking (-12 kcal/mol) and indicates the overall thermodynamic stability of the complex. This confirms that the binding of β -glucan to Dectin-1 is stabilized primarily by electrostatic and van der Waals interactions, while the destabilizing effect of polar solvation is only partially compensated by hydrophobic interactions

In summary, increased degree of β -glucan branching correlates with decreased binding stability in Dectin-1 homodimer interaction pocket, which is reflected by hydrogen bond analysis, RMSD and RMSF data. These results allow us to conclude that the structure of β -glucans – especially the number and length of branches – has a significant impact on the binding efficiency and stability of Dectin-1 dimer, that in this form receptor most likely interacts only with linear β -glucans or linear sections of brached β -glucans.

DISCUSSION

β -glucans have been extensively studied for their immunomodulatory, antitumor, anti-inflammatory, cholesterol and glucose regulating properties

(Li et al., 2010; Liu et al., 2023; Tong et al., 2015). However, information about the negative effects of β -glucans and their increasing use in functional foods and dietary supplements raises questions about their safety. Little is known about the safe doses of β -glucans for immunostimulatory effects. In humans, doses ranging from 100 mg to 500 mg per day have been commonly studied for immune stimulation (Moriyuki and Ichimura, 1980; Vetvicka et al., 2019).

β -glucans can be used for “immune training” (Heng et al., 2021; Moorlag et al., 2020; Wang et al., 2023). However, very little is known about all possible immune system activation pathways, and therefore undesirable effects may occur. For example, various infectious agents, including bacteria, viruses and fungi, can trigger autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis or multiple sclerosis (MS). Bacterial lipopolysaccharides (LPS) promote inflammation and self-antigen presentation, leading autoreactive T-cells activation. It is believed that β -glucans used as adjuvants may stimulate an autoimmune response (Hida et al., 2005). According to Sato et al. (2022), β -glucan curdlan aggravated the course of the disease in autoimmune MS model, but had protective effect in viral model (Sato et al., 2022). These results showed that the immunomodulatory effect of β -glucans depend on the disease context, etiology, stage and the immune environment. Other studies also show that β -glucans can both enhance immunity and promote autoimmunity, and have been linked to increased risk of autoimmune/autoinflammatory syndrome caused by adjuvants (Haacke et al., 2025).

Studies show that β -glucans can have undesirable effects, yet their structural properties (length, branching, solubility) are often poorly characterized. To ensure safe and effective therapeutic use, it is essential to understand how their structure influences interactions with immunoreceptors. While experimental studies are resource-intensive and often rely on animal models, the 3R principles encourage reducing animal use. *In silico* methods, including molecular docking and molecular dynamics simulations, offer a systematic approach to studying β -glucan–receptor interactions. In this work, docking and MD simulations with the Dectin-1 receptor dimer revealed structural differences between linear and branched β -1,3-glucans, along with their influence on interaction stability and duration.

β -glucan structure analysis

β -1,3-glucan is the main component of fungi and yeast cell walls and together with β -1,6-glucans are thought to form rigid network (Kang et al.,

2018; Lamon et al., 2023; Zhang et al., 2002). However, binding of β -glucans to other cell wall components is poorly understood (Aimanianda et al., 2017). Cell wall core of *Candida albicans* is made of β -1,3-glucan and chitin complex (Garcia-Rubio et al., 2020), where chitin is connected through β -1,4-glycosidic bond making the core insoluble (Ehren et al., 2020; Lowman et al., 2021). β -glucan solubility in water depends on polymer molecular weight and branching, making the heavier and more branched β -glucans more soluble (Avramia and Amariei, 2022; Lowman et al., 2021). β -1,3-glucan branches determine the binding of other cell wall components such as chitin, mannoproteins, which makes β -1,3-glucans important in maintaining cross-links and branching in the cell wall (Aimanianda et al., 2017; Avramia and Amariei, 2022; Fernando et al., 2022; Garcia-Rubio et al., 2020).

β -glucan fractions obtained in this work were characterized as β -1,3-glucans with β -1,6-side chain structure. The obtained data are consistent with the data presented in the literature (Liu et al., 2022; Šandula et al., 1999; Synytsya et al., 2023; Zhang et al., 2017). β -glucan fractions isolated by the same method from different yeasts had similar spectral properties, with no species-dependent differences. ATR-FTIR analysis showed slightly higher protein content in the HWN fraction. Despite differences in isolation methods and biological sources, no major compositional differences were observed. ATR-FTIR and NMR methods alone cannot determine the exact composition of analyzed fractions due to the sample specificity. Estimating polysaccharide, protein or lipid content from bands width (%) may be inaccurate due to spectral band overlapping (e.g., chitin and proteins or mannans and β -1,6-glucans). The overlapping of spectral bands may affect their intensity and depends on the relative amount of polysaccharides or proteins, which limits the interpretation of the results. Such calculations can be useful when analyzing high-purity β -glucans and should be performed based on specific experimental needs. However, in order to preserve the native structure of β -glucan, solid-phase analysis is preferred, though it may reduce spectral resolution. Therefore, ATR-FTIR and NMR spectroscopy were used for a more detailed structural analysis of β -glucans in solid state.

ATR-FTIR.

The interpretation of NMR and ATR-FTIR spectra is complicated by the overlapping absorption bands characteristic of different molecules and functional groups (Plata et al., 2013). For example, the ATR IR spectral band at 1155 cm^{-1} , although attributed to α -glucans, can also be attributed to linear β -1,3-glucans or branched β -1,3/1,6-glucans, especially when accompanied

by an absorption band at 1070 cm^{-1} (Fusté set al., 2019). Another region between 3000 cm^{-1} and 2840 cm^{-1} , is associated with C–H stretching vibrations of lipids. However, asymmetric (2925 cm^{-1} and 2953 cm^{-1}), and symmetric (2853 cm^{-1} ir 2875 cm^{-1}) vibrations of CH_2 and CH_3 groups can be detected in polysaccharides (Bzducha-Wróbel et al., 2014; Shi et al., 2014). Therefore, these spectral bands in β -glucan samples do not necessarily indicate lipid impurities. Moreover, according to the data found in the literature, both pure glucose and purified β -1,3/1,6-glucans have spectral bands that are usually assigned to lipids in both NMR spectra and ATR-FTIR absorption spectra, from which we can conclude that the identification of lipid content in β -glucan spectra is difficult. However, without an additional purification step, isolated β -glucan samples may contain some lipid content.

The amide bands characteristic of proteins are also characteristic of chitin. Bands at 1649 cm^{-1} , $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1315\text{ cm}^{-1}$ and 1375 cm^{-1} are characteristic of the C=O, N–H, C–N and N-acetyl – CH_3 groups of chitin, respectively (Adeosun et al., 2019; Poerio et al., 2021; Šandula et al., 1999). Therefore, the source of the sample and isolation methods are important when assessing possible protein or lipid impurities. Isolation of β -glucans from yeasts usually involves the autolysis, high temperatures, treatment with alkalis or acids. Under such conditions, proteins are degraded by proteolytic enzymes, denatured and most of the bonds between β -glucans and proteins are broken. As a result, most of the proteins is removed or degraded to low molecular weight fragments. However, it cannot be excluded that residual protein or lipid components structurally integrated into the yeast cell wall remain in the isolated β -glucan fractions. Thus, complementary methods, such as NMR spectroscopy or chemical composition analysis, can enhance ATR-FTIR data and allow for a more accurate assessment of possible impurities.

NMR.

The heterogeneity and conformation of β -glucans can affect the intensity and width of the spectral bands. NMR spectra of heterogeneous β -glucans are characterized by broader bands (Chakraborty et al., 2021; Kolbe et al., 2021; Lee et al., 2021). Therefore, the narrow and intense C1 carbon spectral band in the HWN fraction can be attributed to the structure of β -1,3-glucans, which contain a small amount of β -1,6-side chains and chitin. In contrast, alkali-extracted AN and AWS fractions, especially the AWS fraction of *C. lusitaniae*, showed broader and lower intensity C1 bands. This indicate that they are dominated by branched β -1,3/1,6-glucans (Ehren et al., 2020; Kang et al., 2018; Lamon et al., 2023; Vaithanomsat et al., 2022). It is likely that the

β -1,3-glucans in the AWS and AN fractions are heterogeneous and are associated with other molecules, such as α -glucans, β -1,6-glucans and chitin.

Based on the chemical shifts of C1–C6 carbons, HWN fraction consist of β -1,3-glucan backbone connected to β -1,6-glucans and chitin molecules (Usui et al., 1975). Differences in the chemical shift values of the C1 carbon may depend on the β -glucan connections with other molecules (Kremmyda et al., 2021). Higher amount of β -1,6-side chains or β -1,4-glucans, hydration and molecular weight of β -glucan can affect the chemical shift. For example, lower amount of water will result in a chemical shift towards higher values (Kono et al., 2017; Kremmyda et al., 2021).

In HWN fraction, the higher C1 shift may be associated with \rightarrow 3)- β -GlcP-(1 \rightarrow linkages, while the lower shift in the AWS and AN fractions may be associated with \rightarrow 3,6)- β -GlcP-(1 \rightarrow branched segments. The latter may occur when a β -1,6-glycosidic bond is formed between the non-reducing end of the β -1,3-glucan and the reducing end of the β -1,6-glucan (Aimanianda et al., 2017; Kollár et al., 1997; Lowman et al., 2011; Zhang et al., 2002). This could explain the absence of the C3-specific β -1,3-residue resonance in the 82-92 ppm region in the AWS and AN fractions, as branching or complexes with other molecules may suppress this signal. The C3-specific signal in the 82-92 ppm region is associated with linear, triple helix β -1,3-glucans and is observed only in the HWN fraction (Kremmyda et al., 2021; Lowman et al., 2011; Saitô and Yokoi, 1989). Similar results were obtained by other scientists (Du et al., 2012; Gopal et al., 1984; Zhang et al., 2002). Therefore, alkali extracted fractions more likely formed random coils (Young et al., 2000).

The C6 carbon signals of AN and AWS β -glucans near 68 ppm could be associated with an additional bond between C1 and C6 carbons, which gives a cross-signal at the C6 position and confirms the branched β -glucan structure of these fractions (Ehren et al., 2020). The data indicate the presence of β -1,6-side chains in the alkali-extracted fractions, with the highest β -1,6-glucan content in the AWS fraction and the lowest in the HWN.

Chitin-specific bands are detected at 174 ppm, 130 ppm, 34 ppm and 24 ppm (Lowman et al., 2021). Similar carbonyl group (C=O) signals are observed at 175,5 ppm in HWN, 181,2 ppm in AN and 182,2 ppm in AWS fractions. In the obtained β -glucan spectra, the region between 120 ppm and 140 ppm, which is characteristic of aromatic amino acids, does not provide detailed information. Spectral bands at \sim 33 ppm may belong to lipids, non-aromatic amino acids, fatty acid residues, or other materials remaining after extraction (Bikmurzin et al., 2022; Camacho et al., 2019; Feás et al., 2020; Fernando et al., 2022; Lamon et al., 2023). The data show that all fractions

contain β -1,4-glycosidic chitin residues, especially in the alkali-extracted fractions. All fractions also contain protein impurities. This correlates with the data obtained by ATR-FTIR spectroscopy.

Other molecules that may have remained after extraction are melanin and glycogen. Hydrophobic melanin forms a complex with chitin in yeasts (Nosanchuk et al., 2015; Walker et al., 2010). Researchers have shown that fungal melanin has strong resonances at 30 ppm and 175 (Camacho et al., 2019; Chatterjee et al., 2015). Different fractions of β -glucans have a yellowish-brown color, which suggests that the intensity and shift of spectral bands in these regions may be due to pigment. Glycogen is an α -1,4-glucan used as a glucose storage, and is often extracted from yeast together with β -glucans (Boutros et al., 2022; Lowman et al., 2021). Scientists report that several *Candida* species have a glycogen complex linked to β -1,3/1,6-glucans by a glycosidic bond (Lowman et al., 2021). The main signal at the C1 carbon of α -glucans, found between 98 ppm and 101 ppm, varies significantly between the extracted fractions. We cannot draw a reliable conclusion from the available data. Therefore, further studies are needed to determine what type of α -glucans are extracted by different isolation methods.

Alkali and hot water-extracted β -glucan fractions are conformationally and structurally different. Alkaline isolation allows for the production of β -glucan chains of different sizes, which are most likely in the form of random chains. Thermal isolation of β -glucans results in linear β -1,3-glucan molecules, most likely forming a triple helix. HWN fractions may have a higher molecular weight because they are not exposed to alkalis that can break β -glycosidic bonds. Differences in the ATR-IR and ^{13}C NMR spectra of the obtained β -glucans have shown a relationship between the isolation method and the structure of β -glucans. Different methods use different isolation processes or treatments, which leads to structural and compositional diversity of β -glucan fractions.

In silico analysis

Brown et al. (2007) were the first to determine the crystal structure of the Dectin-1 receptor and describe the interaction of its dimeric form with a β -glucan composed of three monomers. In the monomeric form of the receptor, a major surface groove between Trp221 and His223 was identified, responsible for β -glucan recognition (Brown et al., 2007; Feng et al., 2022). The binding of β -glucans in this groove is ensured by hydrophobic and electrostatic interactions. Mutations at Trp221 and His223 significantly reduce ligand binding, confirming the importance of this groove for ligand

recognition. Receptor dimerization is driven by the formation of a large (1520 Å) hydrophilic pocket with hydrophobic regions (e.g., Gly151, Asp195, Glu243). This region was found to be formed by the amino acids Ser129A, Tyr131A, Leu154A, Asp158AB, Glu162AB, Glu194AB, Asp195AB, Glu241AB and Glu243AB. Since this region was distant from the Trp221/His223 groove (Fig. 11), and the mutation Glu194Ala did not affect ligand binding *in vitro*, it was assumed that such binding could be an artifact of crystallization and is not essential for direct β -glucan recognition (Adachi et al., 2004; Brown et al., 2007). Therefore, most *in silico* studies were performed with the monomeric form of the receptor.

Molecular modeling showed that the surface groove between Trp221 and His223 effectively binds longer β -glucans (DP \geq 10). More detailed molecular dynamics studies with a triple helix showed that lentinan binds to the Dectin-1 monomer via 4-8 hydrogen bonds, and MM/PBSA analysis showed high affinity, with a binding free energy of $-53,7$ kcal/mol. Hydrogen bonds and hydrophobic interactions occurred with Trp221, His223, Tyr228 and other amino acids (Asn233, Glu230, Trp228, His217, etc.) (Feng et al., 2022; Wu et al., 2021). MM/GBSA analysis of the linear β -glucan and Dectin-1 complex showed that the lowest free energy of binding (ΔG) was $-128,5$ kJ/mol or $-30,7$ kcal/mol, confirming a strong protein-ligand interaction (Feng et al., 2022).

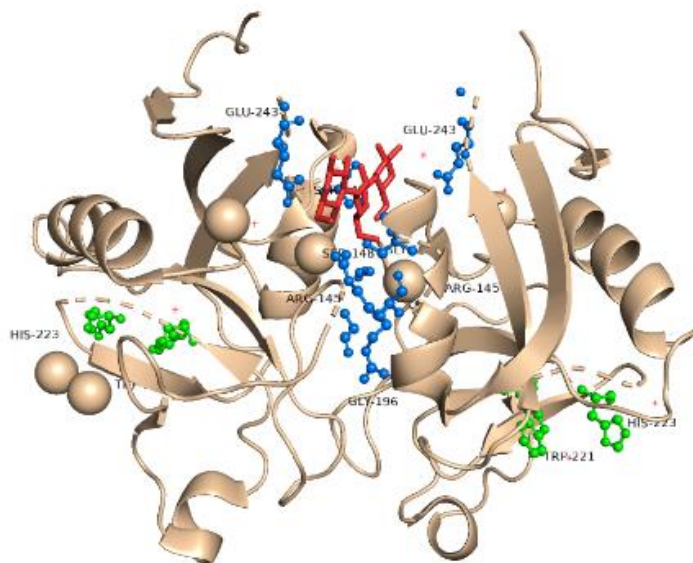


Figure 11. Dectin-1 receptor and β -glucan complex (PDB ID: 2CL8). Green – Trp221 and His223 amino acids involved in β -glucan and receptor monomer interaction; Red – β -glucan, Blue – amino acids involved in β -glucan and receptor dimer interaction.

In recent years, several publications have appeared describing studies with dimeric Dectin-1. In a study by Patidar et al. (2020), using molecular docking, it was found that the affinity of the dimeric form of the Dectin-1 receptor for β -glucan ($-7,9$ kcal/mol) and zymosan ($-8,5$ kcal/mol) is higher than that of the TLR2 receptor for these ligands ($-6,5$ kcal/mol) (Patidar et al., 2020). Molecular docking studies further confirm the specificity and strength of the interaction between Dectin-1 and β -glucan. In another study, Souza et al. (2022) found that the binding energy of curdlan, consisting of four monomers, to Dectin-1 is $-7,5$ kcal/mol, and the interaction occurs through the formation of 18 hydrogen bonds (donors: Ala152, Glu194, Gly151, Leu244, Lys245, Ser148; acceptors: Glu194, Arg145, Glu243) (D'Souza et al., 2022).

In this work, it was found that the Vina affinity of branched and linear β -glucans were similar and ranged from -11 kcal/mol to -13 kcal/mol, while CNN affinity from 4,3 to 4,8 pKd. During docking, it was found that the β -1,6-side chains interacted with the same amino acids as the backbone molecules: Arg145A, Ser148A,B, Glu194A,B, Glu243A,B, Lys245B. However, molecular dynamics did not confirm the stability of the branched β -glucan-receptor complexes. Only linear β -1,3-glucans and the dimeric form of Dectin-1 formed a stable complex during 100 ns MD simulation, with $\Delta G = -14,04$ kcal/mol, with an average of 6 hydrogen bonds, the most important of which were between β -glucan and Arg145, Ser148, Gln149, Asp195 Glu243, Lys245.

In vivo studies have shown that in the resting state, the Dectin-1 receptor remains monomeric, but in the presence of β -glucans, especially higher structures, it oligomerizes and aggregates into small clusters <15 nm. Such aggregation has also been observed when Dectin-1 contacts fungal particles dalelémis (Anaya et al., 2023). Although direct *in vivo* data on Dectin-1 oligomerization are lacking, oligomerization of some CTLD family proteins has been described both *in vitro* and *in vivo*. In the presence of a pathogen with long β -glucan chains, receptor avidity may increase through oligomerization, leading to cluster formation and initiation of signaling dalelémis (Anaya et al., 2023). Given that β -glucan binding to the Dectin-1 receptor is associated with its oligomerization, stronger interactions may be necessary for initial receptor activation, while weaker interactions may be sufficient to maintain the interaction of an already activated receptor. This assumption is further supported by experimental studies, which showed that mutations in Trp221Ala, His223Ala, and Tyr228Ala completely abolished the formation of receptor oligomers (Dulal et al., 2018). However, further

experimental and molecular modeling studies are needed to definitively confirm these findings.

Thus, in conclusion, it is important to note that the molecular docking of β -glucans to dimeric Dectin-1 and the performed receptor-ligand MD simulation described in the work are of great importance for the understanding of receptor signaling. Based on the studies performed, it has been reliably established that only linear β -glucans form stable complexes with the Dectin-1 dimer and this has real applications in immunotherapy.

CONCLUSION

1. Based on the characteristic C3 and C6 carbon signals in the ^{13}C NMR spectrum corresponding to 82-92 ppm region 60-70 ppm region, respectively, it was determined that the hot water (thermally) isolated fraction is predominately composed of linear β -1,3-glucan with triple-helical conformation, while alkali-isolated fraction is enriched in branched β -1,3/1,6-glucans with disordered structure, most likely, random helical conformations. Combined analysis of ^{13}C NMR and ATR-FTIR spectra indicate that chitin represent the main impurity present in all fractions.
2. Molecular docking analysis showed that both linear and branched β -1,3-glucans are capable of interacting with Dectin-1 dimer. The predicted binding affinity calculated by GNINA CNN scoring function ranged from $-4,3$ pKd to $-4,8$ pKd depending on the β -glucan chain length. The interaction was most frequently mediated by residues Ser148, Glu194 and Glu243 from both chains of Dectin-1 dimer. Additional residues, including Arg145, Gln149, Gly151, Ala152 and Asp195, were also involved in β -glucan–Dectin-1 interaction.
3. The results of the conducted 100 ns molecular dynamics simulations showed that the deviation of the linear β -1,3-glucan–Dectin-1 complex from initial conformation during the entire simulation was constant and RMSD values reached 2 Å. The main amino acid residues involved in the interactions included Ser148, Gln149, Asp195, Glu243 and Lys245, each maintaining contacts with the ligand for at least 50 ns of the simulation. The binding free energy calculated using the MM/PBSA method was $-14,04$ kcal/mol, indicate favorable complex formation and shows slightly stronger interaction compared to the docking VINA estimated score of -12 kcal/mol. Complexes formed with branched β -1,3/1,6-glucans and β -1,3/1,4-glucan exhibited limited stability and interactions. The side chains resulted in rearrangement of interactions with amino acids, which may lead to loss of interaction with the receptor, so the

orientation of the interaction pocket of the Dectin-1 homodimer is more favorable for linear β -glucans.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju visiems, kurie buvo šalia, pagelbėjo, konsultavo, padrašindavo, įkvėpdavo.

Dėkoju Prof. Dr. Eglei Lastauskienei, Dr. Visvaldui Kairiui, Dr. Martynui Talaikiui, Dr. Auksei Zinkevičienei, Dr. Vaclav Vetvička, Dr. Arūnui Maršalkai, Dr. Rimantei Bandzevičiūtei, Kristinai Slavuckytei, Dr. Daivai Baltriukienei, visai Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedrai.

Dėkoju darbo vadovei Prof. Dr. Lilijai Kalėdienei.

Atskirai dėkoju draugams ir šeimai.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **Ruslan Bikmurzin**, Arūnas Maršalka, Lilija Kalėdienė. Solid-State ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Study of Soluble and Insoluble β -Glucans Extracted from *Candida lusitanae*. *Molecules* 2023, 28(24), 8066. <https://doi.org/10.3390/molecules28248066>
2. **Ruslan Bikmurzin**, Rimantė Bandzevičiūtė, Arūnas Maršalka, Andrius Maneikis, Lilija Kalėdienė. FT-IR Method Limitations for β -Glucan Analysis. *Molecules* 2022, 27(14), 4616. <https://doi.org/10.3390/molecules27144616>

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

1. Bikmurzin R., Maršalka A., Bandzevičiūtė R., Kalėdienė L. Difficulties with β -glucan isolation and analysis (stendinis pranešimas). CBM2023, 5th Congress of Baltic Microbiologists, Spalio 11-13, Vilnius, Lietuva. ISBN 9786099640907. p. 115.
2. Bikmurzin R., Bandzevičiūtė R., Maršalka A., Maneikis A., Kalėdienė L. Structural comparison of β -glucans by NMR and FT-IR in solid state (stendinis pranešimas) FEMS 2023: 10th congress of European microbiologists, Liepos 9-13 2023, Hamburg, Vokietija.

Publikacijų ir konferencijų sąrašas ne disertacijos tema:

1. Bikmurzin R., Būdienė J., Daunoravičienė R., Pumputienė I., Graželytė J. I. *Comparative In Vitro Evaluation of Selected Essential Oils and Commercial Blends Against Skin-Associated Pathogens*. Cosmetics 2026, 13(1) <https://doi.org/10.3390/cosmetics13010039>
2. Bikmurzin R. *Dirbtinis intelektas biomedicininėje diagnostikoje* (tezės). Laboratorinė medicinos draugija.
3. Bikmurzin R., Būdienė J., Daunoravičienė R., Pumputienė I., Graželytė J. I. *Synergistic Antimicrobial Effect of Essential Oil Blends Against Skin Pathogens* (stendinis pranešimas). 6th Congress of Baltic Microbiologists, CBM2025, 2025 spalio 1-3, Riga, Latvija.
4. Bikmurzin R. *Dirbtinis intelektas biomedicininėje diagnostikoje* (žodinis pranešimas). Respublikinė mokslinė praktinė konferencija „Biomedicininė diagnostika 2025 m.: mokslas ir praktika“. 2025 gegužės 14, Vilnius
5. Bikmurzin R., Kalėdienė L. *Research of the effect of β -glucan on peritoneal adherent cell population*. 4th congress of Baltic Microbiologists, CBM2018, 2018 rugsėjo 10-12, Gdanskas, Lenkija. ISSN 0001-527X. eISSN 1734-154X. 2018, vol. 65, suppl. 1, abstract no. X.P.1, p. 84.

GYVENIMO APRAŠYMAS

Ruslan Bikmurzin

ruslan.bikmurzin@gmc.vu.lt

r.bikmurzin@spf.viko.lt

IŠSILAVINIMAS

- | | |
|-----------|---|
| 2016-2024 | Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras,
Biomokslų institutas
Biologijos doktorantūra |
| 2012-2015 | Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas,
Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra
Mikrobiologijos ir biotechnologijos magistras |
| 2008-2012 | Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas,
Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra
Molekulinė biologijos bakalauras |

DARBINĖ VEIKLA

- | | |
|-------------------|---|
| 2017 - dabar | Vilniaus kolegija
Sveikatos priežiūros fakultetas
Lektorius |
| 2024 06 - 2025 06 | Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras,
Biomokslų institutas
Jaunesnysis mokslo darbuotojas |
| 2020 09 - 2022 09 | Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras,
Biomokslų institutas
Jaunesnysis asistentas |

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.