

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-242

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В БОЛЬШОМ ВНЕКЛЕТОЧНОМ ДОМЕНЕ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b ***IDENTIFICATION OF DISULFIDE BOND POSITIONS IN THE LARGEST EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE SODIUM-DEPENDENT PHOSPHATE TRANSPORTER NaPi2b**А. В. Килунов¹, Л. Ф. Булатова¹, Д. Д. Решетникова¹, В. С. Скрипова¹, Р. Г. Киямова¹, М. В. Богданов²¹НИИЛ «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет²Медицинская школа Макговерна, Научный центр здравоохранения Техасского университета, Хьюстон, СШАA. V. Kilunov¹, L. F. Bulatova¹, D. D. Reshetnikova¹, V. S. Skripova¹, R. G. Kiyamova¹, M. V. Bogdanov²¹Biomarker Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University²McGovern Medical School, University of Texas Health Science Center, Houston, USA

✉ kilunov73@gmail.com

Аннотация

В рамках данной работы методом химической модификации малеимид-содержащими соединениями мутантных вариантов транспортера NaPi2b мы определили положения дисульфидных связей в большом внеклеточном домене, которые поддерживают его конформацию, необходимую для распознавания эпитопа MX35 моноклональными антителами.

Abstract

In this work, by chemical modification of mutant variants of the NaPi2b transporter with maleimide-containing compounds, we determined the positions of disulfide bonds in the largest extracellular domain, that maintain its conformation necessary for recognition of the MX35 epitope by monoclonal antibodies.

Введение. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является привлекательной мишенью для терапии онкологических заболеваний за счет своей мембранной локализации и повышенной экспрессии в ряде опухолей, включая рак яичника. В области большого внеклеточного домена (ВКД) транспортера NaPi2b находится потенциальный опухоль-специфический эпитоп MX35, который распознается терапевтическими антителами преимущественно в опухолевых клетках, но не в клетках нормальных тканей. Мы предполагаем, что в опухолевых клетках за счет дисульфидных связей между остатками цистеина С303, С322, С328 и С350 формируется особая конформация ВКД, при которой эпитоп MX35 доступен для распознавания антителами. Однако между какими остатками цистеина они образуются — неизвестно. Целью данной работы является определение положения дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b в опухолевых клетках.

Материалы и методы. Интактные клетки линии рака яичника OVCAR-8 со стабильной экспрессией рекомбинантных мутантных вариантов транспортера NaPi2b с заменами двух из четырех остатков цистеина в области ВКД: С303А+С328А и С322+С328А обрабатывали реагентом mPEG-Mal-10кДа, ковалентно модифицирующим свободные сульфгидрильные группы остатков цистеина, в условиях с и без восстановления дисульфидных связей реагентом ТСЕР. Модификацию остатков цистеина mPEG-Mal-10кДа оценивали по изменению электрофоретической подвижности NaPi2b в клеточных лизатах методом вестерн-блот-анализа антителами против N-концевого домена транспортера NaPi2b.

Результаты. Во всех исследованных мутантных вариантах транспортера NaPi2b mPEG-Mal-10кДа модифицирует остатки цистеина в области ВКД транспортера NaPi2b только после восстановления дисульфидных связей с помощью ТСЕР. Это говорит о наличии дисульфидных связей в области ВКД С303-С350 и С322-С350 в мутантных вариантах транспортера NaPi2b С322А+С328А и С303А+С328А соответственно.

Заключение. Полученные результаты показывают, что остаток цистеина С350 способен образовать дисульфидную связь как с С303, так и с С322, что может иметь ключевое значение для формирования конформации ВКД транспортера NaPi2b, обеспечивающей доступность эпитопа MX35 для антител.

* Исследование выполнено за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (Приоритет-2030).

© А. В. Килунов, Л. Ф. Булатова, Д. Д. Решетникова, В. С. Скрипова, Р. Г. Киямова, М. В. Богданов, 2024