

УДК 577.11

Tn АНТИГЕН В СОСТАВЕ МОЛЕКУЛЫ CD44 КАК НОВЫЙ БИОМАРКЕР ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С АБЕРРАНТНЫМ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕМ*

© 2020 М.Л. Шувалова¹, А.Т. Копылов², Д.В. Мазуров¹,
А.В. Пичугин¹, Н.В. Бовин³, А.В. Филатов^{1,4**}

¹ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, 115522 Москва, Россия; электронная почта: avfilat@yandex.ru

² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121 Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра иммунологии, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.06.2020

После доработки 08.07.2020

Принята к публикации 30.07.2020

Tn антиген является опухолеспецифическим антигеном, который появляется на раковых клетках в результате аберрантного О-гликозилирования. Наиболее изученной формой Tn антигена является та, которая обнаруживается в составе муцинов, в частности муцина 1 (MUC1). Антитела против этой формы Tn антигена используются для диагностики опухолей, а также для создания Т-киллеров с химерным рецептором. Некоторые карциномы не несут MUC1, и для выявления Tn антигена на этих клетках требуются антитела иной специфичности. В нашей работе был выполнен поиск анти-Tn антител без предварительных предположений о том, на каких белках-носителях может проявляться Tn антиген. Для этого нами было получено несколько пар изогенных клеточных линий с диким типом и нокаутом гена *Cosmc*, который отвечает за корректность О-гликозилирования. С использованием созданных линий как иммуногенов нами было получено моноклональное антитело АКС3, которое реагировало с клетками аденокарциномы легкого A549, дефицитными по *Cosmc*, и не связывалось с клетками дикого типа. С помощью масс-спектрометрии, а также ко-иммунопреципитации было показано, что антитело АКС3 распознает Tn антиген в составе белка CD44, который имеет важное значение при опухолевом росте. Антитело АКС3 может найти применение в диагностике опухолей, а также использоваться при создании Т-клеток с химерным рецептором для лечения опухолей, которые не экспрессируют муцины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Tn антиген, О-гликозилирование, неоантигены, CD44, аденокарцинома легкого человека.

DOI: 10.31857/S0320972520090080

ВВЕДЕНИЕ

Важное значение в диагностике и иммунотерапии злокачественных новообразований имеют опухолеассоциированные и опухолеспецифические антигены. Поиск новых биомаркеров опухолевых клеток осуществляется как на протеом-

ном, так и на иммунохимическом уровне. Если с помощью первого метода определяется структура неоантигенов, то с помощью второго – создаются реагенты для их детекции. Одним из путей формирования неоантигенов является аберрантное гликозилирование. При О-гликозилировании белков построение гликановой цепи начинается с присоединения к остаткам серина или треонина N-ацетилгалактозамина (GalNAc) [1]. При дефиците шаперона *Cosmc* дальнейшее наращивание гликановой цепи прекращается, и концевой GalNAc вместе с прилегающими аминокислотными остатками формирует так называемый Tn антиген [2]. Мутации в гене *Cosmc*, приводящие к образованию Tn антигена, наблюдаются в ряде опухолевых клеток. Более 70% карцином являются положительными по Tn антигену [3]. На нормальных клетках Tn антиген отсутствует.

Принятые сокращения: GalNAc – N-ацетилгалактозамин, LRG1 – богатый лейцином альфа-2-гликопротеин 1, leucine rich alpha-2-glycoprotein 1, MM – молекулярная масса, MUC1 – муцин 1, PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле, PBS – фосфатно-солевой раствор, SDS – додецилсульфат натрия, WB – Вестерн-блот.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-178, 03.09.2020.

** Адресат для корреспонденции.

К настоящему времени получено значительное число антител против Tn антигена [4, 5], которые можно разделить на две большие группы: на антитела, зависимые и независимые от пептидного окружения GalNAc. Пептид-независимые антитела имеют широкий спектр реактивности и связываются с Tn антигеном в составе самых разнообразных белков [6]. К сожалению, такие антитела принадлежат к классу IgM и обладают невысокой константой связывания. Пептид-зависимые антитела представляют больший интерес, поскольку характеризуются высоким аффинитетом, однако они имеют узкий спектр реактивности и реагируют с Tn антигеном в составе только определенных белков. Как правило, анти-Tn антитела получали иммунизацией гликопептидами из муцина, который является наиболее известным белком-носителем Tn антигена. Данные о биомаркерах aberrантного гликозилирования, представленные на других белках, очень ограничены.

Ранее для поиска пептид-специфичных анти-Tn антител на неизвестных белках-носителях нами был предложен метод, использующий Cosmc изогенные линии клеток [7]. Для иммунизации и скрининга нами была использована пара клеточных линий: Jurkat wt, которая конститутивно является дефектной по гену *Cosmc*, а также клетки Jurkat, трансдуцированные геном *Cosmc* дикого типа. Это позволило нам получить антитела против Tn антигена в составе белков CD45 и CD43, которые до этого не были известны, как возможные носители Tn антигена [8].

Целью настоящего исследования является поиск новых биомаркеров карцином, которые образуются в результате aberrантного гликозилирования и впоследствии могут использоваться в диагностике и терапии опухолей. Для достижения этой цели нами были поставлены следующие задачи: (1) путем нокаутирования гена *Cosmc* получить изогенные линии клеток, несущие, в отличие от клеток «дикого типа», Tn антиген; (2) получить пептид-специфичные моноклональные антитела против Tn антигена, представленного на клетках карциномы легкого; (3) идентифицировать новые биомаркеры опухолевых клеток с aberrантным гликозилированием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток, антитела и проточная цитометрия. Клетки линий A549, MCF-7 и RPMI 8226 («ATCC», США) культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% феталь-

ной сыворотки телят, 4 mM L-глутамина и гентамицина (80 мг/л) («ПанЭко», Россия) при 37 °C, в увлажненной атмосфере 5% CO₂. Антитела He7 (IgG2a, анти-CD44), ER1 (IgG2b, анти-CD99), JA1 (IgM, анти-Tn антиген) были получены ранее в нашей лаборатории [7]. Для получения новых моноклональных антител мышей BALB/c трехкратно иммунизировали клетками мишенями, после чего клетки селезенки иммунных мышей гибридизовали с миеломой Sp2/0. Культуральные супернатанты гибридных клеток через 10 дней тестировали в иммунофлуоресцентном тесте на клетках-мишенях и отбирали позитивные клоны [7].

Для иммунофлуоресцентного окрашивания к осадку 1×10^6 клеток добавляли 50 мкл первичных немеченых антител и инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Затем клетки дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. Далее клетки инкубировали с FITC-мечеными вторичными антителами против мышиного IgG или IgM («Merck», США) и отмывали. Окрашенные клетки анализировали на проточном цитометре CytoFLEX S («Beckman-Coulter», США). В качестве негативного контроля использовали клетки, обработанные только вторичными антителами.

Создание клеточных линий с нокаутом гена *Cosmc*. Выбор таргетной последовательности в гене *Cosmc* (Gene ID: 29071) проводили с помощью онлайн ресурса, описанного в работе Hsu et al. [9]. Последовательность gRNA была закодирована в пару комплементарных ДНК олигонуклеотидов для последующего клонирования в вектор: 5-gR-Cosmc: 5'-CACCGCAATGATAGCAAACGTAAGT-3' и 3-gR-Cosmc: 5'-AAACCACTACGTTTGCTATCATTCG-3'. Наряду с этим была использована gRNA из работы Stolfi et al. [10].

Олигонуклеотиды отжигали и клонировали в вектор pKS-gRNA-BB по рестрикционному сайту BbsI [11]. 1 млн клеток трансфицировали с помощью системы для электропорации Neon («Thermo Fisher», США). Через 5 суток после трансфекции с помощью антитела JA1 на клетках оценивали экспрессию Tn антигена, клетки наращивали и сортировали позитивную по Tn антигену популяцию с помощью прибора FACSAria II («Becton Dickinson Biosciences», США).

Периодатное окисление. Клетки A549 в течение 10 мин фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида и 1 ч обрабатывали 20 mM раствором периодата натрия в PBS. Клетки 2 раза отмывали в PBS, и образовавшиеся альдегидные группы блокировали в течение 30 мин в

полной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки [8].

Анализ углеводной специфичности антител с помощью гликочипов. Гликочипы были получены печатью гликанов на стеклянные слайды («Schott-Nexterion», Германия), активированные с помощью гидроксисукцинимидом. На каждом слайде было иммобилизовано ~400 различных лигандов, которые представляли собой синтетические компоненты гликопротеинов и гликолипидов млекопитающих, а также 200 бактериальных полисахаридов. Полный список лигандов приведен в работе Dobrochaeva et al. [12]. Гликочип инкубировали с раствором антитела, отмывали в растворе PBS, содержащем 0,1% (v/v) Tween-20, окрашивали вторичными антителами против IgG мыши, меченными Alexa555 и еще раз отмывали. Флуоресценцию регистрировали на сканере Innoscan 710 Fluorescence Scanner («Innopsys», France).

Флуоресцентный иммунопреципитационный анализ. 2×10^7 клеток окрашивали с помощью аминореактивного флуоресцентного красителя Cy3 (10 мг/мл) («Lumiprobe», Россия) [13]. Клетки 30 мин лизировали при 4 °C в 1 мл лизирующего буфера 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, содержащем 1% (w/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 1 mM фенилметилсульфонилфторида («Merck», США). Иммунопреципитацию проводили путем добавления 1 мл лизата к 20 мкл А-Белок-агарозы («Thermo Fisher», США) с преформированным на ней комплексом преципитирующих антител и последующей инкубации в течение 2 ч при 4 °C. Иммунопреципитаты отмывали трижды, каждый раз добавляя по 800 мкл лизирующего буфера. Связавшиеся флуоресцентно-меченные белки элюировали с носителя прогретием иммунопреципитатов с буфером образца для электрофореза в течение 5 мин при 95 °C.

Электрофорез и Вестерн-блоттинг (WB). Элюированные белки разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях в буферной системе Лэммли [7]. Визуализацию белков в геле проводили на флуоресцентном сканере Molecular Imager FX Pro («Bio-Rad», США), регистрируя флуоресценцию при 600 nm.

Разделенные белки полусухим методом переносили из геля на PVDF-мембрану («Merck», США) [7] и проявляли с помощью первичных, а затем вторичных антител против мышинового IgG, меченных пероксидазой хрена («GE Healthcare», США). Визуализацию блотов проводили на приборе ChemiDoc XRS («Bio-Rad», США) с использованием реагентов для хемилюминесценции («Merck», США).

Масс-спектрометрический анализ. Белковые полосы (~5 мм³) вырезали из геля, отмывали 3 раза в деионизованной воде и проводили трипсинолиз, как описано ранее [13]. Смесь пептидов в объеме 1,5–2,0 мкл загружали на колонку Ultimeta 3000 Plus RSLC nano («Thermo Fisher», США) и разделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии с использованием линейного градиента 2→37% подвижной фазы (ацетонитрил с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 0,03% уксусной кислоты). Регистрацию сигнала проводили с использованием масс-спектрометра Q-Exactive HF-X («Thermo Fisher», США) в диапазоне 425–1300 m/z. Идентификацию белков по тандемным масс-спектрам триптических пептидов проводили с помощью программы SearchGUI и Peptideakher [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание клеточных линий, дефицитных по гену *Cosmc*. Для получения клеточных линий MCF-7, A549 и RPMI 8226 с aberrантным O-гликозилированием была использована технология нокаутирования генов с помощью CRISPR/Cas9 [9]. Клетки трансфецировали компонентами системы CRISPR/Cas9 и через 5 дней выявляли 5–10% Tn положительных клеток, которые определяли с помощью пептид-независимого анти-Tn антитела JA1. После двух раундов сортировки были получены клеточные линии, в которых Tn-позитивными были не менее 90% клеток.

Получение моноклонального антитела против aberrантно гликозилированных клеток A549. Для генерации новых моноклональных антител против Tn-антигена мышь BALB/c была проиммунизирована клетками A549, нокаутными по гену *Cosmc* (A549-Cosmc-KO). Клетки селезенки мыши были гибридизованы с миеломой Sp2/0. На первом этапе скрининга отбирали гибридомы, секретирующие антитела, которые реагировали с клетками A549-Cosmc-KO. На следующем этапе скрининга исключали клоны, реагировавшие с клетками A549 дикого типа. В результате отбора был получен клон АКС3, секретирующий антитело IgG1 изотипа. Это антитело ярко окрашивало клетки A549, нокаутные по гену *Cosmc*, и минимально связывалось с клетками A549 дикого типа (рис. 1, а). При этом антитело АКС3 не реагировало с Tn-позитивными клетками MCF-7 и RPMI 8226, дефицитными по гену *Cosmc* (рис. 1, а).

Биохимическая характеристика антигена АКС3. Для того чтобы проверить, что связывание антитела АКС3 зависит от присутствия угле-

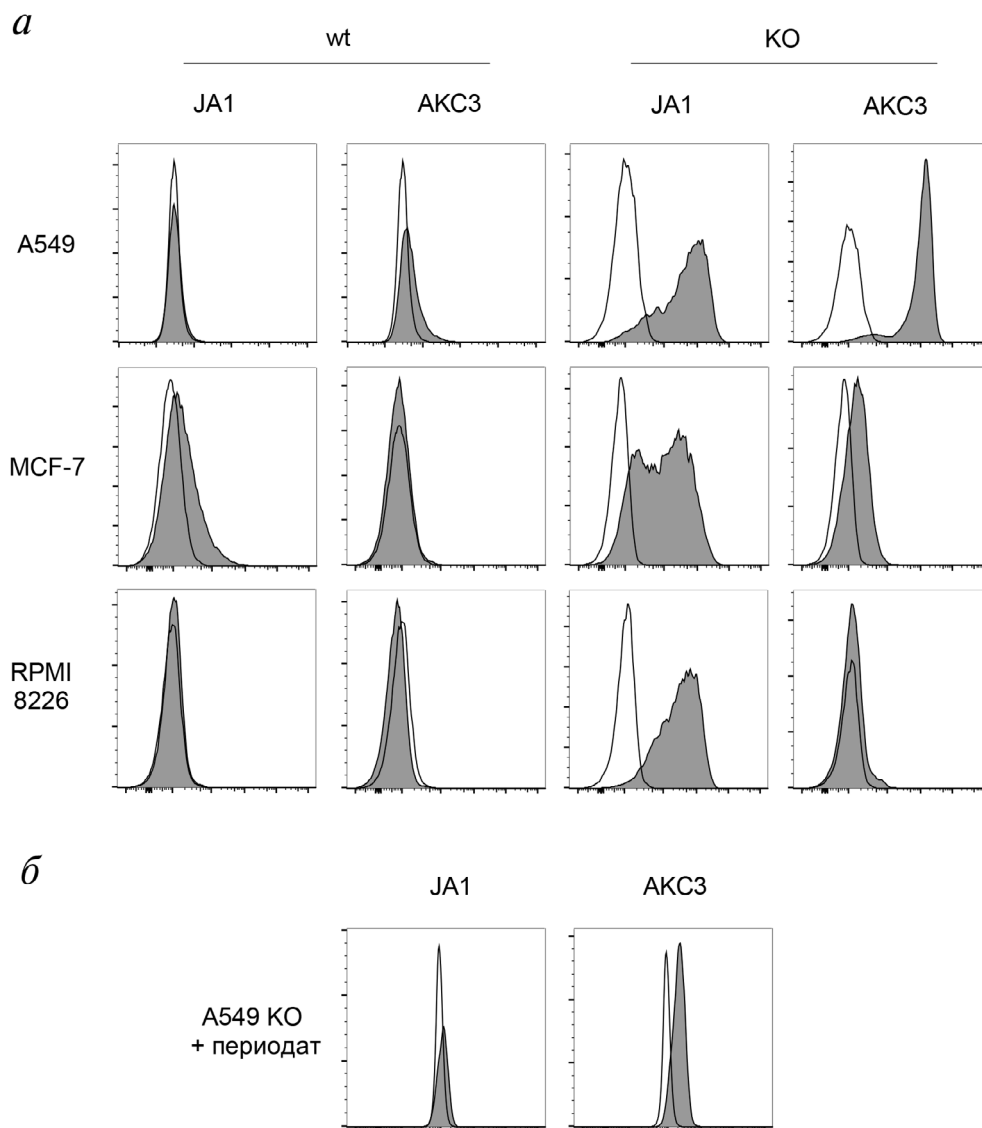


Рис. 1. Экспрессия Tn антигена на клетках, нокаутированных по гену *Cosmc*. *a* – Клетки A549 (верхний ряд), MCF-7 (средний ряд) или RPMI 8226 (нижний ряд) окрашивали антителом JA1 или AKC3, затем вторичными антителами против Ig мыши, меченными FITC, и анализировали на проточном цитометре (закрашенные гистограммы). Отрицательный контроль (клетки окрашивали только вторичными антителами) представлен не закрашенными гистограммами. В двух левых колонках представлены клетки дикого типа (wt), в двух правых колонках – клетки, нокаутированные по гену *Cosmc* (KO); *b* – клетки A549, нокаутированные по гену *Cosmc* (KO), перед окрашиванием антителами JA1 или AKC3 обрабатывали 20 mM раствором периодата натрия

водной детерминанты, было проведено мягкое периодатное окисление клеток. Клетки A549-*Cosmc*-KO, обработанные периодатом натрия, теряли способность окрашиваться антителом AKC3 (рис. 1, *b*). Тестирование антитела AKC3 на гликочипе, имеющем в своем составе более 400 различных гликанов, включая GalNAc α , GalNAc α -Ser и несколько десятков олигосахаридов с терминальным или внутренним фрагментом GalNAc α [13], дало отрицательные результаты. Таким образом, связывание AKC3 является зависимым от присутствия углеводной

цепи, но полностью ею не определяется и зависит от конкретных белков-носителей, которые экспрессированы клетками A549.

Для того чтобы охарактеризовать белки-носители антигена AKC3, мы использовали метод флуоресцентной иммунопреципитации (FIPA) [13]. Антиген AKC3, выделенный на иммуносорбенте на основе антитела AKC3, мигрировал в SDS-PAGE геле в виде двух полос (рис. 2, *a*). Мажорная верхняя полоса соответствовала белку с молекулярной массой (ММ) ~85 кДа. Нижняя полоса была менее интенсивная и зачастую

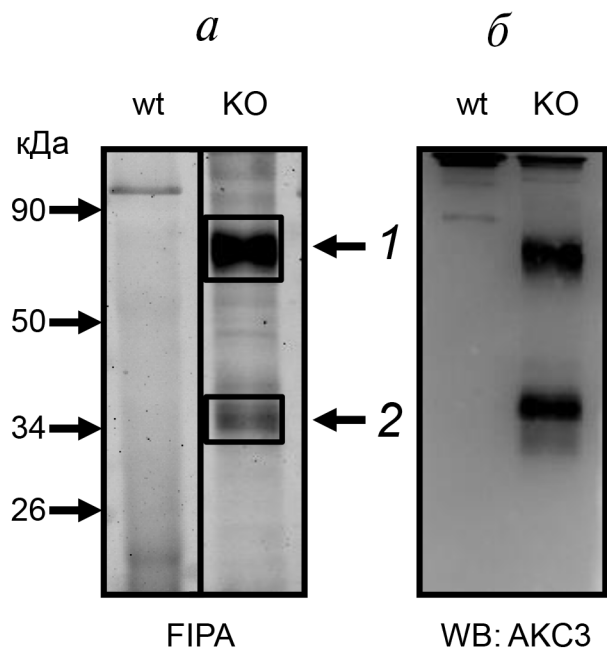


Рис. 2. Иммунопреципитация антигена, выявляемого антителом АКС3. *а* – Клетки метили красителем СуЗ, лизировали в 1%-ном (w/v) Triton X-100 и иммунопреципитировали на антителе АКС3. Выделенные белки разделяли в 12%-ном SDS-PAGE в восстанавливающих условиях и регистрировали флуоресценцию геля (FIPA). Белковые полосы 1 и 2 вырезали и подвергали масс-спектрометрическому анализу; *б* – белки из геля переносили на PVDF-мембрану и проявляли с помощью Вестерн-блоттинга антителом АКС3. В качестве клеток-мишеней использовали клетки A549 дикого типа (wt) или клетки A549, нокаутированные по гену *Cosmc* (KO)

проявлялась в виде двух близко расположенных полос в области 35 кДа. Те же полосы наблюдались в Вестерн-блоттинге (рис. 2, б). Положение всех полос не менялось при переходе с восстанавливающих на невосстанавливающие условия электрофореза. Таким образом, антиген АКС3 присутствует, по крайней мере на двух белках-носителях, которые являются одноцепевыми молекулами.

Масс-спектрометрический анализ антигена АКС3. Для того чтобы идентифицировать белки, несущие Tn антиген, две полосы, полученные при иммунопреципитации с помощью антитела АКС3 (рис. 2, а), были вырезаны из геля и обработаны трипсином. Полученные пептиды были проанализированы методом tandem mass spectrometry с электроспрей-ионизацией с предварительным разделением пептидов методом жидкостной хроматографии. Наиболее релевантные идентифицированные белки представлены в таблице. Для полосы 1 наибольший интерес представлял белок CD44, для которого было проведено более детальное исследование.

Ко-иммунопреципитационный анализ антигена АКС3. Обращает на себя внимание то, что полоса преципитации CD44, полученного из лизата клеток A549-Cosmc-KO, довольно точно совпадает с верхней полосой антигена АКС3 (рис. 3, дорожки 3 и 4). Можно отметить также то, что CD44, выделенный из клеток дикого типа, имел несколько меньшую подвижность, чем CD44 из клеток A549-Cosmc-KO (рис. 3, дорожка 2). Это наблюдение соответствует тому, что в клетках дикого типа степень гликозилирования CD44 должна быть выше, чем в нокаутных клетках.

Для проверки предположения о том, что CD44 является белком-носителем Tn антигена, были проведены эксперименты по взаимной ко-иммунопреципитации CD44 и антигена АКС3. С этой целью сначала с помощью иммуоаффинных сорбентов на основе А-Белок-агарозы были выделены CD44 и антиген АКС3 (рис. 4, а). Затем полученные белки были окрашены методом WB с помощью антитела против CD44 (рис. 4, б) и антигена АКС3 (рис. 4, в). Эти эксперименты показали, что полоса CD44 и верхняя полоса антигена АКС3 одинаково эффективно проявлялись как антителом против CD44, так и антителом АКС3 (рис. 4, б и в). В противоположность этому нижняя полоса антигена АКС3 в WB проявлялась только антителом АКС3, но не антителом против антигена CD44. В качестве отрицательного контроля в этих экспериментах использовали иммунопреципитацию на антителе против CD9. Полосы, обозначенные на WB символами Н и L, проявлялись как в опытных, так и в контрольных дорожках. Эти полосы появлялись в результате диссоциации легких и тяжелых цепей антител, которые использовались для иммунопреципитации. За исключением цепей Н и L, других полос в дорожке с отрицательным контролем не выявлялось.

Молекулярная масса нижней полосы антигена АКС3 довольно близка к таковой белка

Масс-спектрометрическая идентификация белков, выделенных иммунопреципитацией с помощью антитела АКС3

Полоса (рис. 2, а)	Белок	Ген	ММ, кДа
1	POTE ankyrin domain family member F	<i>POTEF</i>	121,4
1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	<i>ITIH1</i>	101,3
1	CD44 antigen	<i>CD44</i>	81,5
2	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	<i>LRG1</i>	38,1

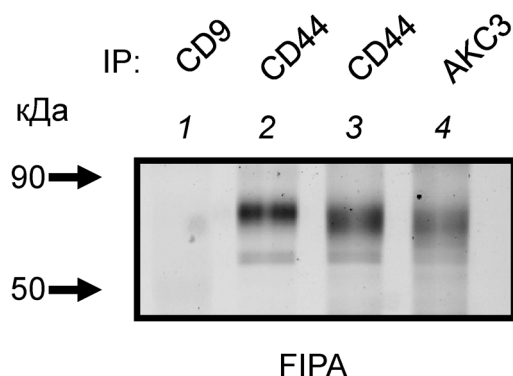


Рис. 3. Сравнение электрофоретической подвижности белка CD44, выделенного из клеток A549 дикого типа и клеток A549, нокаутированных по гену *Cosmc*. Иммунопреципитацию проводили с антителами против CD44, AKC3 или CD9 (отрицательный контроль). В качестве клеточных мишеней использовали клетки A549 дикого типа (дорожка 2) или клетки A549, нокаутированные по гену *Cosmc* (дорожки 1, 3 и 4).

CD99. Известно, что CD99 имеет по меньшей мере один сайт О-гликозилирования, т.е. теоретически может нести Tn-антиген. Для того чтобы проверить возможную связь между CD99 и AKC3 для пары антител CD99 и AKC3, были выполнены эксперименты по ко-иммунопреципитации, аналогично тому, как это было сделано для пары антител CD44 и AKC3 (рис. 5). Однако никакой ко-иммунопреципитации между CD99 и AKC3 обнаружено не было. Кроме того, прямое сравнение электрофоретической подвиж-

ности CD99 и антигена AKC3 показало, что последний обладает заметно более высокой ММ. Очевидно, что нижняя полоса антигена AKC3 никак не связана с белком CD99.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Путем нокаутирования гена *Cosmc* нами были получены 3 пары изогенных линий клеток, которые отличались по экспрессии Tn антигена. Используя изогенные клетки A549, мы получили моноклональное антитело AKC3, которое реагировало с A549-Cosmc-КО клетками и не связывалось с линией A549 wt. При окислении углеводных остатков с помощью периодата натрия связывание антитела AKC3 с клетками отменялось. Таким образом, по своей специфичности AKC3 является анти-Tn антителом. Особенностью нашей работы являлось то, что AKC3 было получено без какого-либо предварительного предположения о белках, в составе которых может присутствовать Tn антиген.

С помощью метода флуоресцентной иммунопреципитации, а также WB мы обнаружили, что AKC3 реагирует с двумя белками с ММ 85 и 34 кДа. Масс-спектрометрический анализ показал, что в полосе 85 кДа обнаруживаются пептиды из белка CD44. Принадлежность антигена AKC3 к белку CD44 была подтверждена при прямом сравнении электрофоретической подвижности этих молекул, а также в эксперимен-

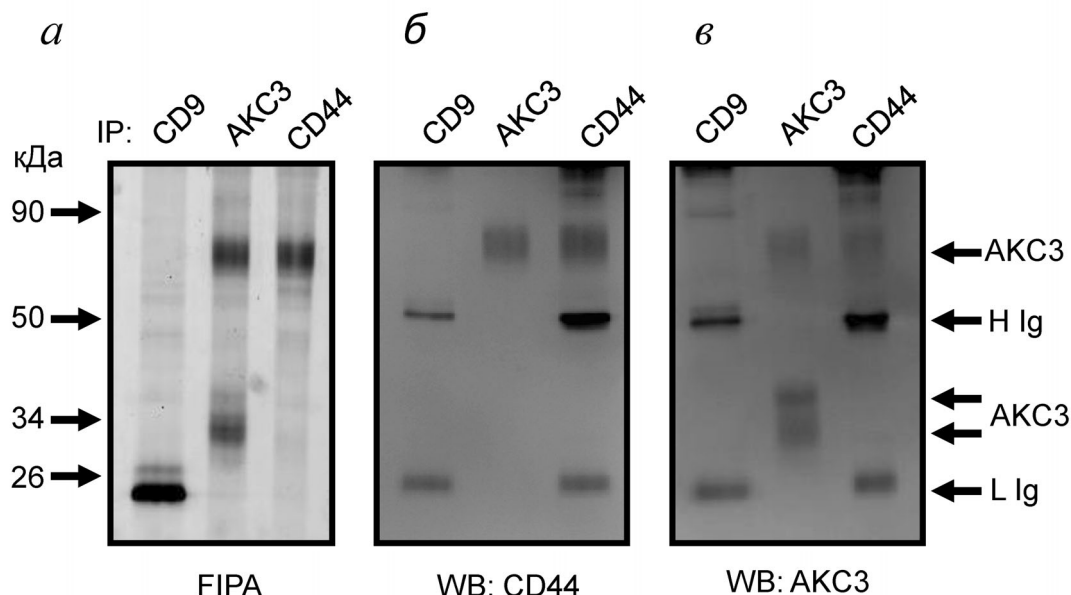


Рис. 4. Ко-иммунопреципитация белка CD44 и антигена AKC3 из лизата клеток A549, нокаутированных по гену *Cosmc*. Иммунопреципитацию проводили на антителах против CD9, CD44 или AKC3. Выделенные белки разделяли в 12%-ном SDS-PAGE и регистрировали флуоресценцию геля (а), далее белки переносили на PVDF-мембрану и проявляли с помощью WB антителами против CD44 (б) или AKC3 (в)

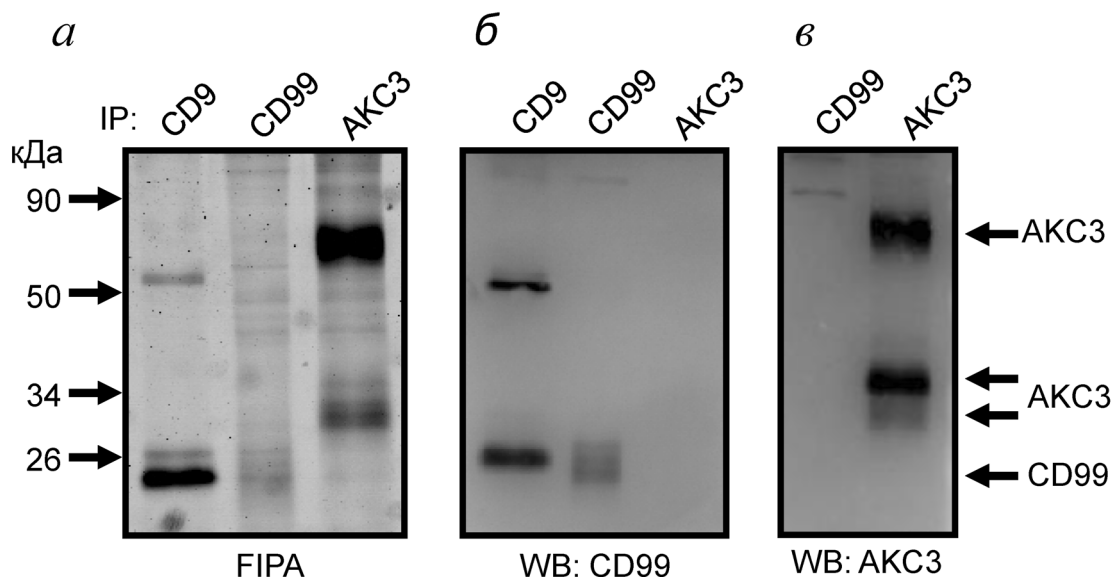


Рис. 5. Ко-иммунопреципитация белка CD99 и антигена AKC3 из лизата клеток A549, нокаутированных по гену *Cosmc*. Иммунопреципитацию проводили на антителах против CD9, CD99 или AKC3. а – Выделенные белки разделяли в 12%-ном SDS-PAGE и регистрировали флуоресценцию геля, далее белки переносили на PVDF-мембрану и проявляли с помощью Вестерн-блоттинга антителами против CD99 (б) или AKC3 (в)

тах по ко-иммунопреципитации. С этим согласуется также отсутствие реактивности антитела AKC3 с субклинами MCF-7 и RPMI 8226, дефицитными по гену *Cosmc*, которые несут Tn антиген, однако не экспрессируют белок CD44.

Стандартная форма человеческого CD44 (CD44s) состоит из 361 аминокислотного остатка и имеет расчетную ММ 39,4 кДа. CD44 является высоко-гликозилированным белком, вследствие чего при электрофорезе он мигрирует в области 85–90 кДа. CD44s имеет 6 потенциальных сайтов N-гликозилирования и 32 сайта O-гликозилирования [14]. Наиболее вероятным является O-гликозилирование 4-х сайтов, расположенных в мотивах Ser-Gly, которые находятся во внеклеточной части CD44s, которая непосредственно прилегает к трансмембранному домену [15]. По другой оценке, CD44s O-гликозилирован по 7 сайтам [16]. Обращает на себя внимание, что CD44, выделенный из нокаутных клеток, имел большую электрофоретическую подвижность, чем CD44 из клеток дикого типа. Это хорошо согласуется с тем, что в нокаутных клетках O-гликозилирование должно быть неполным. Таким образом, по своим характеристикам CD44s удовлетворяет предполагаемым свойствам антигена, распознаваемого AKC3.

CD44 имеет важное функциональное значение. CD44 является рецептором гиалуроновой кислоты, он также связывается с другими компонентами межклеточного матрикса. Как следствие, CD44 участвует в процессах клеточной

адгезии, миграции, а также дифференцировке клеток. Велика роль CD44 в опухолевом росте и метастазировании [17]. На опухолевый рост влияет как общая экспрессия белка CD44 [18], так и присутствие его отдельных гликоформ. В частности, изменения в степени гликозилирования CD44 могут регулировать опухолевый рост [19]. Гликозилирование влияет на связывание с гиалуроновой кислотой и тем самым изменяет адгезионные свойства молекулы CD44 [15]. Было показано, что клетки из первичной меланомы, а также метастазов различаются по степени O-гликозилирования молекулы CD44 [15].

Данные масс-спектрометрии позволяют предположить, что белком-носителем Tn антигена из нижней полосы (рис. 2) может являться богатый лейцином гликопротеин 1 (Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1, LRG1). LRG1 имеет ММ 38 кДа, что довольно близко к массе нижней полосы. Он обладает сайтом O-гликозилирования. По этим критериям LRG1 подходит на роль искомого белка, однако LRG1 экспрессируется преимущественно в нейтрофилах, не имеет мембранной локализации и секретируется в плазму [20]. Таким образом, маловероятно, что антиген AKC3 связан с белком LRG1. Проблематичной выглядит также возможность для антитела AKC3 реагировать с двумя различными белками, хотя этого нельзя исключить полностью. Например, анти-Tn антитело JA5 одновременно реагировало с белками CD45 и CD43 [7]. Высоко O-гликозилированный поверхност-

ный гликопротеин CD99 имеет ММ 32 кДа, что примерно соответствует массе антигена АКСЗ из нижней полосы (рис. 2). Однако прямое сравнение электрофоретической подвижности CD99 и нижней полосы антигена АКСЗ показало, что они являются разными белками. Эксперименты по ко-иммунопреципитации также исключают связь этих белков.

Следует отметить, что в дополнение к стандартной молекуле CD44s существует изоформа CD44 с укороченным цитоплазматическим концом (CD44 short-tail; CD44st). Исходя из аминокислотной последовательности, CD44st имеет расчетную ММ 32 кДа [14]. При минимальном гликозилировании ММ CD44st соответствует нижней полосе антигена АКСЗ. Экспрессия изоформы CD44st наблюдалась в клетках Lovo, K562 и HL-60 [21].

Ранее для поиска опухолеассоциированных белков с aberrантным гликозилированием был предложен подход, который получил название SimpleCells [22]. Пользуясь этой стратегией, было получено антитело против опухолевого биомаркера, который представлял собой Tn антиген в составе белка дисадгерина [23]. При нокаутировании гена *Cosmc* в результате широко масштабного протеомного исследования на клетках рака желудка было идентифицировано 499 O-гликозилированных белков, которые несли более 1000 различных гликосайтов. Интересно, что среди белков с aberrантным гликозилированием был также обнаружен белок CD44 [22].

Поскольку Tn антиген является опухолеассоциированным антигеном, он давно рассматривался как привлекательная мишень при лечении карцином. Антитела против Tn антигена могут использоваться в качестве пассивной вакцины при иммунотерапии рака [24]. На основе антител против Tn антигена идет разработка Т-киллеров с химерным рецептором [25, 26]. Большая часть известных анти-Tn антител распознает этот антиген в составе муцинов. Нами было получено новое анти-Tn антитело, которое реагирует с Tn антигеном в контексте белка CD44. После секвенирования генов Ig гибридомы АКСЗ будет получена хорошая основа для создания Т-клеток с CAR-рецептором для лечения CD44⁺ опухолей, которые не экспрессируют муцины.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-07025 мк).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов. Протокол экспериментов с лабораторными мышами был одобрен Комитетом по этическому отношению к животным при Институте иммунологии. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ju, T., Otto, V. I., and Cummings, R. D. (2011) The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 1770-1791, doi: 10.1002/anie.201002313.
- Ju, T., Lanneau, G. S., Gautam, T., Wang, Y., Xia, B., Stowell, S. R., Willard, M. T., Wang, W., Xia, J. Y., Zuna, R. E., Laszik, Z., Benbrook, D. M., Hanigan, M. H., and Cummings, R. D. (2008) Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in *Cosmc*, *Cancer Res.*, **68**, 1636-1646, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2345.
- Springer, G. F. (1997) Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy, *J. Mol. Med.*, **75**, 594-602, doi: 10.1007/s001090050144.
- Schietinger, A., Philip, M., Yoshida, B. A., Azadi, P., Liu, H., Meredith, S. C., and Schreiber, H. (2006) A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen, *Science*, **314**, 304-308, doi: 10.1126/science.1129200.
- Tarp, M. A., and Clausen, H. (2008) Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development, *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 546-563, doi: 10.1016/j.bbagen.2007.09.010.
- Persson, N., Stühr-Hansen, N., Risinger, C., Mereiter, S., Polónia, A., Polom, K., Kovács, A., Roviello, F., Reis, C. A., Welinder, C., Danielsson, L., Jansson, B., and Blixt, O. (2017) Epitope mapping of a new anti-Tn antibody detecting gastric cancer cells, *Glycobiology*, **27**, 635-645, doi: 10.1093/glycob/cwx033.
- Blixt, O., Lavrova, O. I., Mazurov, D. V., Clo, E., Kracun, S. K., Bovin, N. V., and Filatov, A. V. (2012) Analysis of Tn antigenicity with a panel of new IgM and IgG1 monoclonal antibodies raised against leukemic cells, *Glycobiology*, **22**, 529-542, doi: 10.1093/glycob/cwr178.
- Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., and Filatov, A. (2012) Role of O-glycosylation and expression of CD43 and CD45 on the surfaces of effector T cells in human T cell leukemia virus type 1 cell-to-cell infection, *J. Virol.*, **86**, 2447-2458, doi: 10.1128/JVI.06993-11.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., and Zhang, F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 827-832, doi: 10.1038/nbt.2647.
- Stofa, G., Mondal, N., Zhu, Y., Yu, X., Buffone, A., and Neelamegham, S. (2016) Using CRISPR-Cas9 to quantify the contributions of O-glycans, N-glycans and Glycosphingolipids to human leukocyte-endothelium adhesion, *Sci. Rep.*, **6**, 30392, doi: 10.1038/srep30392.
- Tarasevich, A., Filatov, A., Pichugin, A., and Mazurov, D. (2015) Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells, *Acta Virol.*, **59**, 247-256, doi: 10.4149/av_2015_03_247.

12. Dobrochaeva, K., Khasbiullina, N., Shilova, N., Antipova, N., Obukhova, P., Ovchinnikova, T., Galanina, O., Blixt, O., Kunz, H., Filatov, A., Knirel, Y., LePendu, J., Khaidukov, S., and Bovin, N. (2020) Specificity of human natural antibodies referred to as anti-Tn, *Mol. Immunol.*, **120**, 74-82, doi: 10.1016/j.molimm.2020.02.005.
13. Filatov, A. V., Krotov, G. I., Zgoda, V. G., and Volkov, Y. (2007) Fluorescent immunoprecipitation analysis of cell surface proteins: a methodology compatible with mass-spectrometry, *J. Immunol. Methods*, **319**, 21-33, doi: 10.1016/j.jim.2006.09.014.
14. Azevedo, R., Gaiteiro, C., Peixoto, A., Relvas-Santos, M., Lima, L., Santos, L. L., and Ferreira, J. A. (2018) CD44 glycoprotein in cancer: a molecular conundrum hampering clinical applications, *Clin. Proteom.*, **15**, 22, doi: 10.1186/s12014-018-9198-9.
15. Gasbarri, A., Del Prete, F., Girnita, L., Martegani, M. P., Natali, P. G., and Bartolazzi, A. (2003) CD44s adhesive function spontaneous and PMA-inducible CD44 cleavage are regulated at post-translational level in cells of melanocytic lineage, *Melanoma Res.*, **13**, 325-337, doi: 10.1097/00008390-200308000-00001.
16. Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P. A. (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 33-45, doi: 10.1038/nrm1004.
17. Naor, D., Sionov, R. V., and Ish-Shalom, D. (1997) CD44: structure, function and association with the malignant process, *Adv. Cancer Res.*, **71**, 241-319, doi: 10.1016/S0065-230X(08)60101-3.
18. Hu, B., Ma, Y., Yang, Y., Zhang, L., Han, H., and Chen, J. (2018) CD44 promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer, *Oncol. Lett.*, **15**, 5627-5633, doi: 10.3892/ol.2018.8051.
19. Du, T., Jia, X., Dong X., Ru, X., Li, L., Wang, Y., Liu, J., Feng, G., and Wen, T. (2020) Cosmc disruption-mediated aberrant O-glycosylation suppresses breast cancer cell growth via impairment of CD44, *Cancer Manag. Res.*, **12**, 511-522, doi: 10.2147/CMAR.S234735.
20. O'Donnell, L. C., Druhan, L. J., and Avalos, B. R. (2002) Molecular characterization and expression analysis of leucine-rich alpha2-glycoprotein, a novel marker of granulocytic differentiation, *J. Leukoc. Biol.*, **72**, 478-485.
21. Fang, X. J., Jiang, H., Zhu, Y. Q., Zhang, L. Y., Fan, Q. H., and Tian, Y. (2014) Doxorubicin induces drug resistance and expression of the novel CD44st via NF- κ B in human breast cancer MCF-7 cells, *Oncol. Rep.*, **31**, 2735-2742, doi: 10.3892/or.2014.3131.
22. Campos, D., Freitas, D., Gomes, J., Magalhães, A., Steentoft, C., Gomes, C., Vester-Christensen, M. B., Ferreira, J. A., Afonso, L. P., Santos, L. L., Pinto de Sousa, J., Mandel, U., Clausen, H., Vakhrushev, S. Y., and Reis, C. A. (2015) Probing the O-glycoproteome of gastric cancer cell lines for biomarker discovery, *Mol. Cell. Proteomics*, **14**, 1616-1629, doi: 10.1074/mcp.M114.046862.
23. Steentoft, C., Fuhrmann, M., Battisti, F., Van Coillie, J., Madsen, T. D., Campos, D., Adnan Halim, A., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Schreiber, H., Mandel, U., and Narimatsu, Y. (2019) A strategy for generating cancer-specific monoclonal antibodies to aberrant O-glycoproteins: identification of a novel dysadherin-Tn antibody, *Glycobiology*, **29**, 307-319, doi: 10.1093/glycob/cwz004.
24. Welinder, C., Baldetorp, B., Borrebaeck, C., Fredlund, B.-M., and Jansson, B. (2011) A new murine IgG1 anti-Tn monoclonal antibody with *in vivo* anti-tumor activity, *Glycobiology*, **21**, 1097-1107, doi: 10.1093/glycob/cwr048.
25. Posey, A. D., Schwab, R. D., Boesteanu, A. C., Steentoft, C., Mandel, U., Engels, B., Stone, J. D., Madsen, T. D., Schreiber, K., Haines, K. M., Cogdill, A. P., Chen, T. J., Song, D., Scholler, J., Kranz, D. M., Feldman, M. D., Young, R., Keith, B., Schreiber, H., Clausen, H., Johnson, L. A., and June, C. H. (2016) Engineered CAR T cells targeting the cancer-associated Tn-glycoform of the membrane mucin MUC1 control adenocarcinoma, *Immunity*, **44**, 1444-1454, doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.014.
26. Gorchakov, A. A., Kulemzin, S. V., Kochneva, G. V., and Taranin, A. V. (2020) Challenges and prospects of chimeric antigen receptor T-cell therapy for metastatic prostate cancer, *Eur. Urol.*, **77**, 299-308, doi: 10.1016/j.eururo.2019.08.014.

CD44-ASSOCIATED Tn ANTIGEN AS A NEW BIOMARKER OF TUMOR CELLS WITH ABERRANT GLYCOSYLATION*

M. L. Shuvalova¹, A. T. Kopylov², D. V. Mazurov¹, A. V. Pichugin¹, N. V. Bovin³, and A. V. Filatov^{1,4**}

¹ Institute of Immunology National Research Center, Federal Medical-Biological Agency, 115522 Moscow, Russia; E-mail: avfilat@yandex.ru

² Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia

³ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Immunology Department, 119234 Moscow, Russia

Received June 30, 2020

Revised July 8, 2020

Accepted July 30, 2020

Tn antigen is a tumor-associated antigen that appears on cancer cells as a result of aberrant O-glycosylation. The most studied form of Tn antigen is found in mucins, in particular, in mucin 1 (MUC1). Antibodies against this form of Tn antigen are used to diagnose tumors, as well as to generate T-killers with a chimeric receptor. Some carcinomas do not carry MUC1 and antibodies of a different specificity are required to detect Tn antigen on these cells. In our work, we searched for anti-Tn antibodies without preliminary assumptions about the proteins that may be carriers of the Tn antigen. For this purpose, we obtained several pairs of isogenic cell lines with the wild type and knockout of the *Cosmc* gene, which is essential for correct protein O-glycosylation. Using the created lines as immunogens, we generated a monoclonal antibody AKC3, which reacted with the *Cosmc*-deficient A549 lung adenocarcinoma cells and did not bind to the wild-type cells. Using mass spectrometry, as well as co-immunoprecipitation, it was shown that the AKC3 antibody recognized the Tn antigen in the context of CD44 protein – a protein important for tumor growth. The AKC3 antibody can be used for tumor diagnosis, and to generate T cells with a chimeric receptor for treatment of tumors that do not express mucins.

Keywords: Tn antigen, O-glycosylation, neoantigens, CD44, human lung adenocarcinoma