

Распознавание мутантных форм натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках рака яичника

Л.Ф. Булатова¹, В.С. Скрипова¹, А.В. Коротаева¹,
М.В. Богданов^{1,2}, Р.Г. Киямова^{1*}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;

²Научный центр здоровья при Техасском университете, г. Хьюстон, США

Реферат

Актуальность. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b экспрессируется в ряде опухолей и служит мишенью для терапии моноклональными антителами. В составе транспортера NaPi2b имеется большой внеклеточный домен, где располагаются 4 цистеина и эпитоп MX35, распознаваемый соответствующими моноклональными антителами.

Цель. Изучение распознавания эпитопа MX35 в мутантных по цистеинам формах С303 и С350 натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках рака яичника.

Материал и методы исследования. Клетки рака яичника линии OVCAR-8 были трансфицированы плазмидами, кодирующими мутантные формы транспортера NaPi2b. Распознавание этих форм моноклональными антителами изучали методами вестерн-блота и проточной цитофлуориметрии. Статистическую обработку данных проточной цитометрии проводили с применением χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса.

Результаты. Вестерн-блот анализ лизатов клеток OVCAR-8, экспрессирующих транспортер NaPi2b дикого типа, продемонстрировал наличие специфического сигнала только в образцах без добавления дитиотреитола, тогда как во всех образцах с цистеиновыми мутантами NaPi2b, даже без добавления дитиотреитола, специфического сигнала от моноклональных антител выявлено не было. Результаты проточной цитометрии показали, что доля клеток OVCAR-8 с позитивным окрашиванием эпитопа MX35 антителами меньше при экспрессии мутантных форм NaPi2b по сравнению с диким типом.

Вывод. Цистеины С303 и С350 участвуют в образовании дисульфидной связи, имеющей ключевое значение для формирования конформации большого внеклеточного домена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b, которая обеспечивает распознавание эпитопа MX35 моноклональными антителами.

Ключевые слова: NaPi2b, рак яичника, эпитоп MX35, вестерн-блот анализ, сайт-направленный мутагенез.

Для цитирования: Булатова Л.Ф., Скрипова В.С., Коротаева А.В., Богданов М.В., Киямова Р.Г. Распознавание мутантных форм натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках рака яичника. *Казанский мед. ж.* 2022;103(4):608–616. DOI: 10.17816/KMJ2022-608.

ORIGINAL STUDY | DOI: 10.17816/KMJ2022-608

Recognition of mutant forms of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian cancer cells

L.F. Bulatova¹, V.S. Skripova¹, A.V. Korotaeva¹, M.V. Bogdanov^{1,2}, R.G. Kiyamova^{1*}

¹Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia;

²The University of Texas Health Science Center, Houston, USA

Abstract

Background. The sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b is expressed in a number of tumors and serves as a target for monoclonal antibody therapy. The NaPi2b transporter has a large extracellular domain containing

*Для переписки: kiyamova@mail.ru

Поступила 23.03.2022; принята в печать 19.04.2022;

опубликована: 10.08.2022.

© Эко-Вектор, 2022. Все права защищены.

*For correspondence: kiyamova@mail.ru

Submitted 23.03.2022; accepted 19.04.2022;

published: 10.08.2022.

© Eco-Vector, 2022. All rights reserved.

4 cysteines and an MX35 epitope recognized by the corresponding monoclonal antibodies.

Aim. To study the recognition of the MX35 epitope in cysteine mutants C303 and C350 of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian cancer cells.

Material and methods. Ovarian cancer cells of the OVCAR-8 line were transfected with plasmids encoding mutant forms of the NaPi2b transporter. The recognition of these forms by monoclonal antibodies was studied by Western blot and flow cytometry. Statistical analysis of flow cytometry data was performed using Pearson's Chi-squared test with Yates' correction.

Results. Western blot analysis of lysates of OVCAR-8 cells expressing the wild-type NaPi2b transporter demonstrated the presence of a specific signal only in samples without the addition of dithiothreitol, while in all samples with NaPi2b cysteine mutants, even without the addition of dithiothreitol, no specific signal from monoclonal antibodies was detected. The flow cytometry results showed that proportion of OVCAR-8 cells with positive staining of the MX35 epitope with antibodies is less when expressing the NaPi2b mutants compared to the wild type.

Conclusion. Cysteines C303 and C350 are involved in disulfide bonds formation, which is of key importance for the formation of the conformation of the extracellular domain of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b, which ensures the MX35 epitope recognition by monoclonal antibodies.

Keywords: NaPi2b, ovarian cancer, MX35 epitope, western-blot analysis, flow cytometry, site-directed mutagenesis.

For citation: Bulatova LF, Skripova VS, Korotaeva AV, Bogdanov MV, Kiyamova RG. Recognition of mutant forms of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian cancer cells. *Kazan Medical Journal*. 2022;103(4):608–616. DOI: 10.17816/KMJ2022-608.

Актуальность

Натрий-зависимый фосфатный транспортёр NaPi2b (*SLC34A2*, NaPi-IIb, Npt2) принадлежит к семейству транспортёров SLC34¹ и принимает участие в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека путём переноса неорганического фосфата внутрь клетки [1]. В организме человека фосфатный транспортёр NaPi2b экспрессируется в тонкой кишке, лёгких, щитовидной, слюнной и молочной железах, семенниках, печени, костях и зубах. Повышенная экспрессия фосфатного транспортёра NaPi2b обнаружена в клетках карциномы яичника [2–4], лёгкого [5, 6], колоректального рака [7], рака щитовидной железы [8] и других видов злокачественных новообразований, что делает его привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии.

Транспортёр NaPi2b — интегральный мембранный белок с несколькими трансмембранными доменами, большим внеклеточным доменом (ВКД) с предполагаемыми границами 188–361 а.о., а также С- и N-концевыми доменами, предположительно расположенными в цитоплазме [9]. В состав ВКД транспортёра NaPi2b входят четыре аминокислотных остатка цистеина — C303, C322, C328 и C350, а также несколько потенциальных сайтов N- и O-гликозилирования, роль которых до конца не изучена [9].

Натрий-зависимый фосфатный транспортёр NaPi2b был идентифицирован в качестве ми-

шени для моноклональных антител MX35 [9, 10], на основе которых были созданы и в настоящее время проходят клинические испытания гуманизированные антитела ХМТ-1536 (NCT03319629) и ХМТ-1592 (NCT04396340) для лечения рака яичника и лёгкого. Эпитоп, который распознают моноклональные антитела MX35 (эпитоп MX35), был идентифицирован в районе ВКД транспортёра NaPi2b в пределах 324–338 а.о. [9].

Интересная особенность распознавания эпитопа MX35 антителами MX35 [11] и антителами L2(20/3) [10], которые распознают один и тот же участок ВКД (324–338 а.о.), — чувствительность к восстанавливающим агентам типа дитиотреитола (ДТТ) исключительно в клетках эукариот [10, 12]. Одним из объяснений наблюдаемого феномена может служить вероятное образование дисульфидных связей между четырьмя остатками цистеина, находящимися в составе ВКД транспортёра NaPi2b в положениях 303, 322, 328 и 350, что обеспечивает поддержание конформации ВКД и эпитопа MX35, необходимых для распознавания антителами MX35 и L2(20/3). В работе Yin и соавт. показано, что наиболее вероятно образование дисульфидной связи между остатками цистеинов в положениях 303 и 350 [9].

Цель

Учитывая тот факт, что NaPi2b — привлекательный объект для противоопухолевой терапии и мишень для ряда терапевтических антител, целью нашего исследования стало

¹SLC34 — семейство переносчиков растворённых веществ 34.

изучение особенностей распознавания эпитопа MX35 моноклональными антителами L2(20/3) в мутантных формах транспортёра NaPi2b и получение поликлональных антител, направленных против экстрамембранных доменов NaPi2b.

Материал и методы исследования

Получение поликлональных антител. Для получения поликлональных антител мышей линии BALB/c 8-недельного возраста иммунизировали 4 раза инъекциями антигена в брюшную полость. Работа с животными одобрена локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» в соответствии с протоколом №34 от 27.01.2022. В качестве антигена использовали очищенный рекомбинантный N-концевой фрагмент NaPi2b (1–100 а.о.) и очищенный рекомбинантный фрагмент ВКД NaPi2b (291–361 а.о.).

Гены, кодирующие фрагменты NaPi2b, были клонированы в вектор pET28b. Экспрессию рекомбинантных фрагментов NaPi2b проводили в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) и очищали методом металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы.

Первую иммунизацию делали с использованием 20 мкг высокоочищенного рекомбинантного антигена в 300 мкл 50% раствора полного адьюванта Фрейнда в фосфатно-солевом буфере. Для второй и третьей иммунизации брали по 20 мкг антигена в 300 мкл 50% раствора неполного адьюванта Фрейнда в фосфатно-солевом буфере и проводили иммунизацию с интервалом 2 нед. Последнюю усиливающую иммунизацию мышей «booster» проводили 20 мкг антигена в 300 мкл фосфатно-солевого буфера без адьюванта.

Титр специфических антител в сыворотке крови иммунизированных мышей определяли с помощью иммуноферментного анализа. Спленоциты, выделенные из иммунизированных мышей, были заморожены для получения в дальнейшем гибридомы для производства моноклональных антител.

Клеточные линии и антитела. Для работы использовали клеточные линии рака яичника человека: OVCAR-8² (ATCC, США), в которой отсутствует эндогенная экспрессия транспортёра NaPi2b [12], и OVCAR-4³ (ATCC, США), эндогенно экспрессирующую транспортёр NaPi2b дикого типа [12] в качестве положительного контро-

ля. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (Панэко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 4 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Для распознавания мутантных форм фосфатного транспортёра NaPi2b в вестерн-блот анализе и проточной цитометрии использовали первичные мышинные моноклональные антитела L2(20/3) [13], распознающие эпитоп MX35 в составе ВКД транспортёра NaPi2b, и антитела N-NaPi2b (15/1), направленные против N-концевого домена NaPi2b [14]. Для контроля загрузки белка при проведении вестерн-блот анализа использовали первичные моноклональные мышинные антитела против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH; HyTest, Россия). В качестве вторичных антител использовали моноклональные антитела козы против Fc-фрагментов мышинных антител, конъюгированные с пероксидазой хрена или с флюоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США).

Сайт-направленный мутагенез. Для получения рекомбинантных плазмид, кодирующих гены мутантных форм транспортёра NaPi2b с заменой остатков цистеина на остатки аланина в положениях 303 и 350, проводили сайт-направленный мутагенез с использованием набора реактивов Quick Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, США) в соответствии с методическими рекомендациями производителя. В качестве матрицы для создания мутантных конструкторов использовали рекомбинантную плазмиду pcDNA3.1(+)/NaPi2b, кодирующую ген дикого типа фосфатного транспортёра NaPi2b (*SLC34A2*, NM_006424.2). Целевые мутации в полученных плазмидах были подтверждены с помощью секвенирования по методу Сэнгера.

Трансфекция. Транзientную трансфекцию клеток OVCAR-8 проводили плазмидой pcDNA 3.1+/NaPi2b_C303A и pcDNA 3.1+/NaPi2b_C350A с помощью трансфицирующего агента JetPRIME (Polyplus, США) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве положительного контроля клетки OVCAR-8 трансфицировали плазмидой pcDNA 3.1+/NaPi2b_Дикий тип.

Вестерн-блот анализ. Для проведения вестерн-блот анализа из клеток OVCAR-8, эктопически экспрессирующих рекомбинантные мутантные формы транспортёра NaPi2b в результате транзientной трансфекции, получали лизаты и выделяли белковые фракции для приготовления образцов. Для оценки вклада

² OVCAR-8 — клеточная линия рака яичника 8.

³ OVCAR-4 — клеточная линия рака яичника 4.

дисульфидных связей в распознавание эпитопа MX35 моноклональными антителами L2(20/3) при приготовлении образцов использовали два варианта загрузочного буфера: с ДТТ и без него. Для оценки общего уровня экспрессии NaPi2b в образцах использовали антитела N-NaPi2b (15/1) против N-концевого домена NaPi2b, распознавание которого не зависит от добавления ДТТ. В качестве положительного контроля использовали образцы, полученные из клеточной линии OVCAR-4, эндогенно экспрессирующей дикий тип транспортера NaPi2b.

Вертикальный электрофорез белков проводили в 10% полиакриламидном геле с использованием камеры MINI-Protean TETRA (BIO-RAD, США). Блоттинг белков с геля на PVDF мембрану осуществляли с помощью мокрого переноса с использованием трансфер-буфера (трис основной 0,25 М, глицин 1,92 М, метанол 20%, pH 8,3).

Блокировку мембраны проводили в 5% растворе бычьего сывороточного альбумина в буфере ТБС (трис основной 0,05 М, NaCl 0,149 М, Твин-20 0,05%). После блокировки мембрану инкубировали последовательно с первичными и вторичными антителами с промежуточными отмывками. Детекцию сигнала на мембране проводили с помощью хемилюминесцентного детектора ChemiDoc (BIO-RAD, США).

Проточная цитометрия. Клетки OVCAR-8, прикрепленные к культуральной посуде и эктопически экспрессирующие рекомбинантные мутантные формы или дикий тип транспортера NaPi2b в результате транзientной трансфекции, преинкубировали с мышиными моноклональными антителами L2(20/3) в течение 1 ч. Дальнейшую подготовку образцов проводили по стандартному протоколу для проточной цитометрии живых клеток (BestProtocols: Cell Preparation for Flow Cytometry Protocols, Thermo Fisher).

Для контроля эффективности трансфекции и уровня экспрессии транспортера NaPi2b в клетках OVCAR-8 проводили детекцию его N-концевого домена антителами N-NaPi2b (15/1) в образцах, фиксированных 2% раствором формальдегида и пермеабелизованных 0,1% раствором тритона X-100.

В качестве вторичных антител использовали антитела козы против мышиных иммуноглобулинов, меченные Alexa Fluor 488. Для контроля целостности плазматической мембраны применяли краситель йодистый пропиций, который не способен проникать в живые клетки с неповрежденной мембраной.

Регистрацию флуоресцентного сигнала проводили на проточном цитофлуориметре

BD FACS Aria III (BD Biosciences, США). Для каждого образца анализировали не менее 10 000 единичных событий. Количество клеток, которые распознаются моноклональными антителами с учетом эффективности трансфекции (X), рассчитывали по формуле:

$$X = \text{ВКД}_{\text{пол}} \times 100\% / \text{ВКД}_{\text{общ}},$$

где X — количество клеток, которые распознаются моноклональными антителами с учетом эффективности трансфекции; $\text{ВКД}_{\text{пол}}$ — количество живых трансфицированных клеток OVCAR-8, положительных по окраске антителами L2(20/3); $\text{ВКД}_{\text{общ}}$ — общее количество проанализированных живых трансфицированных клеток OVCAR-8 в образце, окрашенном антителами L2(20/3), с учетом эффективности трансфекции.

Эффективность трансфекции оценивали по доле клеток OVCAR-8, положительных по окраске антителами N-NaPi2b (15/1), в фиксированных и пермеабелизованных образцах после транзientной трансфекции.

Статистическую обработку данных проточной цитометрии проводили с применением χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса с учетом эффективности трансфекции.

Результаты

Создание и вестерн-блот анализ мутантных форм натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с заменой остатков цистеина в положениях 303 и 350 на остатки аланина. Нами были получены генетические конструкторы, кодирующие мутантные варианты транспортера NaPi2b с заменами остатков цистеина на остатки аланина в положениях 303 (NaPi2b_C303A) и 350 (NaPi2b_C350A). Замены кодонов цистеина на кодоны аланина в полученных генетических конструкторах были подтверждены с помощью секвенирования по Сэнгеру. Последовательности праймеров, которые были использованы для сайт-направленного мутагенеза, представлены в табл. 1.

Для изучения влияния остатков цистеина C303 и C350 ВКД транспортера NaPi2b на распознавание эпитопа MX35 антителами L2(20/3) в вестерн-блот анализе рекомбинантные мутантные формы транспортера NaPi2b эктопически экспрессировали в клеточной линии рака яичника человека OVCAR-8 с помощью транзientной трансфекции. В качестве контролей использовали образцы, полученные из клеточной линии рака яичника OVCAR-4, эндогенно экспрессирующей транспортер NaPi2b дикого типа, а также нетрансфицированных клеток линии OVCAR-8.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для получения конструкторов, кодирующих мутантные формы натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b

Название мутантной формы NaPi2b	Название плазмиды	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'→3')
NaPi2b_C303A	pcDNA3.1(+)/NaPi2b-C303A	Праймер прямой: <i>caagagtcttgcagatttgggccaacacacacagacc</i>
		Праймер обратный: <i>ggctctgttggtaaaagtttggccaacacacacagactcttg</i>
NaPi2b_C350A	pcDNA3.1(+)/NaPi2b-C350A	Праймер прямой: <i>cctacaaggagaaacatcgccaagccagcatalctttgt</i>
		Праймер обратный: <i>acaaagatatgctgggctttggcgatgttctctttagg</i>

Примечание. В последовательностях праймеров триплеты с целевыми мутациями выделены полужирным шрифтом.

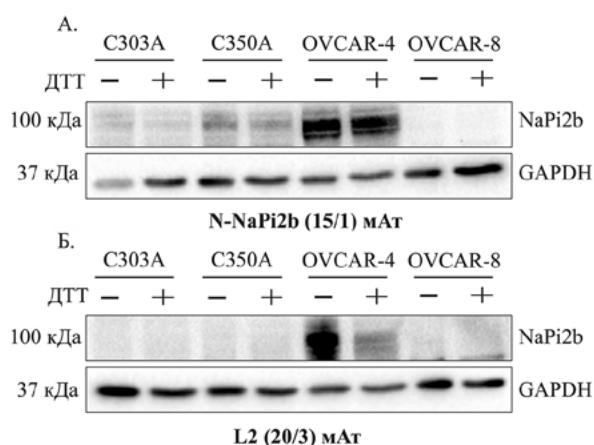


Рис. 1. Вестерн-блот анализ мутантных форм натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с заменами цистеинов на аланин в положениях 303 и 350 в клетках рака яичника OVCAR-8. А. Анализ с моноклональными антителами N-NaPi2b (15/1); Б. Анализ с моноклональными антителами L2(20/3); ДТТ — дитиотреитол; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

Результаты вестерн-блот анализа антителами N-NaPi2b (15/1) подтвердили наличие эктопической экспрессии всех рекомбинантных форм NaPi2b в клетках OVCAR-8 после транзientной трансфекции (рис. 1, А). Молекулярная масса всех рекомбинантных мутантных форм NaPi2b соответствовала гликозилированной форме дикого типа транспортера NaPi2b (около 100 кДа). Следует отметить, что эктопическая экспрессия мутантных форм NaPi2b, детектируемая антителами N-NaPi2b (15/1), была невысокой, что свидетельствует о низкой эффективности трансфекции либо возможной нестабильности/деградации мутантных по цистеинам С303 и С350 форм транспортера NaPi2b в клетках.

При проведении вестерн-блот анализа антителами L2(20/3), распознающими эпитоп МХ35 транспортера NaPi2b, специфический сигнал наблюдали только для образцов, полученных из клеток OVCAR-4, экспрессирующих дикий тип транспортера NaPi2b, не обработанных ДТТ (рис. 1, Б). На рис. 1, Б ясно видно, что за-

мена каждого из исследуемых остатков цистеина в мутантных формах NaPi2b приводила к отсутствию специфичного сигнала от антител L2(20/3) как при обработке образцов ДТТ, так и, что самое важное, без обработки ДТТ. То есть замены остатков цистеина С303 и С350 имитируют восстановление дисульфидных связей, образуемых между ними, результатом чего становится исчезновение сигнала в вестерн-блот анализе антителами L2(20/3) даже без добавления ДТТ.

Полученные данные позволяют сделать заключение об участии остатков цистеина С303 и С350 в образовании дисульфидной связи, имеющей ключевое значение для формирования конформации ВКД фосфатного транспортера NaPi2b, которая влияет на распознавание эпитопа МХ35 транспортера NaPi2b моноклональными антителами L2(20/3).

Получение и проверка поликлональных антител против ВКД и N-концевого домена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b. Поскольку транспортер NaPi2b представляет собой привлекательную мишень для противоопухолевой терапии, важной задачей является получение антител против других эпитопов экстрамембранных доменов транспортера NaPi2b. В связи с этим было решено получить и проверить поликлональные антитела против ВКД и N-концевого домена транспортера NaPi2b.

Для получения поликлональных антител использовали рекомбинантные очищенные фрагменты N-концевого домена NaPi2b (1–100 а.о.) и ВКД NaPi2b (311–340 а.о.). В результате нами были получены поликлональные антитела pL-NaPi2b, направленные против ВКД NaPi2b, и поликлональные антитела pN-NaPi2b, направленные против N-концевого домена NaPi2b. Согласно результатам иммуноферментного анализа титр выделенных поликлональных антител составил не менее 1:10 000–1:100 000.

Полученные поликлональные антитела были проверены в вестерн-блот анализе

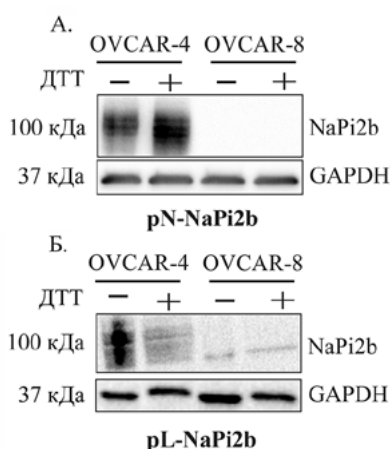


Рис. 2. Вестерн-блот анализ лизатов клеток рака яичника OVCAR-4 и OVCAR-8. А. Анализ с поликлональными антителами pN-NaPi2b. Б. Анализ с поликлональными антителами pL-NaPi2b; ДТТ — дитиотреитол; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

на клетках рака яичника, экспрессирующих транспортёр NaPi2b (OVCAR-4) и не экспрессирующих транспортёр NaPi2b (OVCAR-8), с добавлением восстанавливающего агента ДТТ и без него (рис. 2). Сигнал от поликлональных антител pN-NaPi2b и pL-NaPi2b, соответствующий транспортёру NaPi2b дикого типа, был зарегистрирован только в образцах клеток OVCAR-4 и отсутствовал в образцах клеток OVCAR-8 (см. рис. 2, А, Б). При этом при обработке образцов ДТТ специфический сигнал от антител pL-NaPi2b исчезает, но сохраняется при анализе с антителами pN-NaPi2b.

Анализ распознавания эпитопа MX35 в цистеиновых мутантных формах натрий-зависимого фосфатного транспортёра NaPi2b моноклональными антителами L2(20/3) с помощью проточной цитометрии. Изучение влияния остатков цистеина в положениях 303 и 350 в области ВКД фосфатного транспортёра NaPi2b на распознавание эпитопа MX35 антителами L2(20/3) методом проточной цитометрии осуществляли на живых клетках OVCAR-8, эктопически экспрессирующих рекомбинантные мутантные формы или дикий тип транспортёра NaPi2b в результате транзientной трансфекции. Эффективность трансфекции оценивали по количеству клеток OVCAR-8, имеющих позитивное окрашивание N-концевого домена NaPi2b в фиксированных и пермеабелизованных образцах после транзientной трансфекции.

Доступность эпитопа MX35 транспортёра NaPi2b для антител L2(20/3) при замене остатков цистеина С303 и С350 на остатки аланина оценивали по изменению доли положительно окрашенных антителами L2(20/3) живых клеток OVCAR-8, экспрессирующих мутант-

ные формы NaPi2b, по сравнению с клетками OVCAR-8, экспрессирующими дикий тип NaPi2b, с учётом эффективности трансфекции.

Согласно результатам проточной цитометрии (рис. 3, А–Г) доля живых клеток OVCAR-8, экспрессирующих транспортёр NaPi2b дикого типа и позитивно окрашенных антителами L2(20/3), составляла 56% (рис. 3, Д). В то время как доля живых клеток OVCAR-8, экспрессирующих мутантную форму NaPi2b_C303A и позитивно окрашенных антителами L2(20/3), составила 23% (см. рис. 3, Д). При этом эффективность трансфекции клеток OVCAR-8 конструктом, кодирующим дикий тип NaPi2b, составила 53,8% (см. рис. 3, В), а эффективность трансфекции клеток OVCAR-8, то есть доля клеток, экспрессирующих мутантную форму NaPi2b_C303A, составила 47,9% (см. рис. 3, Г).

В эксперименте с мутантной формой NaPi2b_C350A доля клеток OVCAR-8, экспрессирующих транспортёр дикого типа, составила 85,1% (рис. 4, В), а мутантную форму NaPi2b_C350A — 89,0% (рис. 4, Г). При этом с учётом эффективности трансфекции доля живых клеток OVCAR-8, экспрессирующих транспортёр NaPi2b дикого типа и позитивно окрашенных антителами L2(20/3), составляла 39 и 25% для мутантной формы транспортёра NaPi2b_C350A (рис. 4, Д).

Таким образом, показано, что замена каждого из остатков цистеина в положениях 303 и 350 на остатки аланина приводит к уменьшению распознавания эпитопа MX35 моноклональными антителами L2(20/3) в цистеиновых мутантных формах NaPi2b_C303A и NaPi2b_C350A по сравнению с диким типом транспортёра NaPi2b (см. рис. 3 и 4).

Обсуждение

Изучение особенностей распознавания мембранных белков моноклональными антителами в опухолевых клетках — актуальная задача как для современной трансляционной медицины, так и для фундаментальной науки. Натрий-зависимый фосфатный транспортёр NaPi2b является одной из перспективных мишеней для противоопухолевой терапии, поскольку в составе его ВКД содержится эпитоп MX35 [9], который служит мишенью для ряда терапевтических антител, проходящих клинические испытания для лечения опухолевых заболеваний. Среди них гуманизированные антитела ХМТ-1536 (NCT03319629) и ХМТ-1592 (NCT04396340), разработанные на основе антител MX35, для лечения рака яичника и рака лёгкого.

Поскольку распознавание эпитопа MX35 антителами MX35 и L2(20/3) зависит от обработки

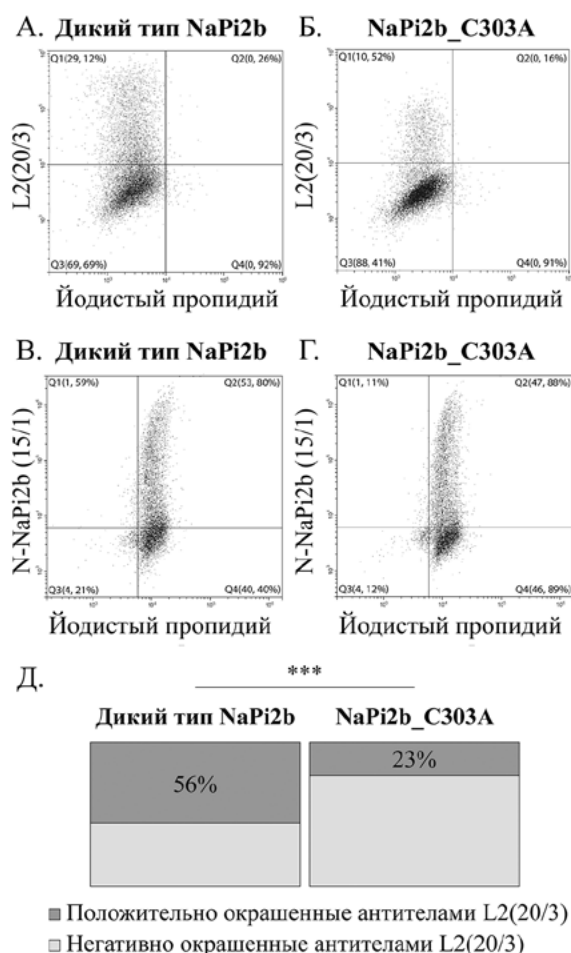


Рис. 3. Анализ мутантных форм натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с помощью проточной цитометрии. А–Г. Точечные диаграммы результатов проточной цитометрии клеток рака яичника OVCAR-8, эктопически экспрессирующих NaPi2b дикого типа (А, В) и его мутантную форму (Б, Г) с заменой остатка цистеина С303 на остаток аланина (NaPi2b_C303A). А и Б. Анализ с моноклональными антителами L2(20/3). В и Г. Анализ с моноклональными антителами N-NaPi2b (15/1). Д. Мозаичный плот сравнения распознавания эпитопа MX35 NaPi2b дикого типа и его мутантной формы NaPi2b_C303A антителами L2(20/3). Статистический анализ выполнен с помощью критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса; *** $p < 0,001$

восстанавливающими агентами, мы предположили, что доступность эпитопа MX35 для антител обеспечивается конформацией ВКД транспортера NaPi2b, поддерживаемой дисульфидными связями между остатками цистеина С303 и С350, входящими в состав ВКД NaPi2b. Мы показали, что замена остатков цистеина на остатки аланина как в положении 303, так и в положении 350 приводит к исчезновению распознавания эпитопа MX35 моноклональными антителами L2(20/3) в условиях вестерн-блот анализа даже без добавления ДТТ, напоминая эффект обработки ДТТ образцов, получен-

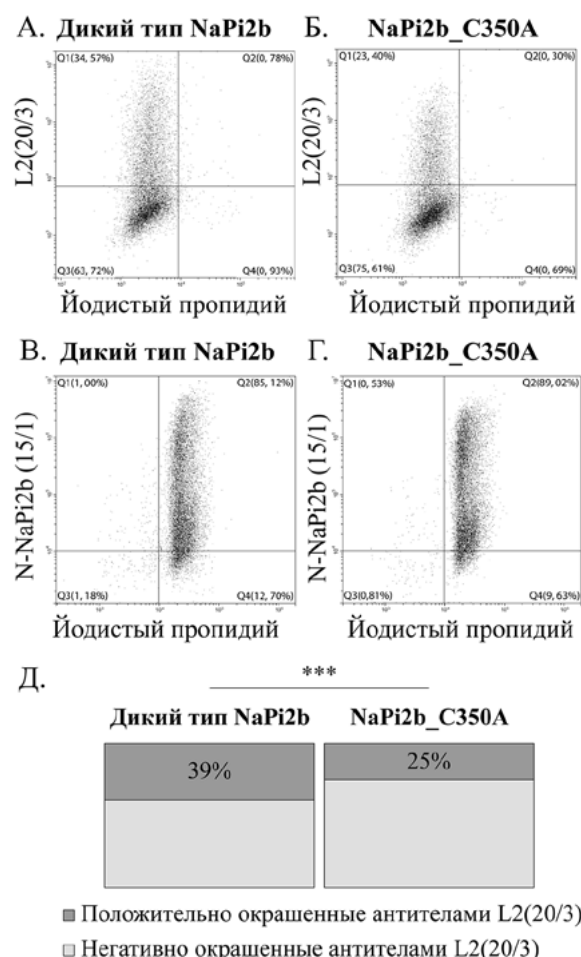


Рис. 4. Анализ мутантных форм натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с помощью проточной цитометрии. А–Г. Точечные диаграммы результатов проточной цитометрии клеток рака яичника OVCAR-8, эктопически экспрессирующих NaPi2b дикого типа (А, В) и его мутантную форму (Б, Г) с заменой остатка цистеина С350 на остаток аланина (NaPi2b_C350A). А и Б. Анализ с моноклональными антителами L2(20/3). В и Г. Анализ с моноклональными антителами N-NaPi2b (15/1). Д. Мозаичный плот сравнения распознавания эпитопа MX35 NaPi2b дикого типа и его мутантной формы NaPi2b_C350A антителами L2(20/3). Статистический анализ выполнен с помощью критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса; *** $p < 0,001$

ных из клеток, экспрессирующих эндогенный транспортер дикого типа (см. рис. 1).

При проведении проточной цитометрии интактных клеток рака яичника OVCAR-8, эктопически экспрессирующих транспортер NaPi2b дикого типа и его мутантные формы, антитела L2(20/3) распознают эпитоп MX35 в мутантных формах NaPi2b в меньшем количестве клеток по сравнению с диким типом транспортера NaPi2b (см. рис. 3 и 4).

Полученные данные позволяют предположить, что между остатками цистеина в положениях 303 и 350 формируется дисульфидная

связь, отвечающая за конформацию ВКД транспортёра NaPi2b, обеспечивающую доступность эпитопа MX35 для моноклональных антител. Полученные данные дают возможность сделать предположение, что когда дисульфидная связь 303–350 нарушается, конформация ВКД транспортёра NaPi2b в клетках рака яичника меняется таким образом, что эпитоп MX35 становится полностью недоступен для антител L2(20/3) в условиях вестерн-блот анализа и частично недоступен в условиях цитометрии.

Нами были получены поликлональные антитела pL-NaPi2b и pN-NaPi2b, направленные против ВКД транспортёра NaPi2b и его N-концевого домена соответственно. Было показано, что при проведении вестерн-блот анализа образцов, полученных из клеток OVCAR-4, поликлональные антитела pL-NaPi2b оказались чувствительны к добавлению ДТТ, в то время как поликлональные антитела pN-NaPi2b не показали такой явной зависимости от добавления ДТТ к исследуемым образцам. Полученные данные свидетельствуют о том, что поликлональные антитела pL-NaPi2b, вероятно, распознают тот же эпитоп MX35, чувствительный к ДТТ, что и антитела L2(20/3), что свидетельствует о его сильной иммуногенности.

Таким образом, несмотря на то обстоятельство, что остатки цистеина С303 и С350 не входят в состав предполагаемого эпитопа MX35 (324–338 а.о.), они критичны для обеспечения конформации ВКД натрий-зависимого фосфатного транспортёра NaPi2b, которая влияет на распознавание эпитопа MX35 моноклональными антителами.

Полученные нами результаты как представляют интерес для фундаментальной науки, так и имеют большую практическую значимость для понимания процесса узнавания терапевтическими антителами мембранного транспортёра NaPi2b в опухолевых клетках.

Выводы

1. Замена остатков цистеина в положениях 303 и 350 во внеклеточном домене натрий-зависимого фосфатного транспортёра NaPi2b приводит к исчезновению распознавания эпитопа MX35 в цистеиновых мутантных формах NaPi2b в вестерн-блот анализе и уменьшению распознавания этих мутантных форм в проточной цитометрии моноклональными антителами L2(20/3).

2. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что остатки цистеина в положениях 303 и 350 участвуют в образовании дисульфидной связи, которая обеспечивает конформацию внеклеточного домена, влияющую

на распознавание эпитопа MX35 натрий-зависимого фосфатного транспортёра NaPi2b моноклональными антителами L2(20/3).

Участие авторов. Л.Ф.Б., В.С.С., М.В.Б. и Р.Г.К. — концепция и дизайн исследования; Л.Ф.Б. и А.В.К. — экспериментальное исследование; Л.Ф.Б., В.С.С. и Р.Г.К. — анализ и интерпретация данных, написание статьи; Р.Г.К. — руководство работой. **Источник финансирования.** Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030). Анализ распознавания эпитопа MX35 с помощью проточной цитометрии и вестерн-блота выполнен за счёт средств гранта Российского научного фонда (РНФ) №20-14-00166.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Levi M, Gratton E, Forster IC, Hernando N, Wagner CA, Biber J, Sorribas V, Murer H. Mechanisms of phosphate transport. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(8):482–500. DOI: 10.1038/s41581-019-0159-y.
2. Rangel LBA, Sherman-Baust CA, Wernyj RP, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene.* 2003; 22(46):7225–7232. DOI: 10.1038/sj.onc.1207008.
3. Gryshkova V, Goncharuk I, Gurtovyy V, Khozhayenko Y, Nespryadko S, Vorobjova L, Usenko V, Gout I, Filonenko V, Kiyamova R. The study of phosphate transporter NAPI2B expression in different histological types of epithelial ovarian cancer. *Exp Oncol.* 2009;31(1):37–42.
4. Shyian M, Gryshkova V, Kostianets O, Gorshkov V, Gogolev Y, Goncharuk I, Nespryadko S, Vorobjova L, Filonenko V, Kiyamova R. Quantitative analysis of SLC34A2 expression in different types of ovarian tumors. *Exp Oncol.* 2011;33(2):94–98.
5. Kopantzev EP, Monastyrskaia GS, Vinogradova TV, Zinov'yeva MV, Kostina MB, Filyukova OB, Tonevitsky AG, Sukhikh GT, Sverdlov ED. Differences in gene expression levels between early and later stages of human lung development are opposite to those between normal lung tissue and non-small lung cell carcinoma. *Lung Cancer.* 2008;62(1):23–34. DOI: 10.1016/j.lungcan.2008.02.011.
6. Zhang Z, Ye S, Zhang M, Wu J, Yan H, Li X, He J. High expression of SLC34A2 is a favorable prognostic marker in lung adenocarcinoma patients. *Tumor Biol.* 2017;39(7):1010428317720212. DOI: 10.1177/1010428317720212.
7. Liu L, Yang Y, Zhou X, Yan X, Wu Z. Solute carrier family 34 member 2 overexpression contributes to tumor growth and poor patient survival in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2018;99:645–654. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.124.
8. Kim HS, Kim DH, Kim JY, Jeoung NH, Lee IK, Bong JG, Jung ED. Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean. *Korean J Intern Medicine.* 2010;25(4):399–407. DOI: 10.3904/kjim.2010.25.4.399.
9. Yin BWT, Kiyamova R, Chua R, Caballero OL,

Gout I, Gryshkova V, Bhaskaran N, Souchelnytskyi S, Hellman U, Filonenko V, Jungbluth AA, Odunsi K, Lloyd KO, Old LJ, Ritter G. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer Immun.* 2008;8:3.

10. Kiyamova RG, Gryshkova VS, Usenko VS, Khozaenko YS, Gurtovyy VA, Yin B, Ritter G, Old L, Gout IT, Filonenko VV. Identification of phosphate transporter NaPi2b as MX35 cancer antigen by modified SEREX approach. *Biopolymers Cell.* 2008;24(3):218–224.

11. Mattes MJ, Look K, Furukawa K, Pierce VK, Old LJ, Lewis JL, Lloyd KO. Mouse monoclonal antibodies to human epithelial differentiation antigens expressed on the surface of ovarian carcinoma ascites cells. *Cancer Res.* 1987;47(24, Pt 1):6741–6750.

12. Минигулова Л.Ф., Скрипова В.С., Нургалиева А.К., Савенкова Д.В., Козлова А.С., Акберова Н.И., Решетникова Д.Д., Савинская Л.А., Гарифулин О.М., Богданов М.В., Киямова Р.Г. Распознавание натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами N-NaPi2b в клетках карциномы

яичника. *Учёные записки Казанского университета. Серия «Естественные науки».* 2020;162(4):529–540. [Minigulova LF, Skripova VS, Nurgalieva AK, Savenkova DV, Kozlova AS, Akberova NI, Reshetnikova DD, Savinska LA, Garifulin OM, Bogdanov MV, Kiyamova RG. Recognition of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies N-NaPi2b in ovarian cancer cells. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki.* 2020;162(4):529–540. (In Russ.)] DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540.

13. Kiyamova R, Gryshkova V, Ovcharenko G, Lituyev D, Malyuchik S, Usenko V, Khozhayenko Y, Gurtovyy V, Yin B, Ritter G, Old L, Filonenko V, Gout I. Development of monoclonal antibodies specific for the human sodium-dependent phosphate co-transporter NaPi2b. *Hybridoma.* 2008;27(4):277–284. DOI: 10.1089/hyb.2008.0015.

14. Gryshkova V, Lituyev D, Savinska L, Ovcharenko G, Gout I, Filonenko V, Kiyamova R. Generation of monoclonal antibodies against tumor-associated antigen MX35/sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b. *Hybridoma.* 2011;30(1):37–42. DOI: 10.1089/hyb.2010.0064.

Сведения об авторах

Булатова Лейсан Фаридовна, мл. науч. сотрудник, НИЛ «Биомаркёр», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия; bulatovalef@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6696-8477>

Скрипова Вера Сергеевна, мл. науч. сотрудник, НИЛ «Биомаркёр», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия; vsskripova@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6342-0390>

Коротаяева Арина Валерьевна, студ., Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия; ArVKorotaeva@stud.kpfu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2253-7488>

Богданов Михаил Васильевич, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, НИЛ «Биомаркёр», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия; проф., каф. биохимии и молекулярной биологии, Медицинская школа МакГоверн, Центр наук о здоровье Университета Техас, Хьюстон, США; mikhael.v.bogdanov@uth.tmc.edu; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6093-0926>

Киямова Рамзия Галлямовна, докт. биол. наук, проф., каф. биохимии, биотехнологии и фармакологии, глав. науч. сотрудник, НИЛ «Биомаркёр», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия; kiyamova@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2547-2843>

Author details

Leisan F. Bulatova, Junior Researcher, research laboratory “Biomarker”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia; bulatovalef@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6696-8477>

Vera S. Skripova, Junior Researcher, research laboratory “Biomarker”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia; vsskripova@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6342-0390>

Arina V. Korotaeva, Stud., Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia; ArVKorotaeva@stud.kpfu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2253-7488>

Mikhail V. Bogdanov, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Fellow, research laboratory “Biomarker”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia; Prof., Depart. of Biochemistry and Molecular Biology, The University of Texas Health Science Center, McGovern Medical School, Houston, USA; mikhael.v.bogdanov@uth.tmc.edu; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6093-0926>

Ramziya G. Kiyamova, D. Sci. (Biol.), Prof., Depart. of biochemistry, biotechnology and pharmacology, chief researcher, research laboratory “Biomarker”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia; kiyamova@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2547-2843>