

УДК 577.2

РАСПОЗНАВАНИЕ Na-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ И ЭУКАРИОТ

© 2022 г. А. В. Коротаева¹, Л. Ф. Булатова¹, Р. А. Власенкова¹, Р. Г. Киямова¹, *

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,
Институт фундаментальной медицины и биологии, НИЛ «Биомаркер», Казань, 420008 Россия

*e-mail: kiyamova@mail.ru

Поступила в редакцию 28.07.2022 г.

После доработки 07.08.2022 г.

Принята к публикации 20.08.2022 г.

Na-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b относится к мембранным гликопротеинам и участвует в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека. В силу мембранной локализации и повышенной экспрессии в ряде злокачественных новообразований NaPi2b считается привлекательной мишенью для терапии моноклональными антителами. В составе NaPi2b есть большой внеклеточный домен с эпитопом MX35, к которому уже получены моноклональные антитела (моноАТ), в том числе терапевтические. Нами изучено распознавание эпитопа MX35 моноАТ L2(20/3) в клетках рака яичника OVCAR-4 и в клетках *Escherichia coli* BL21 (DE3), где не происходит N-гликозилирования и затруднено образование дисульфидных связей. Методом иммуоблоттинга показано, что распознавание эпитопа MX35 Na-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноАТ L2(20/3) в присутствии дитиотреитола снижается в лизатах клеток OVCAR-4, но не в лизатах клеток бактерий, экспрессирующих NaPi2b.

Ключевые слова: NaPi2b, эпитопы, моноклональные антитела, OVCAR-4, *Escherichia coli*

DOI: 10.56304/S023427582205009X

Поиск новых мишеней для разработки таргетных препаратов против онкологических заболеваний, а также изучение механизмов распознавания таких мишеней моноклональными антителами (моноАТ) относится к актуальным задачам современной онкологии. В силу мембранной локализации и повышенной экспрессии в опухолевых клетках ряда карцином Na-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b рассматривают как одну из таких потенциальных мишеней. NaPi2b — мембранный гликопротеин, который участвует в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека путем абсорбции неорганического фосфата в тонком кишечнике и ряде других органов и тканей [1]. NaPi2b имеет несколько трансмембранных доменов, в том числе большой внеклеточный домен (ВКД), а также цитоплазматические N- и C-концевые домены [2].

К эпитопу MX35 NaPi2b получен ряд антител, включая моноАТ L2(20/3) [3]. Интересно, что рас-

познавание эпитопа MX35 этими антителами чувствительно к восстанавливающим агентам типа дитиотреитола (ДТТ) [2, 3]. Известно, что в состав ВКД NaPi2b (188–361 а.о.) входит 4 остатка цистеина (в позициях 303, 322, 328 и 350) и 6 потенциальных сайтов N-гликозилирования (позиции 295, 308, 313, 321, 335 и 340). Мы предположили, что при восстановлении дисульфидных связей, потенциально образуемых между остатками цистеина, происходит изменение конформации ВКД. В результате углеводные цепи гликозилированного NaPi2b, синтезированного в клетках эукариот с характерными для них процессами гликозилирования белков, экранируют эпитоп MX35, препятствуя тем самым связыванию с ним антител. С целью проверить эту гипотезу мы исследовали связывание моноАТ против эпитопа MX35 с NaPi2b, синтезированным в клетках рака яичника OVCAR-4, эндогенно экспрессирующих NaPi2b, и в клетках *Escherichia coli*, где образование дисульфидных связей затруднено [4] и отсутствует гликозилирование транслируемых белков [5].

Цель работы — изучение особенностей распознавания моноАТ эпитопа MX35 Na-зависимого

Список сокращений: ВКД — большой внеклеточный домен (NaPi2b); ДТТ — дитиотреитол; моноАТ — моноклональные антитела; GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; GST (glutathione-S-transferase) — глутатион-S-трансфераза.

фосфатного транспортера NaPi2b, синтезированного в клетках бактерий и эукариот.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Плазмидные векторы

Для экспрессии рекомбинантного большого внеклеточного домена NaPi2b, внутри которого идентифицирован эпитоп MX35, в клетках бактерий использовали плазмидный вектор pGEX-4T-1 со вставкой фрагмента гена *SLC34A2*, кодирующего ВКД NaPi2b (188–361 а.о.), слитого с геном глутатион-S-трансферазы (GST).

Бактериальные штаммы, клеточные линии, питательные среды

В исследовании использовали клетки бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3), которые культивировали в среде LB (PanReac AppliChem, Германия) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина (Thermo Fisher Scientific, США); клетки рака яичника линии OVCAR-4 (ATCC, США), эндогенно экспрессирующие NaPi2b, а также клетки рака яичника линии OVCAR-8, которые не экспрессировали транспортер. Опухолевые клетки культивировали в питательной среде RPMI-1640 (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 2 мМ аланил-глутамин (“ПанЭко”), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО “Диаэм”, Россия) и смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (“ПанЭко”).

Антитела

В работе использованы мышинные моноАТ L2(20/3) [3], направленные против эпитопа MX35 ВКД NaPi2b (188–361 а.о.); мышинные моноАТ N-NaPi2b (15/1) [6], направленные против N-концевого домена NaPi2b; мышинные моноАТ против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) (Thermo Fisher Scientific) и конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) поликлональные козьи антитела против IgG мыши (Thermo Fisher Scientific).

Получение лизата клеток E. coli

Вектор pGEX-4T-1 со вставкой фрагмента гена *SLC34A2* (562–1083 п.н.) трансформировали в клетки *E. coli* BL21(DE3) методом теплового шока. Для индукции экспрессии рекомбинантного ВКД NaPi2b клетки инкубировали в течение 3 ч при 37°C в присутствии 1 мМ изопропил-β-D-тиога-лактопиранозид (ИПТГ) (PanReac AppliChem, Испания).

Осадок клеток, полученный после центрифугирования при 3300 g, ресуспендировали в лизирующем буфере (25 мМ HEPES, pH 7.2, 200 мМ NaCl, 5% глицерин) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Fisher Scientific). Клет-

ки разрушали ультразвуковой обработкой с использованием UP50H Ultrasonic Processor (Hielscher, Германия) при частоте 50 Гц, в импульсном режиме 1 и при выходной мощности 80%, 7 циклов по 10 с, на льду. Лизаты последовательно разделяли на три фракции: тотальная (Т), супернатант (С) и нерастворимый осадок (О).

Получение лизатов клеток OVCAR-4 и OVCAR-8

Для получения лизатов клеток линий рака яичника OVCAR-4 и OVCAR-8 использовали лизирующий буфер RIPA (Thermo Fisher Scientific): 25 мМ Tris-HCl, pH 7.6, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолат натрия, 0.1% SDS – с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Fisher Scientific). Лизаты осветляли центрифугированием при 21 000 g в течение 30 мин при 4°C.

Электрофоретический анализ лизатов

Электрофорез образцов лизатов проводили в 10%-ном SDS-ПААГ в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEIN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США) в течение 90 мин при напряжении 120 В. Для восстановления дисульфидных связей в буфер для загрузки образцов (0.25 М Tris-HCl, pH 6.8, 30% глицерин, 0.15% бромфеноловый синий, 10% SDS) добавляли ДТТ до конечной концентрации 0.5 М.

Наличие экспрессии ВКД NaPi2b во фракциях лизата трансформантов *E. coli* анализировали электрофорезом в тех же условиях по окрашиванию Кумасси G-250 (“Диаэм”, Россия).

Для анализа результатов электрофоретического разделения белков использовали гель-документирующую систему ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

Иммуоблотинг

После завершения электрофореза гель переносили на мембрану PVDF (Thermo Fisher Scientific). Мембрану блокировали 5%-ным BSA в буфере TBS-T (50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 149 мМ NaCl, 0.05% Tween 20) и инкубировали сначала с мышинными моноАТ, а затем с HRP-мечеными козьими антителами против IgG мыши (см. подраздел “Антитела”). Для контроля загрузки белка использовали моноАТ против GAPDH. Хемилюминисцентный сигнал детектировали на приборе ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) с использованием программы Image Lab (Bio-Rad).

Все эксперименты проводили в трех повторах.

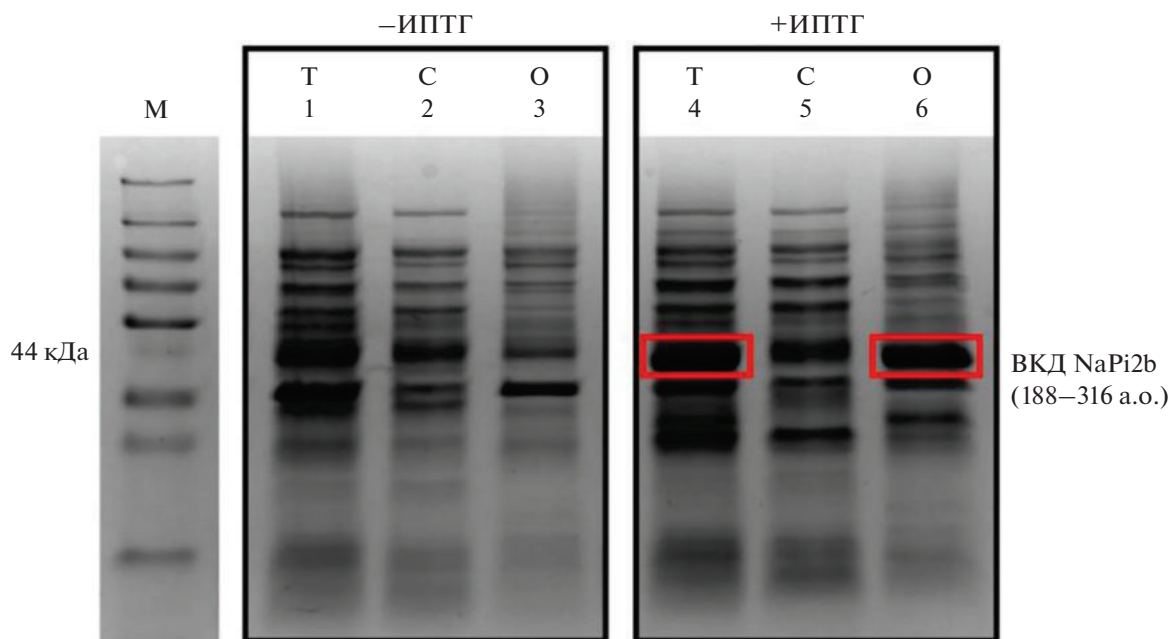


Рис. 1. Анализ экспрессии ВКД NaPi2b в клетках *E. coli* BL21(DE3). М – маркер молекулярной массы белков PageRuler Plus (#26620; Thermo Fisher Scientific, США); Т – тотальный лизат; С – супернатант; О – нерастворимый осадок.

Fig. 1. Expression of NaPi2b large extracellular domain (ECD) in *E. coli* BL21(DE3) cells. M is a marker of the molecular mass of proteins PageRuler Plus (#26620; Thermo Fisher Scientific, USA); T—total lysate; C—supernatant; O—insoluble pellet.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия рекомбинантного фрагмента ВКД NaPi2b в клетках *E. coli*

Вектор pGEX-4T-1 со вставкой участка гена *SLC34A2* (562–1083 п.н.), кодирующего ВКД NaPi2b (188–361 а.о.), слитого с геном *GST*, трансформировали в клетки *E. coli* BL21(DE3) с индукцией экспрессии вектора под действием ИПТГ.

Экспрессию рекомбинантного фрагмента ВКД NaPi2b, содержащего эпитоп MX35, анализировали электрофорезом в SDS-ПААГ (рис. 1).

На электрофореграмме на уровне 44 кДа видна полоса, соответствующая ожидаемой молекулярной массе фрагмента ВКД NaPi2b (174 а.о.), слитого с *GST* (226 а.о.). При сравнении с образцом клеток без индукции экспрессии повышенная экспрессия ВКД NaPi2b зарегистрирована преимущественно в тотальной фракции лизата (рис. 1, Т4) и во фракции нерастворимого осадка (рис. 1, О6), но не в супернатанте (рис. 1, С5). Таким образом, показано, что целевой продукт экспрессируется в клетках *E. coli* и накапливается в нерастворимой фракции лизата – скорее всего, в тельцах включения.

Иммуноблотинг лизатов *E. coli* и клеток двух линий рака яичника

Связывание моноАТ с эпитопом MX35 внутри ВКД NaPi2b в присутствии и в отсутствие ДТТ

анализировали методом иммуноблотинга лизатов клеток *E. coli* BL21 (DE3), экспрессирующих ВКД NaPi2b, и клеток OVCAR-4 рака яичника. В качестве отрицательного контроля использовали лизаты клеток OVCAR-8 рака яичника, не экспрессирующие NaPi2b.

Результаты иммуноблотинга лизатов клеток OVCAR-4 и OVCAR-8 представлены на рис. 2.

Показано, что в образцах лизатов клеток OVCAR-4 без ДТТ антитела L2(20/3) связываются с белком с молекулярной массой около 100 кДа, соответствующей гликозилированной форме NaPi2b. В присутствии ДТТ интенсивность этой полосы снижалась (рис. 2а, дорожка 2). При использовании антител N-NaPi2b (15/1), направленных против N-концевого домена NaPi2b, интенсивность полосы не изменялась в присутствии ДТТ (рис. 2б, дорожки 5, 6). Полное отсутствие сигнала в образцах лизатов клеток OVCAR-8, как с антителами L2(20/3) (рис. 2а, дорожки 3, 4), так и N-NaPi2b (15/1) (рис. 2б, дорожки 7, 8), подтверждает отсутствие экспрессии NaPi2b в этих клетках и специфичность использованных антител.

Из рис. 3 видно, что моноАТ L2(20/3) специфически связываются с полосой в лизатах клеток OVCAR-4, соответствующей гликозилированной форме транспортера NaPi2b, а в присутствии ДТТ интенсивность этой полосы снижается (рис. 3б, дорожка 4). Важно отметить, что антитела L2(20/3)

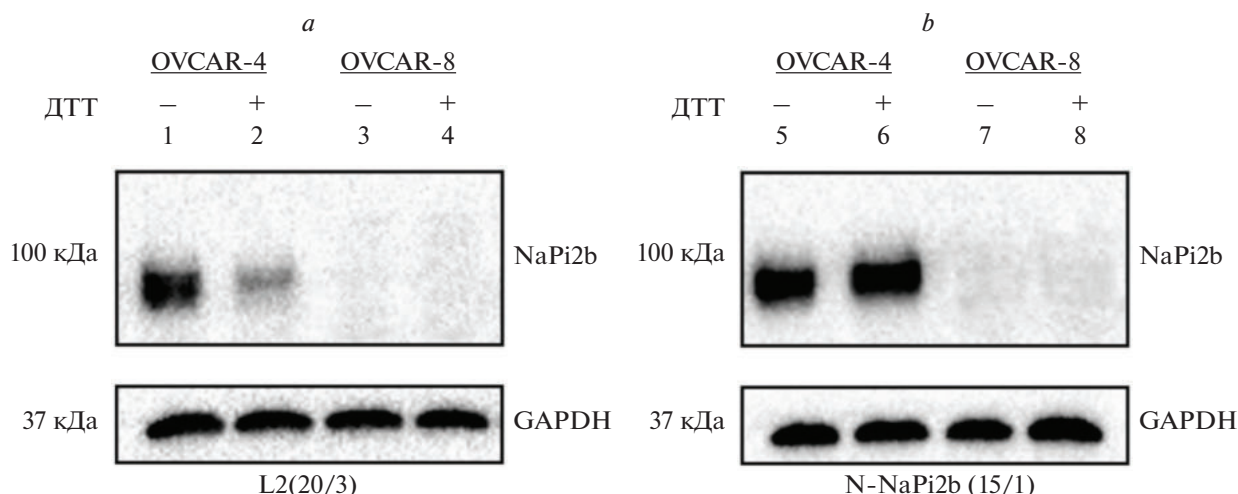


Рис. 2. Иммуноблоттинг лизатов клеток OVCAR-4 и OVCAR-8 с антителами к ВКД (a) и N-концевому домену (b) NaPi2b. На каждую лунку нанесено по 20 мкг лизата клеток OVCAR-4 или OVCAR-8.

Fig. 2. Immunoblotting of OVCAR-4 and OVCAR-8 cell lysates with antibodies to ECD (a) and to N-terminal domain (b) of the NaPi2b. Twenty micrograms of OVCAR-4 or OVCAR-8 cell lysate were applied to each well.

связываются с двумя характерными полосами в лизатах клеток OVCAR-4, что, как мы предполагаем, соответствует двум изоформам белка: 690 а.о. (рис. 3b, верхняя полоса) и 689 а.о. (рис. 3b, нижняя полоса), – которые имеют разную электрофо-

ретическую подвижность. Аналогичный результат для белка NaPi2b был получен ранее Литувевым и Киямовой [7].

Как видно, присутствие ДТТ не влияет на связывание моноАТ L2(20/3) с эпитопом MX35 в со-

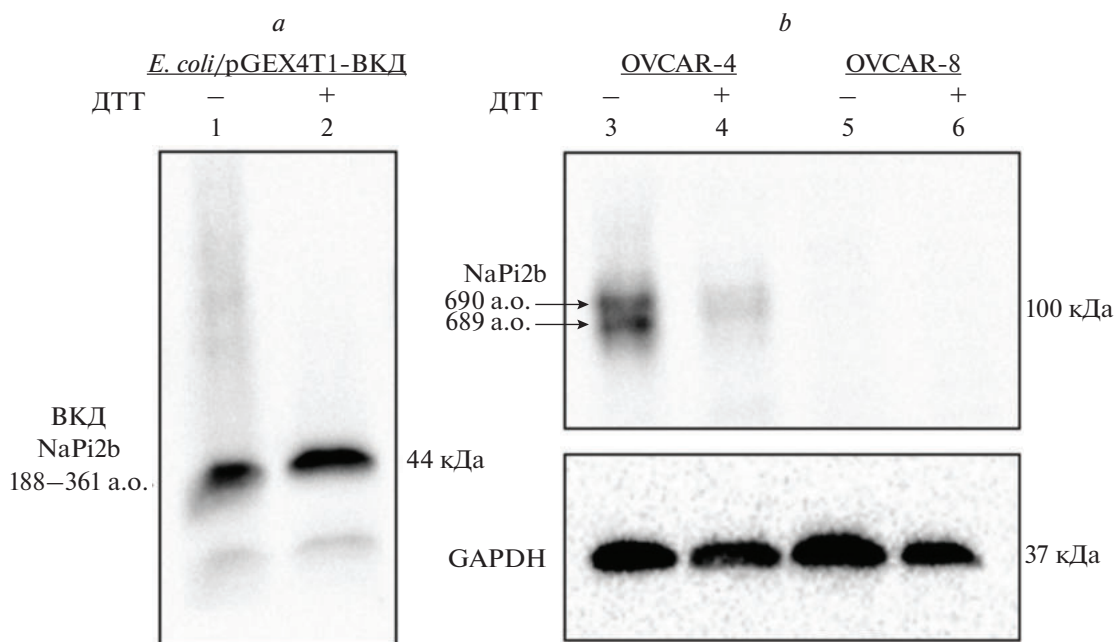


Рис. 3. Анализ связывания моноАТ L2(20/3) с содержащим эпитоп MX35 фрагментом ВКД NaPi2b, экспрессированным в клетках *E. coli* BL21(DE3) (a), и с белком NaPi2b клеток OVCAR-4 (b). Клетки OVCAR-8 – негативный контроль; GAPDH – внутренний контроль. На лунки нанесено 20 мкг лизата клеток OVCAR-4 или OVCAR-8 или 5 нг нерастворимой фракции лизата клеток *E. coli*.

Fig. 3. Analysis of the binding of monoABs L2(20/3) to the NaPi2b ECD fragment containing the MX35 epitope, expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells (a), and to the NaPi2b protein of OVCAR-4 cells (b). OVCAR-8 cells – negative control; GAPDH – internal control. Twenty micrograms of OVCAR-4 or OVCAR-8 cell lysate or 5 ng of insoluble fraction of *E. coli* cell lysate were applied to the wells.

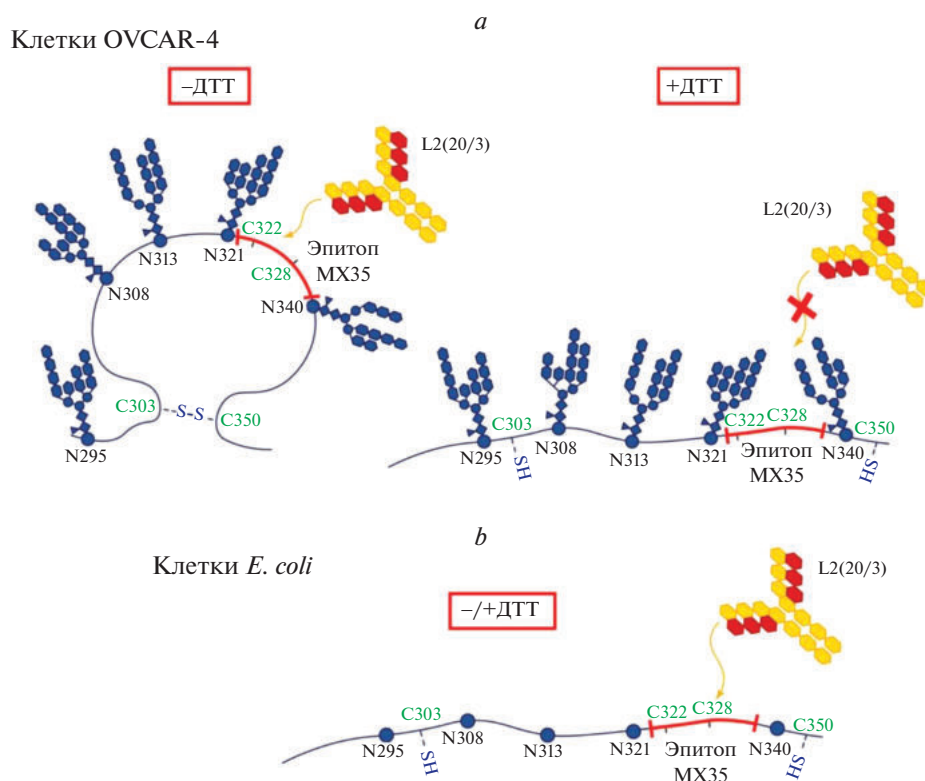


Рис. 4. Схематичная конформация ВКД NaPi2b в присутствии ДТТ в клетках OVCAR-4 (a) и в клетках *E. coli* (b).
Fig. 4. Schematic conformation of NaPi2b ECD in the presence of DTT in OVCAR-4 (a) and in *E. coli* (b) cells.

ставе рекомбинантного ВКД NaPi2b в лизатах клеток *E. coli* (рис. 3a, дорожка 2). Следует отметить наличие второй специфической полосы на уровне 36–38 кДа, (рис. 3a, дорожки 1 и 2), которая, вероятно, представляет собой деградированную форму ВКД NaPi2b.

На основании полученных результатов можно предположить, что при восстановлении дисульфидных связей нативная конформация ВКД NaPi2b изменяется и эпитоп MX35 маскируется углеводными цепями, которые синтезируются в клетках эукариот (здесь: OVCAR-4), в то время как в *E. coli* эпитоп остается доступным для антител в связи с отсутствием гликозилирования в бактериальных клетках (рис. 4).

Модель, представленная на рис. 4, содержит одну дисульфидную связь между остатками цистеинов в позициях 303 и 350, а также 5 потенциальных сайтов N-гликозилирования, согласно опубликованным данным [2].

Модель ВКД NaPi2b, предсказанная с помощью AlphaFold

Для изучения возможных дисульфидных связей внутри ВКД NaPi2b мы использовали модель трехмерной структуры этого белка (идентификатор AlphaFoldDB – AF-O95436-F1), предсказан-

ную с помощью DeepMind AlphaFold [8]. Согласно этой модели, в области ВКД NaPi2b могут образовываться две дисульфидные связи: C303–C350 и C322–C328. Дисульфидная связь C322–C328, по-видимому, поддерживается за счет “жесткого” изгиба полипептидной цепи, формируемого пролином в позиции 325 (рис. 5).

Интересно отметить, что наличие двух потенциальных дисульфидных связей внутри ВКД NaPi2b, предсказанных с помощью DeepMind AlphaFold, не совпадает с экспериментальными данными В. Yin с соавт. [2], которые обнаружили только одну дисульфидную связь в этом регионе белка. Так что число дисульфидных связей, образуемых четырьмя остатками цистеина, входящими в состав ВКД NaPi2b, еще предстоит определить.

Таким образом, впервые показано, что присутствие восстанавливающего дисульфидные связи агента не влияет на взаимодействие моноАТ L2(20/3) с эпитопом MX35 белка NaPi2b в лизатах клеток бактерий, но существенно снижает связывание в лизатах клеток эукариот – OVCAR-4, эндогенно экспрессирующих NaPi2b. Модель NaPi2b, предсказанная с помощью AlphaFold, в целом, не противоречит выдвинутой нами гипотезе о роли гликанов эукариотических клеток в экранировании эпитопа MX35 в “расшитом” ДТТ белке NaPi2b.

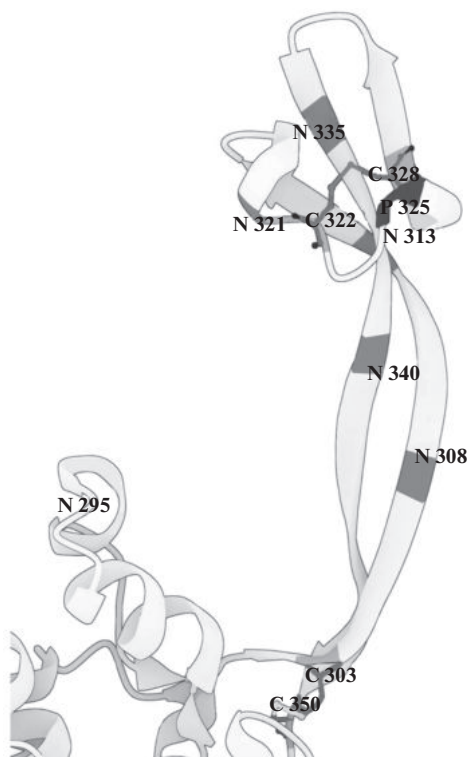


Рис. 5. Модель ВКД NaPi2b, предсказанная с помощью программы DeepMind AlphaFold (идентификатор AlphaFoldDB – AF-O95436-F1). На рисунке выделены остатки цистеина в позициях 303, 322, 328 и 350; аспарагина в позициях 295, 308, 313, 321, 335 и 340; пролина в позиции 325. Визуализация выполнена с помощью инструмента Mol* (<https://molstar.org/>).

Fig. 5. The NaPi2b ECD model predicted by the DeepMind AlphaFold program (AlphaFoldDB identifier is AF-O95436-F1). Cysteine at positions 303, 322, 328, and 350; asparagine at positions 295, 308, 313, 321, 335 and 340; and proline at position 325 are highlighted in the figure. Visualization was performed using the Mol* tool (<https://molstar.org/>).

Полученные данные позволят лучше понять особенности распознавания эпитопа MX35 в составе большого внеклеточного домена Na-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в опухолевых клетках терапевтическими антителами, что важно как для понимания фундаментальных основ структуры и функций мембранных белков, так и для разработки новых, более эффективных противоопухолевых препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и при финансовой поддержке РНФ в рамках проекта № 20-14-00166.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Levi M., Gratton E., Forster I.C., Hernando N., Wagner C.A., Biber J., Sorribas V., Murer H. Mechanisms of phosphate transport. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2019, 15(8), 482–500. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0159-y>
2. Yin B.W., Kiyamova R., Chua R., Caballero O.L., Gout I., Gryshkova V., Bhaskaran N., Souchelnitskyi S., Hellman U., Filonenko V., Jungbluth A.A., Odunsi K., Lloyd J.O., Lloyd K.O., Ritter G. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer Immun.*, 2008, 8, 3.
3. Kiyamova R., Gryshkova V., Ovcharenko G., Lituyev D., Malyuchik S., Usenko V., Khozhayenko Y., Gurtovyy V., Yin B., Ritter G., Lloyd K.O., Filonenko V., Gout I. Development of monoclonal antibodies specific for the human sodium-dependent phosphate co-transporter NaPi2b. *Hybridoma* (Larchmt.), 2008, 27(4), 277–284. <https://doi.org/10.1089/hyb.2008.0015>
4. Kong B., Guo G.L. Soluble expression of disulfide bond containing proteins FGF15 and FGF19 in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2014, 9(1), e85890.
5. Mueller P., Gauttam R., Raab N., Handrick R, Wahl C., Leptihn S., Zorn M., Kussmaul M., Scheffold M., Eikmanns B., Elling L. High level *in vivo* mucin-type glycosylation in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*, 2018, 17(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1013-9>
6. Gryshkova V., Lituiev 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* (Larchmt.), 2011, 30(1), 37–42. <https://doi.org/10.1089/hyb.2010.0064>
7. Lituiev D.S., Kiyamova R.G. Mutations in the gene of human type IIb sodium-phosphate cotransporter *SLC34A2*. *Biopolym. Cell*, 2010, 26, 13–22. <https://doi.org/10.7124/bc.00013F>
8. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nicolov S., Jain R., Adler J., Back T., Peterson S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Recognition of the Na-Dependent Phosphate Transporter NaPi2b by Monoclonal Antibodies in Bacterial and Eukaryotic Cells

A. V. Korotaeva^a, L. F. Bulatova^a, R. A. Vlasenkova^a, and R. G. Kiyamova^{a, #}

^a*Biomarker Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

[#]*e-mail: kiyamova@mail.ru*

Abstract—The Na-dependent phosphate transporter NaPi2b belongs to membrane glycoproteins and is involved in maintaining phosphate homeostasis in the human body. Due to the membrane location and over-expression in several malignancies, NaPi2b is considered an attractive target for monoclonal antibody therapy. NaPi2b has a large extracellular domain (ECD) with the MX35 epitope, to which monoclonal antibodies (monoAbs), including therapeutic ones, have already been obtained. We have studied the recognition of the MX35 epitope by monoAb L2(20/3) in OVCAR-4 ovarian cancer cells and in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells wherein post-translational modifications of proteins, including N-glycosylation, do not occur and disulfide bonds are difficult to form. Immunoblotting showed that, in the presence of dithiothreitol, the recognition of the MX35 epitope of the Na-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoAb L2(20/3) was reduced in OVCAR-4 ovarian cancer cells lysates, but not in NaPi2b-expressing bacterial cells.

Keywords: NaPi2b, epitope, monoclonal antibody, OVCAR-4, *Escherichia coli*