

УДК 577.2

doi: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540

РАСПОЗНАВАНИЕ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ N-NaPi2b В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

Л.Ф. Минигулова¹, В.С. Скрипова¹, А.К. Нургалиева¹, Д.В. Савенкова¹,
А.С. Козлова¹, Н.И. Акберова¹, Д.Д. Решетникова¹, Л.А. Савинская²,
О.М. Гарифулин², М.В. Богданов^{1,3}, Р.Г. Киямова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев, 03680, Украина

³Научный центр здоровья Техасского университета в Хьюстоне,
г. Хьюстон, TX 77030, США

Аннотация

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b кодируется геном *SLC34A2*, является трансмембранным белком, который входит в семейство фосфатных транспортеров SLC34 и принимает участие в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека. Фосфатный транспортер NaPi2b экспрессируется в ряде нормальных тканей и органов, а также при злокачественных новообразованиях яичника, легкого, колоректального и других видов рака и является мишенью для терапевтических гуманизованных антител Rebma200, ХМТ-1535 и ХМТ-1536. Эти антитела были созданы на основе антител MX35 и направлены против большого внеклеточного домена транспортера. Расположение N-концевого домена NaPi2b в клетке экспериментально не подтверждено, поэтому целью настоящей работы был анализ распознавания фосфатного транспортера NaPi2b в клетках линий рака яичника OVCAR-4 и OVCAR-8 антителами против N-концевого домена транспортера с помощью вестерн-блот-анализа и конфокальной микроскопии.

Ключевые слова: *SLC34A2*, NaPi2b, N-концевой домен NaPi2b, моноклональные антитела, карцинома яичника

Введение

Натрий-зависимый фосфатный транспортер 2В (*SLC34A2*, NaPi2b, NaPi-2b, NPT2) относится к семейству натрий-зависимых фосфатных переносчиков типа II и принимает участие в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека путем абсорбции неорганического фосфата в тонком кишечнике и ряде других органов и тканей [1]. Фосфатный транспортер NaPi2b был идентифицирован нами в качестве гипотетического антигена MX35 путем скрининга фаговой кДНК библиотеки, созданной из клеточной линии рака яичника OVCAR-3 антителами MX35 [2, 3]. Транспортер NaPi2b супер экспрессирован в карциномах яичника [4, 5], легкого [6, 7], колоректального рака [8] и является потенциальной мишенью для терапевтических антител Rebma 200 [9], ХМТ-1535 [10]

и ХМТ-1536 [11]. Антитела ХМТ-1536 представляют собой модифицированную версию антител ХМТ-1535. Антитела ХМТ-1535 были созданы на основе антител Rebma200, которые, в свою очередь, являются гуманизированной версией антител МХ35 [9].

Известно, что NaPi2b – это интегральный мембранный белок, который имеет несколько трансмембранных доменов, большой внеклеточный домен (188–361 а.к.), а также N- и C-концевые домены, предположительно расположенные в цитоплазме [3]. NaPi2b является гликопротеином с молекулярным весом около 100 кДа и имеет две изоформы, состоящие из 689 и 690 аминокислотных остатков [12]. С помощью вестерн-блот-анализа показано, что антитела МХ35 [3] и L2(20/3) [13] распознают эпитоп в пределах 311–340 а.к. большого внеклеточного домена транспортера только в отсутствие ДТТ [13]; этот факт свидетельствует, что в распознавании эпитопа для антител МХ35 и L2 (20/3) принимают участие дисульфидные связи.

Роль N-концевого домена транспортеров NaPi2a и NaPi2b мало изучена и представляет интерес с точки зрения как фундаментальной науки, так и практического применения с учетом того факта, что транспортер NaPi2b является опухолевым маркером и мишенью для противоопухолевой терапии. Возможно, N-концевой домен NaPi2b принимает участие в обеспечении точности вставки всего белка в мембрану клетки [14] и способствует правильной ориентации всех последующих трансмембранных доменов в клетке согласно модели последовательного топогенеза мембранных белков [15, 16].

Так как расположение N-концевого домена и роль NaPi2b в клетке до конца не изучены, целью настоящей работы был анализ особенностей распознавания фосфатного транспортера NaPi2b в опухолевых клетках рака яичника антителами против N-концевого домена транспортера с помощью вестерн-блот-анализа и конфокальной микроскопии.

1. Материалы и методы

1.1. Антитела и клеточные линии. Для работы использовали клеточные линии карциномы яичника OVCAR-4 и OVCAR-8. Клетки культивировали в среде RPMI (Панэко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 4 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, при 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела против N-концевого домена NaPi2b N-NaPi2b(15/1) [1]. В качестве вторичных антител использовали антитела козы, направленные против Fc-фрагментов N-концевых антител и конъюгированные с пероксидазой хрена или с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве контроля загрузки использовали антитела к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH).

1.2. Вестерн-блот-анализ. Электрофорез лизатов опухолевых клеточных линий (20 нг на лунку) проводили в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия с добавлением ДТТ и без. Перенос белков на 0.45 мкм мембрану PVDF (Millipore,

США) осуществляли путем «мокрого» переноса в электрофорезной камере (Bio-Rad, США). Мембрану блокировали 1 ч в 5%-ном растворе бычьего сывроточного альбумина (БСА) на трис-буфере солевом с добавлением Tween-20 (ТБС-Т; 20 мМ трис рН 7.6, 150 мМ NaCl, 0.1% Твин-20). Мембрану инкубировали 3 ч при комнатной температуре с первичными антителами против N-концевого домена NaPi2b в разведении 1:1000 [17]. После отмывки мембраны с помощью ТБС-Т-буфера инкубировали со вторичными антителами козы против Fc-фрагментов первичных антител мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена в разведении 1:5000 (Thermo Fisher Scientific, США). Контроль загрузки белка осуществляли с помощью антител к GAPDH и β -тубулину (Thermo Fisher Scientific, США). Сигнал хемилюминесценции детектировали с помощью субстрата Clarity ECL (Bio-Rad, США) на приборе ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США). Для оценки молекулярной массы NaPi2b использовали маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

1.3. Конфокальная микроскопия. Для визуализации N-концевого домена NaPi2b с помощью лазерной конфокальной микроскопии использовали клетки линий OVCAR-4 и OVCAR-8. Клетки предварительно фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 15 мин и затем инкубировали с первичными антителами против N-концевого домена NaPi2b в течение ночи при температуре +4 °С. В качестве вторичных антител использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 555. Для пермеабиллизации клеток использовали 0.1%-ный раствор Тритона X-100 на фосфатно-солевом буфере с добавлением БСА до 3%. Для окраски ядер использовали краситель 4',6-диамиидно-2-фенилиндол (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, США). Детекцию флуоресцентного сигнала проводили на лазерном конфокальном микроскопе Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss AG, Германия).

1.4. Биоинформатический анализ. Для предсказания количества трансмембранных доменов NaPi2b и топологии его N-концевого домена использовали сервер CCTOP, предоставляющий построение топологии NaPi2b разными программами, а именно: HMMTOP, MemSAT, Octopus, Philius, Phobius, Pro, Provid, Scampi, ScampiMsa, TMHMM.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Биоинформатический анализ доменов трансмембранного фосфатного транспортера NaPi2b. NaPi2b – это мембранный белок, у которого локализация N- и C-концевых доменов в клетке до конца не изучена. Предполагается, что оба они находятся в цитоплазме, как было экспериментально доказано для наиболее изученного транспортера NaPi2a [18]. Натрий-зависимый транспортер NaPi2a экспрессируется в проксимальных канальцах почечных нефронов и играет основную роль в поддержании фосфатного гомеостаза в организме млекопитающих [1]. Роль его C-концевого домена заключается во взаимодействии с другими цитоплазматическими белками, которые могут принимать участие в релокализации NaPi2a с мембраны клеток в субапикальное пространство в зависимости

Табл. 1

Биоинформатический анализ доменов трансмембранного фосфатного транспортера NaPi2b с помощью сервера ССТОР

№	Программа	Количество трансмембранных доменов	Границы N-концевого домена NaPi2b, а.к.	Расположение
1	НММТОР	13	1–100	Цитоплазма
2	Memsat	9	1–91	Цитоплазма
3	Octopus	8	1–96	Цитоплазма
4	Philius	10	1–97	Цитоплазма
5	Phobius	10	1–100	Цитоплазма
6	Pro	11	1–104	Внеклеточное пространство
7	Prodiv	11	1–97	Внеклеточное пространство
8	Scampi	11	1–91	Цитоплазма
9	ScampiMsa	11	1–92	Цитоплазма
10	ТМНММ	11	1–102	Внеклеточное пространство

от потребления фосфатов [19]. Предположительно, С-концевой домен фосфатного транспортера NaPi2b также находится в цитоплазме, взаимодействуя с цитоплазматическими белками благодаря его PDZ-мотиву [20]. Расположение и функция N-концевого домена транспортера NaPi2b экспериментально не изучались.

Нами был предпринят биоинформатический анализ предсказания количества трансмембранных доменов и расположения N-концевого домена фосфатного транспортера NaPi2b в клетках клеточных линий рака яичника с помощью программ сервера ССТОР [21].

Длина N-концевого домена варьирует незначительно от 91 до 104 а.к. по результатам предсказания программ ССТОР (табл. 1). Интересно отметить, что большинство программ (7 из 10) предсказывает внутриклеточное расположение N-концевого домена NaPi2b (табл. 1).

2.2. Оценка экспрессии NaPi2b в опухолевых клеточных линиях рака яичника. Для анализа расположения N-концевого домена транспортера NaPi2b методом конфокальной микроскопии необходимо было выбрать клеточные линии, эндогенно экспрессирующие и не экспрессирующие фосфатный транспортер NaPi2b.

На рис. 1 представлены результаты вестерн-блот-анализа клеточных линий рака яичника OVCAR-4 и OVCAR-8 моноклональными антителами против N-концевого домена транспортера, полученными нами в предыдущих исследованиях [17] в условиях с добавлением восстанавливающего агента ДТТ и без добавления.

Можно видеть, что фосфатный транспортер NaPi2b экспрессируется в клетках линии рака яичника OVCAR-4 и не экспрессируется в клетках линии рака яичника OVCAR-8. При этом добавление ДТТ практически не влияет на распознавание транспортера NaPi2b, кроме того, что сигнал становится более концентрированным в вестерн-блот-анализе (рис. 1).

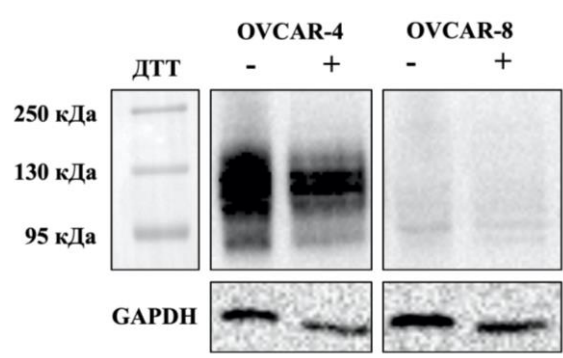


Рис. 1. Анализ экспрессии NaPi2b в клеточных линиях карциномы яичника OVCAR-4 и OVCAR-8. В качестве загрузочного контроля использовали GAPDH

2.3. Анализ клеточной локализации N-концевого домена NaPi2b в клетках рака яичника. Определение расположения N-концевого домена транспортера NaPi2b было проведено с помощью конфокальной микроскопии клеток линий рака яичника OVCAR-4 и OVCAR-8 антителами N-NaPi2b(15/1) в условиях с пермеабиллизацией клеточной мембраны и без (рис. 2 и 3).

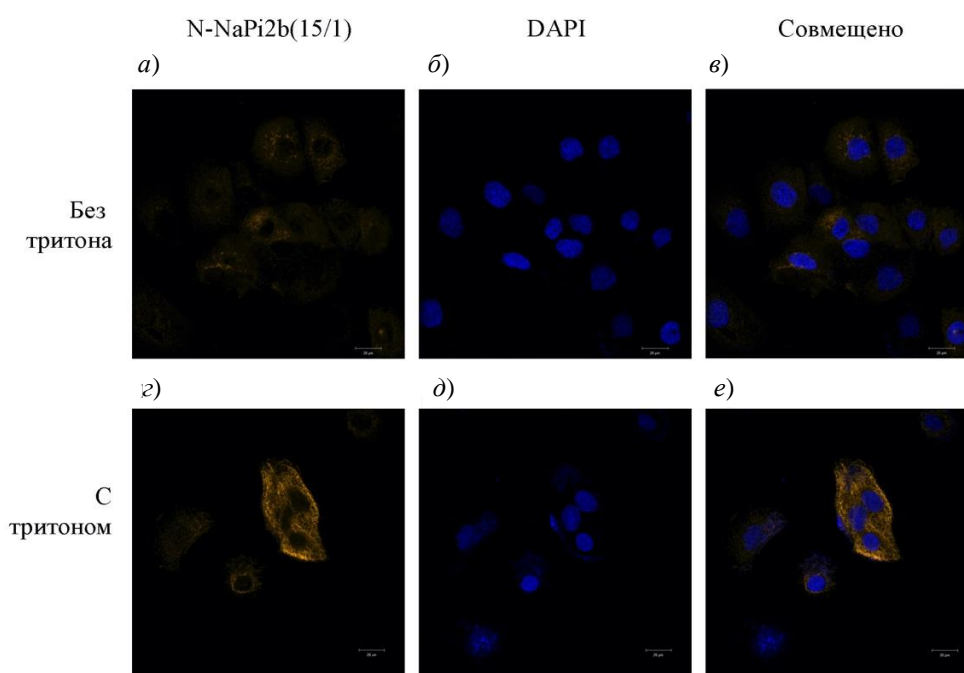


Рис. 2. Визуализация N-концевого домена NaPi2b с помощью лазерной конфокальной микроскопии в клетках линии карциномы яичника OVCAR-4 в условиях с и без пермеабиллизации клеток: а) фиксированные клетки, обработанные антителами N-NaPi2b (15/1); б) фиксированные клетки, обработанные ядерным красителем DAPI; в) совмещенная фотография для рисунков а и б; г) фиксированные и пермеабиллизованные Тритоном X-100 клетки, обработанные антителами N-NaPi2b (15/1); д) фиксированные и пермеабиллизованные Тритоном X-100 клетки, обработанные ядерным красителем DAPI; е) совмещенная фотография для рисунков г и д

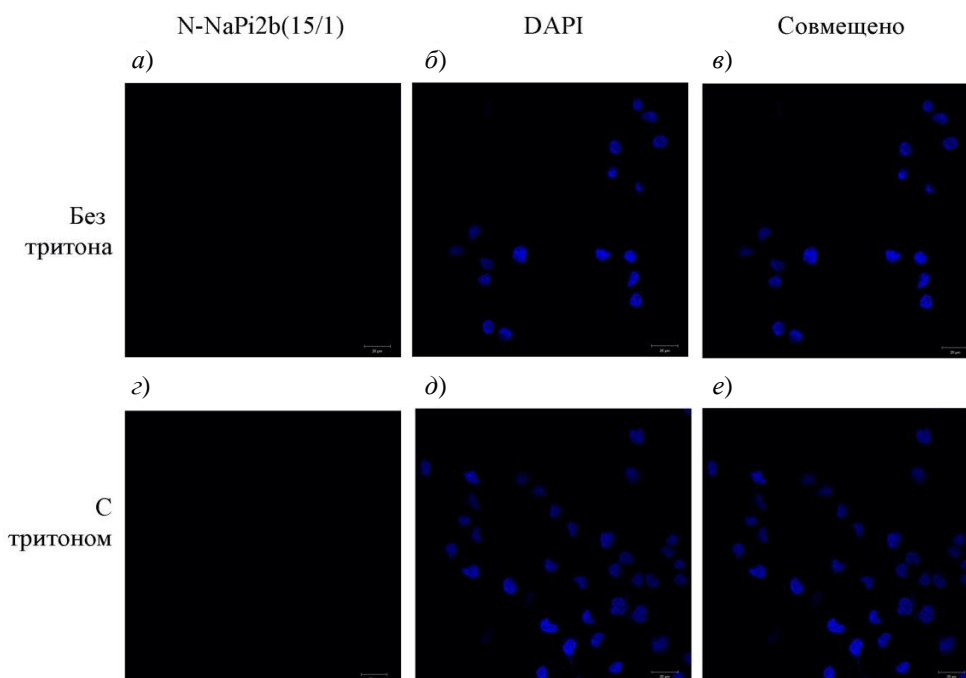


Рис. 3. Визуализация N-концевого домена NaPi2b с помощью лазерной конфокальной микроскопии в клетках линии карциномы яичника OVCAR-8 в условиях с и без пермеабиллизации клеток: *а)* фиксированные клетки, обработанные антителами N-NaPi2b (15/1); *б)* фиксированные клетки, обработанные ядерным красителем DAPI; *в)* совмещенная фотография для рисунков *а* и *б*; *г)* фиксированные и пермеабиллизованные Тритоном X-100 клетки, обработанные антителами N-NaPi2b (15/1); *д)* фиксированные и пермеабиллизованные Тритоном X-100 клетки, обработанные ядерным красителем DAPI; *е)* совмещенная фотография для рисунков *г* и *д*

На рис. 2 можно видеть, что N-концевой домен NaPi2b хорошо детектируется антителами N-NaPi2b(15/1) в условиях с пермеабиллизацией мембраны Тритоном X-100 (рис. 2, *г*) в клетках линии OVCAR-4, которые эндогенно экспрессируют фосфатный транспортер. Полученные результаты свидетельствуют о том, что N-концевой домен транспортера NaPi2b располагается в цитоплазме клеток линии рака яичника OVCAR-4.

На рис. 3 не выявлена экспрессия фосфатного транспортера NaPi2b в клетках рака яичника OVCAR-8 как в условиях с пермеабиллизацией клеточной мембраны, так и без пермеабиллизации. Полученные данные подтверждают данные вестерн-блот-анализа об отсутствии экспрессии NaPi2b в клеточной линии рака яичника OVCAR-8.

Заключение

В работе установлено, что натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b экспрессируется в клетках линии рака яичника OVCAR-4 и не экспрессируется в клетках карциномы яичника OVCAR-8. С помощью конфокальной микроскопии показано, что N-концевой домен транспортера NaPi2b локализуется преимущественно в цитоплазме клеток линии OVCAR-4. Для дальнейшего изучения

особенностей локализации N-концевого домена NaPi2b в опухолевых клетках мы планируем моделирование опухолевого микроокружения в клетках рака яичника.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90173, а также частично за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров. Часть работы на конфокальном лазерном микроскопе выполнена при поддержке РНФ в рамках проекта № 20-14-00166.

Литература

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. – V. 15, No 8. – P. 482–500. – doi: 10.1038/s41581-019-0159-y.
2. *Kiyamova R.G., Gryshkova V.S., Usenko V.S., Khozaenko Y.S., Gurtovyy V.A., Yin B., Ritter G., Old L., Gout I.T., Filonenko V.V.* Identification of phosphate transporter NaPi2b as MX35 cancer antigen by modified SEREX approach // *Biopolym. Cell.* – 2008. – V. 4, No 3. – P. 218–224. – doi: 10.7124/bc.0007A3.
3. *Yin B.W.T., Kiyamova R., Chua R., Caballero O.L., Gout I., Gryshkova V., Bhaskaran N., Souchelnytskyi S., Hellman U., Filonenko V., Jungbluth A.A., Odunsi K., Lloyd K.O., Old L.J., Ritter G.* Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas // *Cancer Immun.* – 2008. – V. 8. – Art. 3, P. 1–9.
4. *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. – V. 31, No 1. – P. 37–42.
5. *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. – V. 33, No 2. – P. 94–98.
6. *Kiyamova R., Shyian M., Lyzogubov V.V., Usenko V.S., Gout T., Filonenko V.* Immunohistochemical analysis of NaPi2b protein (MX35 antigen) expression and subcellular localization in human normal and cancer tissues // *Exp. Oncol.* – 2011. – V. 33, No 3. – P. 157–161.
7. *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 // *Tumour Biol.* – 2017. – V. 39, No 7. – Art. 1010428317720212, P. 1–7. – doi: 10.1177/1010428317720212.
8. *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. – V. 99. – P. 645–654. – doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.124.
9. *Santos M.L., Yeda F.P., Tsuruta L.R., Horta B.B., Pimenta A.A., Degaki T.L., Soares I.C., Tuma M.C., Okamoto O.K., Alves V.A.F., Old L.J., Ritter G., Moro A.M.* Rebmab200, a humanized monoclonal antibody targeting the sodium phosphate transporter NaPi2b displays strong immune mediated cytotoxicity against cancer: A novel reagent for targeted antibody therapy of cancer // *PLoS ONE.* – 2013. – V. 8, No 7. – Art. e70332, P. 1–10. – doi: 10.1371/journal.pone.0070332.

10. *Mosher R., Poling L.L., Bergstrom D.A.* Compositions and methods for predicting response to NaPi2b-targeted therapy. Patent No WO 2019/060542 A2. – 2019. – 97 p.
11. *Bodyak N., Yurkovetskiy A., Yin M., Gumerov D., Bollu R., Conlon P., Gurijala V.R., McGillicuddy D., Stevenson C., Ter-Ovanesyan E., Park P.U., Poling L., Lee W., DeVit M., Xiao D., Qin L., Lowinger T.B., Bergstrom D.A.* Discovery and preclinical development of a highly potent NaPi2b-targeted antibody-drug conjugate (ADC) with significant activity in patient-derived non-small cell lung cancer (NSCLC) xenograft models // *Cancer Res.* – 2016. – V. 76, No 14, Suppl: Proc. 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2016 Apr 16-20; New Orleans, LA. Philadelphia (PA). – Abstr. No 1194. – doi: 10.1158/1538-7445.AM2016-1194.
12. *Lituyev D.S., Kiyamova R.G.* Mutations in the gene of human type IIb sodium-phosphate cotransporter SLC34A2 // *Biopolym. Cell.* – 2010. – V. 26, No 1. – P. 13–22. – doi: 10.7124/bc.00013F.
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 cotransporter NaPi2b // *Hybridoma (Larchmt).* – 2008. – V. 27, No 4. – P. 277–284. – doi: 10.1089/hyb.2008.0015.
14. *Charneski C.A., Hurst L.D.* Positive charge loading at protein termini is due to membrane protein topology, not a translational ramp // *Mol. Biol. Evol.* – 2014. – V. 31, No 1. – P. 70–84. – doi: 10.1093/molbev/mst169.
15. *Hartmann E., Rapoport T.A., Lodish H.F.* Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1989. – V. 86, No 15. – P. 5786–5790. – doi: 10.1073/pnas.86.15.5786.
16. *Bogdanov M., Dowhan W., Vitrac H.* Lipids and topological rules governing membrane protein assembly // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 1843, No 8. – P. 1475–1488. – doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.007.
17. *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 (Larchmt).* – 2011. – V. 30, No 1. – P. 37–42. – doi: 10.1089/hyb.2010.0064.
18. *Fenollar-Ferrer C., Patti M., Knöpfel T., Werner A., Forster I.C., Forrest L.R.* Structural fold and binding sites of the human Na⁺-phosphate cotransporter NaPi-II // *Biophys. J.* – 2014. – V. 106, No 6. – P. 1268–1279. – doi: 10.1016/j.bpj.2014.01.043.
19. *Lanaspa M.A., Caldas Y.A., Breusegem S.Y., Andrés-Hernando A., Cicerchi C., Levi M., Sorribas V.* Inorganic phosphate modulates the expression of the NaPi-2a transporter in the trans-Golgi network and the interaction with PIST in the proximal tubule // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – V. 2013. – Art. 513932, P. 1–9. – doi: 10.1155/2013/513932.
20. *Giral H., Cranston D., Lanzano L., Caldas Y., Sutherland E., Rachelson J., Dobrinskikh E., Weinman E.J., Doctor R.B., Gratton E., Levi M.* NHE3 regulatory factor 1 (NHERF1) modulates intestinal sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-2b) expression in apical microvilli // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287, No 42. – P. 35047–35056. – doi: 10.1074/jbc.M112.392415.
21. *Dobson L., Reményi I., Tusnády G.E.* CCTOP: A Consensus Constrained TOPology prediction web server // *Nucleic Acids Res.* – 2015 – V. 43, No W1. – P. W408–W412. – doi: 10.1093/nar/gkv451.

- Минигулова Лейсан Фаридовна**, младший научный сотрудник НИЛ «Биомаркер»
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *minigulovalf@gmail.com*
- Скрипова Вера Сергеевна**, младший научный сотрудник НИЛ «Биомаркер»
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *vsk190@gmail.com*
- Нургалиева Алсина Камилловна**, младший научный сотрудник НИЛ «Биомаркер»
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *alsina97@mail.ru*
- Савенкова Дарья Валерьевна**, младший научный сотрудник НИЛ «Биомаркер»
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *darina.sava1@gmail.com*
- Козлова Анастасия Сергеевна**, младший научный сотрудник НИЛ «Биомаркер»
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *hellgatedoctor@yandex.com*
- Акберова Наталья Ивановна**, старший научный сотрудник НИЛ «Биомаркер»
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *nakberova@mail.ru*
- Решетникова Дарья Дмитриевна**, лаборант-исследователь НИЛ «Биомаркер»
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *reshetnikovaddm@gmail.com*
- Савинская Лилия Алексеевна**, старший научный сотрудник отдела сигнальных систем клетки
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
ул. Академика Заболотного, д. 150, г. Киев, 03680, Украина
E-mail: *savinska@gmail.com*
- Гарифулин Олег Минирович**, старший научный сотрудник отдела сигнальных систем клетки
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
ул. Академика Заболотного, д. 150, г. Киев, 03680, Украина
E-mail: *oleg.garifulin@gmail.com*
- Богданов Михаил Васильевич**, ведущий научный сотрудник НИЛ «Биомаркер»; профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
Научный центр здоровья Техасского университета в Хьюстоне
7000 Фаннин Стрит, г. Хьюстон, TX 77030, США
E-mail: *mikhail.v.bogdanov@uth.tmc.edu*
- Киямова Рамзия Галлямовна**, главный научный сотрудник НИЛ «Биомаркер»
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *kiyamova@mail.ru*

doi: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540

**Recognition of the Sodium-Dependent Phosphate Transporter NaPi2b
by Monoclonal Antibodies N-NaPi2b in Ovarian Cancer Cells**

L.F. Minigulova^{a*}, *V.S. Skripova*^{a**}, *A.K. Nurgalieva*^{a***}, *D.V. Savenkova*^{a****},
A.S. Kozlova^{a*****}, *N.I. Akberova*^{a*****}, *D.D. Reshetnikova*^{a*****}, *L.A. Savinska*^{b*****},
O.M. Garifulin^{b*****}, *M.V. Bogdanov*^{a,c*****}, *R.G. Kiyamova*^{a*****}

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia^bInstitute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
Kiev, 03680 Ukraine^cUniversity of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX 77030 USA

E-mail: *minigulovalf@gmail.com, **vsk190@gmail.com, ***alsina97@mail.ru,

****darina.sava1@gmail.com, *****hellgatedoctor@yandex.com, *****nakberova@mail.ru,

*****reshetnikovaddm@gmail.com, *****savinska@gmail.com, *****oleg.garifulin@gmail.com,

*****mikhail.v.bogdanov@uth.tmc.edu, *****kiyamova@mail.ru

Received August 26, 2020

Abstract

The sodium-dependent phosphate cotransporter NaPi2b encoded by the *SLC34A2* gene is a transmembrane protein that belongs to the family of phosphate transporters SLC34 and is involved in maintaining phosphate homeostasis in the human body. The phosphate transporter NaPi2b is expressed in several normal tissues and body organs, as well as in malignant neoplasms of the ovary, lung, colorectal, and other types of cancer. The membrane protein NaPi2b is a target for therapeutic humanized antibodies Rebma200, XMT-1535, and XMT-1536 in cancer cells. These antibodies were created based on MX35 antibodies and are directed against the large extracellular domain of the transporter NaPi2b. Since the location of the N-terminal domain of NaPi2b in the cell has not been experimentally confirmed, this work aimed to analyze the recognition of the phosphate transporter NaPi2b in ovarian cancer cells OVCAR-4 and OVCAR-8 by antibodies against the N-terminal domain of the transporter using Western blot analysis and confocal microscopy.

Keywords: *SLC34A2*, NaPi2b, N-terminal domain of NaPi2b, monoclonal antibodies, ovarian cancer

Acknowledgments. This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 19-34-90173) and in part by the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University. Confocal laser microscope images were taken with the support of the Russian Science Foundation (project no. 20-14-00166).

Figure Captions

Fig. 1. Analysis of the NaPi2b expression in ovarian cancer cells OVCAR-4 and OVCAR-8. GAPDH was used as loading control.

Fig. 2. Visualization of the N-terminal domain of NaPi2b using confocal laser microscopy in ovarian cancer cells OVCAR-4 with and without cell permeabilization: *a*) fixed cells treated with N-NaPi2b antibodies (15/1); *b*) fixed cells stained with DAPI; *c*) superimposed image for *a* and *b*; *d*) fixed and permeabilized with Triton X-100 cells treated with N-NaPi2b antibodies (15/1); *e*) fixed and permeabilized with Triton X-100 cells stained with DAPI; *f*) superimposed image for *d* and *e*.

Fig. 3. Visualization of the N-terminal domain of NaPi2b using confocal laser microscopy in ovarian cancer cells OVCAR-8 with and without cell permeabilization: fixed cells treated with N-NaPi2b

antibodies (15/1); *b*) fixed cells stained with DAPI; *c*) superimposed image for *a* and *b*; *d*) fixed and permeabilized with Triton X-100 cells treated with N-NaPi2b antibodies (15/1); *e*) fixed and permeabilized with Triton X-100 cells stained with DAPI; *f*) superimposed image for *d* and *e*.

References

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, vol. 15, no. 8, pp. 482–500. doi: 10.1038/s41581-019-0159-y.
2. Kiyamova R.G., Gryshkova V.S., Usenko V.S., Khozaenko Y.S., Gurtovyy V.A., Yin B., Ritter G., Old L., Gout I.T., Filonenko V.V. Identification of phosphate transporter NaPi2b as MX35 cancer antigen by modified SEREX approach. *Biopolym. Cell*, 2008, vol. 4, no. 3, pp. 218–224. doi: 10.7124/bc.0007A3.
3. Yin B.W.T., Kiyamova R., Chua R., Caballero O.L., Gout I., Gryshkova V., Bhaskaran N., Souchelnyskiy S., Hellman U., Filonenko V., Jungbluth A.A., Odunsi K., Lloyd K.O., Old L.J., Ritter G. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer Immun.*, 2008, vol. 8, art. 3, pp. 1–9.
4. 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, vol. 31, no. 1, pp. 37–42.
5. 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, vol. 33, no. 2, pp. 94–98.
6. Kiyamova R., Shyian M., Lyzogubov V.V., Usenko V.S., Gout T., Filonenko V. Immunohistochemical analysis of NaPi2b protein (MX35 antigen) expression and subcellular localization in human normal and cancer tissues. *Exp. Oncol.*, 2011, vol. 33, no. 3, pp. 157–161.
7. 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. *Tumour Biol.*, 2017, vol. 39, no. 7, art. 1010428317720212, pp. 1–7. doi: 10.1177/1010428317720212.
8. 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, vol. 99, pp. 645–654. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.124.
9. Santos M.L., Yeda F.P., Tsuruta L.R., Horta B.B., Pimenta A.A., Degaki T.L., Soares I.C., Tuma M.C., Okamoto O.K., Alves V.A.F., Old L.J., Ritter G., Moro A.M. Rebmab200, a humanized monoclonal antibody targeting the sodium phosphate transporter NaPi2b displays strong immune mediated cytotoxicity against cancer: A novel reagent for targeted antibody therapy of cancer. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 7, art. e70332, pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0070332.
10. Mosher R., Poling L.L., Bergstrom D.A. Compositions and methods for predicting response to NaPi2b-targeted therapy. Patent no. WO 2019/060542 A2. 2019. 97 p.
11. Bodyak N., Yurkovetskiy A., Yin M., Gumerov D., Bollu R., Conlon P., Gurijala V.R., McGillicuddy D., Stevenson C., Ter-Ovanesyan E., Park P.U., Poling L., Lee W., DeVit M., Xiao D., Qin L., Lowinger T.B., Bergstrom D.A. Discovery and preclinical development of a highly potent NaPi2b-targeted antibody-drug conjugate (ADC) with significant activity in patient-derived non-small cell lung cancer (NSCLC) xenograft models. *Cancer Res.*, 2016, vol. 76, no. 14, suppl.: Proc. 107th Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.; Apr. 16–20, 2016; New Orleans, LA. Philadelphia (PA). abstr. no. 1194. doi: 10.1158/1538-7445.AM2016-1194.
12. Lituiev D.S., Kiyamova R.G. Mutations in the gene of human type IIb sodium-phosphate cotransporter SLC34A2. *Biopolym. Cell*, 2010, vol. 26, no. 1, pp. 13–22. doi: 10.7124/bc.00013F.
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* (Larchmt), 2008, vol. 27, no. 4, pp. 277–284. doi: 10.1089/hyb.2008.0015.
14. Charneski C.A., Hurst L.D. Positive charge loading at protein termini is due to membrane protein topology, not a translational ramp. *Mol. Biol. Evol.*, 2014, vol. 31, no. 1, pp. 70–84. doi: 10.1093/molbev/mst169.

15. Hartmann E., Rapoport T.A., Lodish H.F. Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989, vol. 86, no. 15, pp. 5786–5790. doi: 10.1073/pnas.86.15.5786.
16. Bogdanov M., Dowhan W., Vitrac H. Lipids and topological rules governing membrane protein assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, vol. 1843, no. 8, pp. 1475–1488. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.007.
17. 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, vol. 30, no. 1, pp. 37–42. doi: 10.1089/hyb.2010.0064.
18. Fenollar-Ferrer C., Patti M., Knöpfel T., Werner A., Forster I.C., Forrest L.R. Structural fold and binding sites of the human Na⁺-phosphate cotransporter NaPi-II. *Biophys. J.*, 2014, vol. 106, no. 6, pp. 1268–1279. doi: 10.1016/j.bpj.2014.01.043.
19. Lanaspá M.A., Caldas Y.A., Breusegem S.Y., Andrés-Hernando A., Cicerchi C., Levi M., Sorribas V. Inorganic phosphate modulates the expression of the NaPi-2a transporter in the trans-Golgi network and the interaction with PIST in the proximal tubule. *Biomed. Res. Int.*, 2013, vol. 2013, art. 513932, pp. 1–9. doi: 10.1155/2013/513932.
20. Giral H., Cranston D., Lanzano L., Caldas Y., Sutherland E., Rachelson J., Dobrinskikh E., Weinman E.J., Doctor R.B., Gratton E., Levi M. NHERF1 modulates intestinal sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-2b) expression in apical microvilli. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 42, pp. 35047–35056. doi: 10.1074/jbc.M112.392415.
21. Dobson L., Reményi I., Tusnády G.E. CSTOP: A Consensus Constrained TOPology prediction web server. *Nucleic Acids Res.*, 2015, vol. 43, no. W1, pp. W408–W412. doi: 10.1093/nar/gkv451.

Для цитирования: Минигулова Л.Ф., Скрипова В.С., Нурғалиева 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 // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2020. – Т. 162, кн. 4. – С. 529–540. – doi: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540.

For citation: Minigulova L.F., Skripova V.S., Nurgalieva A.K., Savenkova D.V., Kozlova A.S., Akberova N.I., Reshetnikova D.D., Savinska L.A., Garifulin O.M., Bogdanov M.V., Kiyamova R.G. Recognition of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies N-NaPi2b in ovarian cancer cells. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2020, vol. 162, no. 4, pp. 529–540. doi: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540. (In Russian)