

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-114-126>

# Создание *in vitro* модели для изучения роли дисульфидных связей в составе большого внеклеточного домена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в клетках карциномы яичника OVCAR-8

В.С. Скрипова, Д.А. Фирсова, А.В. Килунов, Л.Ф. Булатова, М.А. Попутский, Р.Г. Киямова

Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18, корп. 1

**Контакты:** Рамзия Галлямовна Киямова [kiyatova@mail.ru](mailto:kiyatova@mail.ru), Вера Сергеевна Скрипова [v.s.scripova@yandex.ru](mailto:v.s.scripova@yandex.ru)

**Введение.** Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b – перспективная мишень для таргетной противоопухолевой терапии. Его большой внеклеточный домен (ВКД) содержит скрытый эпитоп МХ35, против которого разработаны терапевтические антитела, проходящие доклинические и клинические испытания. Доступность эпитопа МХ35 для антител выше в опухолевых клетках и зависит от конформации ВКД, обусловленной дисульфидными связями между остатками цистеина С303, С322, С328 и С350. Количество этих дисульфидных связей неизвестно, как и то, какие именно остатки цистеина участвуют в поддержании конформации ВКД NaPi2b, возможной регуляции его транспортной активности и стабильности. Выделение и очистка трансмембранных белков, включая NaPi2b, для структурных и функциональных исследований являются трудно разрешимыми задачами, поэтому необходимо разработать *in vitro* модель для изучения особенностей формирования дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b, а также определения их роли в обеспечении доступности скрытого эпитопа МХ35 и активности транспортера в живых клетках.

**Цель исследования** – создание панели клональных сублиний карциномы яичника человека OVCAR-8, содержащих рекомбинантные варианты транспортера NaPi2b дикого типа, а также варианты с одиночными и двойными заменами остатков цистеина в области ВКД на остатки аланина.

**Материалы и методы.** Клетки карциномы яичника OVCAR-8, не экспрессирующие ген транспортера NaPi2b, трансдуцировали лентивирусными частицами, несущими нуклеотидные последовательности, кодирующие транспортер NaPi2b дикого типа или его мутантные варианты с одиночными и двойными заменами остатков цистеина С303, С322, С328 и С350 на остатки аланина, для имитации восстановления потенциальных дисульфидных связей между ними. После отбора трансдуцированных клеток получали клональные сублинии, в лизатах которых методами вестерн- и дот-блоттинга оценивали содержание рекомбинантных вариантов транспортера NaPi2b.

**Результаты.** Получена панель из 9 клональных сублиний карциномы яичника OVCAR-8, содержащих рекомбинантный транспортер NaPi2b дикого типа и его мутантные варианты. Отмечено влияние введенных аминокислотных замен на содержание и электрофоретическую подвижность транспортера NaPi2b.

**Заключение.** Полученная панель клональных сублиний может быть использована в качестве *in vitro* модели для изучения конформации ВКД транспортера NaPi2b, обусловленной дисульфидными связями, что позволит раскрыть механизм образования скрытого эпитопа МХ35 и пролить свет на роль ВКД в регуляции транспортной активности NaPi2b. Понимание механизма образования скрытого эпитопа МХ35 даст возможность найти новые скрытые эпитопы в составе внеклеточных доменов трансмембранных белков, которые могут быть использованы в качестве мишеней для таргетной противоопухолевой терапии.

**Ключевые слова:** NaPi2b, SLC34A2, злокачественное новообразование, дисульфидная связь, опухоль-специфический эпитоп, конформация

**Для цитирования:** Скрипова В.С., Фирсова Д.А., Килунов А.В. и др. Создание *in vitro* модели для изучения роли дисульфидных связей в составе большого внеклеточного домена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в клетках карциномы яичника OVCAR-8. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):114–26.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-114-126>

## Development of an *in vitro* model to study the role of disulfide bonds in the largest extracellular domain of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b in OVCAR-8 ovarian carcinoma cells

V.S. Skripova, D.A. Firsova, A.V. Kilunov, L.F. Bulatova, M.A. Poputsky, R.G. Kiyamova

Research Laboratory "Biomarker", Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University; Bld. 1, 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia

**Contacts:** Ramziya Gallyamovna Kiyamova [kiyamova@mail.ru](mailto:kiyamova@mail.ru), Vera Sergeevna Skripova [v.s.skripova@yandex.ru](mailto:v.s.skripova@yandex.ru)

**Introduction.** The sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b is a promising target for targeted antitumor therapy. There is the largest extracellular domain (ECD) containing a cryptic MX35 epitope, against which therapeutic antibodies have been developed and are undergoing preclinical and clinical trials. The accessibility of the MX35 epitope to antibodies is higher in tumor cells and depends on the conformation of the ECD, determined by disulfide bonds between cysteine residues C303, C322, C328 and C350. The number of these disulfide bonds and cysteine residues that participate in the NaPi2b ECD conformation maintaining, regulation of its transport activity and stability is unknown. Isolation and purification of transmembrane proteins, including NaPi2b, for structural and functional studies is difficult, therefore it is necessary to develop an *in vitro* model to study the formation of disulfide bonds in the ECD region of the NaPi2b transporter and their role in ensuring the availability of the cryptic MX35 epitope and transporter activity in living cells.

**Aim.** To create a panel of clonal sublines of human ovarian carcinoma OVCAR-8 containing recombinant variants of the wild-type NaPi2b transporter, as well as with single and double substitutions of cysteine residues in the ECD region with alanine residues.

**Materials and methods.** OVCAR-8 ovarian carcinoma cells that do not express the NaPi2b transporter gene were transduced with lentiviral particles carrying nucleotide sequences encoding the wild-type NaPi2b transporter or its mutant variants with single and double substitutions of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 with alanine residues to simulate reduction of potential disulfide bonds between them. After selecting transduced cells, clonal sublines were obtained, in the lysates of which the content of recombinant variants of the NaPi2b transporter was assessed using Western blot analysis and dot blot analysis.

**Results.** A panel of 9 clonal sublines of OVCAR-8 ovarian carcinoma containing the wild-type recombinant NaPi2b transporter and its mutant variants was obtained. The effect of the introduced amino acid substitutions on the content and electrophoretic mobility of the NaPi2b transporter was noted.

**Conclusion.** The resulting panel of clonal sublines can be used as an *in vitro* model to study the conformation of the ECD transporter NaPi2b, determined by disulfide bonds, which will reveal the mechanism of formation of the cryptic MX35 epitope and shed light on the role of ECD in the regulation of NaPi2b transport activity. Understanding the mechanism of formation of the cryptic MX35 epitope will make it possible to find new cryptic epitopes in the extracellular domains of transmembrane proteins, which can be used as targets for antitumor therapy.

**Keywords:** NaPi2b, *SLC34A2*, malignancy, disulfid bond, tumor-specific epitope, conformation

**For citation:** Skripova V.S., Firsova D.A., Kilunov A.V. et al. Development of an *in vitro* model to study the role of disulfide bonds in the largest extracellular domain of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b in OVCAR-8 ovarian carcinoma cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):114–26. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-114-126>

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из приоритетных задач современной онкологии является разработка новых терапевтических подходов, обладающих высокой эффективностью и низкой токсичностью. К ним относится таргетная терапия лекарственными препаратами, направленными против конкретных молекулярных мишеней, характерных преимущественно для опухолевых клеток. Поиск таких опухоль-специфических мишеней является непростой задачей, поскольку большинство белков клеток опухоли представлены и в клетках нормальных тканей, что увеличивает риск их повреждения при введении таргетной терапии.

Примером перспективных опухоль-специфических мишеней является мембранный гликопротеин – натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b из семейства транспортеров SLC34, который участвует

в поддержании фосфатного гомеостаза [1, 2]. Экспрессия гена *SLC34A2*, кодирующего транспортер NaPi2b у человека, выявлена в клетках ряда нормальных тканей [3–5], а повышенный уровень его экспрессии – в клетках некоторых злокачественных новообразований, включая рак яичника, легкого, щитовидной железы и др. [5–13].

Транспортер NaPi2b идентифицирован в качестве мишени для моноклональных антител MX35 [14–16], их терапевтических производных и аналогов [17–20] с помощью модифицированного подхода SEREX (serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries) [21–23]. Показано, что эпитоп для вышеописанных антител (эпитоп MX35) находится в составе большого внеклеточного домена (ВКД 188–361 а.о.) транспортера NaPi2b на участке 311–340 а.о. [15, 16]. Особенностью данных антител является то, что при

введении в организм *in vivo* они накапливаются преимущественно в очагах карциномы яичника, а не в клетках нормальных тканей, в которых экспрессируется ген транспортера NaPi2b [24, 25]. Это может говорить об опухоли-специфической природе эпитопа MX35 в молекуле транспортера NaPi2b. Следует отметить, что в этой же области ВКД находятся 4 остатка цистеина — С303, С322, С328 и С350, а также несколько потенциальных сайтов для N-гликозилирования [15]. Результаты наших исследований и работ других авторов показали, что при восстановлении дисульфидных связей в условиях *in vitro* эффективность связывания антител с эпитопом MX35 значительно снижалась в лизатах клеток эукариот, но не изменялась для синтетических пептидов [15], и в лизатах клеток прокариот, в которых отсутствует гликозилирование, в условиях вестерн-блоттинга [26].

Мы предполагаем, что эпитоп MX35 является скрытым эпитопом, а его доступность для распознавания антителами зависит от конформации ВКД транспортера NaPi2b, обусловленной дисульфидными связями и N-гликозилированием [27–29]. На данный момент структура транспортера NaPi2b экспериментально не разрешена, поэтому остается неизвестным, сколько и между какими именно остатками цистеина в области его ВКД образуются дисульфидные связи, от которых зависит доступность эпитопа MX35 для распознавания антителами. На сегодняшний день с помощью экспериментальных и *in silico* подходов, включая анализ структуры транспортера NaPi2b из базы структур белков AlphaFold, предсказана возможность образования дисульфидных связей между остатками цистеина С303–С350 и С322–С328 [15, 26].

В связи со сложностью проведения структурных исследований трансмембранных белков, в том числе NaPi2b, для анализа дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b необходимо использовать другие методы и подходы, включая *in vitro* модели для исследования транспортера в условиях, позволяющих сохранять его нативную конформацию, — на живых клетках.

**Цель исследования** — путем лентивирусной трансдукции получить панель клональных сублиний карциномы яичника человека OVCAR-8, синтезирующих рекомбинантный натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b дикого типа и его мутантные варианты, в которых каждый из остатков цистеина в области ВКД в положениях С303, С322, С328, С350 или одновременно 2 из них, а именно С303 и С322, С303 и С328, С322 и С328, заменены на остатки аланина. С помощью такой клеточной панели могут быть изучены особенности образования дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b, от которых зависит доступность скрытого эпитопа MX35 для антител (в частности, определено, между какими именно остатками цистеина они образуются), а также их влияние на функциональную активность, конформацию и топологию транспортера NaPi2b.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточные линии.** Клеточную линию почки эмбриона человека НЕК293Т (ATCC, США) использовали для создания лентивирусных частиц. Клеточную линию карциномы яичника человека OVCAR-8, в которой отсутствует эндогенная экспрессия гена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b [30, 31], — для получения панели клональных сублиний, содержащих рекомбинантный транспортер NaPi2b дикого типа, а также его варианты с одиночными и двойными заменами остатков цистеина в положениях С303, С322, С328 и С350 на остатки аланина.

**Культивирование клеточных линий.** Клеточную линию НЕК293Т культивировали в полной питательной среде DMEM («Панэко», Россия) с содержанием 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Cargicorn, Германия), 2 мМ L-аланил-L-глутамин («Панэко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина («Панэко», Россия) и 100 мкг/мл стрептомицина («Панэко», Россия). Клеточную линию OVCAR-8 культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 («Панэко», Россия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Cargicorn, Германия), 2 мМ L-аланил-L-глутамин («Панэко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина («Панэко», Россия) и 100 мкг/мл стрептомицина («Панэко», Россия). Сублинии OVCAR-8, трансдуцированные лентивирусными частицами, полученными на основе вектора pLV-CMV-H4-пуго, культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 («Панэко», Россия) в присутствии 1 мкг/мл пурамицина (Gibco, США).

**Получение рекомбинантных лентивирусных векторов.** Вектор pcDNA3.1(+)/NaPi2b, кодирующий транспортер NaPi2b дикого типа, полученный нами ранее, использовали в качестве матрицы для выделения плазмид, кодирующих мутантные варианты транспортера NaPi2b с одиночными и двойными заменами остатков цистеина С303, С322, С328 и С350 на остатки аланина [32], методом сайт-направленного мутагенеза с помощью набора реактивов QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, США) по инструкции производителя. Наличие целевых мутаций в плаزمиде после мутагенеза подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Из выделенных плазмид с помощью рестриктаз EcoRI (Thermo Fisher Scientific, США) и BamHI (Thermo Fisher Scientific, США) получены нуклеотидные последовательности, кодирующие мутантные варианты транспортера NaPi2b, с последующим клонированием в лентивирусный вектор pLV-CMV-H4-пуго [33] по сайтам рестрикции EcoRI и BamHI. Амплификацию рекомбинантных лентивирусных векторов проводили в клетках *E. coli* XL1-Blue с последующим выделением и очисткой с помощью набора Plasmid MiniPrep («Евроген», Россия).

**Лентивирусная трансдукция клеток млекопитающих.** Лентивирусные частицы получали в клетках НЕК293Т путем трансфекции упаковочными плазмидами

psPAX2 (Addgene #12260) и pMD2.G (Addgene #12259) и рекомбинантными векторами pLV-CMV-H4-puro, кодирующими мутантные варианты транспортера NaPi2b. Трансфекцию проводили с помощью полиэтиленimina (Thermo Fisher Scientific, США), как описано ранее [34]. Трансдукцию клеток карциномы яичника OVCAR-8 полученными лентивирусными частицами также выполняли, как описано ранее [35]. Для отбора трансдуцированных клеток через 48 ч после трансдукции добавляли питательную среду, содержащую селективный антибиотик пурамицин в концентрации 1 мкг/мл.

**Получение клональных сублиний.** Клональные сублинии получали методом редкого посева. В 96-луночный планшет рассеивали по 100 мкл суспензии клеток с концентрацией 5 кл/мл и добавляли 100 мкл полной питательной среды. В каждом случае использовали от 2 до 4 96-луночных планшетов. С помощью светового микроскопа находили и отмечали лунки, где образовались клональные популяции клеток, которые наращивали для дальнейшей работы.

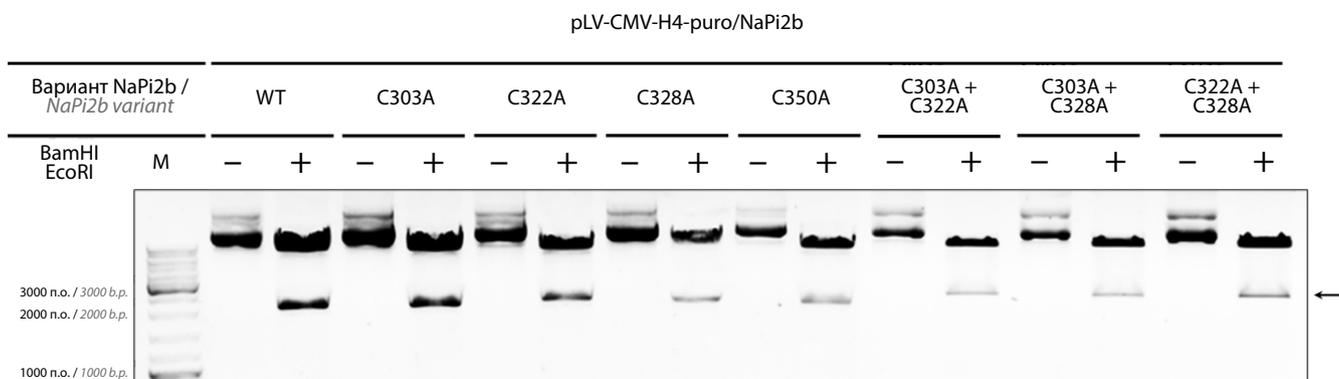
**Вестерн-блоттинг.** Клетки рассеивали в лунки 6-луночного планшета и культивировали до достижения 80 % конфлюэнтности. Клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером и лизировали в 100 мкл буфера RIPA (Thermo Fisher Scientific, США), содержащего смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные лизаты центрифугировали при 10 тыс. об/мин при +4 °C в течение 30 мин. Растворимую белковую фракцию собирали и использовали в качестве образцов для проведения электрофореза в денатурирующих условиях в 10 % полиакриламидном геле. Вестерн-блоттинг проводили в соответствии с рекомендациями производителей антител кролика против N-концевого домена транспортера NaPi2b (CST, США) и GAPDH

(Thermo Fisher Scientific, США). В качестве вторичных антител использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США). Для получения хемилюминисцентного сигнала использовали субстраты для пероксидазы хрена SuperSignal™ West Pico PLUS и Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, США). Детекцию сигнала проводили с использованием системы геле-документирования ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

**Дот-блоттинг.** Образцы клеточных лизатов готовили аналогично образцам для вестерн-блоттинга. На нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) наносили объем образцов клеточных лизатов, в котором содержалось 5 мкг общего белка. После высушивания мембраны обрабатывали и анализировали так же, как для вестерн-блоттинга, в соответствии с рекомендациями производителя антител против N-концевого домена транспортера NaPi2b (CST, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом молекулярного клонирования получены рекомбинантные лентивирусные экспрессионные векторы pLV-CMV-H4-puro с нуклеотидными последовательностями, кодирующими транспортер NaPi2b дикого типа, его мутантные варианты с одиночными заменами остатков цистеина на остатки аланина в положениях 303, 322, 328 и 350, а также с заменами одновременно двух из них: C303 и C322, C303 и C328, C322 и C328. Наличие целевых последовательностей в полученных рекомбинантных векторах подтверждено с помощью рестрикции очищенных из бактериальных клеток рекомбинантных векторов ферментами EcoRI и BamHI. Во всех случаях наблюдали наличие фрагмента ДНК длиной примерно 2100 п.о., что соответствовало ожидаемым результатам (рис. 1).



**Рис. 1.** Результаты горизонтального электрофореза в агарозном геле продуктов рестрикции эндонуклеазами BamHI и EcoRI рекомбинантных лентивирусных векторов pLV-CMV-H4-puro после клонирования последовательностей, кодирующих рекомбинантные варианты натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с одиночными и двойными аминокислотными заменами остатков цистеина C303, C322, C328 и C350 на остатки аланина. M – маркер длин ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, США); н.о. – пары оснований; WT – дикий тип. Стрелкой указаны последовательности ДНК, кодирующие транспортер NaPi2b (~2100 н.о.)

**Fig. 1.** Results of the horizontal agarose gel electrophoresis of recombinant lentiviral vectors pLV-CMV-H4-puro products of restriction by BamHI and EcoRI after cloning sequences encoding recombinant variants of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b with single and double amino acid substitutions of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 to alanine residues results. M – GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, США); b.p. – base pair; WT – wild-type. Arrow is showing DNA sequences encoding NaPi2b transporter (~2100 b.p.)

**Таблица 1.** Характеристика сублиний карциномы яичника OVCAR-8, полученных после лентивирусной трансдукции**Table 1.** Characteristics of OVCAR-8 ovarian carcinoma sublines after lentiviral transduction

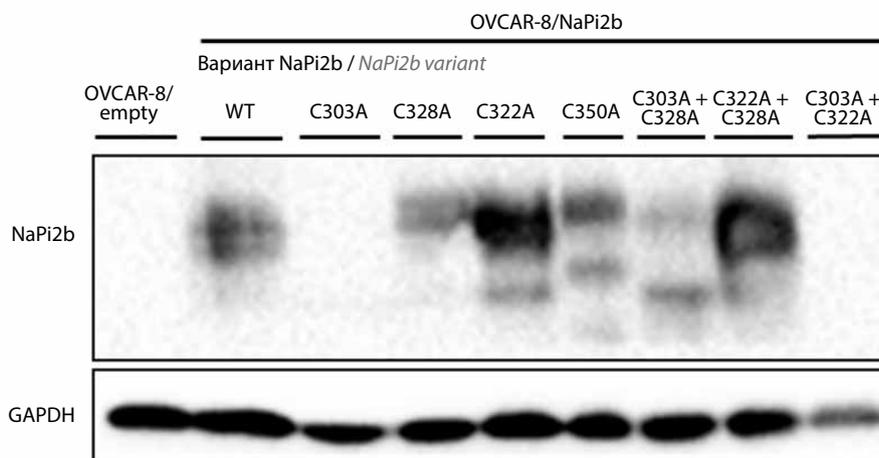
Сублиния Subline	Вариант рекомбинантного транспортера NaPi2b, содержащийся в сублинии The recombinant NaPi2b transporter variant contained in the subline
OVCAR-8/NaPi2b-wt	Дикого типа Wild-type
OVCAR-8/NaPi2b-C303A	С аминокислотной заменой C303A With C303A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C322A	С аминокислотной заменой C322A With C322A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C328A	С аминокислотной заменой C328A With C328A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C350A	С аминокислотной заменой C350A With C350A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A	С аминокислотными заменами C303A и C322A With C303A and C322A amino acid substitutions
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A	С аминокислотными заменами C303A и C328A With C303A and C328A amino acid substitutions
OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A	С аминокислотными заменами C322A и C328A With C322A and C328A amino acid substitutions
OVCAR-8/empty	Не содержащий NaPi2b Without NaPi2b

На основе полученных векторов созданы лентивирусные частицы, которыми трансдуцировали клетки карциномы яичника человека OVCAR-8. Для использования в качестве отрицательного контроля клетки OVCAR-8 трансдуцировали лентивирусными частицами, полученными на основе пустого вектора pLV-CMV-H4-riго, не содержащего последовательность, кодирующую транспортер NaPi2b. Такой контроль может быть использован в том числе для подтверждения специфичности антител против транспортера NaPi2b, а также при необходимости для учета влияния процесса трансдукции на физиологию клеток при дальнейших исследованиях.

В результате отбора с использованием пурамицина (1 мкг/мл) получены устойчивые к нему популяции клеток OVCAR-8, что говорит об их успешной трансдукции. В каждом случае количество трансдуцированных клеток, выживших в присутствии пурамицина, не различалось, что говорит об одинаковой эффективности трансдукции. Перечень полученных сублиний и их характеристика представлены в табл. 1.

С помощью вестерн-блоттинга лизатов трансдуцированных клеток OVCAR-8 проанализировано содержание каждого рекомбинантного варианта транспортера NaPi2b, которое оценивали по интенсивности специфического хемилюминисцентного сигнала от антител против его N-концевого домена (рис. 2).

Содержание рекомбинантного транспортера NaPi2b в исследуемых образцах в разных вариантах различалось. Высокий уровень его содержания характерен для дикого типа и мутантных вариантов транспортера NaPi2b с аминокислотными заменами C322A и C322A + C328A (см. рис. 2; образцы WT, C322A, C322A + C328A), средний — для мутантных вариантов с аминокислотными заменами C328A и C350A (см. рис. 2; образцы C328A и C350A), низкий — для мутантного варианта транспортера с аминокислотными заменами C303A + C328A (рис. 2; образец C303A + C328A). В случае мутантных вариантов транспортера с аминокислотными заменами C303A и C303A + C322A не наблюдали специфического сигнала, соответствующего транспортеру NaPi2b (см. рис. 2; образцы C303A и C303A + C322A), что может говорить об отсутствии или крайне низком содержании данных мутантных вариантов в исследуемых образцах. Поскольку в каждом случае эффективность трансдукции клеток OVCAR-8 была одинаковой, разницу в уровне содержания различных вариантов транспортера NaPi2b можно объяснить гетерогенностью полученных после трансдукции популяций клеток. Поскольку при лентивирусной трансдукции интеграция экспрессионной кассеты в геном клетки происходит случайно, содержащийся в ней трансген может попадать в области генома с разной доступностью хроматина для транс-



**Рис. 2.** Результаты анализа содержания рекомбинантных вариантов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в поликлональных популяциях клеток OVCAR-8 после трансдукции лентивирусными частицами, полученными на основе рекомбинантных лентивирусных векторов pLV-CMV-H4-puro/NaPi2b, кодирующих дикий тип (WT) и мутантные варианты транспортера NaPi2b

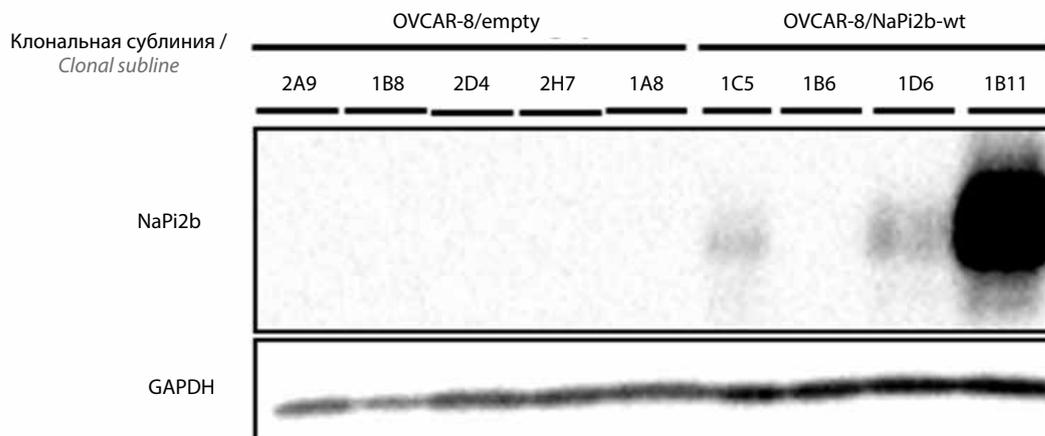
**Fig. 2.** Results of the analysis of recombinant sodium-dependents phosphate transporter NaPi2b variants content in polyclonal OVCAR-8 cell populations after transduction by lentiviral particles based on recombinant lentiviral vectors pLV-CMV-H4-puro/NaPi2b encoding wild-type (WT) and mutant variants of NaPi2b transporter

крипции. Это приводит к формированию поликлональных популяций, в которых уровень экспрессии трансгена может значительно различаться между клетками, что, в свою очередь, влияет на интерпретацию результатов дальнейших исследований. В связи с этим для последующей работы получали клональные сублинии (полученные из одной клетки) трансдуцированных клеток OVCAR-8 (см. табл. 1).

Для отрицательного контроля OVCAR-8/empty, а также для каждого рекомбинантного варианта транспортера NaPi2b получены от 4 до 39 клональных сублиний, среди которых проводили отбор сублиний с высоким содержанием целевых рекомбинантных ва-

риантов транспортера NaPi2b с помощью вестерн-и/или дот-блоттинга.

Для всех пяти полученных клональных сублиний OVCAR-8/empty по результатам вестерн-блоттинга подтверждено отсутствие содержания в клетках рекомбинантного транспортера NaPi2b (рис. 3), а клональная сублиния OVCAR-8/empty/2H7 отобрана для включения в панель клеточных линий в качестве отрицательного контроля. Среди четырех полученных клональных сублиний OVCAR-8/NaPi2b-wt наибольшее содержание целевого белка наблюдалось в клональной сублинии OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11 (см. рис. 3), которая вошла в панель и использовалась в дальнейшей



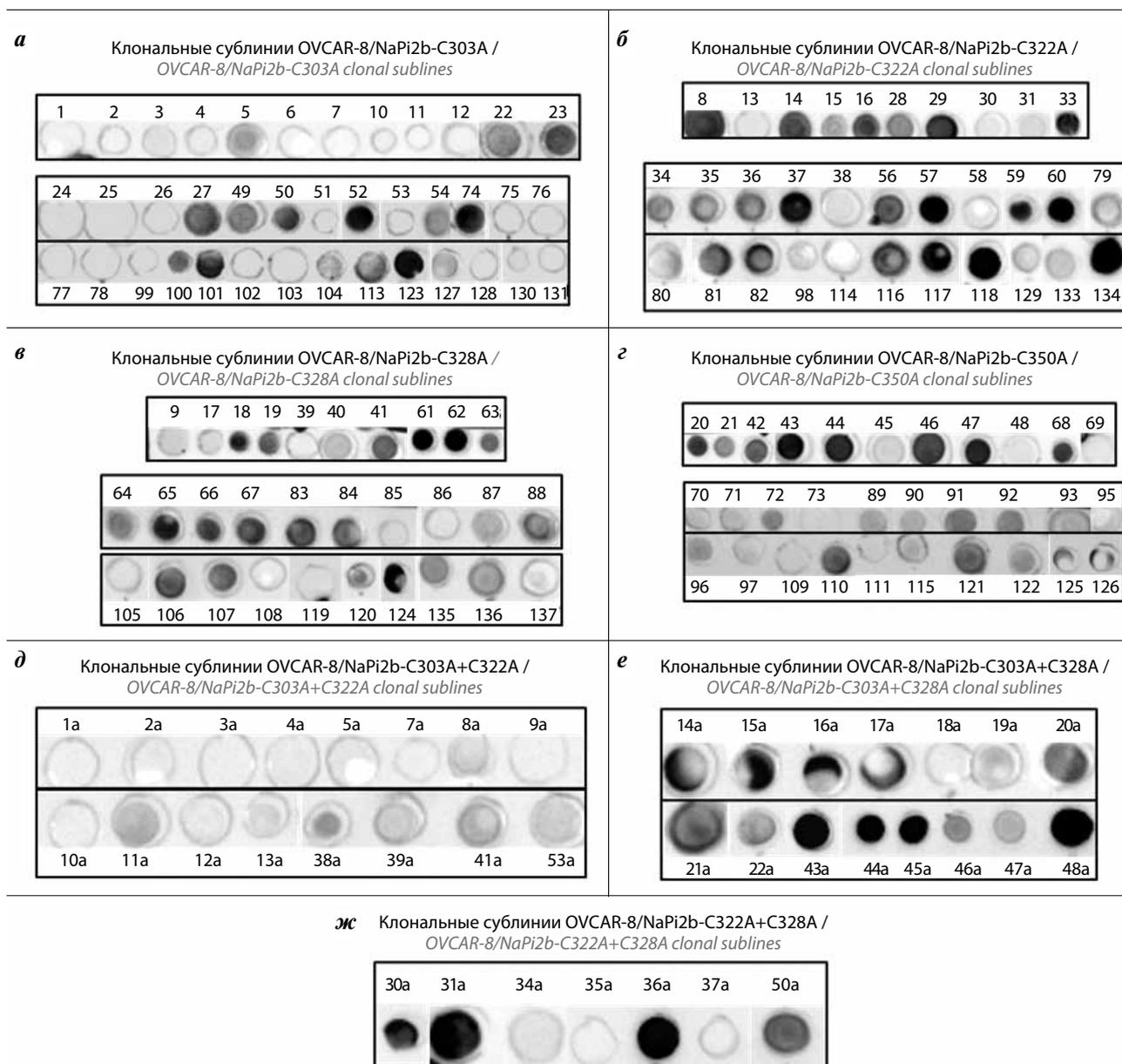
**Рис. 3.** Результаты анализа содержания рекомбинантного натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в клональных сублиниях OVCAR-8/empty и OVCAR-8/NaPi2b-wt

**Fig. 3.** Results of the analysis of recombinant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b content in OVCAR-8/empty and OVCAR-8/NaPi2b-wt clonal sublines

работе в качестве положительного контроля содержания транспортера NaPi2b.

Отбор клональных сублиний, содержащих рекомбинантные мутантные варианты транспортера NaPi2b (OVCAR-8/NaPi2b-mut), проводили в 2 этапа. На первом этапе клеточные лизаты исследуемых сублиний анализировали методом дот-блоттинга, что позволило выявить от 5 до 30 сублиний, содержащих рекомбинантные мутантные варианты транспортера NaPi2b (рис. 4).

Интересно отметить, что для сублиний OVCAR-8/NaPi2b-C303A и OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A выявлены клональные сублинии, содержащие соответствующие рекомбинантные мутантные варианты транспортера NaPi2b (см. рис. 4, а, д, табл. 2), несмотря на то, что результаты вестерн-блоттинга лизатов клеток до клональной селекции не выявили в них наличие рекомбинантного транспортера NaPi2b (см. рис. 2; образцы C303A и C303A+C322A).



**Рис. 4.** Результаты анализа содержания рекомбинантных мутантных вариантов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с заменами остатков цистеина C303, C322, C328 и C350 на остатки аланина в клональных сублиниях OVCAR-8/NaPi2b-C303A (а), OVCAR-8/NaPi2b-C322A (б), OVCAR-8/NaPi2b-C328A (в), OVCAR-8/NaPi2b-C350A (г), OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A (д), OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A (е) и OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A (ж)

**Fig. 4.** Results of the analysis of recombinant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b with substitution of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 with alanine residues content in clonal sublines OVCAR-8/NaPi2b-C303A (a), OVCAR-8/NaPi2b-C322A (б), OVCAR-8/NaPi2b-C328A (в), OVCAR-8/NaPi2b-C350A (г), OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A (д), OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A (е) и OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A (ж)

**Таблица 2.** Результаты анализа содержания рекомбинантных мутантных вариантов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с заменами остатков цистеина C303, C322, C328 и C350 на остатки аланина в клональных сублиниях OVCAR-8/NaPi2b-mut, полученные с помощью дот-блоттинга

Table 2. Results of the analysis of recombinant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b with substitution of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 with alanine residues content in clonal sublines in clonal sublines OVCAR-8/NaPi2b-mut obtained by dot blotting

Сублиния Subline	Номер клональных сублиний, содержащих транспортер NaPi2b Number of the clonal sublines, containing NaPi2b transporter	Количество проанализированных/содержащих NaPi2b клональных сублиний, отобранных для вестерн-блоттинга Amount of analyzed/containing NaPi2b/selected for Western blot analysis clonal sublines
OVCAR-8/NaPi2b-C303A	<b>3, 5, 22, 23, 27, 49, 50, 52, 54, 74, 100,</b> 101, 104, <b>113,</b> 123, 127	39/16/12
OVCAR-8/NaPi2b-C322A	8, 13, 14, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, <b>37,</b> 38, 56, <b>57,</b> 59, <b>60,</b> 79, 80, 81, 82, 98, 116, <b>117,</b> 118, 129, 133, 134	32/30/4
OVCAR-8/NaPi2b-C328A	9, 17, <b>18,</b> 19, 40, 41, <b>61, 62,</b> 63, 64, <b>65,</b> 66, 67, 83, 84, 87, 88, 106, 107, 120, 124, 135, 136	30/23/4
OVCAR-8/NaPi2b-C350A	20, 21, 42, <b>43, 44,</b> 45, <b>46, 47,</b> 48, 68, 70, 71, 72, 89, 90, 91, 92, 93, 96, 97, 110, 115, 121, 122, 125, 126	31/26/4
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A	8а, <b>11а,</b> 13а, 38а, 39а, <b>41а, 53а</b>	16/7/3
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A	14а, 15а, 16а, 17а, 19а, 20а, 21а, 22а, <b>43а, 44а,</b> 45а, 46а, 47а, 48а	15/14/2
OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A	<b>30а, 31а,</b> 34а, 36а, 50а	7/5/2

**Примечание.** Жирным шрифтом выделены сублинии, отобранные для вестерн-блоттинга.  
Note. Clonal sublines numbers selected for Western-blot analysis are in bold.

По результатам дот-блоттинга для каждой сублинии OVCAR-8/NaPi2b-mut отобраны от 2 до 12 клональных сублиний (см. табл. 2), в лизатах которых содержание транспортера NaPi2b исследовали методом вестерн-блоттинга. Подтверждено, что в образцах отобранных клональных сублиний OVCAR-8/NaPi2b-mut содержатся соответствующие рекомбинантные мутантные варианты транспортера NaPi2b (рис. 5 и 6).

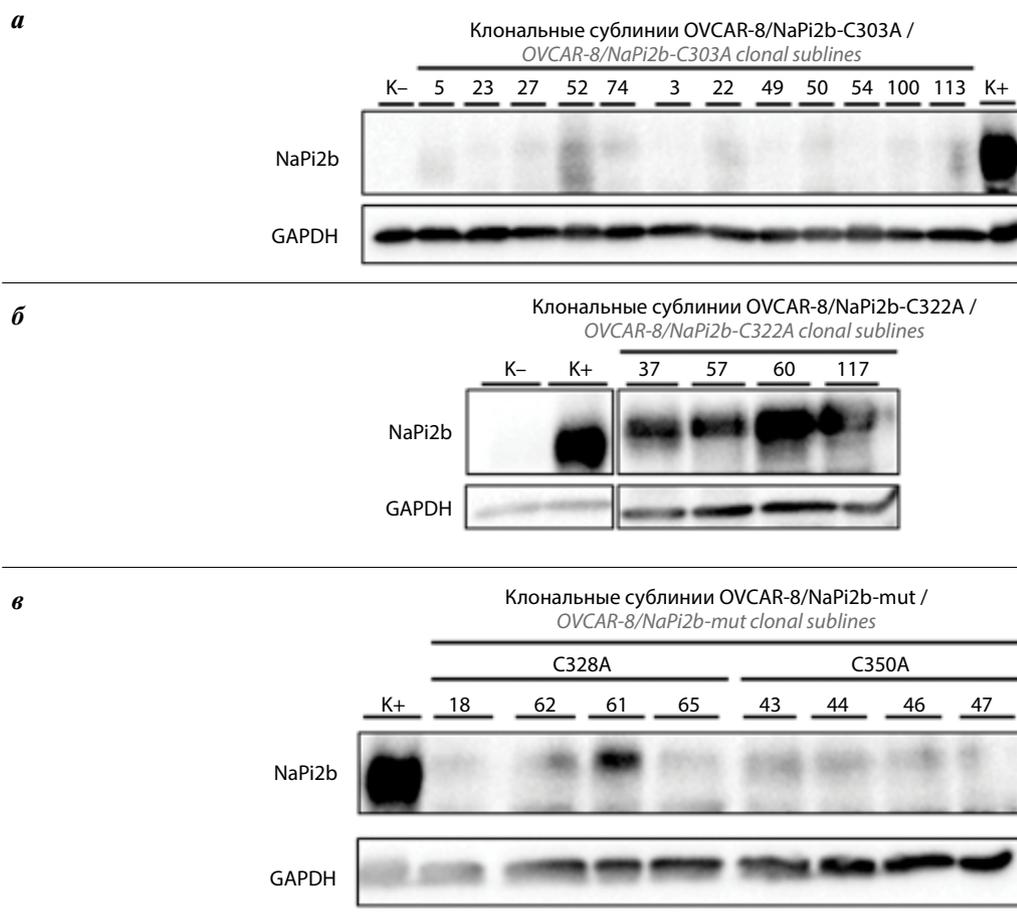
Содержание всех рекомбинантных мутантных вариантов транспортера NaPi2b как с одиночными, так и с двойными заменами остатков цистеина, во всех исследованных клональных сублиниях OVCAR-8 ниже, чем рекомбинантного транспортера NaPi2b дикого типа (см. рис. 5 и 6). Особенно низкое содержание отмечено для рекомбинантных мутантных вариантов транспортера NaPi2b с заменами C303A (рис. 5а) и C303A+C322A (см. рис. 6; образцы 41а, 53а, 11а). В случае мутантного варианта транспортера NaPi2b с заменой C303A+C322A специфический сигнал удалось детектировать только при более длительной экспозиции (114 с) при регистрации хемилюминисценции (см. рис. 6; образцы 41а, 53а, 11а).

Результаты вестерн-блоттинга показали, что электрофоретическая подвижность транспортера NaPi2b дикого типа (см. рис. 5 и 6; образец К+) выше, чем его рекомбинантных мутантных вариантов с заменами C303A (см. рис. 5, а), C322A (рис. 5, б), C328A (рис. 5, в; образцы 18, 62, 61, 65), C350A (рис. 5, в; образцы 43, 44,

46, 47), C303A+C328A (см. рис. 6; образцы 43а и 44а) и C322A+C328A (см. рис. 6; образцы 30а и 31а). Стоит отметить, что для всех рекомбинантных вариантов транспортера NaPi2b наряду с основной гликозилированной формой (100–130 кДа) наблюдается наличие более электрофоретически подвижной дегликозилированной формы на уровне около 75 кДа, что особенно заметно для транспортера NaPi2b с двойными аминокислотными заменами C303A+C328A (см. рис. 6; образцы 43а и 44а) и C322A+C328A (см. рис. 6; образцы 30а и 31а). В случае двойной аминокислотной замены C303A+C322A при длительной экспозиции удалось детектировать только дегликозилированную форму транспортера NaPi2b на уровне 75 кДа (см. рис. 6, образцы 41а, 53а, 11а).

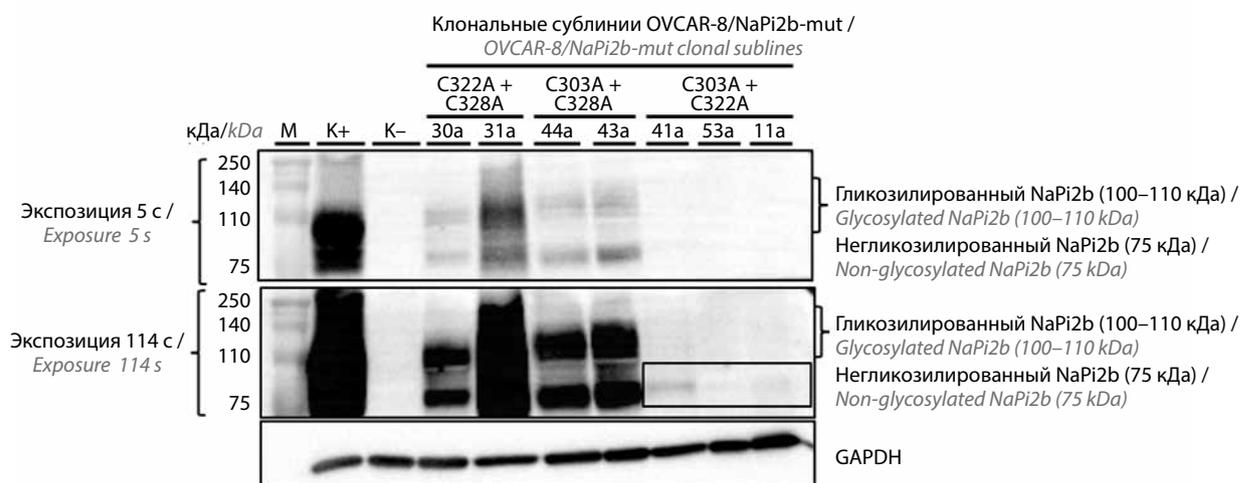
Проведенный анализ позволил отобрать клональные сублинии карциномы яичника OVCAR-8/NaPi2b-mut, содержащие рекомбинантные мутантные варианты транспортера NaPi2b, для включения в клеточную панель (табл. 3).

Таким образом, получена панель клональных сублиний карциномы яичника OVCAR-8, содержащих рекомбинантные варианты транспортера NaPi2b, включая дикий тип и мутантные варианты с одиночными заменами остатков цистеина на остатки аланина в положениях C303, C322, C328 и C350, а также с двойными заменами C303A+C322A, C303A+C328A и C322A+C328A (см. табл. 3).



**Рис. 5.** Результаты анализа содержания рекомбинантных мутантных вариантов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с одиночными заменами остатков цистеина C303, C322, C328 и C350 на остатки аланина в клональных сублиниях OVCAR-8/NaPi2b-C303A (а), OVCAR-8/NaPi2b-C322A (б), OVCAR-8/NaPi2b-C328A и OVCAR-8/NaPi2b-C350A (в). K- – OVCAR-8/empty; K+ – OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11

Fig. 5. Results of the analysis of recombinant mutant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b with single substitutions of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 with alanine residues content in clonal sublines OVCAR-8/NaPi2b-C303A (a), OVCAR-8/NaPi2b-C322A (б), OVCAR-8/NaPi2b-C328A и OVCAR-8/NaPi2b-C350A (в). K- – OVCAR-8/empty; K+ – OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11



**Рис. 6.** Результаты анализа содержания рекомбинантных мутантных вариантов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с двойными заменами остатков цистеина C303, C322, C328 и C350 на остатки аланина в клональных сублиниях OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A, OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A, OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A. K- – OVCAR-8/empty; K+ – OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11

Fig. 6. Results of the analysis of recombinant mutant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b with double substitutions of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 with alanine residues content in clonal sublines OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A, OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A, OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A. K- – OVCAR-8/empty; K+ – OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11

## ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск новых опухоль-специфических мишеней для разработки противоопухолевых препаратов является одной из самых актуальных задач современной онкологии. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является примером потенциальной опухоль-специфической мишени, поскольку содержит в составе своего ВКД скрытый эпитоп MX35, который при введении *in vivo* распознается моноклональными антителами преимущественно в клетках опухоли [24, 25]. Известно, что доступность эпитопа MX35 для антител зависит от дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b, которые потенциально могут образовываться между остатками цистеина C303, C322, C328 и C350 [15, 26]. Однако сколько и между какими именно остатками цистеина образуются дисульфидные связи, при которых конформация ВКД транспортера NaPi2b позволяет антителам связаться с эпитопом MX35 в опухолевых клетках, неизвестно. В связи с особенностями работы с трансмембранными белками, к которым относится транспортер NaPi2b, необходимо разрабатывать подходы, позволяющие изучать их структуру, в том числе образование дисульфидных связей, в живых клетках с сохранением их нативной конформации.

В результате проведенной работы с помощью лентивирусной трансдукции получены клональные сублинии

карциномы яичника OVCAR-8, содержащие различные рекомбинантные варианты натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с одиночными (C303A, C322A, C328A, C350A) и двойными (C303A+C322A, C303A+C328A, C322A+C328A) заменами остатков цистеина на остатки аланина в области его ВКД (см. табл. 3).

Отмечено, что введенные замены аминокислотных остатков цистеина в области ВКД влияли на содержание и электрофоретическую подвижность рекомбинантных мутантных форм транспортера NaPi2b (см. рис. 5 и 6). В частности, как при одиночных, так и при двойных заменах остатков цистеина мы наблюдали снижение содержания мутантных рекомбинантных форм транспортера NaPi2b по сравнению с NaPi2b дикого типа, особенно в случае аминокислотных замен C303A (рис. 5, а) и C303A+C322A (см. рис. 6). Мы предполагаем, что это может быть связано как с низким уровнем транскрипции трансгенов, кодирующих данные мутантные варианты транспортера NaPi2b, так и с посттрансляционной нестабильностью их структуры из-за нарушения образования дисульфидных связей в области ВКД [36–39], что могло способствовать их внутриклеточной деградации.

Известно, что образование дисульфидных связей в трансмембранных белках тесно взаимосвязано с N-гликозилированием, как было показано для ряда

**Таблица 3.** Состав панели клональных сублиний карциномы яичника OVCAR-8 для изучения особенностей формирования дисульфидных связей в области внеклеточного домена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b

Table 3. Panel of the OVCAR-8 ovarian carcinoma clonal sublines for investigation of disulfide bonds formation in the largest extracellular domain of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b

Клональная сублиния Clonal subline	Вариант рекомбинантного транспортера NaPi2b, содержащийся в сублинии The recombinant NaPi2b transporter variant contained in the subline
OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11	Дикого типа Wild-type
OVCAR-8/NaPi2b-C303A/74	С аминокислотной заменой C303A With C303A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C322A/60	С аминокислотной заменой C322A With C322A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C328A/61	С аминокислотной заменой C328A With C328A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C350A/43	С аминокислотной заменой C350A With C350A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A/41a	С аминокислотными заменами C303A и C322A With C303A and C322A amino acid substitutions
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A/44a	С аминокислотными заменами C303A и C328A With C303A and C328A amino acid substitutions
OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A/31a	С аминокислотными заменами C322A и C328A With C322A and C328A amino acid substitutions
OVCAR-8/empty/2H7	Не содержащий NaPi2b Without NaPi2b

белков [39]. Особенности посттрансляционных модификаций белков, в свою очередь, тоже могут влиять на их стабильность [36–39]. В молекуле транспортера NaPi2b есть несколько потенциальных сайтов для N-гликозилирования, которые находятся на том же участке его ВКД, что изучаемые в данной работе остатки цистеина [15]. В нашей работе результаты вестерн-блоттинга показали, что у мутантных вариантов транспортера NaPi2b электрофоретическая подвижность ниже, чем у транспортера дикого типа (см. рис. 5 и 6). Однако при замене С303А+С322А удалось детектировать только негликозилированную форму транспортера NaPi2b (см. рис. 6; образцы 41а, 53а, 11а). Можно предположить, что отсутствие дисульфидных связей в области ВКД в мутантных вариантах транспортера NaPi2b приводит к изменению профиля N-гликозилирования, от которого зависят конформация и стабильность белка. Однако это требует экспериментального подтверждения с помощью специализированных методик для изучения дисульфидных связей и N-гликозилирования, что может быть осуществлено с использованием полученной панели клеточных сублиний.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования мы впервые получили панель клональных сублиний карциномы яичника человека

OVCAR-8, содержащих рекомбинантный транспортер NaPi2b дикого типа, а также его мутантные варианты с одиночными (С303А, С322А, С328А, С350А) и двойными (С303А+С322А, С303А+С328А, С322А+С328А) заменами остатков цистеина на остатки аланина в области его ВКД, где расположен скрытый эпитоп МХ35. Введенные аминокислотные замены влияли как на уровень содержания рекомбинантных вариантов транспортера NaPi2b, так и на его электрофоретическую подвижность. Мы предполагаем, что исследуемые замены остатков цистеина приводят к изменениям посттрансляционных модификаций транспортера NaPi2b, включая образование дисульфидных связей и N-гликозилирование в области ВКД, что может влиять на его конформацию и стабильность. Полученные нами данные будут полезны для исследования конформации ВКД, его структуры и роли в регуляции активности транспортера NaPi2b, а также механизма образования скрытого эпитопа МХ35 с использованием полученной нами панели клональных сублиний карциномы яичника OVCAR-8. Понимание особенностей образования скрытого эпитопа МХ35 в молекуле транспортера NaPi2b может помочь в будущем предсказывать и находить новые скрытые опухоль-специфические эпитопы в составе других трансмембранных белков, представленных на поверхности опухолевых клеток.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Forster I.C. The molecular mechanism of SLC34 proteins: insights from two decades of transport assays and structure-function studies. *Pflugers Arch European J Physiology* 2019;471:15–42. DOI: 10.1007/s00424-018-2207-z
- Murer H., Forster I., Biber J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch* 2004;447:763–7. DOI: 10.1007/s00424-003-1072-5
- Homann V., Rosin-Steiner S., Stratmann T. et al. Sodium-phosphate cotransporter in human salivary glands: molecular evidence for the involvement of NPT2b in acinar phosphate secretion and ductal phosphate reabsorption. *Arch Oral Biol* 2005;50(9):759–68. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2005.01.009
- Nishimura M., Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008;23(1):22–44. DOI: 10.2133/dmpk.23.22
- Kiyamova R., Shyian M., Lyzogubov V.V. et al. Immunohistochemical analysis of NaPi2b protein (MX35 antigen) expression and subcellular localization in human normal and cancer tissues. *Exp Oncol* 2011;33(3):157–61.
- Rangel L.B.A., Sherman-Baust C.A., Wernyj R.P. et al. Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene* 2003;22(46):7225–32. DOI: 10.1038/sj.onc.1207008
- Kopantzev E.P., Monastyrskaya G.S., Vinogradova T.V. et al. 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
- Gryshkova V., Goncharuk I., Gurtovyy V. et al. The study of phosphate transporter NAPI2B expression in different histological types of epithelial ovarian cancer. *Exp Oncol* 2009;31(1):37–42.
- Chen D.R., Chien S.Y., Kuo S.J. et al. SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer. *Anticancer Res* 2010;30(10):4135–40.
- Kim H.S., Kim D.H., Kim J.Y. et al. 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
- Shyian M., Gryshkova V., Kostianets O. et al. Quantitative analysis of SLC34A2 expression in different types of ovarian tumors. *Exp Oncol* 2011;33(2):94–8.
- Soares I.C., Simões K., de Souza J.E. et al. In Silico analysis and immunohistochemical characterization of NaPi2b protein expression in ovarian carcinoma with monoclonal antibody Mx35. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20(2):165–72. DOI: 10.1097/pai.0b013e318228e232
- Zhang Z., Ye S., Zhang M. et al. High expression of SLC34A2 is a favorable prognostic marker in lung adenocarcinoma patients. *Tumor Biol* 2017;39(7):1010428317720212. DOI: 10.1177/1010428317720212
- Mattes M.J., Look K., Furukawa K. et al. Mouse monoclonal antibodies to human epithelial differentiation antigens expressed on the surface of ovarian carcinoma ascites cells. *Cancer Res* 1987;47(24 Pt 1):6741–50.
- Yin B.W.T., Kiyamova R., Chua R. et al. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer Immunol* 2008;8:3.
- Kiyamova R.G., Gryshkova V.S., Usenko V.S. et al. Identification of phosphate transporter Napi2b as MX35 cancer antigen by modified SEREX approach. *Biopolym Cell* 2008;24(3):218–24. DOI: 10.7124/bc.0007A3
- Kiyamova R., Gryshkova V., Ovcharenko G. et al. Development of monoclonal antibodies specific for the human sodium-dependent

- phosphate co-transporter NaPi2b. *Hybridoma* 2008;27(4):277–84. DOI: 10.1089/hyb.2008.0015
18. Dos Santos M.L., Yeda F.P., Tsuruta L.R. et al. 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;8(7):e70332. DOI: 10.1371/journal.pone.0070332
  19. Fessler S., Dirksen A., Collins S.D. et al. XMT-1592, a site-specific dolasynthen-based NaPi2b-targeted antibody-drug conjugate for the treatment of ovarian cancer and lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2020;80(16\_Suppl.):2894. DOI: 10.1158/1538-7445.am2020-2894
  20. Bodyak N.D., Mosher R., Yurkovetskiy A.V. et al. the dolaflexin-based antibody-drug conjugate XMT-1536 targets the solid tumor lineage antigen SLC34A2/NaPi2b. *Mol Cancer Ther* 2021;20(5):896–905. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-20-0183
  21. Kostianets O., Shyian M., Sergiy D. et al. Serological analysis of SEREX-defined medullary breast carcinoma-associated antigens. *Cancer Invest* 2012;30(7):519–27. DOI: 10.3109/07357907.2012.697231
  22. Garifulin O.M., Kykot V.O., Gridina N.Y. et al. Application of SEREX-analysis for identification of human colon cancer antigens. *Exp Oncol* 2015;37(3):173–80. DOI: 10.31768/2312-8852.2015.37(3):173-180
  23. Kostianets O., Shyyan M., Antoniyuk S.V. et al. Panel of SEREX-defined antigens for breast cancer autoantibodies profile detection. *Biomarkers* 2017;22(2):149–56. DOI: 10.1080/1354750X.2016.1252952
  24. Rubin S.C., Kostakoglu L., Divgi C. et al. Biodistribution and intraoperative evaluation of radiolabeled monoclonal antibody Mx35 in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;51(1):61–6. DOI: 10.1006/gyno.1993.1247
  25. Lindegren S., Andrade L.N.S., Bäck T. et al. Binding affinity, specificity and comparative biodistribution of the parental murine monoclonal antibody MX35 (Anti-NaPi2b) and its humanized version Rebmab200. *PLoS One* 2015;10(5):e0126298. DOI: 10.1371/journal.pone.0126298
  26. Коротаева А.В., Булатова Л.Ф., Власенкова Р.А., Киямова Р.Г. Распознавание Na-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках бактерий и эукариот. *Биотехнология* 2022;38(5):66–72. DOI: 10.56304/S023427582205009X  
Korotaeva A.V., Bulatova L.F., Vlasenkova R.A., Kiyamova R.G. Recognition of the Na-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in bacterial and eukaryotic cells. *Biotechnologia = Biotechnology* 2022;38(5):66–72. (In Russ.). DOI: 10.56304/S023427582205009X
  27. Kiyamova R., Minigulova L.F., Skripova V. et al. N-glycosylation status of membrane phosphate transporter NaPi2b is crucial for its epitope recognition by monoclonal antibody in tumour cells. *Annals of Oncology* 2020;31(Suppl. 5):S1227–8. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.2193
  28. Булатова Л.Ф., Скрипова В.С., Коротаева А.В. и др. Распознавание мутантных форм натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках рака яичника. *Казанский медицинский журнал* 2022;103(4):608–16. DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ2022-608>
  - Bulatova L.F., Skripova V.S., Korotaeva A.V. et al. Recognition of mutant forms of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian cancer cells. *Kazanskij meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal* 2022;103(4):608–16. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ2022-608>
  29. Reshetnikova D., Bulatova L.F., Skripova V. et al. Effect of disulfide bonds and N-glycosylation on the recognition of the NaPi2b transporter by monoclonal antibodies. *Annals of Oncology* 2022;33(Suppl. 8):S1408. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.09.082
  30. Минигулова Л.Ф., Скрипова В.С., Нургуалиева А.К. и др. Распознавание натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами N-NaPi2b в клетках карциномы яичника. *Ученые записки Казанского университета* 2020;162(4):529–40. DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540  
Minigulova L.F., Skripova V.S., Nurgalieva A.K. Recognition of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies N-NaPi2b in ovarian cancer cells. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta = Scientific Notes of Kazan University* 2020;162(4):529–40 (In Russ.). DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540
  31. Firsova D., Levashov I., Reshetnikova D. et al. Analysis of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b expression in human tumor cell lines. *EJCI* 2022;52(S1):114–5. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13796>
  32. Bulatova L.F., Skripova V.S., Nurgalieva A.K. et al. Structurally constrained tumor-specific epitope within the largest extracellular domain of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b. *Ann Oncol* 2021;32(5):S368–9. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.08.304
  33. Makhov P., Golovine K., Teper E. et al. Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signalling and mediates cancer cell death. *Br J Cancer* 2014;110(4):899–907. DOI: 10.1038/bjc.2013.810
  34. Longo P.A., Kavran J.M., Kim M.S., Leahy D.J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol* 2013;529:227–40. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5
  35. Boichuk S., Dunaev P., Skripova V. et al. Unraveling the mechanisms of sensitivity to anti-FGF therapies in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (GIST) lacking secondary KIT mutations. *Cancers (Basel)* 2023;15(22):5354. DOI: 10.3390/cancers15225354
  36. Zavodszky M., Chen C.W., Huang J.K. et al. Disulfide bond effects on protein stability: designed variants of Cucurbita maxima trypsin inhibitor-V. *Protein Sci* 2001;10(1):149–60. DOI: 10.1110/ps.26801
  37. Karimi M., Ignasiak M.T., Chan B. et al. Reactivity of disulfide bonds is markedly affected by structure and environment: implications for protein modification and stability. *Sci Rep* 2016;6:38572. DOI: 10.1038/srep38572
  38. Feige M.J., Braakman I., Hendershot L.M. Basic principles, cellular regulation and engineering. In: *Oxidative folding of proteins*. Ed. by M.J. Feige. The Royal Society of Chemistry, 2018. Pp. 1–33.
  39. Bakshi T., Pham D., Kaur R., Sun B. Hidden relationships between N-glycosylation and disulfide bonds in individual proteins. *Int J Mol Sci* 2022;23(7):3742. DOI: 10.3390/ijms23073742

**Благодарность.** Исследование выполнено при инфраструктурной поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета («Приоритет-2030»).

**Acknowledgement.** The study was carried out with infrastructure support of the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (Priority-2030).

**Вклад авторов**

В.С. Скрипова: разработка дизайна исследования, проведение лабораторных исследований, анализ данных, написание текста статьи;  
Д.А. Фирсова, А.В. Килунов, Л.Ф. Булатова, М.А. Попутский: проведение лабораторных исследований, анализ данных;  
Р.Г. Киямова: разработка дизайна исследования, анализ данных, написание текста статьи, редактирование.

**Authors' contributions**

V.S. Skripova: research design development, laboratory research, data analysis, article writing;  
D.A. Firsova, A.V. Kilunov, L.F. Bulatova, M.A. Poputsky: laboratory research, data analysis;  
R.G. Kiyamova: research design development, data analysis, article writing, editing.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

В.С. Скрипова / V.S. Skripova: <https://orcid.org/0000-0002-6342-0390>  
Д.А. Фирсова / D.A. Firsova: <https://orcid.org/0009-0007-5744-1615>  
А.В. Килунов / A.V. Kilunov: <https://orcid.org/0009-0007-2262-4200>  
Л.Ф. Булатова / L.F. Bulatova: <https://orcid.org/0000-0001-6696-8477>  
М.А. Попутский / M.A. Poputsky: <https://orcid.org/0009-0008-0426-3621>  
Р.Г. Киямова / R.G. Kiyamova: <https://orcid.org/0000-0002-2547-2843>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (грант № 23-15-00456, <https://rscf.ru/project/23-15-00456/>).

**Funding.** The work was supported by the Russian Science Foundation grant (grant No. 23-15-00456, <https://rscf.ru/project/23-15-00456/>).

**Статья поступила:** 26.06.2024. **Принята к публикации:** 03.09.2024. **Опубликована онлайн:** 11.12.2024.

**Article submitted:** 26.06.2024. **Accepted for publication:** 03.09.2024. **Published online:** 11.12.2024.