

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-77-88>

Роль остатка пролина Р325 в распознавании эпитопа МХ35 натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках карциномы яичника

Л.Ф. Булатова, И.А. Слīdzюк, А.В. Килунов, В.С. Скрипова, 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

Введение. Одним из ключевых компонентов клеточных мембран являются мембранные белки, обеспечивающие широкий спектр функций – от транспорта и передачи сигналов до координации межклеточных взаимодействий. Среди них особый интерес представляет натрийзависимый фосфатный транспортер NaPi2b, играющий большую роль в поддержании гомеостаза фосфатов и содержащийся в большом количестве в ряде опухолевых клеток. В состав большого внеклеточного домена (ВКД) NaPi2b входит эпитоп МХ35, который представляет значительный интерес в контексте разработки моноклональных антител для таргетной терапии карциномы яичника и легкого. Распознавание эпитопа МХ35 зависит от конформации большого ВКД, обусловленной дисульфидными связями и гликозилированием. Между двумя остатками цистеина – С322 и С328 – находится остаток пролина Р325, который, как мы предполагаем, может участвовать в формировании конформации большого ВКД NaPi2b посредством образования дисульфидной связи С322–С328, влияющей на взаимодействие моноклональных антител и эпитопа МХ35.

Цель исследования – изучение влияния остатка пролина в положении 325 в области большого ВКД транспортера NaPi2b на взаимодействие моноклональных антител L3(28/1) с эпитопом МХ35.

Материалы и методы. В исследовании использованы клеточные линии эпителиальной карциномы яичника человека OVCAR-8 и OVCAR-4. Путем сайт-направленного мутагенеза остаток пролина Р325 NaPi2b заменили на остаток аланина, в результате чего были получены клетки OVCAR-8, стабильно экспрессирующие мутантный вариант NaPi2b^{р.Р325А}. С помощью вестерн-блот-анализа и лазерной конфокальной микроскопии изучено влияние замены р.Р325А NaPi2b на взаимодействие моноклональных антител L3(28/1) и эпитопа МХ35. Для определения влияния мутации р.Р325А на формирование дисульфидных связей в большом ВКД NaPi2b проводили модификацию тиоловых групп остатков цистеина с использованием малеимидсодержащих соединений.

Результаты. Выявлено, что замена р.Р325А NaPi2b не оказывает значительного влияния на распознавание эпитопа МХ35 антителами L3(28/1) как при вестерн-блот-анализе, так и при конфокальной микроскопии. Количество дисульфидных связей в большом ВКД NaPi2b^{р.Р325А} не менялось по сравнению с NaPi2b дикого типа.

Заключение. Замена р.Р325А транспортера NaPi2b не оказывает значимого влияния на распознавание эпитопа МХ35 антителами и формирование дисульфидных связей в большом ВКД NaPi2b. Дальнейшие исследования могут быть направлены на более детальное изучение роли других замен в большом ВКД NaPi2b и их влияния на доступность эпитопа для антител.

Ключевые слова: NaPi2b, эпитоп МХ35, остаток пролина Р325, моноклональное антитело, карцинома яичника

Для цитирования: Булатова Л.Ф., Слīdzюк И.А., Килунов А.В. и др. Роль остатка пролина Р325 в распознавании эпитопа МХ35 натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках карциномы яичника. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):77–88.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-77-88>

The role of proline P325 residue in the recognition of the MX35 epitope of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian carcinoma cells

L.F. Bulatova, I.A. Slidzuk, A.V. Kilunov, V.S. Skripova, R.G. Kiyamova

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

Contacts: Ramziya Gallyamovna Kiyamova kiyamova@mail.ru

Introduction. One of the key components of cell membranes are membrane proteins, which provide a wide range of functions – from transport and signal transmission to coordination of intercellular interactions. Among them, of particular interest is the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b, which plays an important role in maintaining phosphate homeostasis and is characterized by an increased content in a number of tumor cells. The large extracellular domain (ECD) of NaPi2b contains the MX35 epitope, which is of significant interest in the context of the development of monoclonal antibodies for targeted therapy of ovarian and lung carcinoma. Recognition of the MX35 epitope depends on the conformation of the large ECD, which is influenced by disulfide bonds and glycosylation. Between cysteine residues C322 and C328, there is a proline residue P325, which we hypothesize may contribute to the conformation of the NaPi2b large ECD by forming a disulfide bond between C322 and C328, potentially affecting the interaction of monoclonal antibodies with the MX35 epitope.

Aim. To study the impact of the proline residue at position 325 in the large ECD of the transporter NaPi2b on the interaction of monoclonal antibodies L3(28/1) with the MX35 epitope.

Materials and methods. The human ovarian epithelial carcinoma cell lines OVCAR-8 and OVCAR-4 were used in the study. By site-directed mutagenesis, the proline residue P325 of NaPi2b was replaced with an alanine residue, resulting in OVCAR-8 cells stably expressing the mutant variant of NaPi2b^{p.P325A}. The effect of the p.P325A substitution in NaPi2b on the interaction of monoclonal antibodies L3(28/1) with the MX35 epitope was analyzed using western blotting and laser confocal microscopy. To assess the impact of the p.P325A mutation on the formation of disulfide bonds in the NaPi2b large ECD, cysteine residues thiol groups were modified using maleimide-containing compounds.

Results. It was found that the substitution of p.P325A in NaPi2b did not significantly affect the recognition of the MX35 epitope by L3(28/1) antibodies, as shown by both western blot analysis and confocal microscopy. The number of disulfide bonds in the large ECD of the mutant NaPi2b^{p.P325A} form was unchanged compared to wild-type NaPi2b.

Conclusion. Substitution p.P325A in the NaPi2b transporter does not have a significant effect on the recognition of the MX35 epitope by antibodies or the formation of disulfide bonds in the NaPi2b large ECD. Future studies could focus on a more detailed investigation of the roles of other substitutions in the NaPi2b large ECD and their influence on the epitope's accessibility to antibodies.

Keywords: NaPi2b, MX35 epitope, proline residue P325, monoclonal antibody, ovarian carcinoma

For citation: Bulatova L.F., Slidzuk I.A., Kilunov A.V. et al. The role of proline P325 residue in the recognition of the MX35 epitope of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian carcinoma cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):77–88. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-77-88>

ВВЕДЕНИЕ

Мембранные белки представляют собой важный класс молекул, обеспечивающих регуляцию широкого спектра биологических процессов, включая трансмембранный транспорт веществ, рецепторно-опосредованное распознавание, передачу внутриклеточных сигналов, а также межклеточные взаимодействия [1]. Около 30 % всех генов, аннотированных в полном геноме клетки, кодируют мембранные белки [2]. Локализация на клеточной мембране делает такие белки особенно ценными с точки зрения разработки таргетных лекарственных препаратов [3]. В связи с этим исследование пространственной организации и конформационных особенностей мембранных белков, в частности их внеклеточных доменов, представляет собой приоритетное направление для выявления новых молекулярных мишеней, пригодных для разработки таргетной терапии.

Транспортер NaPi2b, который входит в семейство натрийзависимых фосфатных транспортеров SLC34, функционирует как трансмембранный переносчик фосфата и играет большую роль в регуляции фосфатного обмена у человека, млекопитающих и других позвоночных организмов [4]. Высокая экспрессия гена, кодирующего транспортер NaPi2b, наблюдается в клетках различных злокачественных новообразований, что делает NaPi2b привлекательной мишенью для разработки таргетных противоопухолевых препаратов [5–10]. Предметом особого интереса является большой внеклеточный домен (ВКД, 188–361 а.о.) NaPi2b, поскольку именно в его пределах локализуется эпитоп MX35 (311–340 а.о.) [11], который служит мишенью для терапевтических моноклональных антител (мАТ), разрабатываемых для таргетного лечения карцином яичника и легкого [12, 13]. Установлено, что доступность эпитопа MX35 для связывания

с антителами определяется структурными особенностями большого ВКД NaPi2b, в частности гликозилизацией и наличием дисульфидных связей [14]. Обработка лизатов опухолевых клеток с высокой экспрессией NaPi2b восстанавливающими агентами, такими как ди-тиотреитол (ДТТ), приводит к утрате способности МАТ к распознаванию эпитопа MX35 при проведении вестерн-блот-анализа [11, 15–17]. Показано, что замена остатков цистеина в позициях 303, 322, 328 и 350 на остатки аланина, моделирующая условия, при которых дисульфидные связи нарушены, вызывает полную утрату связывания эпитопа MX35 с МАТ. Эти данные свидетельствуют о большом значении остатков цистеина в формировании пространственной структуры большого ВКД NaPi2b, необходимой для обеспечения доступности эпитопа MX35 [18, 19].

Интересно, что в районе эпитопа MX35 располагается остаток пролина в положении 325. Он находится в непосредственной близости от остатков цистеина в позициях 322 и 328, которые согласно структурной модели, предсказанной с использованием алгоритма AlphaFold DeepMind, могут участвовать в формировании дисульфидной связи [15]. Такая пространственная организация указывает на возможную роль остатка пролина в стабилизации конформации большого ВКД и, как следствие, доступности эпитопа MX35. С учетом способности остатка пролина обеспечивать изгибы в полипептидной цепи за счет своей жесткой циклической структуры [20] мы предположили, что остаток пролина в позиции 325 может опосредованно вызывать образование дисульфидной связи между остатками цистеина C322 и C328, обуславливая изменение конформации большого ВКД и сближая данные остатки цистеина в пространстве.

Таким образом, исследование участия остатка пролина P325 в формировании дисульфидной связи между остатками цистеина C322 и C328 в большом ВКД NaPi2b, а также его роли в распознавании эпитопа MX35 МАТ представляет собой актуальное направление. С этой целью мы заменили остаток пролина в позиции 325 на остаток аланина методом сайт-направленного мутагенеза и изучили распознавание эпитопа MX35 МАТ с использованием вестерн-блот-анализа и лазерной конфокальной микроскопии. Кроме того, было проведено сравнение количества дисульфидных связей в большом ВКД мутантной формы NaPi2b (NaPi2b^{P325A}) и транспортера дикого типа (NaPi2b^{WT}) с помощью модификации тиоловых групп остатков цистеина с применением малеимидсодержащих соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моноклональные антитела. Для распознавания NaPi2b^{P325A} и NaPi2b^{WT} в ходе вестерн-блот-анализа и конфокальной микроскопии использовали первичные мышинные МАТ L3(28/1) [21], распознающие эпитоп MX35 в области большого ВКД транспортера NaPi2b, и мышинные МАТ N-NaPi2b(15/1), направленные

против внутриклеточного N-концевого домена NaPi2b [17]. Для контроля загрузки белка при проведении вестерн-блот-анализа применяли первичные мышинные МАТ против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH; HyTest, Россия). В качестве вторичных антител использовали козы антигенов, которые связываются с Fc-фрагментом мышинных антител, конъюгированные с пероксидазой хрена или с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США).

Клеточные линии и бактериальные штаммы. В исследовании использованы клеточные линии карциномы яичника человека: OVCAR-8 (Creative Biolabs, США), в которой отсутствует эндогенная экспрессия гена транспортера NaPi2b, и OVCAR-4 (Merck Millipore, США), эндогенно экспрессирующая ген транспортера NaPi2b^{WT}, в качестве положительного контроля [16]. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 («Панэко», Россия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Capricorn, Германия), 2 мМ аланил-глутамин («Панэко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина («Панэко», Россия), 100 мкг/мл стрептомицина («Панэко», Россия). Клетки почки эмбриона человека HEK-293Т (ATCC, США) использовали для получения лентивирусных частиц. Клетки культивировали в питательной среде DMEM («Панэко», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Capricorn, Германия), 4 мМ аланил-глутамин («Панэко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина («Панэко», Россия), 100 мкг/мл стрептомицина («Панэко», Россия). Все клеточные линии культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Для создания рекомбинантных плазмид, кодирующих транспортер NaPi2b с аминокислотной заменой р.Р325А, использовали компетентные клетки бактерий *Escherichia coli* (*E. coli*) штамма XL1-Blue («Евроген», Россия), которые культивировали в лизогенной среде LB (PanReac AppliChem, Германия).

Получение клеток карциномы яичника OVCAR-8, синтезирующих NaPi2b^{P325A}. Клетки карциномы яичника OVCAR-8, синтезирующие NaPi2b^{P325A}, получали с помощью лентивирусной трансдукции. Для этого методом сайт-направленного мутагенеза сначала получали рекомбинантную плазмиду, содержащую комплементарную ДНК (кДНК) мутантной формы транспортера NaPi2b с заменой остатка пролина в положении 325 на остаток аланина, с использованием набора реактивов Quick Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, США) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве матрицы применяли рекомбинантную плазмиду для транзientной трансфекции pcDNA3.1(+)/NaPi2b, содержащую кДНК дикого типа фосфатного транспортера NaPi2b (*SLC34A2*, NM_006424.2). Наличие целевой мутации подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру.

Для сайт-направленного мутагенеза использовали следующие праймеры: прямой праймер 5'-ССААСAG

AGGGAAGCGGAGGTGCAGTTAG-3', обратный праймер 5'-СТААСТGCACCTCCGCTTCCCTCTGTTGG-3'. Затем кДНК NaPi2b^{p.P325A} клонировали в лентивирусный вектор pLV-CMV-H4-puro с помощью рестриктаз EcoRI и BamHI с последующей амплификацией в клетках *E. coli* штамма XL-1 Blue и выделением плазмидной ДНК с использованием набора Plasmid MiniPrep («Евроген», Россия). Лентивирусные частицы получали путем трансфекции клеток HEK-293T упаковочными плазмидами psPAX2 (Addgene #12260), pMD2.G (Addgene #12259) и рекомбинантным лентивирусным вектором pLV-CMV-H4-puro/NaPi2b^{p.P325A}. Лентивирусную трансдукцию клеток OVCAR-8 проводили, как описано ранее [22], с последующим отбором клональных сублиний методом редкого посева. В экспериментах также использовали полученные нами ранее клетки OVCAR-8, стабильно экспрессирующие NaPi2b^{WT} (OVCAR-8/NaPi2b^{WT}) или пустой вектор pLV-CMV-H4-puro без вставки (OVCAR-8/empty).

Модификация тиоловых групп остатков цистеина.

Метод разработан для определения количества дисульфидных связей между остатками цистеина во внеклеточных доменах белков [23]. При его использовании свободные сульфгидрильные группы остатков цистеина, не вовлеченные в формирование дисульфидных связей, блокируются 3-(N-малеимидопропионил)-биоцитином (MPB). Затем существующие во внеклеточных доменах дисульфидные связи восстанавливаются с помощью трис(2-карбоксиэтил)-фосфина (ТСЕР), высвобождая новые тиоловые группы, которые далее ковалентно модифицируются метоксиполиэтиленгликолем малеимидом-5000 (mPEG-Mal-5000). Эта модификация сопровождается увеличением молекулярной массы исследуемого белка пропорционально числу свободных сульфгидрильных групп (около 5 кДа на одну группу), что можно оценить по его электрофоретической подвижности МАТ в вестерн-блот-анализе.

Суспензии живых клеток (по 2 млн клеток на образец) линий OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT} последовательно обрабатывали химическими агентами MPB, ТСЕР и mPEG-Mal-5000. Клетки инкубировали со 100 мкМ MPB в течение 13 мин, с 2,5 мМ ТСЕР (для восстановления дисульфидных связей) в течение 40 мин и модифицировали с помощью 2,5 мМ mPEG-Mal-5000 в течение 40 мин. Все инкубации проводили в условиях 37 °C и 5 % CO₂. После каждой инкубации клетки 3 раза отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с последующим центрифугированием при 900 об/мин в течение 3 мин.

Вестерн-блот-анализ. Для проведения вестерн-блот-анализа получали растворимые белковые фракции лизатов клеток OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}, OVCAR-8/NaPi2b^{WT}, OVCAR-8/empty и OVCAR-4. Перед загрузкой образцов в гель для проведения электрофореза растворимые белковые фракции смешивали с загрузочным буфером (0,25 М Трис основной, 30 % глицерин, 0,15 % бромфеноловый синий, 10 % додецилсуль-

фат натрия, pH 6,8) с добавлением 0,5 М восстанавливающего дисульфидные связи агента ДТТ или без него. Образцы инкубировали 5 мин при температуре 95 °C. Электрофорез белков осуществляли в 10 % полиакриламидном геле в камере MINI-Protean TETRA (Bio-Rad, США).

Перенос белков с геля на PVDF-мембрану проводили методом мокрого переноса, используя буфер (0,25 М Трис основной, 1,92 М глицин, 20 % метанол, pH 8,3). В качестве положительного контроля применяли образцы, полученные из клеток OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-4. В качестве отрицательного контроля использовали образцы, полученные из клеток OVCAR-8/empty. Для распознавания эпитопа MX35 транспортера NaPi2b применяли первичные мышиные МАТ L3(28/1). Уровень содержания транспортера NaPi2b в исследуемых образцах оценивали с помощью первичных мышиных МАТ N-NaPi2b(15/1) против внутриклеточного N-концевого домена NaPi2b, распознавание которого не зависит от добавления восстанавливающих дисульфидные связи агентов и аминокислотных замен в области большого ВКД [17]. Для контроля равномерной загрузки белков использовали первичные мышиные МАТ против GAPDH. В качестве вторичных антител применяли козы анти тела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена. Хемилюминесцентный сигнал детектировали с помощью прибора ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США) с использованием программы Image Lab (Bio-Rad, США).

Эксперименты проводили в 3 биологических повторах. Для анализа влияния замены p.P325A на доступность эпитопа MX35 транспортера NaPi2b для МАТ L3(28/1) проводили количественную оценку его распознавания по интенсивности хемилюминесцентного сигнала от МАТ L3(28/1) с учетом уровня содержания транспортера NaPi2b и загрузки образцов. Денситометрический анализ интенсивности хемилюминесцентного сигнала выполняли в программе Image Lab для образцов лизатов клеток OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}, не содержащих ДТТ. Сначала для учета погрешностей при загрузке образцов интенсивность сигнала для МАТ L3(28/1) и N-NaPi2b(15/1) каждого образца нормализовали на интенсивность сигнала от МАТ против GAPDH для этих же образцов. Затем для учета уровня содержания транспортера NaPi2b нормализованные значения интенсивности сигнала для МАТ L3(28/1) делили на нормализованные значения интенсивности сигнала для МАТ N-NaPi2b(15/1) в тех же образцах. Полученные значения использовали для статистического анализа, который проводили в программе GraphPad Prism с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Лазерная конфокальная микроскопия. Для изучения взаимодействия МАТ с эпитопом MX35 в NaPi2b^{p.P325A} с помощью лазерной конфокальной микроскопии использовали интактные (живые) и/или фиксированные и пермеабелизованные клетки карциномы яичника

OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}. За 1 день до проведения эксперимента клетки предварительно пассивировали на культуральные чашки Петри со стеклянным дном (Mattek, США) в количестве 50 тыс. на чашку.

Интактные клетки инкубировали с первичными мАТ L3(28/1) в среде RPMI-1640 без содержания фенолового красного («Панэко», Россия) в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. Образцы отмывали от первичных антител ФСБ 3 раза по 5 мин. После отмывки клетки инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488, в течение 30 мин при температуре 37 °С. Образцы отмывали от вторичных антител ФСБ 3 раза по 5 мин.

Оценку уровня содержания транспортера NaPi2b проводили в фиксированных и пермеабилizованных клетках OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} с использованием мАТ N-NaPi2b(15/1). Клетки фиксировали 4 % раствором параформальдегида (PanReas AppliChem, Германия) в течение 20 мин при комнатной температуре. Для удаления остатков параформальдегида их промывали ФСБ 3 раза по 5 мин. Блокировку и пермеабилзацию клеток проводили блокирующим буфером (3 % раствор бычьего сывороточного альбумина на ФСБ), содержащим 0,1 % Тритона X-100 (PanReas AppliChem, Германия). Инкубацию клеток с первичными мАТ N-NaPi2b(15/1) осуществляли в течение 1 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере. Образцы отмывали от первичных антител ФСБ 3 раза по 5 мин. После отмывки клетки инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США), в блокирующем буфере при комнатной температуре в течение 30 мин. Образцы отмывали от вторичных антител ФСБ 3 раза по 5 мин.

Для визуализации ядер интактных и фиксированных клеток использовали красители Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, США) в конечной концентрации 1 мкг/мл и йодид пропидия (Thermo Fisher Scientific, США) в конечной концентрации 0,1 мкг/мл с добавлением 10 мкг/мл РНКазы А (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы инкубировали с красителями за 30 мин до визуализации на микроскопе, без отмывки. Анализ образцов проводили с помощью лазерного конфокального микроскопа Stedyscon (Abberior, США).

Эксперименты выполняли в 3 биологических повторях. По результатам эксперимента проводили цифровую и статистическую обработку флуоресцентного сигнала, полученного с микрофотографий. Количественную оценку интенсивности флуоресценции выполняли с использованием программного обеспечения ImageJ на основе анализа 9 полей изображения для каждого образца. Для каждого поля рассчитывали интегральную интенсивность (integrated density) по каналу Alexa Fluor 488 (зеленый спектр 488/520 нм — флуоресценция соответствует сигналу от вторичных антител, специфичных к первичным антителам против NaPi2b) и количество клеток, окрашенных Hoechst

33342 (синий спектр 405/525 нм — используется для окрашивания ядерной ДНК). Для повышения точности измерений из интегральной интенсивности сигнала Alexa Fluor 488 вычитали фоновую флуоресценцию, которую вычисляли путем умножения средней интенсивности (mean gray value) по 6 областям фона одного поля зрения на площадь изображения. Для каждого из 9 полей изображения определяли удельную интенсивность флуоресценции Alexa Fluor 488 на 1 клетку, которую рассчитывали путем деления интегральной интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 488 после вычитания фоновой флуоресценции на количество клеток, окрашенных Hoechst 33342. На основе полученных данных по 9 полям изображения для каждого образца определяли среднее значение удельной интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 488.

Для анализа влияния замены p.P325A на доступность эпитопа MX35 для распознавания мАТ L3(28/1) среднюю удельную интенсивность флуоресценции Alexa Fluor 488 образцов клеток OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}, окрашенных мАТ L3(28/1), делили на среднюю удельную интенсивность флуоресценции Alexa Fluor 488 образцов этих же клеток, окрашенных мАТ N-NaPi2b(15/1), для учета уровня содержания транспортера в исследуемых клетках. Полученные значения использовали для статистического анализа с применением U-критерия Манна–Уитни в программе GraphPad Prism. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распознавание эпитопа MX35 моноклональными антителами в NaPi2b^{p.P325A}. На рис. 1 представлена схема получения клеток карциномы яичника OVCAR-8, стабильно экспрессирующих NaPi2b^{WT} и NaPi2b^{p.P325A}. На рис. 1, а изображена модель структуры большого ВКД NaPi2b^{WT} из базы AlphaFold DeepMind [15], в области которого находятся 4 остатка цистеина C303, C322, C328 и C350. Между остатками цистеина C322 и C328, которые согласно модели AlphaFold образуют дисульфидную связь (см. рис. 1, а), расположен остаток пролина в положении 325 (P325). Мы получили клетки карциномы яичника OVCAR-8, экспрессирующие либо NaPi2b^{WT} (OVCAR-8/NaPi2b^{WT}), либо NaPi2b^{p.P325A} (OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}), используя сайт-направленный мутагенез и лентивирусную трансдукцию. Предполагается, что в результате данной замены может нарушаться образование дисульфидной связи в области большого ВКД NaPi2b (см. рис. 1, б).

Для оценки влияния мутации p.P325A на распознавание эпитопа MX35 мАТ L3(28/1) проведен вестерн-блот-анализ лизатов OVCAR-8/NaPi2b^{WT} или OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}. Анализ проводили как в присутствии ДТТ, так и без него, что позволило оценить степень распознавания эпитопа MX35 в зависимости от наличия или отсутствия дисульфидных связей внутри большого ВКД NaPi2b. Для верификации

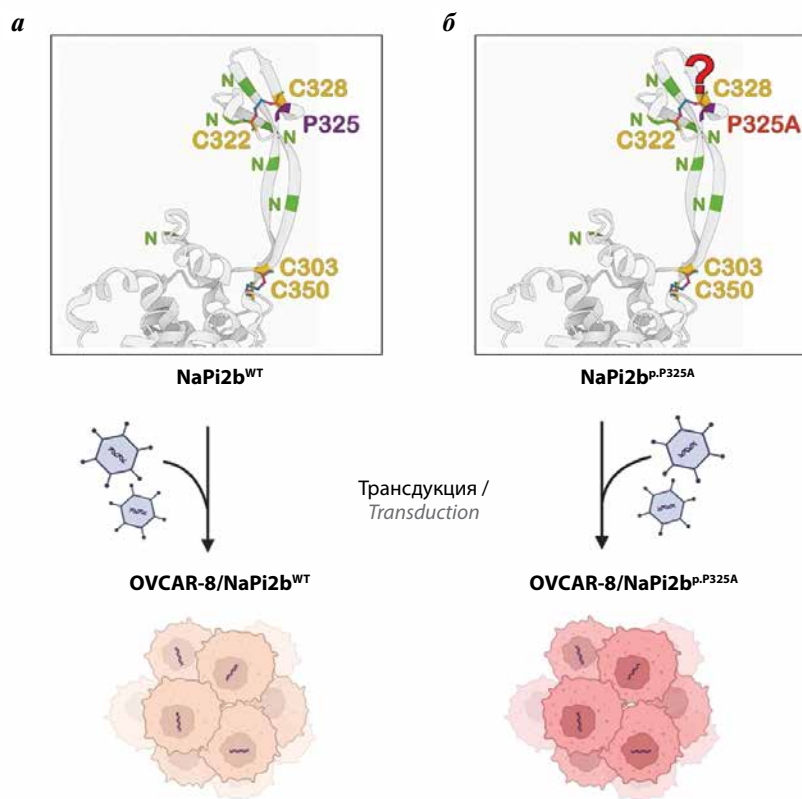


Рис. 1. Схема получения клеток карциномы яичника OVCAR-8, стабильно экспрессирующих дикий тип транспортера NaPi2b (NaPi2b^{WT}) (а) или его мутантную форму с заменой остатка пролина на остаток аланина в положении 325 (NaPi2b^{p.P325A}) (б)
Fig. 1. Schematic representation of generating OVCAR-8 ovarian carcinoma cells stably expressing either the wild-type NaPi2b transporter (NaPi2b^{WT}) (а) or its mutant form with a proline-to-alanine substitution at position 325 (NaPi2b^{p.P325A}) (б)

уровня экспрессии NaPi2b в образцах использовали МАТ N-NaPi2b(15/1), направленные против N-концевого домена транспортера, эпитоп которого не чувствителен к восстановлению дисульфидных связей (рис. 2, а). Полученные данные подтвердили наличие как NaPi2b^{WT}, так и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} в соответствующих клетках карциномы яичника (см. рис. 2, а, дорожки 1–4), а также эндогенного транспортера NaPi2b в образцах клеток OVCAR-4, которые использовали в качестве положительного контроля (см. рис. 2, а, дорожки 7 и 8). Следует отметить, что интенсивность хемилюминесцентного сигнала не уменьшалась при добавлении ДТТ, как и ожидалось для МАТ N-NaPi2b(15/1) (см. рис. 2, а) [17]. Результаты вестерн-блот-анализа образцов клеток OVCAR-8/emrty, которые использовали в качестве отрицательного контроля, подтвердили отсутствие в них транспортера NaPi2b (см. рис. 2, а, дорожки 5 и 6).

Результаты вестерн-блот-анализа распознавания эпитопа MX35 антителами L3(28/1) показали, что интенсивность специфического сигнала снижается во всех образцах при добавлении ДТТ, что связано с изменением доступности эпитопа MX35 для МАТ при восстановлении дисульфидных связей (рис. 2, б, дорожки 2, 4, 8) и подтверждает полученные ранее данные [11, 15]. Для оценки

влияния замены остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 на распознавание эпитопа MX35 МАТ L3(28/1) проведена количественная обработка результатов вестерн-блот-анализа, полученных для NaPi2b^{p.P325A} и NaPi2b^{WT}. На основе этих данных построен график, отражающий относительную интенсивность сигнала, соответствующего связыванию антител с эпитопом MX35, с учетом уровня экспрессии рекомбинантного NaPi2b в клетках OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT} (рис. 2, в). Выявлено незначительное повышение распознавания NaPi2b^{p.P325A} по сравнению с NaPi2b^{WT}, однако в ходе статистической обработки данных с применением U-критерия Манна–Уитни не обнаружено значимых различий в связывании антител L3(28/1) с эпитопом MX35 в NaPi2b^{p.P325A} по сравнению с NaPi2b^{WT}.

Далее мы провели сравнительный анализ распознавания NaPi2b^{p.P325A} и NaPi2b^{WT} в клетках OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT} соответственно с использованием лазерной конфокальной микроскопии. Для начала был оценен уровень содержания рекомбинантного NaPi2b в пермеабилizованных клетках с использованием антител N-NaPi2b(15/1), направленных против внутриклеточного N-концевого домена

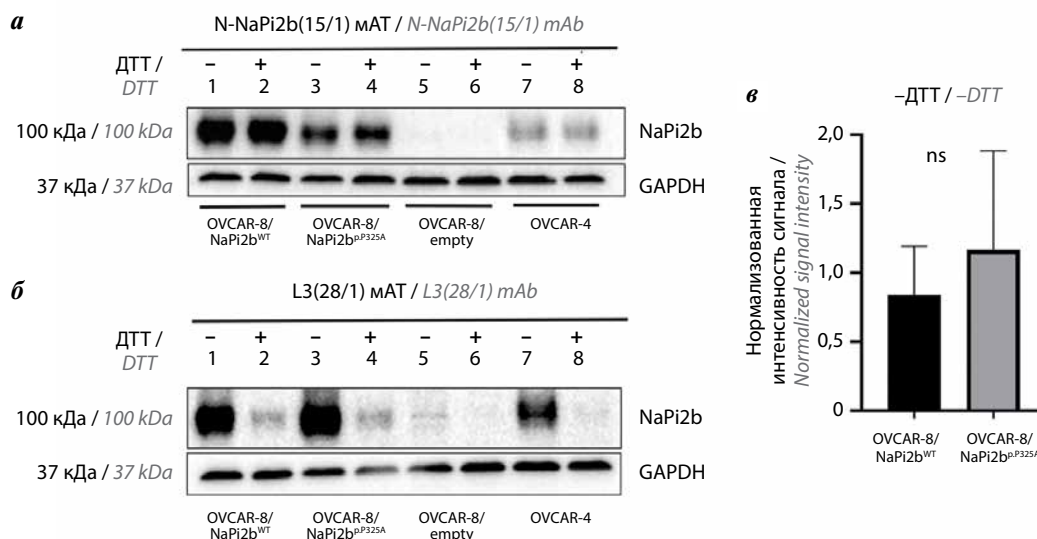


Рис. 2. Результаты вестерн-блот-анализа содержания рекомбинантного натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами (мАТ) N-NaPi2b(15/1) против N-концевого домена транспортера (а) и доступности эпитопа MX35 NaPi2b для распознавания мАТ L3(28/1) (б). Сравнение распознавания эпитопа MX35 антителами L3(28/1) в мутантной форме NaPi2b с заменой остатка пролина на остаток аланина в положении 325 (NaPi2b^{P325A}) и NaPi2b дикого типа (NaPi2b^{WT}) с учетом уровня содержания белка NaPi2b в исследуемых образцах без добавления дитиотреитола (ДТТ) (в). GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; ns — отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$)

Fig. 2. Western blot analysis of recombinant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b content using N-NaPi2b(15/1) monoclonal antibodies (mAb) against the N-terminal domain of the transporter (a), and the availability of the MX35 NaPi2b epitope for recognition by L3(28/1) mAb (b). Comparison of MX35 epitope recognition by L3(28/1) antibodies in NaPi2b^{P325A} and NaPi2b^{WT}, considering the NaPi2b protein levels in the samples without dithiothreitol (DTT) addition (v). GAPDH — glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ns — no statistically significant differences ($p > 0.05$)

NaPi2b (рис. 3, а). Статистическая обработка данных микроскопии показала, что уровень флуоресцентного сигнала в клетках, экспрессирующих NaPi2b^{P325A}, был значимо выше по сравнению с клетками, экспресси-

рующими NaPi2b^{WT} (рис. 3, б). Это свидетельствует о более высоком уровне экспрессии NaPi2b^{P325A} по сравнению с NaPi2b^{WT} в исследуемых клетках OVCAR-8.

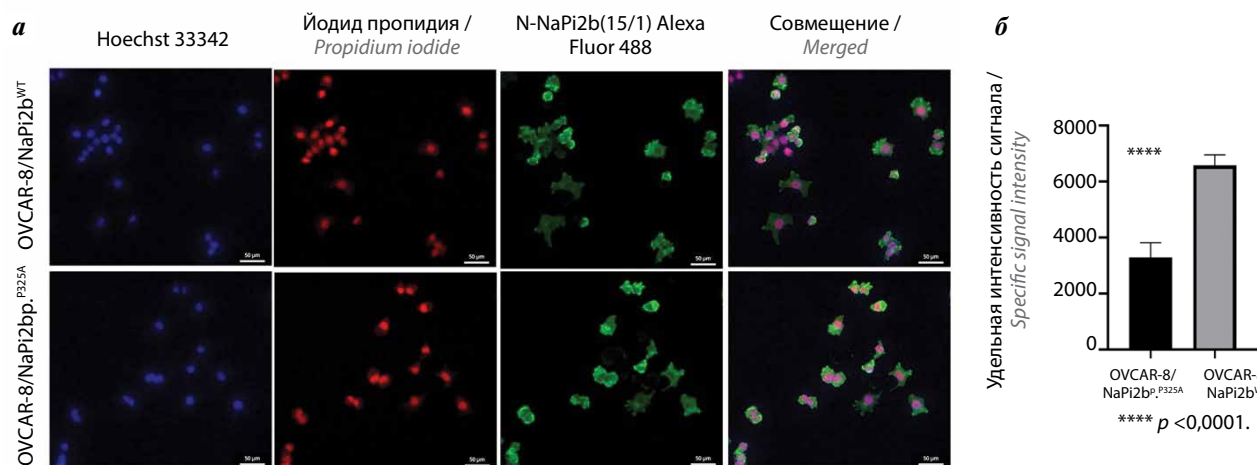


Рис. 3. Содержание рекомбинантного транспортера NaPi2b в клетках OVCAR-8, экспрессирующих NaPi2b^{WT} и NaPi2b^{P325A} по данным лазерной конфокальной микроскопии: а — визуализация NaPi2b в фиксированных и пермеабилizованных клетках с использованием моноклональных антител N-NaPi2b(15/1), распознающих N-концевой домен транспортера; б — содержание NaPi2b в клетках OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{P325A} (удельная интенсивность флуоресценции). Статистическая значимость различий определена с использованием U-критерия Манна–Уитни. NaPi2b^{P325A} — мутантная форма NaPi2b с заменой остатка пролина на остаток аланина в положении 325; NaPi2b^{WT} — NaPi2b дикого типа

Fig. 3. Recombinant NaPi2b transporter content in OVCAR-8 cells expressing NaPi2b^{WT} and NaPi2b^{P325A} according to laser confocal microscopy: (a) visualization of NaPi2b in fixed and permeabilized cells using N-NaPi2b(15/1) monoclonal antibody recognizing the N-terminal domain of the transporter; (b) NaPi2b content between OVCAR-8/NaPi2b^{WT} and OVCAR-8/NaPi2b^{P325A} cells based on specific fluorescence intensity. Statistical significance of differences was calculated using the Mann–Whitney U-criterion. NaPi2b^{P325A} — mutant form of NaPi2b with a proline residue replaced by alanine at position 325; NaPi2b^{WT} — wild-type NaPi2b

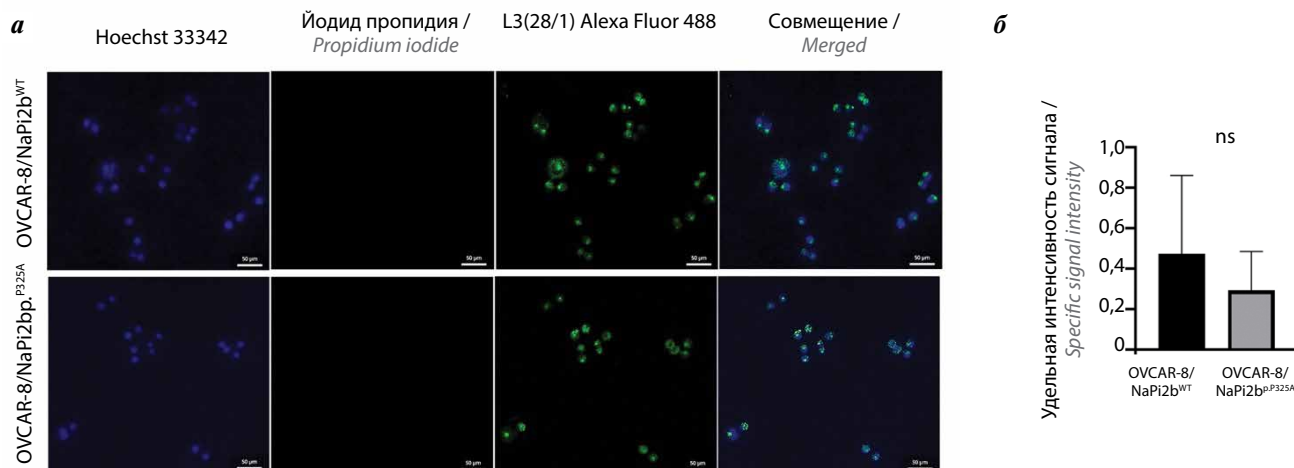


Рис. 4. Распознавание эпитопа MX35 транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках OVCAR-8, экспрессирующих NaPi2b^{WT} и NaPi2b^{p.P325A}, методом лазерной конфокальной микроскопии: а – визуализация NaPi2b в живых интактных клетках с использованием моноклональных антител L3(28/1), распознающих эпипептид MX35; б – сравнение распознавания эпитопа MX35 NaPi2b в клетках OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} на основе удельной интенсивности флуоресценции. Статистическая значимость различий рассчитана с использованием U-критерия Манна–Уитни. NaPi2b^{p.P325A} – мутантная форма NaPi2b с заменой остатка пролина на остаток аланина в положении 325; NaPi2b^{WT} – NaPi2b дикого типа; ns – отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$)

Fig. 4. Recognition of the MX35 epitope of the NaPi2b transporter by monoclonal antibodies in OVCAR-8 cells expressing NaPi2b^{WT} and NaPi2b^{p.P325A} by laser confocal microscopy: a – visualization of NaPi2b in live intact cells using L3(28/1) monoclonal antibody recognizing the MX35 epitope; б – comparison of MX35 epitope recognition by NaPi2b between OVCAR-8/NaPi2b^{WT} and OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} cells based on specific fluorescence intensity. Statistical significance of differences was calculated using the Mann–Whitney U-criterion. NaPi2b^{p.P325A} – mutant form of NaPi2b with a proline residue replaced by alanine at position 325; NaPi2b^{WT} – wild-type NaPi2b; ns – no statistically significant differences ($p > 0.05$)

На следующем этапе работы проанализирована связь между заменой остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 в большом ВКД NaPi2b и доступностью эпитопа MX35 для распознавания мАТ L3(28/1). Интактные клетки карциномы яичника OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT} инкубировали с мАТ L3(28/1) и визуализировали с помощью микроскопии (рис. 4, а). Для подтверждения целостности плазматической мембраны исследуемых клеток использовали окрашивание йодидом пропидия. Для оценки количества клеток проводили окрашивание ядер Hoechst 33342. Отсутствие флуоресцентного сигнала в красном канале указывает на то, что мембрана клеток остается непроницаемой для йодида пропидия. Это свидетельствует о сохранении интактности клеток. Таким образом, флуоресцентный сигнал в зеленом канале соответствует мембранному окрашиванию NaPi2b и локализации эпитопа MX35 на поверхности клеток (см. рис. 4, а).

Для статистической оценки влияния замены остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 на эффективность распознавания эпитопа MX35 антителами L3(28/1) проанализированы количественные данные, полученные с помощью лазерной конфокальной микроскопии интактных клеток OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT}, с учетом уровня экспрессии NaPi2b в соответствующих образцах, как описано в разделе «Материалы и методы». Несмотря на то что в среднем распознавание NaPi2b^{p.P325A} антителами L3(28/1) оказалось хуже по сравнению с NaPi2b^{WT}, различия не были статистически значимыми (рис. 4, б).

Полученные данные свидетельствуют о том, что замена р.Р325А в транспортере NaPi2b не оказывает существенного влияния на доступность эпитопа MX35 для распознавания мАТ L3(28/1) при анализе с использованием конфокальной микроскопии.

Таким образом, результаты вестерн-блот-анализа и лазерной конфокальной микроскопии не подтвердили наличие значимых различий в узнаваемости эпитопа MX35 антителами L3(28/1) между NaPi2b^{p.P325A} и NaPi2b^{WT}. В ходе статистической обработки данных не выявлено значимого изменения уровня связывания антител с эпипептидом MX35 в мутантной форме NaPi2b^{p.P325A}.

Модификация тиоловых групп остатков цистеина в NaPi2b^{p.P325A}. В ходе выполнения данной работы изучено влияние замены р.Р325А на количество дисульфидных связей в большом ВКД NaPi2b. Для этого мы использовали метод химической модификации тиоловых групп остатков цистеина малеимидсодержащими соединениями [23]. Исследование проводили на живых клетках OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT} для модификации тиоловых групп остатков цистеина, локализованных во ВКД транспортера NaPi2b, без воздействия на внутриклеточные домены, также содержащие остатки цистеина. Лизаты клеток после химической модификации использовали для вестерн-блот-анализа электрофоретической подвижности транспортера NaPi2b антителами N-NaPi2b(15/1). Результаты вестерн-блот-анализа лизатов модифицированных и немодифицированных клеток представлены на рис. 5.

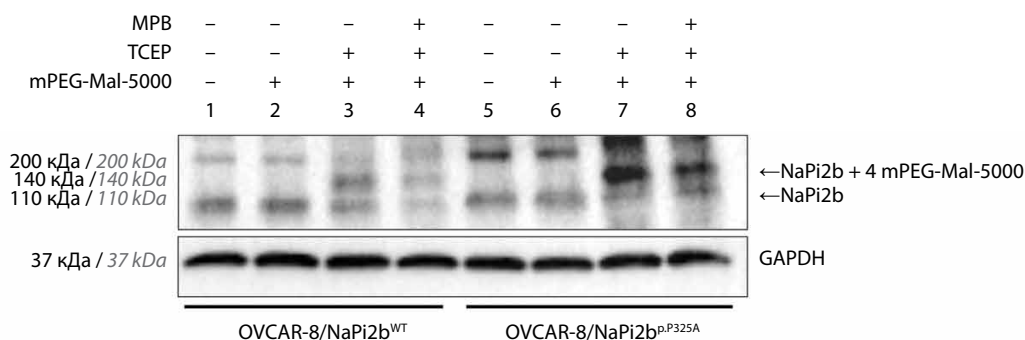


Рис. 5. Результаты вестерн-блот-анализа лизатов клеток карциномы яичника OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{P.325A} после модификации maleimидсодержащими соединениями. Детекцию NaPi2b проводили с использованием моноклональных антител N-NaPi2b(15/1). MPB — 3-(N-maleimidopropionyl)-биоцитин; TCEP — трис-(2-карбоксиэтил)-фосфин гидрохлорида; mPEG-Mal-5000 — метоксиполиэтилен-гликоль maleimид-5000; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

Fig. 5. Results of Western blot analysis of lysates of OVCAR-8/NaPi2b^{WT} and OVCAR-8/NaPi2b^{P.325A} ovarian carcinoma cells after modification with maleimide-containing compounds. NaPi2b detection was performed using N-NaPi2b(15/1) monoclonal antibody. MPB — 3-(N-maleimidopropionyl)-biocytin. TCEP — tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride; mPEG-Mal-5000 — methoxypolyethylene glycol maleimide 5000; GAPDH — glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Специфический сигнал, детектируемый в ходе вестерн-блот-анализа с использованием антител N-NaPi2b(15/1), наблюдался в области около 100 кДа в лизатах немодифицированных клеток как OVCAR-8/NaPi2b^{P.325A}, так и OVCAR-8/NaPi2b^{WT}, что соответствует молекулярной массе NaPi2b без воздействия модифицирующих и восстанавливающих агентов (см. рис. 5, дорожки 1 и 5). Обработка клеток только модифицирующим агентом mPEG-Mal-5000 не привела к изменению электрофоретической подвижности транспортера как в NaPi2b^{WT}, так и в NaPi2b^{P.325A} (см. рис. 5, дорожки 2 и 6). Это указывает на отсутствие свободных тиоловых групп в большом ВКД NaPi2b и, следовательно, говорит о том, что все 4 остатка цистеина (C303, C322, C328 и C350) вовлечены в образование 2 дисульфидных связей. Восстановление дисульфидных связей с дальнейшей модификацией клеток mPEG-Mal-5000 привело к изменению электрофоретической подвижности транспортера NaPi2b примерно на 20 кДа. Скорее всего, к каждой молекуле NaPi2b присоединились 4 молекулы mPEG-Mal-5000, каждая молекулярной массой 5000 кДа, что увеличило молекулярную массу NaPi2b на 20 кДа (см. рис. 5, дорожки 3 и 7). Это означает, что восстанавливающий агент разрушает 2 дисульфидные связи в области большого ВКД, переводя тиоловые группы 4 остатков цистеина большого ВКД NaPi2b в восстановленную форму и высвобождая их для модификации mPEG-Mal-5000. В случае предварительной обработки клеток MPB, который связывается со свободными тиоловыми группами и делает их недоступными для химической модификации, с дальнейшим восстановлением дисульфидных связей и модификацией mPEG-Mal-5000, мы наблюдаем аналогичный сдвиг специфической полосы на 20 кДа (см. рис. 5, дорожки 4 и 8). Это подтверждает, что в области большого ВКД транспортера NaPi2b отсутствуют свободные тиоловые группы, а все 4 остатка

цистеина (C303, C322, C328 и C350) вовлечены в образование 2 дисульфидных связей.

Таким образом, полученные в ходе эксперимента данные указывают на то, что замена остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 не нарушает формирование дисульфидных связей в большом ВКД NaPi2b. Все 4 остатка цистеина продолжают участвовать в образовании 2 дисульфидных связей, обеспечивающих стабильную конформацию большого ВКД NaPi2b.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе данной работы изучено влияние замены остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 на способность МАТ L3(28/1) распознавать эпитоп MX35 в составе транспортера NaPi2b. Для этого проводили вестерн-блот-анализ и конфокальную микроскопию клеток OVCAR-8, стабильно экспрессирующих либо мутантную форму NaPi2b^{P.325A}, либо транспортер дикого типа NaPi2b^{WT}. Кроме того, выполнено сравнение количества дисульфидных связей, формирующихся в большом ВКД NaPi2b^{P.325A} и NaPi2b^{WT}.

Данные, полученные с использованием вестерн-блот-анализа и лазерной конфокальной микроскопии, свидетельствуют о том, что замена остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 NaPi2b не оказывает влияния на эффективность распознавания эпитопа MX35 МАТ L3(28/1) (см. рис. 2 и 4). Количество дисульфидных связей в области большого ВКД NaPi2b^{P.325A} и NaPi2b^{WT} также не различалось (см. рис. 5).

Таким образом, наше предположение о том, что остаток пролина в положении 325 играет ключевую роль в распознавании эпитопа MX35 МАТ за счет участия в формировании дисульфидной связи между остатками цистеина C322 и C328 в большом ВКД транспортера NaPi2b, не подтвердилось. Это может быть связано со многими причинами, включая необ-

ходимость использования более чувствительных методов анализа.

Результаты конфокальной микроскопии демонстрируют повышенное содержание NaPi2b^{p.P325A} в исследуемых клетках (см. рис. 3), однако снижение распознавания эпитопа MX35 в NaPi2b^{p.P325A} не было статистически значимым (см. рис. 4, б). Таким образом, можно говорить о тенденции к ухудшению распознавания антителами эпитопа MX35 NaPi2b^{p.P325A} по сравнению с NaPi2b^{WT}. Возможно, необходимо увеличить количество анализируемых клеток и данных для статистического анализа с помощью таких методов, как широкопольная флуоресцентная микроскопия, что позволит выявить значимые различия. Кроме того, отсутствие влияния замены p.P325A на распознавание эпитопа MX35 может быть обусловлено тем, что ключевую роль в доступности данного эпитопа играет не дисульфидная связь C322–C328, а связь C303–C350, которая, согласно данным литературы, может образоваться в области большого ВКД NaPi2b [11, 15].

Образование 2 дисульфидных связей как в NaPi2b^{p.P325A}, так и в NaPi2b^{WT} (см. рис. 5) позволяет предположить, что остаток пролина в положении 325 не влияет на количество образуемых дисульфидных связей в большом ВКД этого транспортера. Согласно ранее опубликованным данным, одиночные остатки пролина могут способствовать изгибам только в коротких полипептидных петлях, которые содержат от 2 до 10 аминокислотных остатков [24]. Поскольку большой ВКД NaPi2b состоит из 174 а.о. [11], можно предположить, что изгиб полипептидной петли в большом ВКД NaPi2b, предсказанный с использованием алгоритма AlphaFold DeepMind [15], зависит не только от присутствия остатка пролина в положении 325.

Необходимо учитывать, что на настоящий момент отсутствуют экспериментальные данные, однозначно указывающие на пары остатков цистеина, формирующих дисульфидные связи, необходимые для поддержания такой конформации большого ВКД NaPi2b, при которой эпитоп MX35 становится доступным для распознавания антителами в опухолевых клетках. В связи с этим выявленное отсутствие влияния мутации p.P325A на распознавание эпитопа MX35 может быть обусловлено тем, что остатки цистеина в позициях 322 и 328 не участвуют в формировании дисульфидной связи, обеспечивающей пространственную доступность эпитопа. Вместо этого они, вероятно, вовлечены в образование других дисульфидных связей, например C303–C322 и C328–C350. Данный вопрос остается нерешенным и требует дальнейших исследований.

Таким образом, хотя замена остатка пролина P325 не повлияла ни на распознавание эпитопа MX35 МАТ, ни на количество образуемых дисульфидных связей внутри большого ВКД, вопреки первоначальной гипотезе, полученные результаты вносят большой вклад

в понимание молекулярных механизмов, ответственных за поддержание конформационной стабильности большого ВКД NaPi2b. Кроме того, с учетом недавних разработок новых гуманизированных антител против NaPi2b [12, 25], для определения эффективности которых при карциномах яичника и легкого планируется провести доклинические и клинические испытания, важным направлением дальнейших исследований является анализ вклада других аминокислотных остатков в доступность эпитопа MX35 для антител. Целесообразно изучить наследственные мутации в участке гена *SLC34A2*, кодирующем область большого ВКД NaPi2b у пациентов с онкологическими заболеваниями, и оценить их влияние на распознавание эпитопа MX35 терапевтическими МАТ. Так, показано, что при аминокислотной замене p.T330V в белке NaPi2b эпитоп MX35 становится недоступным для распознавания соответствующими МАТ [26]. Это указывает на вероятность того, что больные с заменой p.T330V в транспортере NaPi2b могут быть нечувствительны к терапии на основе антител, нацеленных на эпитоп MX35. В связи с этим создание клеточных моделей, экспрессирующих различные мутантные формы NaPi2b, идентифицированные у онкологических пациентов, и последующее исследование доступности эпитопа MX35 в этих моделях представляют собой перспективные направления разработки прогностических инструментов для оценки эффективности таргетной терапии опухолей на основе антител против NaPi2b.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что аминокислотная замена остатка пролина в позиции 325 транспортера NaPi2b не оказывает значимого влияния на распознавание эпитопа MX35 МАТ в области большого ВКД в опухолевых клетках карциномы яичника. Кроме того, выявлено, что в NaPi2b^{p.P325A} количество дисульфидных связей не изменяется по сравнению с NaPi2b^{WT}. Наблюдаемая тенденция к снижению доступности эпитопа MX35 для антител в живых клетках карциномы яичника может свидетельствовать о необходимости применения более высокочувствительных методов детекции, включая широкопольную флуоресцентную микроскопию.

Важным направлением будущих исследований также является изучение роли других аминокислотных остатков в доступности эпитопа MX35 транспортера NaPi2b для МАТ. Кроме того, полученные на примере NaPi2b данные позволят раскрыть механизмы образования опухоль-специфических эпитопов, доступных для распознавания антителами только в клетках опухолей, и проводить поиск подобных эпитопов для разработки высокоэффективных таргетных препаратов для улучшения диагностики и лечения онкологических заболеваний.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Guo L., Wang S., Li M., Cao Z. Accurate classification of membrane protein types based on sequence and evolutionary information using deep learning. *BMC Bioinformatics* 2019;20:1–17. DOI: 10.1186/s12859-019-3275-6
- Krogh A., Larsson B., Von Heijne G., Sonnhammer E.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001;305(3):567–80. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4315
- Overington J.P., Al-Lazikani B., Hopkins A.L. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(12):993–6. DOI: 10.1038/nrd2199
- Forster I.C. The molecular mechanism of SLC34 proteins: insights from two decades of transport assays and structure-function studies. *Pflügers Arch* 2019;471(Pt 2):15–42. DOI: 10.1007/s00424-018-2207-z
- Bulatova L., Savenkova D., Nurgalieva A. et al. Toward a topology-based therapeutic design of membrane proteins: validation of NaPi2b topology in live ovarian cancer cells. *Front Mol Biosci* 2022;9:895911. DOI: 10.3389/fmolb.2022.895911
- Vlasenkova R., Nurgalieva A., Akberova N. et al. Characterization of SLC34A2 as a potential prognostic marker of oncological diseases. *Biomolecules* 2021;11(12):1878. DOI: 10.3390/biom11121878
- Soares I.C., Simões K., de Souza J.E.S. 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
- 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.
- 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.
- 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
- Yin B.W.T., Kiyamova R., Chua R. et al. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer Immun* 2008;8:3.
- Horsley E., Jabeen A., Veillard N. et al. Preclinical development of NaPi2b-PL2202, a novel camptothecin-based antibody-drug conjugate targeting solid tumors expressing NaPi2b. *Cancer Res* 2024;84(6_Suppl):5085. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2024-5085
- 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
- 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. *Ann Oncol* 2020;31(5):S1227–8. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.2193
- Корогаева 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. Корогаева А.В., Булатова Л.Ф., Власенкова Р.А., Киямова Р.Г. 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
- Минигулова Л.Ф., Скрипова В.С., Нургуалиева А.К. и др. Распознавание натрийзависимого 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. et al. Recognition of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies N-NaPi2b in ovarian cancer cells. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta* = *Academic notes of Kazan University* 2020;162(4):529–40. (In Russ.). DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540
- Gryshkova V., Lituev D., Savinska L. et al. Generation of monoclonal antibodies against tumor-associated antigen MX35 sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b. *Hybridoma* (Larchmt) 2011;30(1):37–42. DOI: 10.1089/hyb.2010.0064
- 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
- Булатова Л.Ф., Скрипова В.С., Коротаева А.В. и др. Распознавание мутантных форм натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках рака яичника. *Казанский медицинский журнал* 2022;103(4):608–16. DOI: 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. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal* = *Kazan medical journal* 2022;103(4):608–16. (In Russ.). DOI: 10.17816/KMJ2022-608
- Nadeau V.G., Deber C.M. Structural impact of proline mutations in the loop region of an ancestral membrane protein. *Biopolymers* 2016;106(1):37–42. DOI: 10.1002/bip.22765
- 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
- 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
- McKinnon L.J., Fukushima J., Endow J.K. et al. Membrane chaperoning of a thylakoid protease whose structural stability is modified by the protonmotive force. *Plant Cell* 2020;32(5):1589–609. DOI: 10.1105/tpc.19.00797
- Krieger F., Möglich A., Kiefhaber T. Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains. *J Am Chem Soc* 2005;127(10):3346–52. DOI: 10.1021/ja042798i
- Schmitt S., Mai I., Machui P. et al. TUB-040, a novel Napi2b-targeting ADC built with ethynylphosphonamidate conjugation chemistry, demonstrates high and long-lasting anti-tumor efficacy via Topoisomerase-I inhibition and excellent tolerability predictive of a wide therapeutic window in humans. *Cancer Res* 2024;84(6_Suppl):2622. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2024-2622
- Gryshkova V.S., Filonenko V.V., Kiyamova R.G. Inhibition of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b function with MX35 antibody. *Biopolym Cell* 2011;27:193–8. DOI: 10.7124/bc.0000B9

Вклад авторов

Л.Ф. Булатова: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, анализ данных, написание текста статьи;
И.А. Слīdzьук, А.В. Килунов, В.С. Скрипова: проведение экспериментов, анализ данных;
Р.Г. Киямова: разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

L.F. Bulatova: development of research design, conducting experiments, data analysis, article writing;
I.A. Slidziuk, A.V. Kilunov, V.S. Skripova: conducting experiments, data analysis;
R.G. Kiyamova: development of the research concept and design, data analysis, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID authors

Л.Ф. Булатова / L.F. Bulatova: <https://orcid.org/0000-0001-6696-8477>
И.А. Слīdzьук / I.A. Slidziuk: <https://orcid.org/0009-0001-6709-1010>
А.В. Килунов / A.V. Kilunov: <https://orcid.org/0009-0007-2262-4200>
В.С. Скрипова / V.S. Skripova: <http://orcid.org/0000-0002-6342-0390>
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. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (грант № 23-15-00456, <https://rscf.ru/project/23-15-00456/>).

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

Статья поступила: 28.10.2024. Принята к публикации: 28.04.2025. Опубликовано онлайн: 23.06.2025.

Article submitted: 28.10.2024. Accepted for publication: 28.04.2025. Published online: 23.06.2025.