

Модификация красного флуоресцентного белка TagRFP для уменьшения его иммуногенности при создании флуоресцирующих модельных опухолей иммунокомпетентных мышей *Balb/c*

Н. К. Марынич, А. В. Гавшина, И. Г. Меерович

Институт биохимии им. А. Н. Баха ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»; Россия, 119071 Москва, Ленинский пр-кт, 33, стр. 2

Контакты: Ирина Геннадьевна Меерович imeerovich@inbi.ras.ru

Введение. Длинноволновые флуоресцентные белки наиболее перспективны при исследованиях *in vivo* на флуоресцирующих моделях опухолей лабораторных животных. Если экспрессирующие флуоресцентные белки опухоли имеют большую иммуногенность для данной линии иммунокомпетентных мышей по сравнению с исходными, то сложно вычленимь иммунную составляющую противоопухолевого действия цитотоксической терапии.

Цель исследования – получение мышиных опухолевых клеточных линий 4T1, стабильно экспрессирующих исходный красный флуоресцентный белок TagRFP и мутантный белок TagRFP-L228A, получение опухолевых моделей на их основе и оценка гуморального иммунного ответа мышей линии *Balb/c* на такие опухоли.

Материалы и методы. Эукариотические плазмиды pcDNA3, содержащие гены, кодирующие экспрессию исходного белка TagRFP (TagRFP-WT) и белка с мутацией L228A (TagRFP-L228A), получали из прокариотических плазмид генно-инженерными методами. Индивидуальные клоны опухолевых клеток 4T1, экспрессирующие TagRFP-WT и TagRFP-L228A, получали путем последовательной липосомальной трансфекции клеток эукариотическими плазмидами, селекции и клонирования. Опухолевые модели получали подкожной инокуляцией суспензии клеток 4T1, 4T1-TagRFP-WT и 4T1-TagRFP-L228A самкам мышей *Balb/c*. Через 4 нед оценивали иммунный ответ на белок TagRFP методом иммуноферментного анализа по связыванию сывороток венозной крови мышей с исходным белком TagRFP-WT.

Результаты. Получены плазмиды для экспрессии белков TagRFP-WT и TagRFP-L228A в эукариотических клетках и клоны клеток 4T1, стабильно экспрессирующие эти белки. После инокуляции клеток 4T1-TagRFP-WT, 4T1-TagRFP-L228A и 4T1 опухоли развились у всех мышей соответствующих групп. Методом иммуноферментного анализа на планшетах с адсорбированным белком TagRFP-WT показано наличие у мышей *Balb/c* с флуоресцирующими опухолями гуморального иммунного ответа на исходный флуоресцентный белок в отличие от такового у мышей с опухолями 4T1. По сравнению с сыворотками мышей с опухолью 4T1-TagRFP-WT связывание с исходным белком TagRFP-WT сывороток мышей с опухолями 4T1-TagRFP-L228A уменьшается более чем в 4 раза.

Заключение. Единственная аминокислотная замена L228A в белке TagRFP приводит к существенному уменьшению гуморального иммунного ответа на экспрессируемый опухолями белок TagRFP-L228A по сравнению с исходным TagRFP-WT. Это позволит использовать экспрессирующие TagRFP-L228A клеточные линии для создания оптимизированных опухолевых моделей для мышей *Balb/c*.

Ключевые слова: красный флуоресцентный белок TagRFP, иммуногенность, опухолевая модель, гуморальный иммунный ответ, иммуноферментный анализ

Для цитирования: Марынич Н. К., Гавшина А. В., Меерович И. Г. Модификация красного флуоресцентного белка TagRFP для уменьшения его иммуногенности при создании флуоресцирующих модельных опухолей иммунокомпетентных мышей *Balb/c*. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):36–44.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-36-44>

Modification of the red fluorescent protein TagRFP to reduce its immunogenicity in establishing fluorescent model tumors in immunocompetent *Balb/C* mice

Nadezhda K. Marynich, Alexandra V. Gavshina, Irina G. Meerovich

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences; 33, bld. 2 Leninsky Prospekt, Moscow 119071, Russia

Contacts: Irina Gennad'evna Meerovich imeerovich@inbi.ras.ru

Background. Long-wave fluorescent proteins (FP) exhibit significant potential for *in vivo* investigations involving fluorescent tumor models in laboratory animals. If tumors expressing FP exhibit enhanced immunogenicity in a specific strain of immunocompetent mice as compared with the original tumors, it becomes challenging to delineate the immune component contributing to the antitumor effects of cytotoxic therapy.

Aim. To establish mouse tumor cell lines 4T1 that consistently express the original protein TagRFP and the mutant protein TagRFP-L228A, to develop tumor models based on these cell lines, and to assess the humoral immune response of *Balb/c* mice to such tumors.

Materials and methods. Eukaryotic plasmids pcDNA3 containing genes encoding the expression of the original protein TagRFP (TagRFP-WT) and the L228A mutant protein (TagRFP-L228A) were obtained from prokaryotic plasmids by genetic engineering methods. Individual 4T1 tumor cell clones expressing TagRFP-WT and TagRFP-L228A were obtained by sequential liposomal transfection of cells with eukaryotic plasmids, selection, and cloning. Tumor models were obtained by subcutaneous inoculation of suspensions of 4T1, 4T1-TagRFP-WT, and 4T1-TagRFP-L228A cells into female *Balb/c* mice. After 4 weeks, the immune response to TagRFP protein was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by binding of mouse venous blood sera to the parent TagRFP-WT protein.

Results. Plasmids for the expression of TagRFP-WT and TagRFP-L228A proteins in eukaryotic cells and 4T1 cell clones stably expressing these proteins have been obtained. After inoculation of 4T1-TagRFP-WT, 4T1-TagRFP-L228A and 4T1 cells, tumors developed in all mice of the corresponding groups. Using an ELISA on microplates with adsorbed TagRFP-WT protein, the presence of a humoral immune response to the original fluorescent protein was shown in *Balb/c* mice with fluorescent tumors, in contrast to mice with 4T1 tumors. Compared to the sera of mice with the 4T1-TagRFP-WT tumors, the binding to the original protein TagRFP-WT of the sera of mice with the 4T1-TagRFP-L228A tumors decreases by more than 4 times.

Conclusion. The single amino acid substitution L228A in the TagRFP protein leads to a significant reduction in the humoral immune response to the TagRFP-L228A protein expressed by tumors compared to the original TagRFP-WT. This will allow using TagRFP-L228A expressing cell lines to create optimized tumor models for *Balb/c* mice.

Keywords: red fluorescent protein TagRFP, immunogenicity, tumor model, humoral immune response, enzyme-linked immunosorbent assay

For citation: Marynich N.K., Gavshina A.V., Meerovich I.G. Modification of the red fluorescent protein TagRFP to reduce its immunogenicity in establishing fluorescent model tumors in immunocompetent *Balb/C* mice. *Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(3):36–44. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-36-44>

Введение

Флуоресцентные белки (ФБ) используются в качестве генетически кодируемых флуоресцентных маркеров для визуализации биологических процессов, происходящих в живых клетках, тканях и организмах. Длинноволновые (красные и дальне-красные) флуоресцентные белки [1] наиболее перспективны при исследованиях *in vivo* на лабораторных животных [2, 3]. Использование таких ФБ предоставляет возможность изучения опухолевых узлов в удаленных от поверхности тела лабораторных животных органах и тканях благодаря большому пропусканию света тканями животных в этом диапазоне спектра за счет низкого поглощения и рассеяния в нем. Это особенно важно при использовании флуоресцирующих моделей метастазирующих опухолей [4]. Красный флуоресцентный

белок TagRFP отличается высоким коэффициентом экстинкции и длительным временем жизни флуоресценции. Он широко используется в качестве генетически кодируемого сенсора как сам по себе, так и в составе более сложных генетически кодируемых сенсоров, например, для детекции каспаза-3-зависимого апоптоза в клетках флуоресцирующих опухолей [5].

В последние годы значительное внимание уделяется иммунной составляющей противоопухолевого эффекта, в том числе при изучении химиотерапии [6], фотодинамической терапии [7–9].

Исходно многие опухолевые модели на основе экспрессирующих ФБ опухолевых клеточных линий создавались преимущественно для иммунодефицитных мышей *Nude* или *SCID* [10]. Это давало

возможность использовать широкий спектр опухолевых моделей, включая те, которые основаны на клеточных линиях человеческих опухолей, но такой подход не рассматривал проблему влияния на результаты исследований иммунного ответа на экспрессирующийся в опухолевых клетках ФБ. При использовании в качестве опухолевых моделей ФБ-экспрессирующих опухолей сингенных иммунокомпетентных мышей оказалось, что многие ФБ иммуногенны для мышей-хозяев. В связи с этим, например, экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок GFP клеточную линию аденокарциномы толстой кишки мыши СТ-26 можно было использовать у иммунокомпетентных мышей (*Balb/c*) для изучения ранних стадий метастатического роста у мышей, в частности для отслеживания экстравазации опухолевых клеток. Однако оценку долгосрочного метастатического роста такой опухоли целесообразно проводить на иммунодефицитных мышах [11].

В исследовании [12] представлено, что экспрессия флуоресцентных белков GFP или TagRFP некоторыми модельными опухолями (например, после подкожной инокуляции соответствующих линий на основе клеток СТ-26) коррелирует с отторжением опухоли начиная с 8-го дня после инокуляции. При тех же условиях экспрессия этих белков опухолями 4T1 и V16-F10 не оказывала существенного влияния на развитие опухолей на основе 4T1 у мышей линий *Balb/c* и V16-F10 у мышей линии C57BL/6 (для V16-F10). Авторы связали это как со сравнительно более высоким уровнем экспрессии флуоресцентных белков клетками СТ-26, так и с имеющимися в литературе сведениями о сравнительно более высокой иммуногенности собственно опухолей СТ-26.

В исследовании [13] продемонстрировано, что скорость роста опухолей карциномы легких Льюис снижена после трансдукции tdTomato и люциферазы (tdTomato/Luc) по сравнению с исходной клеточной линией. Кроме того, экспрессия tdTomato/Luc опухолевыми клетками изменила микроокружение опухоли за счет увеличения лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, при одновременном ингибировании супрессорных клеток миелоидного происхождения, индуцированных опухолью. Таким образом, показано, что трансгенная экспрессия чужеродных белков может вызывать иммунные реакции в иммунокомпетентных сингенных моделях трансплантированных опухолей, что может оказывать влияние на оценку эффективности экспериментальных препаратов.

А. Castano и соавт. [14] показали, что стабильная экспрессия зеленого ФБ EGFP (enhanced green fluorescent protein) в опухолях мышей подавляла рост опухоли и приводила к образованию цитотоксических Т-клеток CD8 (cluster of differentiation 8), которые распознают EGFP-экспрессирующие клетки, а им-

плантация EGFP-экспрессирующих опухолей мышам вызывает присутствие анти-EGFP антител иммуноглобулина класса G в сыворотке крови. При оценке результатов фотодинамической терапии (ФДТ) установлено, что имеются значительные различия между ответом на мышинные опухоли, полученные из стабильно экспрессирующих EGFP и немодифицированных опухолевых клеток RIF-1. ФДТ с производным бензопорфирина приводила к 100 % излечению опухолей RIF-1, экспрессирующих EGFP, что значительно отличалось от результата воздействия на неэкспрессирующие ФБ опухоли RIF-1, где результат был менее значителен и продолжителен. После ФДТ также снижалась скорость роста флуоресцирующей опухоли по сравнению с нефлуоресцирующей, и было высказано предположение о том, что так проявляется реакция иммунной системы мыши на присутствие «чужеродного» белка EGFP после цитотоксической терапии.

Таким образом, при выраженной иммунной составляющей противоопухолевого эффекта использование ФБ в качестве маркера опухолевых клеток в экспериментальной терапии опухолей ставит вопрос о достоверной интерпретации результатов. В том случае, когда экспрессирующие ФБ опухоли имеют большую иммуногенность для данной линии иммунокомпетентных мышей по сравнению с исходными опухолями, более сложно вычлнить иммунную составляющую противоопухолевого действия цитотоксической терапии (например, химиотерапии или ФДТ) и сопоставить результаты, полученные на исходной (нефлуоресцирующей) и флуоресцирующей моделях. Экспрессируемый опухолевыми клетками ФБ может действовать как характерный для них дополнительный чужеродный антиген, влияя как на прививаемость и скорость роста опухоли, так и на дальнейшую реакцию иммунной системы на повторную перевивку опухоли после терапевтического воздействия, а также на достоверность оценки терапевтического воздействия на опухоль.

В связи с этим встает задача снижения иммуногенности ФБ, причем ее нужно решать в рамках конкретной модели на животных, поскольку один и тот же ФБ для одной линии иммунокомпетентных мышей может быть существенно иммуногенным, а для другой – нет [15]. Один из подходов к снижению иммуногенности флуоресцентных белков как генетически кодируемых сенсоров состоит во внесении соответствующих мутаций непосредственно в последовательность белка. Такой подход, в частности, рассматривается в работе [16], в которой получены мутанты EGFP, демонстрирующие сниженную иммуногенность белка по сравнению с немодифицированным белком (обозначаемым в литературе как WT – wild type, т. е. дикого типа) при экспрессии

в опухолевых клетках, служащих для создания опухолевой модели у мышей линии *Balb/c* либо C57BL/6. Например, полученный мутант EGFP Y200T оказался практически идентичным исходному EGFP по физико-химическим свойствам. При этом экспериментальные данные подтвердили, что гуморальный иммунный ответ на вариант EGFP Y200T у мышей линии *Balb/c* практически отсутствует.

Ранее мы использовали искусственную нейросеть для предсказания наличия эпитопов главного комплекса гистосовместимости I класса NetMHC-4.0 [17] в аминокислотной последовательности красного флуоресцентного белка TagRFP (рис. 1) для мышей линии *Balb/c*. По результатам этого поиска и в согласовании с расположением В-клеточных эпитопов, определенных с помощью ресурсов Ellipro [18] и DiscoTope 3.0 [19], для мышей линии *Balb/c* нами были выбраны возможные места одиночных мутаций для уменьшения связывания белка с соответствующими эпитопами.

Для двукратной иммунизации мышей линии *Balb/c* использован мутантный белок TagRFP-L228A, полученный в результате сайт-направленного мутагенеза в положении на С-конце TagRFP за пределами β -бочонка и не отличавшийся от белка TagRFP-WT по спектральным свойствам. С использованием иммуноферментного анализа (ИФА) сывороток крови мышей показано, что замена L228A привела к уменьшению связывания мышинных сывороток с адсорбированным белком дикого типа по сравнению с иммунизацией исходным белком [20].

Цель данной работы — получение мышинных опухолевых клеточных линий 4T1, стабильно экспрессирующих исходный красный ФБ TagRFP и мутантный белок TagRFP-L228A, получение опухолевых моделей на их основе и оценка гуморального иммунного ответа мышей линии *Balb/c* на такие опухоли.

```
MVSKGGELIKENMNMKLYMEGTVNNHNFKCTSEGEKPYEGTQ
TMRIKVVVEGGPLPFAFDILATSFMYGSRFTINHTQGIPDFFKQSF
PEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVKIRGVNFPSNG
PVMQKKTGLWEANTEMLYPADGGLEGRSDMALKLVGGGH
LICNFKTTYRSKKPAKLNKMPGVVYVD
HRLRIKEADKETVVEQHEVAVARYCDLPuSKLGHK
```

Рис. 1. Первичная последовательность исходного красного флуоресцентного белка TagRFP, использованного в работе. Голубым выделена последовательность, входящая в предсказанные эпитопы, внутри которых производились замены при получении мутанта. Подчеркнуто место введения мутации *Leu*->*Ala*

Fig. 1. Primary sequence of TagRFP used in the work. The sequence included in the predicted epitopes, within which substitutions were made performed at obtaining the mutant, is highlighted in blue. The site of introduction of the *Leu*->*Ala* mutation is underlined

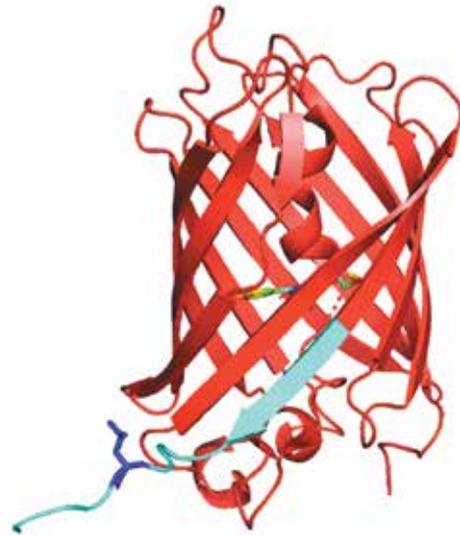


Рис. 2. Модель третичной структуры белка TagRFP. Голубым цветом выделены эпитопы, внутри которых производилась мутация, фиолетовым — аминокислотный остаток лейцина, который заменяли на аланин в мутанте TagRFP-L228A. Модель создана при помощи ресурса PyMOL v.2.2.0

Fig. 2. Model of the tertiary structure of the TagRFP. Epitopes within which the mutation was performed are highlighted in blue, the leucine amino acid residue which was replaced by alanine in the TagRFP-L228A mutant, is highlighted in purple. The model was created using the PyMOL v.2.2.0 software

Материалы и методы

Животные

Мыши линии *Balb/c* (самки возрастом 6–8 нед) категории SPF получены из Пущинского питомника лабораторных животных. Животных содержали в специальном помещении по 3 особи в клетках с фильтрами в защищенном шкафу Sync 4E4 (Charles River, Франция) с позитивным давлением, влажностью 30–50 %, температурой 22–26 °С, соблюдением режима «день/ночь» и свободным доступом к еде и воде.

Опухолевая клеточная линия и ее культивирование

Культуру клеток рака молочной железы мышей 4T1 (ATCC №CRL-2539) культивировали в полной питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, «ПанЭко», Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % фетальной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия, происхождение сыворотки — Южная Америка), 1 % L-глутамина («ПанЭко», Россия), 1 % пенициллин-стрептомицина («ПанЭко», Россия), во влажной атмосфере при температуре 37 °С с 5 % CO₂.

Конструирование эукариотической плазмиды

Для экспрессии в клетках эукариот последовательности исходного белка TagRFP, а также его мутанта TagRFP-L228A клонированы в вектор pcDNA3 по сайтам HindIII/XhoI путем получения методом

полимеразной цепной реакции фрагментов (в качестве матрицы использованы исходные гены в векторе прокариотической плазмиды рЕТ22b) с праймерами (табл. 1), рестрикции их и вектора (HindIII компании SibEnzyme, Россия, XhoI Thermo Fisher Scientific, США) и последующего лигирования T4 ДНК-лигазой (Thermo Fisher Scientific, США). Рестрикция и лигирование выполнены согласно протоколам производителя. Отсутствие случайных и наличие целевых замен подтверждено секвенированием («Евроген», Россия).

Таблица 1. Праймеры для составления конструкций для экспрессии TagRFP и TagRFP-L228A в эукариотических клетках

Table 1. Primers for constructing expression constructs for TagRFP and TagRFP-L228A in eukaryotic cells

Праймер Primer	Последовательность Sequence
TagRFP_fw_HindIII_K	TTT AAG CTT GCC ACC ATG GTG TCT AAG GGC G
TagRFP_rev_Xho	TTA TCT CGA GTT ATT TGT GCC CCA GTT
TRFP228_rev_Xho	TTA TCT CGA GTT ATT TGT GCC CGG CTT

Плазмиды рсDNA3, содержащие гены, кодирующие экспрессию TagRFP-WT и TagRFP-L228A, нарабатывали в клетках *Escherichia coli* DH5a, выделяли и очищали с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя, включая очистку плазмидной ДНК от эндотоксинов с использованием входящего в набор раствора.

Липосомальная трансфекция клеток 4Т1

Клетки 4Т1 высевали в лунки 24-луночных культуральных планшетов в полной культуральной среде в количестве, достаточном для получения через 1 сут монослоя 70–80 % конfluентности. Трансфекцию проводили с использованием реагента для липосомальной трансфекции GenJect-39 (Molekta, Россия) согласно инструкции производителя, варьируя нагрузку клеток по реагенту для липофекции, соотношение плазмидной ДНК и реагента и время инкубации (3–18 ч). Затем среду меняли на свежую полную среду для культивирования.

Получение клонов клеток 4Т1, экспрессирующих красный флуоресцентный белок TagRFP и его мутант

Спустя 1 сут после замены среды в нее добавляли селективирующий антибиотик генетицин (G-418) (NeoFroxx GmbH, Германия) сначала в концентрации 200 мкг/мл среды, а затем постепенно эскалировали

дозу до 1200 мкг/мл среды, повышая концентрацию на 200 мкг/мл каждые 3–4 дня. Полученную смесь флуоресцирующих клеток рассаживали методом предельного разведения [21] в лунки 96-луночного культурального планшета из расчета 1–2 клетки на лунку в полной ростовой среде, а затем вели мониторинг роста флуоресцирующих одиночных клонов, пересаживая их в лунки планшетов большего размера. Затем клоны нарабатывали и культивировали в полной ростовой среде в течение нескольких пассажей, проводя мониторинг стабильности флуоресценции целевых белков.

Инокуляция опухолевых клеток 4Т1, экспрессирующих красный флуоресцентный белок TagRFP и его мутанты, мышам *Balb/c*

Клетки исходной клеточной линии 4Т1, а также клонов 4Т1, экспрессировавших исходный белок TagRFP-WT и его мутант TagRFP-L228A, наращивали в культуральных флаконах площадью 75 см² (SPL, Корея), затем трипсинизировали 0,25 % раствором Трипсин-ЭДТА («ПанЭко», Россия) с последующим центрифугированием и трехкратной отмывкой фосфатно-солевым стерильным буфером (PBS) Дульбекко («ПанЭко», Россия), ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе («ПанЭко», Россия) исходя из концентрации 1,5 млн клеток/100 мкл и хранили на льду до инокуляции мышам (в течение не более получаса).

Инокуляцию опухолевых клеток проводили в правый бок самкам мышей линии *Balb/c* (возрастом 10–12 нед) по 100 мкл клеточной суспензии на особь. Клетки каждой клеточной линии вводили группе из 3 мышей.

Подготовка планшетов для иммуноферментного анализа

В лунки планшета для ИФА («НИИмедполимер», Россия) добавляли по 50 мкл очищенного нативного исходного белка TagRFP в концентрации 50 мкг/мл в 0,1 М карбонатном буфере, pH 8,7, инкубировали 2 ч при температуре 37 °С, а затем ночь при температуре 4 °С. Далее отмывали лунки восьмикратно буфером PBST (PBS с Твин-20): PBS, pH 7,4, 0,05 % Твин-20 («Диаэм», Россия). Затем в течение 2 ч инкубировали планшет с 200 мкл/лунку раствором PBS-AT (PBST + 1 % BSA (Elabscience, КНР)), также восьмикратно отмывали.

Оценка гуморального иммунного ответа на красные флуоресцентные белки, экспрессируемые опухолями

Через 4 нед после инокуляции опухолей отбирали по 10 мкл крови из хвостовой вены мышей в 100 мкл физиологического раствора, отстаивали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем в течение ночи при температуре 4 °С. После этого образцы центрифугировали

при температуре 4 °С, сыворотку отбирали и использовали для оценки связывания с исходным белком TagRFP, адсорбированным в лунках планшетов для ИФА. Сыворотку разводили буфером PBSAT (PBS + 0,05 % Твин-20 + 1 % BSA) и раститровывали в 3 раза в лунках ранее подготовленного 96-луночного иммунологического планшета с адсорбированным TagRFP (2 повтора на каждую сыворотку). После инкубации (1 ч при температуре 37 °С) проводили восьмикратную отмывку буфером PBST (PBS + 0,05 % Твин-20). В качестве вторичных антител использовали антитела козы к иммуноглобулинам класса G мыши, меченные пероксидазой хрена (Elabsience, КНР). В лунки добавляли по 100 мкл раствора вторичных антител в PBSAT, инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С, затем отмывали 8 раз буфером PBST. В каждую лунку добавляли по 100 мкл готового раствора, содержащего субстрат пероксидазы ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина) и пероксид водорода («НВО Иммуно-тех», Россия). Через 15 мин добавляли стоп-раствор (1 М раствор серной кислоты) по 50 мкл на лунку, при этом растворы в лунках меняли цвет с синего на желтый. Измеряли оптическую плотность растворов в лунках на длине волны 450 нм, используя мультимодальный планшетный спектрофотометр CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Германия).

Результаты и обсуждение

Свойства клонов клеток, экспрессирующих исходный белок TagRFP и его мутанты

После трансфекции опухолевых клеток 4Т1 плазмидами, кодирующими экспрессию флуоресцентного белка TagRFP-WT и его мутанта TagRFP-L228A, не обнаружено существенных отличий в эффектив-

ности, которая составляла приблизительно 10–15 %. Не отмечено токсичности трансфекции для клеток, которая могла бы проявляться в существенной гибели клеток или изменении морфологии флуоресцирующих клеток по сравнению с исходными.

Клоны имели сходную интенсивность флуоресценции (рис. 3).

Для полученных клонов флуоресцирующих клеток TagRFP-WT и TagRFP-L228A не наблюдали признаков токсичности, вызванных экспрессией белков опухолевыми клетками 4Т1, как морфологически (отсутствие значимой доли флуоресцирующих клеток с измененной морфологией, а также погибших клеток), так и по скорости роста клеток флуоресцирующих клонов по сравнению друг с другом и с клетками исходной линии 4Т1.

Получение опухолей 4Т1, экспрессирующих исходный белок TagRFP и его мутант, и оценка гуморального ответа на экспрессируемые ими флуоресцентные белки

После перевивки опухоли развились у всех мышей, использованных в эксперименте. При оценке методом ИФА сыворотки мышей с различными опухолями (4Т1, 4Т1-TagRFP, 4Т1-TagRFP-L228A) на планшетах с адсорбированным белком TagRFP-WT показано, что все мыши с опухолями, экспрессирующими красный ФБ, развили гуморальный иммунный ответ на исходный белок TagRFP (рис. 4).

Среднее значение разведения по группе мышей с соответствующими опухолями, при котором связывание сыворотки составляло 1/2 от «насыщающего» значения, у мышей с опухолями, экспрессирующими мутантный белок TagRFP-L228A, уменьшилось более

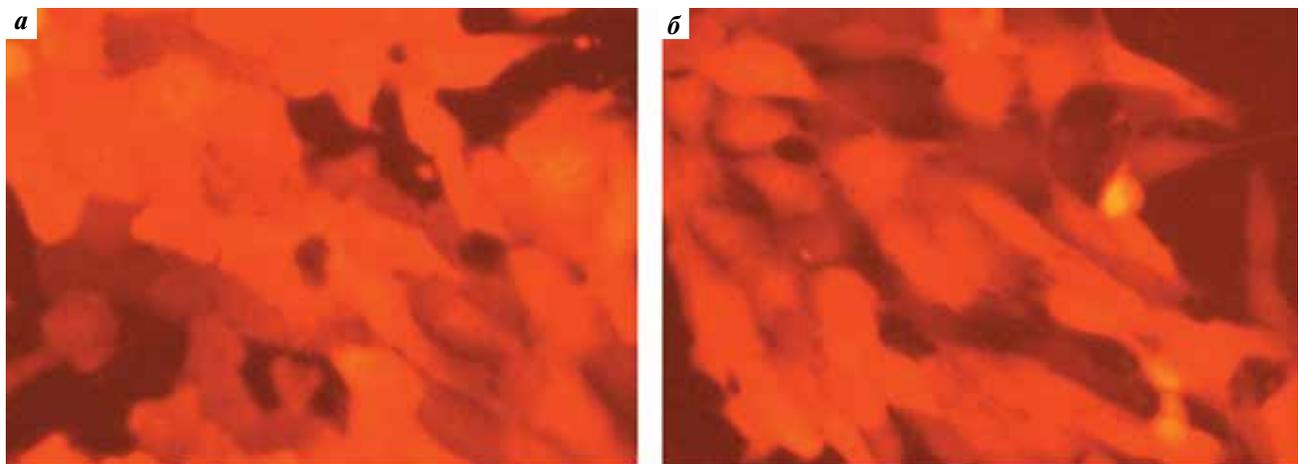


Рис. 3. Флуоресцентные микрофотографии клонов опухолевых клеток 4Т1, экспрессирующих красные флуоресцентные белки. Флуоресцентный инвертированный микроскоп Nikon TE2000-U, $\times 40$. Вычисленная с использованием ПО ImageJ (НИН, США) средняя интенсивность флуоресценции для клеток TagRFP-WT (а) составила $77,98 \pm 20,38$ усл. ед., а для клеток TagRFP-L228A (б) – $69,42 \pm 17,93$ усл. ед.

Fig. 3. Fluorescent microphotographs of 4T1 tumor cell clones expressing red fluorescent proteins. Nikon TE2000-U fluorescence inverted microscope, $\times 40$. The average fluorescence intensity calculated using ImageJ software (NIH, USA) for TagRFP-WT cells (a) – 77.98 ± 20.38 a. u., and for TagRFP-L228A cells (b) – 69.42 ± 17.93 a. u.

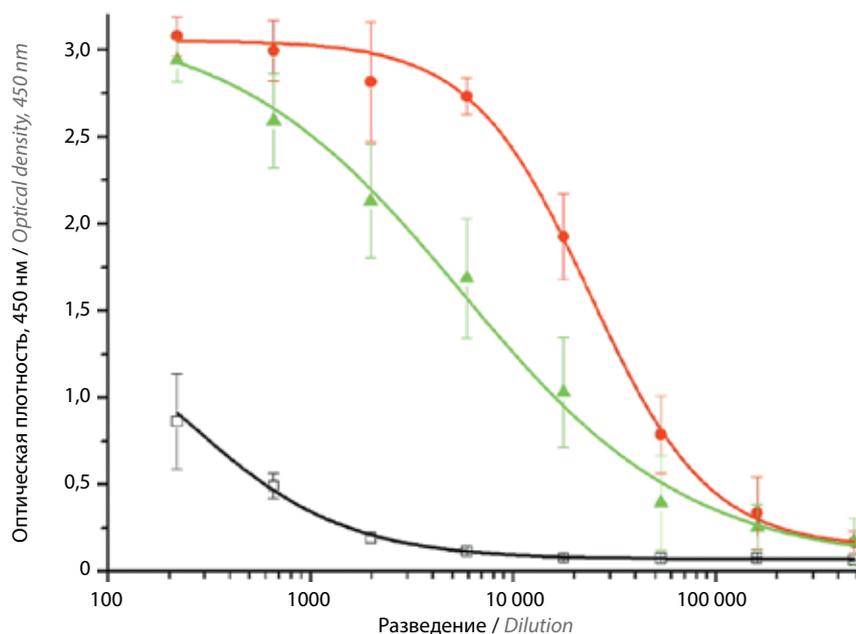


Рис. 4. Кривые связывания с адсорбированным в ИФА-планишетах белком TagRFP-WT сывороток крови мышей после инокуляции опухолевых клеток 4T1 (черный), 4T1-TagRFP-WT (красный) и 4T1-TagRFP-L228A (зеленый). Приведены средние значения \pm стандартные отклонения
Fig. 4. Binding curves of mice blood sera to the TagRFP-WT adsorbed in ELISA microplates after inoculation with 4T1 (black), 4T1-TagRFP-WT (red) and 4T1-TagRFP-L228A (green) tumor cells. Mean values \pm standard deviations are shown

Таблица 2. Параметры аппроксимации экспериментальных кривых

Table 2. Approximation parameters for experimental curves

Показатель Parameter	Клетки опухоли Tumor cells		
	4T1	4T1-TagRFP-WT	4T1-TagRFP-L228A
χ^2	0,5944	0,1032	0,132
R^2	0,9789	0,9995	0,999
A1 (начальная) A1 (initial)	1,668 \pm 1,67	3,052 \pm 0,095	3,166 \pm 0,376
A2 (конечная) A2 (final)	0,07 \pm 0,003	0,137 \pm 0,078	0,053 \pm 0,232
Разведение при Y50 Dilution at Y50	—	24000 \pm 4510	5550,7 \pm 2880

чем в 4 раза по сравнению с таковым у мышей с опухолями, экспрессирующими исходный белок TagRFP. Таким образом, одиночная замена L228A привела к существенному снижению гуморального иммунного ответа на экспрессируемый мутантный белок по сравнению с исходным.

Полученные средние значения были аппроксимированы с использованием программного обеспечения Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., США) сигмоидальными кривыми с параметрами, указанными в табл. 2.

Заключение

Таким образом, получены клеточные линии на основе линии 4T1, экспрессирующие красный флуоресцентный белок TagRFP и его мутант с единственной аминокислотной заменой TagRFP-L228A, а также мышинные опухолевые модели у мышей *Balb/c* на основе этих линий. Показано, что единственная аминокислотная замена в белке приводит к существенному уменьшению связывания с исходным ФБ сывороток крови мышей с флуоресцирующими опухолями, экспрессирующими мутантный белок,

по сравнению с теми мышами, флуоресцирующие опухоли которых экспрессировали исходный белок. В частности, значительно (более чем в 4 раза) уменьшается разведение сыворотки мышей, при котором связывание сыворотки составляет 1/2 от «насыщающего» значения. Таким образом, мутация L228A привела к существенному падению гуморального

иммунного ответа на экспрессируемый мутантный белок по сравнению с исходным. Полученные результаты позволяют использовать клеточные линии, экспрессирующие мутантный белок с пониженной иммуногенностью TagRFP-L228A, для создания оптимизированных опухолевых моделей у мышей *Balb/c*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V. et al. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J* 2009;418(3):567–74. DOI: 10.1042/BJ20081949
- Savitsky A.P., Meerovich I.G., Zherdeva V.V. et al. Three-dimensional *in vivo* imaging of tumors expressing red fluorescent proteins. In: *In Vivo Cellular Imaging Using Fluorescent Proteins*; Robert M. Hoffman (ed.), Springer Science+Business Media New York 2012, 872. DOI: 10.1007/978-1-61779-797-2_7
- Mishchenko T.A., Balalaeva I.V., Klimenko M.O. et al. Far-red fluorescent murine glioma model for accurate assessment of brain tumor progression. *Cancers (Basel)* 2022;14(15):3822. DOI: 10.3390/cancers14153822
- Kubota Y., Aoki Y., Wang A. et al. Non-invasive fluorescence imaging of breast cancer metastasis to the brain in an orthotopic nude-mouse model with very-narrow-band-width laser excitation of red fluorescent protein resulting in an ultra-bright signal without skin autofluorescence. *In Vivo* 2024;38(1):69–72. DOI: 10.21873/invivo.13411
- Zherdeva V.V., Kazachkina N.I., Shcheslavskiy V., Savitsky A.P. Long-term fluorescence lifetime imaging of a genetically encoded sensor for caspase-3 activity in mouse tumor xenografts. *J Biomed Opt* 2018;23(3):1–11. DOI: 10.1117/1.JBO.23.3.03500
- Galluzzi L., Guilbaud E., Schmidt D. et al. Targeting immunogenic cell stress and death for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2024;23(6):445–60. DOI: 10/1038/s41573-024-00920-9
- Tan L., Shen X., He Zh., Lu Y. The role of photodynamic therapy in triggering cell death and facilitating antitumor immunology. *Front Oncol* 2022;12:863107. DOI: 10.3389/fonc.2022.863107
- Alzeibak R., Mishchenko T.A., Shilyagina N.Y. et al. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future. *J Immunother Cancer* 2021;9(1):e001926. DOI: 10.1136/jitc-2020-001926
- Chou W., Sun T., Peng N. et al. Photodynamic therapy-induced anti-tumor immunity: influence factors and synergistic enhancement strategies. *Pharmaceutics* 2023;15(1):2617. DOI: 10.3390/pharmaceutics15112617
- Hoffman R.M. Fluorescent proteins as visible *in vivo* sensors. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;113:389–402. DOI: 10.1016/B978-0-12-386932-6.00010-7
- Steinbauer M., Guba M., Cernaianu G. et al. GFP-transfected tumor cells are useful in examining early metastasis *in vivo*, but immune reaction precludes long-term tumor development studies in immunocompetent mice. *Clin Exp Metastasis* 2003;20(2):135–41. DOI: 10.1023/a:1022618909921
- Vodopyanov S.S., Kunin M.A., Garanina A.S. et al. Preparation and testing of cells expressing fluorescent proteins for intravital imaging of tumor microenvironment. *Bull Exp Biol Med* 2019;167(1):123–30. DOI: 10.1007/s10517-019-04475-312
- Huang L., Bommireddy R., Munoz L.E. et al. Expression of tdTomato and luciferase in a murine lung cancer alters the growth and immune microenvironment of the tumor. *PLoS One* 2021;16(8):e0254125. DOI: 10.1371/journal.pone.0254125
- Castano A.P., Liu Q., Hamblin M.R. A green fluorescent protein-expressing murine tumour but not its wild-type counterpart is cured by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2006;94(3):391–7. DOI: 10.1023/A:10226189099218
- Skelton D., Satake N., Kohn D.B. The enhanced green fluorescent protein (eGFP) is minimally immunogenic in C57BL/6 mice. *Gene Ther* 2001;8(23):1813–4. DOI: 10.1038/sj.gt.3301586
- Eyes T.J. Deimmunisation of enhanced green fluorescent protein. PhD Thesis. The University of Manchester (United Kingdom), 2014.
- NetMHC-4.0. URL: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHC-4.0/>.
- ElliPro. URL: <http://tools.iedb.org/elliPro>.
- DiscoTope-3.0 Structure Base Antibody Prediction. URL: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/DiscoTope-3.0>.
- Меерович И.Г., Марынич Н.К., Гавшина А.В., Савицкий А.П. Мутанты красного флуоресцентного белка TagRFP с пониженной иммуногенностью для использования во флуоресцирующих опухолевых моделях. В кн.: VI Международная конференция «Постгеном'2024», XI Российский симпозиум «Белки и пептиды», Российско-китайский конгресс в области наук о жизни. Сборник тезисов докладов. М.: Перо, 2024. Meerovich I.G., Marynich N.K., Gavshina A.V., Savitsky A.P. Mutants of the red fluorescent protein TagRFP with reduced immunogenicity for use in fluorescent tumor models. In the book: VI International Conference Postgenome'2024, XI Russian Symposium Proteins and Peptides, Russian-Chinese Congress in Life Sciences. Bulletin (Collection) of abstracts. Moscow: Pero Publishing House, 2024. (In Russ.).
- Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2010. P. 208–11. DOI: 10.1002/9780470649367

Вклад авторов

Н.К. Марынич: проведение сайт-направленного мутагенеза белков, клонирование полученных генов флуоресцентных белков в эукариотическую плазмиду, трансфекция опухолевых клеток, получение сывороток крови мышей, обсуждение и редактирование рукописи; А.В. Гавшина: расчет праймеров для сайт-направленного мутагенеза белков, проведение сайт-направленного мутагенеза белков, написание, обсуждение и редактирование рукописи;

И.Г. Меерович: обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, выбор мутаций, трансфекция опухолевых клеток эукариотическими плазмидами, селекция и получение индивидуальных клонов флуоресцирующих клеток; инокуляция опухолевых клеток мышам, отбор образцов крови мышей, иммуноферментный анализ сывороток крови мышей, анализ полученных данных, написание, обсуждение и редактирование рукописи.

Author's contributions

N.K. Marynich: conducting site-directed mutagenesis of proteins, cloning the obtained genes of fluorescent proteins into a eukaryotic plasmid, transfection of tumor cells mouse blood samples collection, writing, discussion and editing of manuscripts;

A.V. Gavshina: calculation of primers for site-directed mutagenesis of proteins, performing site-directed mutagenesis of proteins, writing, discussion and editing of the manuscript;

I.G. Meerovich: review of publications on the topic of the article, development of the study design, selection of mutations, transfection of tumor cells with eukaryotic plasmids, selection and production of individual clones of fluorescent cells; inoculation of tumor cells to mice, mouse blood samples collection, ELISA of mouse blood serum, analysis of the obtained data, writing, discussion and editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.К. Марынич / N.K. Marynich: <https://orcid.org/0000-0003-1032-0959>

А.В. Гавшина / A.V. Gavshina: <https://orcid.org/0000-0002-2822-5143>

И.Г. Меерович / I.G. Meerovich: <https://orcid.org/0000-0001-9732-8149>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-24-00550).

Funding. The research was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 24-24-00550).

Соблюдение правил биоэтики. В ходе исследования были соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных. Вся экспериментальная работа осуществлялась в соответствии с нормами Международных рекомендаций по биомедицинским исследованиям (International Recommendations for Biomedical Research (CIOMS)), национальных руководств и правил учреждения по содержанию и использованию лабораторных животных. Протоколы исследований на животных одобрены этическим комитетом ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» (решение №3/2024).

Compliance with the rules of bioethics. All applicable international, national and/or institutional principles of animal care and use were followed during the study. All experimental work was carried out in accordance with the norms of the International Recommendations for Biomedical Research (CIOMS), as well as national guidelines and rules established by the institution regarding housing and usage of laboratory animals. Animal research protocols were approved by the Ethics Committee of the Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences (Decision No. 3/2024).

Статья поступила: 10.06.2025. Принята к публикации: 25.08.2025. Опубликовано онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 10.06.2025. Accepted for publication: 25.08.2025. Published online: 25.09.2025.