

ПРЯМОЕ СРАВНЕНИЕ ВАРИАНТОВ ДАЛЬНЕ-КРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ KATUSHKA С ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЕЙ НА КСЕНОГРАФТНЫХ МЫШИНЫХ МОДЕЛЯХ ИЗУЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Левчук К. А.¹, Богданова Д. А.^{2,3}, Ершова А. Е.^{1,3}, Смирнов С. В.¹,
Голдаева А. А.⁴, Васюткина М. Л.¹, Истомина М. С.¹,
Демидов О. Н.^{1,2,3}, Петухов А. В.¹, Торопова Я. Г.^{1,5}

Контактная информация:

Левчук Ксения Александровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: ksenialevchuk2@gmail.com

Статья поступила в редакцию 03.12.2022
и принята к печати 22.12.2022.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург,
Россия

³ Автономная некоммерческая образовательная организация
высшего образования «Научно-технологический университет
«Сириус», Сочи, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург,
Россия

Резюме

Актуальность. Исследования в области онкологии требуют использования животных ксенографтных моделей, соответствующих принципам гуманности и рациональности. Доклинические исследования низкомолекулярных ингибиторов, противоопухолевых моноклональных антител, вакцин, клеточных препаратов, в том числе CAR-T клеток, нуждаются в прижизненном контроле динамики роста опухоли. Широко применяемая люциферазная детекция биолюминесценции ксенографтов требует введения субстрата, однако инъекции менее гуманны, более трудоемки, дорогостоящи, стрессируют животное. Альтернативой люциферазной биолюминесценции могут быть флуоресцентные белки дальне-красного спектра, визуализация эмиссии которых в экспериментальных моделях *in vivo* упростит манипуляции с животными и увеличит доступность детекции. **Цель.** Сравнить эффективность детекции динамики роста опухолевых ксенографтов *in vivo* в мышинных моделях с инъекцией опухоли шейки матки, применяя доступную линейку флуоресцентных дериватов красного белка одной кланды Katushka с распространенной в *in vivo* исследованиях люциферазой *Renilla*. **Материалы и методы.** Ксенографтные модели NSG-SGM3 мышей были получены подкожным введением модифицированных клеток линии HeLa, экспрессирующих флуоресцентные белки-репортеры Katushka, Katushka2S, TurboRFP, TurboFP650 и люциферазу *Renilla*. Исследование и оценку флуоресцентного и биолюминесцентного сигнала опухоли

проводили на 7, 14, 21 сутки после введения ксенографта. **Результаты.** Спектральные характеристики и детекция эмиссии белков-репортеров *Katushka* и *Katushka2S* выделяют данные маркеры среди всей линейки исследуемых белков дальне-красного спектра. **Заключение.** Детекция флуоресцентного сигнала дальне-красных белков-репортеров *Katushka* и *Katushka2S* может служить полноценной альтернативой люциферазной биолуминесценции фермента *Renilla* в экспериментальных моделях *in vivo* в рамках иммунотерапевтических исследований.

Ключевые слова: биолуминесценция, визуализация ксенографтов *in vivo*, люциферазная детекция, флуоресцентные белки, флуоресценция в биомедицинских исследованиях.

Для цитирования: Левчук К.А., Богданова Д.А., Ершова А.Е., Смирнов С.В., Голдаева А.А., Васютина М.Л., Истомина М.С., Демидов О.Н., Петухов А.В., Торопова Я.Г. Прямое сравнение вариантов дальне-красных флуоресцентных белков *KATUSHKA* с люциферазной биолуминесценцией на ксенографтных мышечных моделях изучения опухолей эпителиального происхождения. *Трансляционная медицина*. 2021;9(6):59-70. DOI: 10.18705/2311-4495-2022-9-6-59-70

////////////////////////////////////

DIRECT COMPARISON OF KATUSHKA FAR-RED FLUORESCENT PROTEIN VARIANTS WITH LUCIFERASE BIOLUMINESCENCE IN XENOGRAFT MOUSE MODELS OF EPITHELIAL TUMOR STUDIES

Ksenia A. Levchuk¹, Daria A. Bogdanova^{2,3}, Alina E. Ershova^{1, 3}, Sergey V. Smirnov¹, Alexandra A. Goldaeva⁴, Marina L. Vasyutina¹, Maria S. Istomina¹, Oleg N. Demidov^{1,2,3}, Alexey V. Petukhov¹, Yana G. Toropova^{1,5}

Corresponding author:

Ksenia A. Levchuk,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: ksenialevchuk2@gmail.com

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Cytology, Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

³ Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

⁴ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

⁵ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Received 03 December 2022; accepted
22 December 2022.

////////////////////////////////////

Abstract

Background. Research in oncology assumes establishment and usage of xenograft animal models, meeting the requirements of humanity and rationality. Although praised as promising field of research, preclinical studies of low-molecular-weight inhibitors, antitumor monoclonal antibodies, vaccines, cellular therapy products, CAR-T cells entail continuous control of tumor growth dynamics. Luciferase detection of bioluminescence requires injection of a reporter substrate. However, injections not only are laborious, time-consuming and expensive, but are also stressful for animals. Thus, a vast variety of new visualization methods is employed, including proteins of the far-red spectrum. **Objective.** The study aimed to compare detection efficiency of tumor growth dynamics in mice models of cervical cancer, applying a commercially available line of fluorescent red protein derivatives of *Katushka* clade and *Renilla* luciferase, that is commonly used in *in vivo* studies. **Design and methods.** Xenograft mice models were derived injecting modified HeLa cell line, that expresses fluorescent reporter proteins: *Katushka*, *Katushka2S*, TurboRFP, TurboFP650 and *Renilla* enzyme. **Results.** Spectral properties and emission wavelength

of far-red fluorescent protein Katushka and Katushka2S outlines these markers within RFP derivatives lineage as outstanding instrument for *in vivo* tumor visualization. **Conclusion.** Detection of fluorescent far-red reporters Katushka and Katushka2S can be considered as a credible alternative to *Renilla* luciferase bioluminescence in experimental models *in vivo* on the part of immunotherapy research.

Key words: bioluminescence, fluorescence in biomedical research, fluorescent proteins, luciferase detection, visualization of xenografts *in vivo*.

For citation: Levchuk KA, Bogdanova DA, Ershova AE, Smirnov SV, Goldaeva AA, Vasyutina ML, Istomina MS, Demidov ON, Petukhov AV, Toropova YG. Direct comparison of KATUSHKA far-red fluorescent protein variants with luciferase bioluminescence in xenograft mouse models of epithelial tumor studies. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2022;9(6):59-70. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2022-9-6-58-70

Введение

Биолюминесценция, созданная самой природой для целей полового размножения, привлечения жертвы, отпугивания и других нужд у различных организмов, стала незаменимым инструментом в биологических исследованиях [1–4]. Индуктором биолюминесценции могут служить свет (фотолюминесценция) или энергия химической реакции (хемилюминесценция). Сложно переоценить важность использования этого явления в колоссальном количестве исследований, что подтверждает Нобелевская премия по химии 2008 года за открытие и развитие исследований с применением зеленого флуоресцентного белка (англ. GFP). Ее были удостоены три биолога: Осаму Шимомура, Роджер Тсиен и Мартин Чалфи [5]. Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 2008 году разделили три вирусолога, в том числе Харальд цур Хаузен, за открытие вирусов папилломы человека, вызывающих рак шейки матки. Весьма интересным является тот факт, что в нашей работе исследуются флуоресцентные белки, экзогенно экспрессирующиеся в линии рака шейки, объединив тем самым объекты двух Нобелевских премий одного года. GFP, ставший первым широко используемым в исследованиях флуоресцентным белком, был получен, а через 30 лет и клонирован как ген из медузы *Aequorea victoria*. Зеленое свечение этого белка было возможно только в присутствии источника света определенной длины волны, получаемого этим же организмом в результате окисления белка экворина и в присутствии ионов кальция. Кроме экворина известной группой светоизлучающих веществ являются люциферины. Люциферины излучают свет в результате их окисления ферментами люциферазами и встречаются у светлячков, моллюсков, бактерий, простейших, ракообразных, глубоководных рыб и грибов [6]. Еще один представитель книдарий, как и ранее упомяну-

тая медуза *Aequorea Victoria*, *Renilla reniformis*, или коралловый полип морские аниотины глазки синтезирует используемую нами мономерную люциферазу RLuc [7] (рис. 1).

Как фото-, так и хемилюминесценция позволяют визуализировать и отслеживать молекулы, отдельные клетки, ткани, органы, организмы и, конечно, опухоли. Применяя биолюминесценцию в изучении опухолей, можно отследить их рост и метастазирование в ксенографтных мышинных моделях без инвазивного вмешательства, эвтаназии животного или неточных наружных измерений приборами типа штангенциркуля, то есть возможно оценить рост и развитие опухоли в живом модельном организме в динамике и, например, под воздействием терапии. Существенной проблемой в такого рода исследованиях может быть поглощение биолюминесценции или интерференция тканями и органами животного, в том числе такими их компонентами, как гемоглобин и меланин. Длины волн от 650 нм до 900 нм проходят через ткани мышей практически беспрепятственно и характеризуются как «окно прозрачности». Термин «окно прозрачности» используется в работах Владислава Верхуши и его коллег, которыми в Медицинском колледже Альберта Эйнштейна в Нью-Йорке были получены фитохомные белки iRFP670, iRFP682, iRFP702, iRFP713 и iRFP720, поглощающие и излучающие свет в ближней инфракрасной части [8–10]. Другими флуоресцентными белками, попадающими в «окно прозрачности», являются дериваты красного флуоресцентного белка (RFP) актинии *Entacmaea quadricolor* (рис. 1): TurboFP635 или Katushka, его улучшенная версия Katushka2S и TurboFP650 [11–16] (рис. 2), полученные путем аминокислотных замен.

Собственно, дериваты ветки Katushka и экспрессирующие их опухолевые линии коммерчески

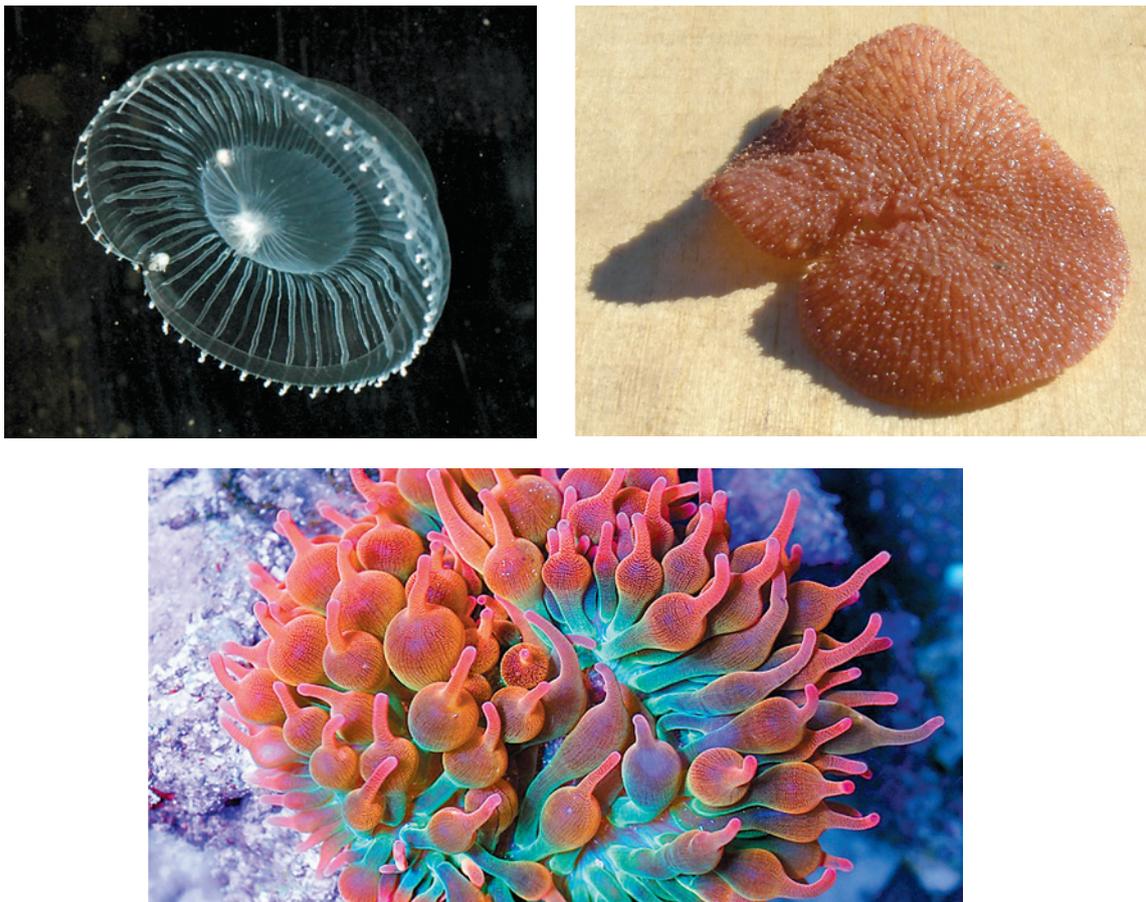


Рис. 1. Медуза *Aequorea Victoria*, коралловый полип *Renilla reniformis* и актиния *Entacmaea quadricolor* (фото Sierra Blakely, Gregory Badon и Matthew Zahler соответственно)

Figure 1. Jellyfish *Aequorea Victoria*, coral polyp *Renilla reniformis* and sea anemone *Entacmaea quadricolor* (photo by Sierra Blakely, Gregory Badon and Matthew Zahler, respectively)

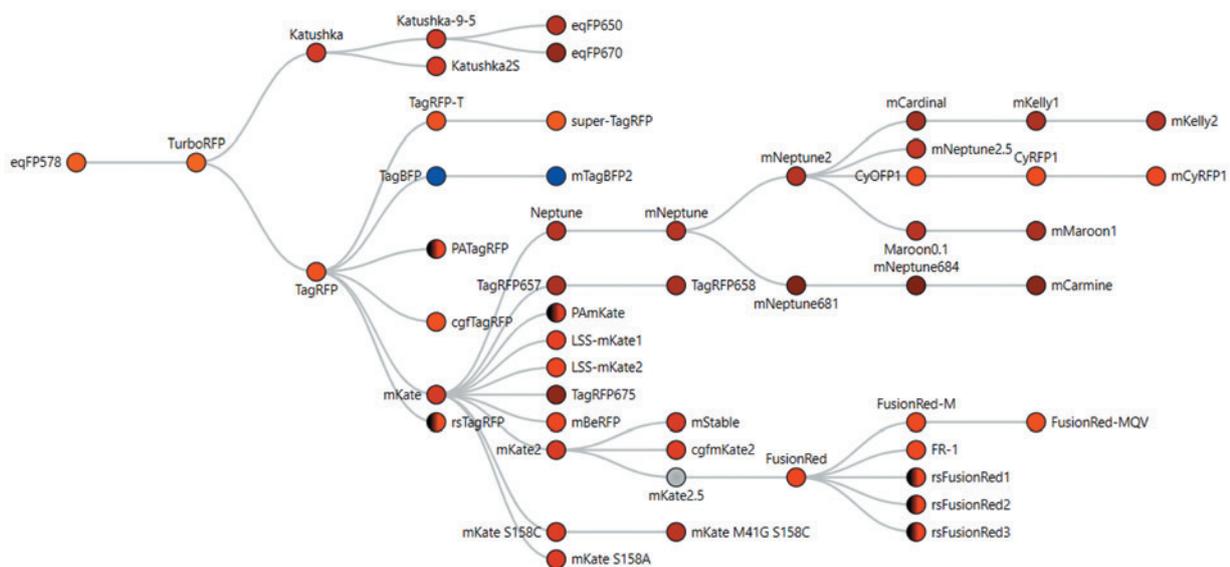


Рис. 2. Дериваты RFP [16]

Figure 2. RFP derivatives [16]

доступны, характеризуются быстрым созреванием при 37 °С, высокой рН-стабильностью и фотостабильностью, не образуют агрегатов и могут подходить для визуализации внутри целых организмов. Нами была изучена данная ветвь дериватов для выбора оптимального флуоресцентного белка в подкожной ксенографтной модели опухолевого роста NSG мышей, которые отличны от часто используемого штамма Nude наличием шерсти, также являющейся барьером для визуализации. Мыши NSG, благодаря их мутациям, дефицитны по В- и Т-клеткам и функциональным НК-клеткам, не имеют С5 комплимент и незаменимы в исследованиях иммунной функции человека, инфекционных заболеваний, диабета, онкологии и биологии стволовых клеток [17]. NSG мышей возможно гуманизировать прививанием CD34+ гемопоэтических стволовых клеток человека [18], и они подходят для исследований с использованием различных стратегий ксенотрансплантации [19], высокочувствительны к диабетогенным эффектам стрептозотоцина [20], применяются в исследованиях CAR-T препаратов [21].

Материалы и методы

Клеточные линии

Используемые клеточные линии аденокарциномы шейки матки HeLa, полученной от 31-летнего пациента, и иммортализованной почки эмбриона человека Hek293T культивировали в ростовой среде RPMI 1640 (Capricorn Scientific, RPMI-STA) с добавлением 10 % FBS (Thermo Fisher Scientific, 26140079) и пенициллин-стрептомицина (Capricorn Scientific, PS-B). Экспериментальные клеточные линии были любезно предоставлены Лабораторией регуляции экспрессии генов Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Оверэкспрессия дальне-красных белков-репортеров

Флуоресцентные белки были клонированы в экспрессионные плазмиды для сборки лентивирусных векторов с бластицидиновой устойчивостью и ко-трансфецированы с векторами psPAX2 и pMD2.G, предоставленными Didier Trono в линию-упаковщик Hek293T. Для сборки лентивирусных векторов, несущих ген *Renilla*, использовалась плазида pLenti.PGK.blast-*Renilla*_Luciferase, предоставленная Reuben Shaw. Для трансфекции использовалось соотношение ДНК 3:3:1 между плазидами соответственно и 2:1 между катионным трансфецирующим реагентом PEI MAX (PEI MAX™, 24765-1) и смесью всех трех плазмид. Рекомбинантные лентивирусные частицы концентриро-

вали с использованием метода ультрафильтрации на модулях Amicon 100K (Millipore, ACS510024), линию HeLa трансдуцировали в условиях MOI 10 и применением реагента протамина сульфата (АО «ЭКОФАРМПЛЮС», V03AB14). Селекцию прошедших этап лентивирусной трансдукции клеток и экспрессирующих белок-репортер осуществляли в течение недели с помощью антибиотика бластицидина (InvivoGen, ant-bl-05) в концентрации 5 мкг/мл. Оценку флуоресценции также производили методом проточной цитофлуориметрии на оборудовании CytoFLEX (Beckman Coulter).

In vivo модели NSG-SGM3

Мыши NSG-SGM3 — линия иммунодефицитных трансгенных мышей, экспрессирующих SCF (*KITLG*), GM-CSF (*CSF2*) и IL-3, представляет собой главную экспериментальную *in vivo* модель в иммунотерапевтических исследованиях. Содержание мышей осуществляли в условиях стерильной зоны вивария ЦДТИ НМИЦ им. В. А. Алмазова. В эксперимент были отобраны 6 здоровых особей линии NSG-SGM3 в возрасте 14 недель без градации по половому признаку. Животным на первом этапе путем однократной подкожной инъекции были трансплантированы в объеме 0,2 мл 2 миллиона клеток опухоли HeLa, экспрессирующих флуоресцентные белки *Katushka*, *TurboRFP*, *Katushka2S*, *TurboRFP650*, а также ген люциферазы и контрольная клеточная линия без модификаций. Животные всех групп получили опухолевые клетки подкожно в зону бедра во внеклеточном матриксе матригеле (Merck Life Science LLC, CLS354234). Измерение размеров опухоли, взвешивание животных и осмотр производили один раз в неделю. Во временные точки эксперимента — день 1 (спустя сутки после введения), день 8, день 15 и день 22 была осуществлена оценка флуоресценции и биолюминесценции репортеров с помощью системы визуализации IVIS® Lumina LT series III (PerkinElmer, США). Для животного с опухолью HeLa *Renilla* внутрибрюшинно раз в неделю вводили субстрат *ViviRen* (Promega Corporation, P1231) для инициации реакции и детекции хемилюминесцентного сигнала (объем введения 0,2 мл).

Визуализация ксенографтов *in vivo*

Исследование люминесценции и флуоресценции произведено на флуоресцентном биоимиджере IVIS Lumina. Предварительно животные были наркотизированы 1,5 % раствором изофлурана («АЕРРАН», Baxter), а затем перемещены в камеру для визуализации, где также продолжалось поддержание 1 % наркоза. Фильтры для эксперименталь-

ных групп выбирались исходя из спектров поглощения и излучения белков Katushka, Katushka2S, TurboRFP, TurboFP650, которые соответствуют встроенным фильтрам 640-Cy5.5 и 535-DsRed, а для фермента *Renilla* выбран люминесцентный режим съемки с автоматической настройкой экспозиции.

Обработка изображений произведена в ПО Living Image 4.7.4. Сигналы флуоресценции и люминесценции были измерены с помощью автоматического выделения контура ROI (изучаемая область) на оптическом изображении.

Результаты

Согласно результатам проточной цитофлуориметрии клеточных линий были обнаружены разные уровни инфекции рекомбинантными лентивирусными частицами и разный процент положительной по дальне-красному маркеру популяции (рис.

3). Наиболее эффективно прошла трансдукция клеточных линий Katushka и Katushka2S — 96,68 % и 98,37 % соответственно. Наиболее низкий процент эффективности трансдукции был обнаружен для клеточных линий HeLa с оверэкспрессией TurboRFP и TurboFP650 — 67,69 % и 25,39 %. Разница в процентах эффективности трансдукции и флуоресценции вводимых ксенографтов была учтена в дальнейшей обработке данных по расчетам интенсивности свечения *in vivo*.

Визуализацию функциональности репортерной конструкции с трансгеном *Renilla* осуществляли с помощью набора Dual-Luciferase® Reporter (DLR™, E1910), согласно протоколу производителя. Наличие экспрессии люциферазы *Renilla* в лизатах клеточных линий HeLa_{wt} (контроль) и HeLa_{Renilla} оценивали по катализу реакции окисления коэлюцентеразина косвенно по испусканию квантов света. Детекцию испускаемых квантов

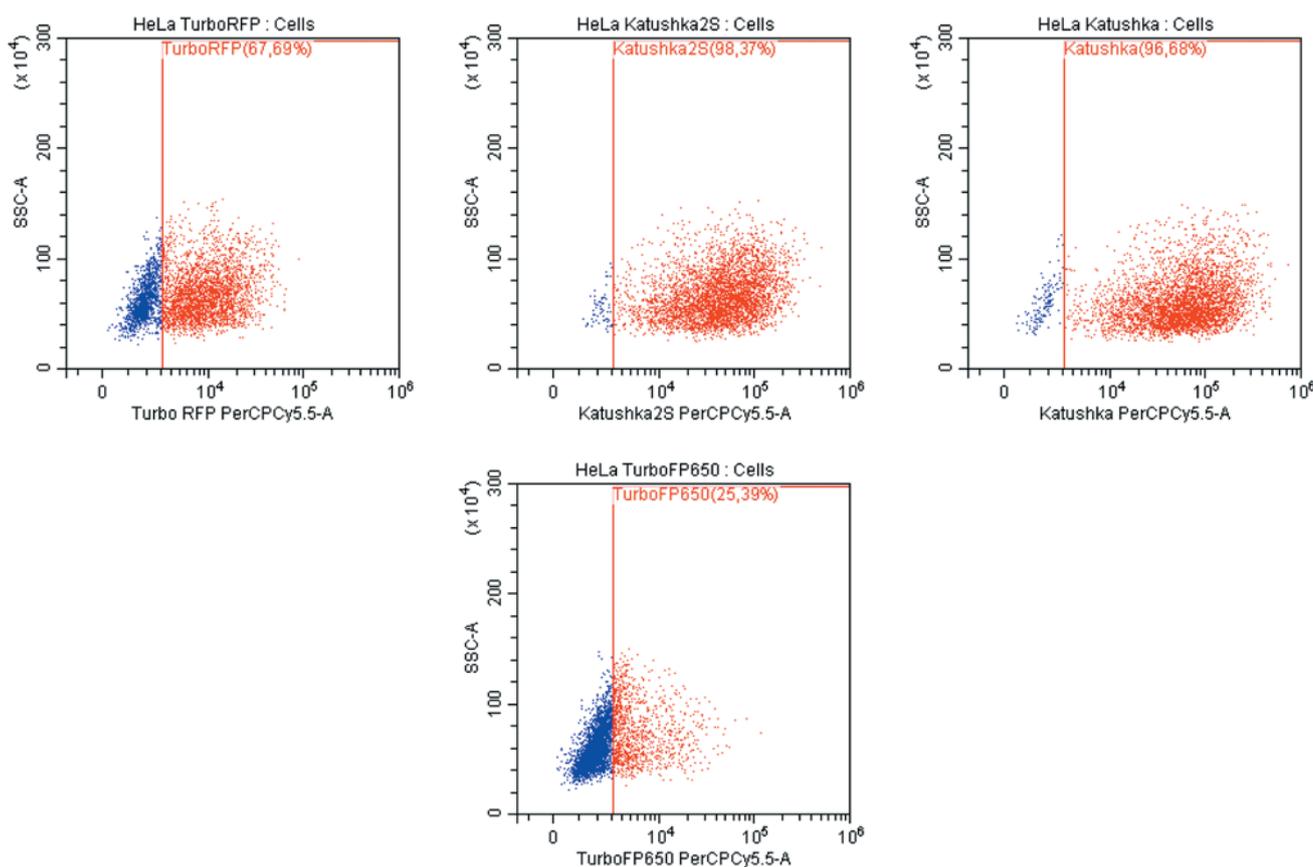


Рис. 3. Цитофлуориметрическая оценка линий HeLa с экспрессией белков дальне-красного спектра Katushka, TurboRFP, Katushka2S, TurboRFP650 после трансдукции рекомбинантными лентивирусными частицами

Красным выделены события, которые отражают процент успешно прошедших трансдукцию и селекцию клеток.

Figure 3. Cytofluorometric evaluation of HeLa lines expressing far-red proteins Katushka, TurboRFP, Katushka2S, TurboRFP650 after transduction with recombinant lentiviral particles

Events are highlighted in red, which reflect the percentage of successfully transduced and selected cells.

света проводили в канале хемилюминесценции системы визуализации ChemiDoc MP Imaging System (BioRad) (рис. 4).

Визуализацию ксенографтных моделей мышей *in vivo* осуществляли с помощью системы докли-

нической визуализации IVIS® Lumina LT series III (PerkinElmer, США). Экспериментальных животных временно подвергали ингаляционной анестезии, во время которой проводили визуализацию флуоресцентного сигнала ксенографтов. Опухоло-

Таблица 1. Показатели визуализации опухолевых ксенографтов линии NSG-SGM3 спустя 22 дня после подкожного введения (финальная точка)

Table 1. Visualization parameters of tumor xenografts of the NSG-SGM3 line after 22 days of subcutaneous injection (final point)

Белок-репортер	Реальная средняя интенсивность флуоресценции свечения на единицу площади опухоли (ИФ), [p/s/cm ² /sr]/ [μW/cm ²]	Пересчет интенсивности на процент трансдукции, [p/s/cm ² /sr]/ [μW/cm ²]	Эффективность детекции (ЭД), [p/s/cm ² /sr]/ [μW/cm ²]
TurboRFP	1,02E+09	1,50E+09	6,63E+03
TurboFP650	1,59E+08	6,25E+08	2,80E+03
Katushka	1,53E+09	1,58E+09	7,81E+03
Katushka2S	6,75E+08	6,86E+08	3,20E+03
<i>Renilla</i>	1,94E+05	1,94E+05	1,00E+00

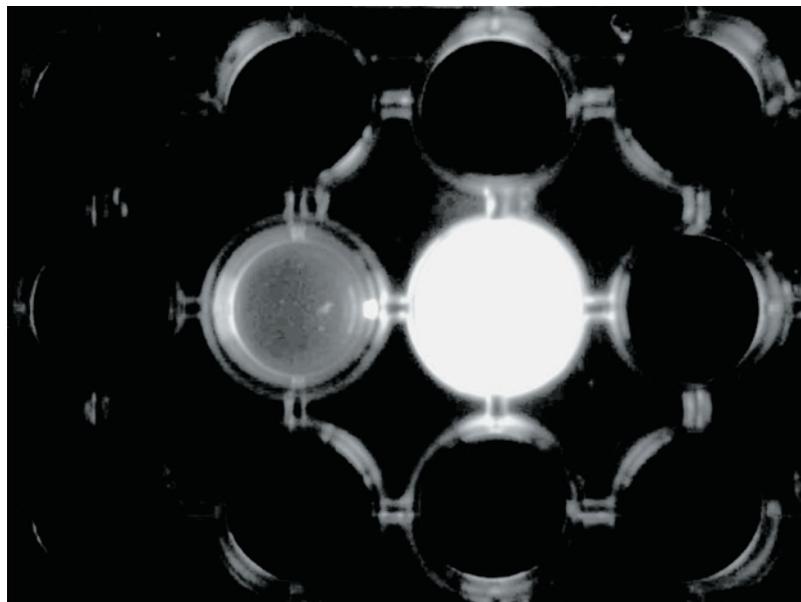


Рис. 4. Детекция люминесцентного сигнала в клеточных линиях HeLa_wt (негативный контроль, слева) и HeLa_Renilla (исследуемая линия, справа)

Экспрессия репортера люциферазы *Renilla* верифицируется испусканием квантов света при реакции окисления коэлентеразина.

Figure 4. Detection of the luminescent signal in the HeLa_wt (negative control, left) and HeLa_Renilla (test line, right) cell lines

The expression of the *Renilla* luciferase reporter is verified by the emission of light quanta during the oxidation reaction of coelenterazine.

вый ксенографт был обнаружен для всех исследуемых вариантов белков дальне-красного спектра. Прослеживалось увеличение размеров узла опухоли и вращание ксенографта в бедренную мышцу модельных животных. Наибольшими значениями средней эффективности излучения обладали ксенографты опухолей с экспрессией *Katushka*, *TurboRFP*,

Katushka2S — 1,53E+09, 1,02E+09, 6,75E+08 [p/s/cm²/sr]/ [μW/cm²] соответственно (табл. 1). Для сравнения уровней детекции белков были вычислены единицы эффективности детекции для каждого исследуемого флуоресцентного маркера (рис. 5). Непосредственное сравнение интенсивности свечения ксенографтов проводили, используя данные



Рис. 5. Оценка единиц эффективности детекции флуоресценции белков дальне-красного спектра при визуализации мышей линии NSG-SGM3 с помощью системы IVIS® Lumina LT series III (PerkinElmer, США)

Сигнал биoluminesценции ксенографта с репортером *Renilla* является контрольным.

Figure 5. Evaluation of units of efficiency of detection of fluorescence of far-red spectrum proteins during imaging of NSG-SGM3 mice using the IVIS® Lumina LT series III system (PerkinElmer, USA).

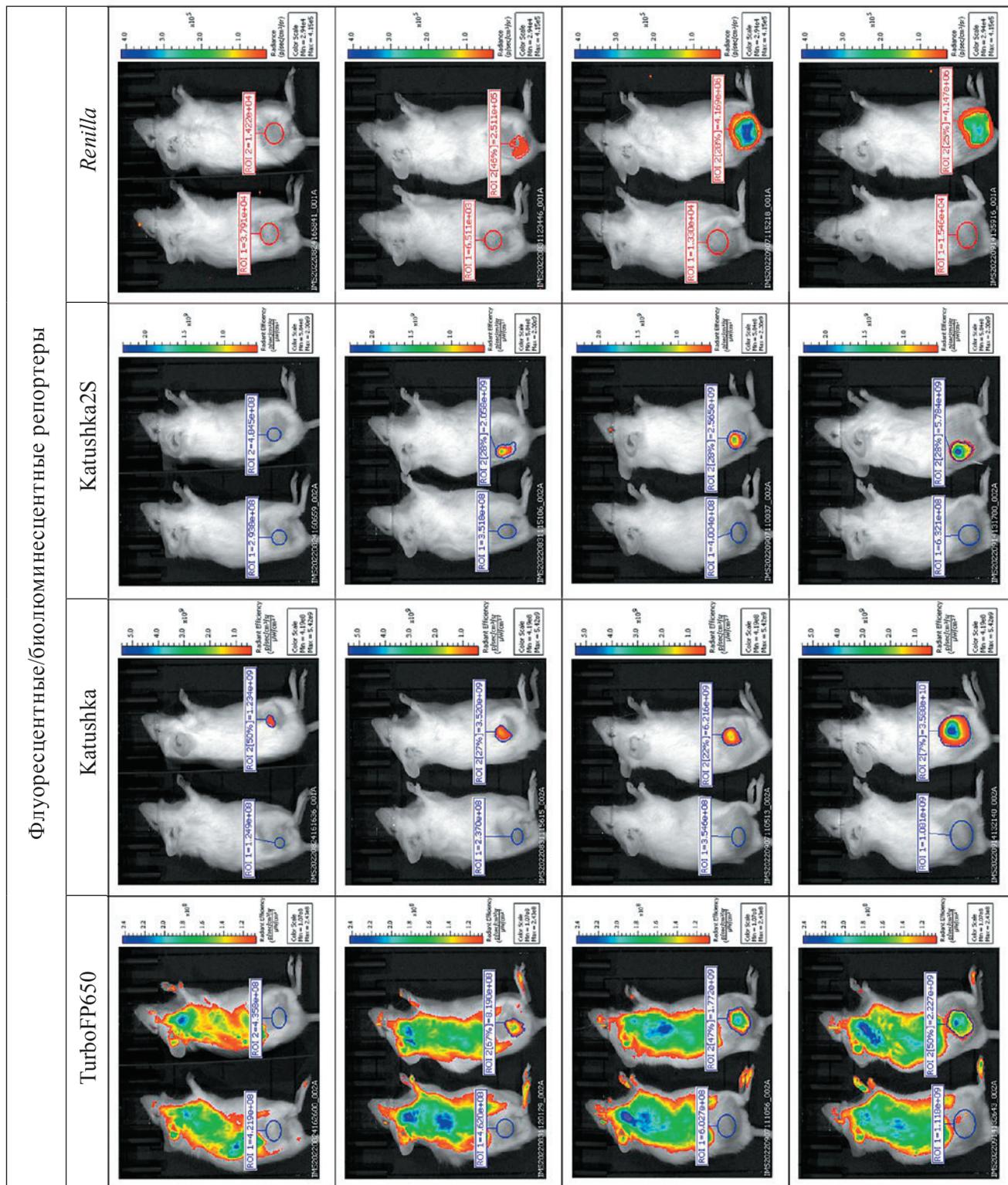
The bioluminescence signal of the xenograft with the *Renilla* reporter is the control.

$$ЭД = \frac{ИФ/ЭТ * 100 - ФС}{РЗ}$$

Рис. 6. Формула вычисления единиц эффективности детекции для сравнения детектируемого сигнала белков-репортеров дальне-красного спектра в *in vivo* моделях

ЭД — эффективность детекции, ИФ — интенсивность флуоресценции, ЭТ — эффективность трансдукции, ФС — фоновое свечение, РЗ — референтное значение.

Figure 6. Formula for calculating detection efficiency units for comparing the detected signal of far-red reporter proteins in *in vivo* models



Флуоресцентные/ биолюминесцентные репортеры	TurboRFP			
День визуализации	1 день после введения инъекции (начальная точка)	8 день после введения инъекции	15 день после введения инъекции	22 день после введения инъекции (финальная точка)

Таблица 2. Визуализация флуоресцентного и биолюминесцентного сигнала опухоли. Точки измерений: 2, 8, 15, 22 сутки после введения инъекции

Table 2. Visualization of fluorescent and bioluminescent tumor signal. Measurement points: 2, 8, 15, 22 days after injection

финальной точки визуализации, на 22 сутки после инъекции опухоли.

При прямом сравнении трех дериватов RFP, как и собственно самого красного флуоресцентного белка, со ставшей классической люциферазной детекцией отсутствие фонового сигнала показали только белки *Katushka* и *Katushka2S*. Ввиду разного уровня трансдуцированных клеток невозможно провести сравнение эффективности детекции, для получения возможности сопоставления эффективностей необходимо вычислить теоретическую среднюю интенсивность свечения на единицу площади при 100 % трансдукции. Для сравнения показателей нами была использована следующая формула расчета эффективности детекции (ЭД): значение средней интенсивности флуоресценции на единицу площади (ИФ), полученное с прибора, необходимо разделить на процент трансдукции для того, чтобы оценить уровень свечения при 1 % трансдукции (ИФ/ЭТ). Полученное значение следует умножить на 100 (ИФ/ЭТ*100), что позволит получить теоретическое значение средней интенсивности свечения на единицу площади опухоли. Далее по формуле мы вычитаем среднее свечение фона на единицу площади (ФС) и делим на референтное значение (РЗ) — среднее свечение ренилла на единицу площади, так мы сможем оценить эффективность свечения относительно *Renilla*. Формула, по которой производится расчет, представлена на рисунке 6.

В динамике детекция показала раннее обнаружение *Katushka* по сравнению с *Katushka2S* и

Renilla. Фото визуализации представлены в виде таблицы 2.

Обсуждение

Нами было установлено предпочтительное использование *in vivo* в подкожной ксенографтной модели NSG мышей опухоли шейки матки флуоресцентных белков *Katushka* и *Katushka2S* по сравнению с RFP и RFP650, так как при получении изображения флуоресценции FRP и RFP650 наблюдается свечение волосяного покрова мыши, что затрудняет визуализацию и, следовательно, не позволяет получить точного изображения ксенографта без фонового свечения. Эффективность детекции репортеров *Katushka* и *Katushka2S* в подкожных опухолевых ксенографтах солидной опухоли позволяет визуализировать изменения с той же чувствительностью, что и с помощью люциферазной биолюминесценции фермента *Renilla* и субстрата *ViviRen*. Раннее обнаружение флуоресценции белка *Katushka* по сравнению с детекцией других репортеров может быть вызвано разницей в эффективности свечения или динамике роста самой опухоли. В свою очередь последний показатель косвенно указывает на токсичность флуоресцентных белков. Отдельным вопросом остается возможность применения белков дальне-красного спектра *Katushka* и *Katushka2S* для иммунотерапевтических исследований в области онкогематологии и визуализации так называемых жидких опухолей, а также их иммуногенность, что может стать предметом наших дальнейших исследований.

Заключение

Визуализация флуоресценции белков-репортеров дальне-красного спектра *Katushka* и *Katushka2S* является эффективным и удобным инструментом детекции динамики опухолевых ксенографтов в *in vivo* моделях мышей. Использование данных белков позволяет эффективно заменить применение биолюминесцентных маркеров. Белки дальне-красного спектра *Katushka* и *Katushka2S* — удобный и точный инструмент визуализации опухолевых ксенографтов в иммунотерапевтических исследованиях *in vivo*.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Работа выполнена за счет средств РФФ № 19-74-20026 от 16 апреля 2019 г. «Исследование механизмов эффективности Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) против клеточных и животных моделей солидных опухолей» 2019-2022 гг. / Recent work was funded by the Russian Science Foundation No. 19-74-20026 dated April 16, 2019 “Investigation of the effectiveness of T-cells with a chimeric antigen receptor (CAR-T) against cell and animal models of solid tumors” 2019-2022.

Список литературы / References

- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 2004; 22(12):1567–1572. DOI: 10.1038/nbt1037.
- Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci.* 2007; 120(Pt 24):4247–4260. DOI: 10.1242/jcs.005801.
- Shaner NC, Lambert GG, Chammas A, et al. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods.* 2013; 10(5):407–409. DOI: 10.1038/nmeth.2413.
- Shaner NC. Fluorescent proteins for quantitative microscopy: important properties and practical evaluation. *Methods Cell Biol.* 2014; 123:95–111. DOI: 10.1016/B978-0-12-420138-5.00006-9.
- Swaminathan S. GFP: the green revolution. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(S1):S20–S20. DOI: 10.1038/ncb1953.
- Hastings JW. Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *J Mol Evol.* 1983; 19(5):309–321. DOI: 10.1007/BF02101634.
- Otto-Duessel M, Khankaldyyan V, Gonzalez-Gomez I, et al. *In vivo* testing of *Renilla* luciferase substrate analogs in an orthotopic murine model of human glioblastoma. *Mol Imaging.* 2006; 5(2):57–64.
- Filonov GS, Piatkevich KD, Ting LM, et al. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for *in vivo* imaging. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(8):757–761. DOI: 10.1038/nbt.1918.
- Shcherbakova DM, Verkhusha VV. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor *in vivo* imaging. *Nat Methods.* 2013; 10(8):751–754. DOI: 10.1038/nmeth.2521.
- Krumholz A, Shcherbakova DM, Xia J, et al. Multicontrast photoacoustic *in vivo* imaging using near-infrared fluorescent proteins. *Sci Rep.* 2014; 4:3939. DOI: 10.1038/srep03939.
- Leblond F, Davis SC, Valdés PA, et al. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J Photochem Photobiol B.* 2010; 98(1):77–94. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2009.11.007.
- Gurskaia NG, Staroverov DB, Fradkov AF, et al. Coding region of far-red fluorescent protein *katushka* contains a strong donor splice site. *Bioorg Khim.* 2011; 37(3):425–428. DOI: 10.1134/s1068162011030071.
- Luker KE, Pata P, Shemiakina II, et al. Comparative study reveals better far-red fluorescent protein for whole body imaging. *Sci Rep.* 2015; 5:10332. DOI: 10.1038/srep10332.
- Shcherbo D, Murphy CS, Ermakova GV, et al. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J.* 2009; 418(3):567–574. DOI: 10.1042/BJ20081949.
- Shcherbo D, Shemiakina II, Ryabova AV, et al. Near-infrared fluorescent proteins. *Nat Methods.* 2010; 7(10):827–829. DOI: 10.1038/nmeth.1501.
- FPbase: The Fluorescent Protein Database. <https://www.fpbases.org/organism/6118/>
- The Jackson Laboratory. <https://www.jax.org/strain/005557>
- Xia X, Li H, Satheesan S, Zhou J, et al. Humanized NOD/SCID/IL2rynull (hu-NSG) Mouse Model for HIV Replication and Latency Studies. *J Vis Exp.* 2019; (143):10.3791/58255. DOI: 10.3791/58255.
- Skoda J, Neradil J, Staniczkova Zambo I, et al. Serial Xenotransplantation in NSG Mice Promotes a Hybrid Epithelial/Mesenchymal Gene Expression Signature and Stemness in Rhabdomyosarcoma Cells. *Cancers (Basel).* 2020; 12(1):196. DOI: 10.3390/cancers12010196.
- Jurczyk A, Diiorio P, Brostowin D, et al. Improved function and proliferation of adult human beta cells engrafted in diabetic immunodeficient NOD-scid IL2ry(null) mice treated with alogliptin. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2013; 6:493–499. DOI: 10.2147/DMSO.S53154.
- Wen H, Qu Z, Yan Y, et al. Preclinical safety evaluation of chimeric antigen receptor-modified T cells against CD19 in NSG mice. *Ann Transl Med.* 2019; 7(23):735. DOI: 10.21037/atm.2019.12.03.

Информация об авторах:

Левчук Ксения Александровна, аспирант, младший научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Богданова Дарья Алексеевна, младший научный сотрудник, аспирант Научно-технологического университета «Сириус»; старший лаборант-исследователь Института цитологии РАН;

Ершова Алина Евгеньевна, студент Научно-технологического университета «Сириус»; лаборант-исследователь ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Смирнов Сергей Владимирович, младший научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Голдаева Александра Андреевна, студент Санкт-Петербургского государственного университета;

Васютина Марина Львовна, научный сотрудник, ветеринарный врач вивария ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Истомина Мария Сергеевна, младший научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Демидов Олег Николаевич, д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии РАН»; ведущий научный сотрудник Научно-технологического университета «Сириус», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Петухов Алексей Вячеславович, научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Торопова Яна Геннадьевна, к.б.н., доцент кафедры патологической физиологии лечебного факультета Института медицинского образования, заведующий НИЛ биопротезирования и кардиопротекции ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Author information:

Ksenia A. Levchuk, PhD student, Junior researcher, Almazov National Medical Research Centre;

Daria A. Bogdanova, Senior laboratory researcher, Institute of Cytology Russian Academy of Science; Junior researcher, PhD student, Sirius University of Science and Technology;

Alina E. Ershova, student, Sirius University of Science and Technology; Laboratory researcher Almazov National Medical Research Centre;

Sergey V. Smirnov, Junior researcher, Almazov National Medical Research Centre;

Alexandra A. Goldaeva, student, Saint Petersburg State University;

Marina L. Vasyutina, Researcher, Vivarium veterinarian, Almazov National Medical Research Centre;

Maria S. Istomina, Junior researcher, Almazov National Medical Research Centre;

Oleg N. Demidov, MD, Leading researcher, Institute of Cytology Russian Academy of Science; Leading researcher, Sirius University of Science and Technology, Almazov National Medical Research Centre;

Alexey V. Petukhov, researcher, Almazov National Medical Research Centre;

Yana G. Toropova, Ph.D., assistant professor, Department of pathological physiology, Institute of medical education, Head of the Bioprosthesis and Cardioprotection Research Laboratory, Almazov National Medical Research Centre; deputy director of scientific work, Institute of experimental medicine.