

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 616-006.81.04:[57.085.23+577.21+612.017.1]
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-465-473>

Поступило в редакцию 26.08.2024
Received 26.08.2024

**Н. Г. Антоневи́ч¹, И. А. Бадаля́н¹, А. Е. Гонча́ров¹,
академик Л. П. Титов², В. В. Гринев³**

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

²*Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья,
Минск, Республика Беларусь*

³*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

РАЗРАБОТКА ЛЕНТИВИРУСНОЙ ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ И ПРЕЗЕНТАЦИИ МЕЛАНОМНОГО АНТИГЕНА MLANA В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация. Освоены и испытаны лентивирусные векторы экспрессии, кодирующие два генно-инженерных варианта белка MLANA, названных MLANA-FLAG[®] и MLANA-FLAG[®]-LAMP1. Транскрипционная/трансляционная активность сконструированных последовательностей в клетках линии HEK 293T и дендритных клетках подтверждена методами флуоресцентной конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. Созданные генетические конструкции могут быть использованы для генетической модификации дендритных клеток и разработки новых методов клеточной терапии меланомы.

Ключевые слова: меланома, белок MLANA, лентивирусная трансдукция, дендритные клетки, презентация антигена

Для цитирования. Разработка лентивирусной векторной системы для эктопической экспрессии и презентации меланомного антигена MLANA в клетках человека / Н. Г. Антоневи́ч [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 465–473. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-465-473>

**Natalia G. Antonevich¹, Iryna A. Badalyan¹, Andrei Y. Hancharou¹,
Academician Leonid P. Titov², Vasily V. Grinev³**

¹*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus*

³*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

DEVELOPMENT OF THE LENTIVIRUS-BASED VECTOR SYSTEM FOR ECTOPIC EXPRESSION AND PRESENTATION OF THE MELANOMA ANTIGEN MLANA IN HUMAN CELLS

Abstract. Lentivirus-based vectors encoding two engineered melanoma associated MLANA proteins, named MLANA-FLAG[®] and MLANA-FLAG[®]-LAMP1, were developed and tested. Transcriptional and translational activity of engineered proteins was confirmed in HEK 293T cells and dendritic cells by fluorescence confocal microscopy and flow cytometry. These new vectors can be used for lentiviral transduction of dendritic cells and the creation of new cell therapies for human melanoma.

Keywords: melanoma, MLANA protein, lentiviral transduction, dendritic cells, antigen presentation

For citation. Antonevich N. G., Badalyan I. A., Hancharou A. Y., Titov L. P., Grinev V. V. Development of the lentivirus-based vector system for ectopic expression and presentation of the melanoma antigen MLANA in human cells. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 465–473 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-465-473>

Введение. Меланома – злокачественное новообразование кожи, формирующееся из трансформированных меланоцитов кожи, сетчатки глаз или слизистых оболочек. Из-за быстрого роста опухоли и развития ранних отдаленных метастазов меланома занимает одно из первых мест в отношении неблагоприятного прогноза лечения среди всех онкологических заболеваний. По данным ВОЗ, заболеваемость меланомой кожи за последние 50 лет увеличилась в 7 раз, ежегодно во всем мире регистрируется свыше 300 тыс. случаев заболевания меланомой [1].

Классическая триада – хирургическое, химиотерапевтическое и радиолучевое лечение – зачастую оказывается малоэффективной в лечении метастатической меланомы. Комбинированная терапия IV стадии меланомы дает лишь от 5 до 22,5 % 5-летней выживаемости [2]. Таким образом, по-прежнему существует острая необходимость в разработке более эффективных методов лечения меланомы, улучшающих показатели выживаемости пациентов, особенно когда речь идет о прогрессировании заболевания и переходе онкологического процесса в терминальную стадию.

Известно, что при прогрессировании меланомы происходят глубокие изменения в работе системы иммунитета. В частности, снижение количества дендритных клеток (ДК), которые являются ключевыми активаторами адаптивного иммунного ответа и играют ведущую роль в индукции противоопухолевого иммунного ответа [3]. Основной функцией ДК является поглощение антигенов, в том числе опухолевых, их процессинг и презентация на мембране в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГСК) I и II класса, в таком виде антиген может быть распознан CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетками соответственно. Клетки опухоли способны нарушать межклеточную сигнализацию, увеличивая выработку иммуносупрессивных цитокинов, что приводит, с одной стороны, к торможению активации Т-клеток, с другой – к снижению уровня экспрессии ГСК I и II ДК и их способности к антигенной презентации.

Учитывая, с одной стороны, снижение активности иммунной системы во время прогресса меланомы, и с другой – важность ДК и презентации ими опухолеспецифических или опухолеассоциированных антигенов для противоопухолевого иммунитета, инновационным подходом адъювантной иммунотерапии меланомы может быть использование ДК в качестве биомедицинского клеточного продукта (БМКП). Показано, что такого рода клеточные продукты являются эффективным средством для иммунотерапии онкологических заболеваний и безопасны в использовании [4]. Вместе с тем в случае меланомы результаты лечения с использованием ДК не всегда удовлетворительны. Одним из подходов повышения функциональной активности ДК является их генетическая модификация. Генетическая модификация ДК с помощью трансдукции (переноса генов посредством рекомбинантных вирусов) является предпочтительным способом получения клеток, презентующих целевой антиген, в тех случаях, когда нужна стабильная долгосрочная иммунизация. Наиболее эффективным вариантом такой модификации является лентивирусная трансдукция – перенос генов с помощью рекомбинантных лентивирусов [5; 6].

В качестве генов, переносимых в ДК с помощью лентивирусной трансдукции, могут выступать гены, кодирующие как опухолеассоциированные, так и опухолеспецифические меланомные антигены. Среди опухолеассоциированных антигенов меланомы интересен белок MLANA (MART-1, или антиген, связанный с меланомой, распознаваемый Т-клетками). Он представляет собой специфический для меланоцитов трансмембранный белок, экспрессируемый в нормальных меланоцитах, пигментном эпителии сетчатки и клетках меланомы. Внутриклеточно этот белок обнаруживается в эндоплазматическом ретикулуме, транс-отделе аппарата Гольджи и меланосомах [7], в созревании которых MLANA участвует путем обеспечения стабильности, транспортности и процессинга белка Pmel17 (gp100), что важно для образования меланосом II стадии созревания.

Цель исследования – разработка лентивирусной векторной системы для эктопической экспрессии и презентации антигена MLANA в дендритных клетках человека как основы дальнейшего получения БМКП для лечения меланомы.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы плазмиды pUC57 с конструкциями, кодирующими разработанные авторами генно-инженерные варианты белка MLANA (Synbio Technologies, Южная Корея), лентивирусный вектор экспрессии pHR-SINcPPT-SIEW, вектор упаковки pCMV-dR8.91, вектор оболочки pMD2.G, линия клеток НЕК 293Т и бактериальный штамм *E. coli* DH5a.

Трансформацию бактерий *E. coli* DH5a плазмидной ДНК осуществляли кальциевым методом. Эндонуклеазы рестрикции SgsI и BamHI (Thermo Fisher Scientific, США) использовали для подготовки нуклеотидных последовательностей для клонирования. Очистку плазмид для ко-трансфекции проводили с помощью набора реагентов Endotoxin-free Plasmid DNA Purification

Xtra Midi Plus EF (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Германия). Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью реагентов «АртДНК MiniSpin Гель» (Беларусь).

Ко-трансфекцию клеток линии НЕК 293Т осуществляли с помощью полиэтиленимина: к смеси векторов экспрессии, упаковки и оболочки, взятых в соотношении 3 : 2 : 1 по массе, добавляли полиэтиленимин в массовом соотношении 3 : 1 с плазмидной ДНК, через 24 ч меняли ростовую среду на свежую. Сбор рекомбинантных псевдотипированных лентивирусов осуществляли через 48–72 ч после завершения ко-трансфекции. Концентрирование вирусных частиц проводили методом ультрацентрифугирования на протяжении 120 мин при 120000g и температуре +4 °С. Трансдукцию клеток проводили методом спинокуляции (1500g, 2 ч, +32 °С) с добавлением 4 мкг/мл Polybrene® как описано ранее [8; 9].

Через 48–72 ч после трансдукции осуществляли иммунофенотипирование клеток методом проточной цитометрии на визуализирующих проточных цитометрах Luminex Amnis FlowSight и Luminex Amnis ImageStream mkII (Luminex Corporation, США). Для иммунофенотипирования использовали антитела к белкам MLANA (APC, клон REA1093; Miltenyi Biotec, Германия), LAMP1/CD107a (BV605, клон H4A3; BioLegend, США) и аминокислотной последовательности FLAG® (FLAG-tag) (PE-Cy7, клон L5; BioLegend, США). Ядро визуализировали с помощью Hoechst 33258. Для обработки данных использовали программы IDEAS версии 6.2 и 6.4 (Luminex Corporation, США) и FCS Express, версия 7 (DeNovo Software, США). Микрофотографии клеток получали с использованием флуоресцентного микроскопа IX-73 (Olympus, Япония), обработку проводили в программе ImageJ версии 1.54 (NIH, США).

Вторичную структуру молекул РНК рассчитывали с помощью сервиса RNAfold с параметрами, взятыми по умолчанию. Вторичную структуру генно-инженерных белков рассчитывали с помощью сервиса Jpred4. Пространственно-мембранную локализацию белка рассчитывали с помощью программ Protter [10], I-TASSER [11], RosettaLoop [12] и GalaxyRefine2 [13].

Результаты и их обсуждение. *Разработка экспрессионной кассеты на основе комплементарной ДНК гена MLANA человека.* Ген человека *MLANA* (*Melan-A*, *MART-1*, *MART1*) локализован в сегменте 9p24.1 хромосомы 9 с координатами chr9:5890889-5910606. Нами проведен биоинформатический анализ транскриптомных данных, полученных по технологии RNA-Seq, для уточнения структуры и глобального профиля экспрессии гена *MLANA* в клетках человека. Результаты проведенного анализа указывают на то, что экспрессия этого гена может приводить к образованию в клетках пяти основных изоформ РНК. При этом три изоформы (депонированные в базе Ensembl под идентификационными номерами ENST00000381477, ENST00000381476 и ENST00000381471) являются матричными РНК и имеют высокую степень подтвержденности, а вот две другие изоформы (ENST00000482341 и ENST00000490518 по базе Ensembl) могут быть классифицированы как некодирующие и имеют низкий уровень подтверждения.

Разнообразие изоформ мРНК гена *MLANA* формируется за счет использования альтернативных точек начала и терминации транскрипции, а также альтернативного сплайсинга 5'-концевой области первичных РНК. Структура же открытой рамки считывания (ORF) при этом не меняется, что определяет существование у гена *MLANA* одной консенсусной последовательности CCDS6466.1, кодирующей только одну изоформу белка MLANA (Q16655 по UniProtKB).

Более детальный анализ 5'-концевых последовательностей мРНК гена *MLANA* показывает, что они обладают рядом особенностей, усложняющих дизайн единой комплементарной ДНК для клонирования. Во-первых, общим у всех трех изоформ мРНК является фрагмент длиной 27 нуклеотидов, непосредственно примыкающий к стартовому кодону, что недостаточно для выполнения роли полноценной 5'-нетранслируемой области (5'UTR) в будущем искусственном гене: согласно данным Ensembl первый квартиль распределения длин 5'UTRs 71981 мРНК человека равен 88 нуклеотидам. Во-вторых, стартовый кодон трансляции во всех этих молекулах РНК не является частью последовательности Козак. Причем, в-третьих, транскрипты ENST00000381476 и ENST00000381471 имеют в 5'UTR еще и криптоические стартовые кодоны. Как минимум один из таких кодонов в транскрипте ENST00000381471 может служить стартовым для короткой открытой рамки считывания uORF, начинающейся 117 нуклеотидом и заканчивающейся 329-м. Наконец, в-четвертых, расчет вторичной структуры 5'UTRs обсуждаемых транскриптов с помо-

шью RNAfold показывает, что 5'UTR транскрипта ENST00000381471 укладывается в термодинамически стабильную вторичную структуру с минимумом свободной энергии $-116,20$ ккал/моль, в то время как 5'UTR транскрипта ENST00000381477 стабилизируется с высвобождением лишь $15,9$ ккал/моль. Влияют ли такие вторичные структуры на эффективность трансляции мРНК гена *MLANA* не известно.

Таким образом, учитывая существенные различия в структуре 5'UTRs мРНК гена *MLANA*, а также отсутствие эмпирически выверенных сведений о влиянии таких 5'UTRs на эффективность трансляции транскриптов целевого гена видится целесообразным создание не одной, а нескольких последовательностей транскрибируемой части экспрессионной кассеты *MLANA*, различающихся по 5'-концевому региону. Однако это существенно усложнило бы работу по созданию конечной генетической конструкции, поэтому нами было принято решение о разработке экспрессионной кассеты *MLANA* на основе полноразмерных 5'UTR и ORF от транскрипта ENST00000381477. 5'UTR указанного транскрипта имеет минимально необходимый размер, не содержит криптических стартовых кодонов и обладает подходящим термодинамическим профилем. В дополнение к указанным элементам в экспрессионную кассету сразу же за ORF была добавлена 24-нуклеотидная вставка, кодирующая 8-аминокислотный ярлык DYKDDDDK в составе ожидаемого белка *MLANA-FLAG*[®] (рис. 1, *a*), необходимый для идентификации целевого белка с помощью универсальных анти-*FLAG*[®] антител.

Очевидно, что для презентации пептидов *MLANA* в комплексе с антигенами HLA класса I каких-то дополнительных конструктивных изменений описанной выше транскрибируемой последовательности не требуется: часть синтезируемого в клетках белка *MLANA* будет процессироваться и предоставляться Т-клеткам в комплексе с антигенами HLA класса I благодаря конститутивному механизму презентации [14]. Однако для презентации таких пептидов в комплексе с антигенами HLA класса II требуется попадание белка в лизосомальный или поздне-эндосомальный компартменты клетки. Необходимая компартиментализация может быть достигнута путем добавления к целевому белку, который экспрессируется эктопически, сигнальных пептидов от белков *LAMP1* или *LAMP3*, либо инвариантной цепи, ассоциированной с антигенами главного комплекса гистосовместимости класса II [15].

Сравнительный анализ имеющихся эмпирических данных показывает, что экспериментально наиболее подтверждена эффективность применения сигнального пептида от лизосомального мембранного гликопротеина *LAMP1*. При этом для встраивания целевого белка в лизосомальную мембрану целесообразно использовать не только сигнальный пептид, но и трансмембранный домен *LAMP1*. В связи с этим нами была спроектирована альтернативная конструкция кодирующей части экспрессионной кассеты *MLANA*, которая способна обеспечить наработку в целевых клетках гибридного белка *MLANA-FLAG*[®]-*LAMP1* (рис. 1, *a*) с заданной внутриклеточной локализацией.

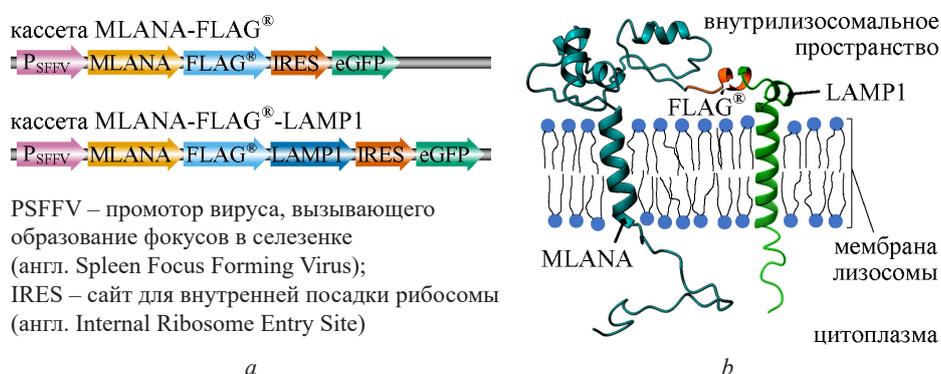


Рис. 1. Структура экспрессионных кассет (*a*), кодирующих разработанные белки *MLANA-FLAG*[®] и *MLANA-FLAG*[®]-*LAMP1*, и мембранная модель (*b*) гибридного белка *MLANA-FLAG*[®]-*LAMP1*

Fig. 1. The structure of the expression cassettes (*a*) encoding the developed *MLANA-FLAG*[®] and *MLANA-FLAG*[®]-*LAMP1* proteins, and membrane model (*b*) of the *MLANA-FLAG*[®]-*LAMP1* hybrid protein

Проведенный с помощью сервиса Jpred4 предварительный расчет вторичной структуры разработанного гибридного белка MLANA-FLAG[®]-LAMP1 показал, что он должен эффективно встраиваться в лизосомальную мембрану за счет сигнального пептида и трансмембранного домена от белка LAMP1. При этом основная часть белка MLANA должна экспонироваться во внутрелизосомальное пространство, что обеспечит его доступность для лизосомальных гидролаз и процессинг. Результаты данного этапа моделирования также указывают на то, что ярлык FLAG[®] должен остаться доступным для антител в случае встраивания в лизосомальную мембрану двух доменов MLANA и LAMP1 (рис. 1, b).

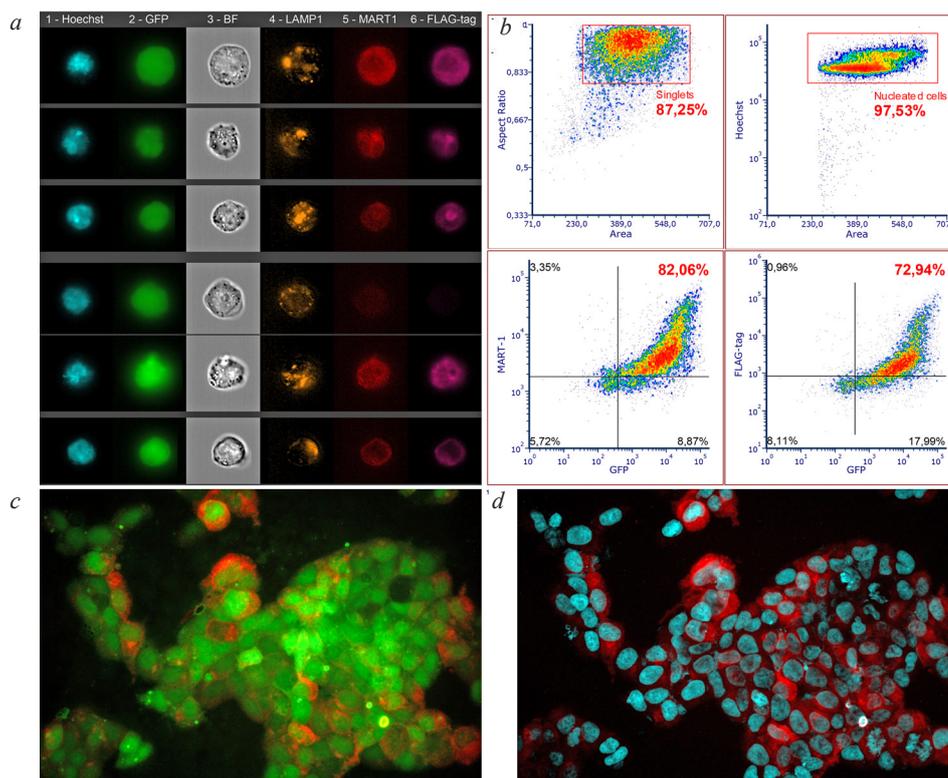


Рис. 2. Экспрессия целевых белков в клетках линии HEK 293Т, трансдуцированных рекомбинантными лентивирусами на основе вектора pHR'-MLANA-FLAG[®]-LAMP1: *a* – визуализирующая проточная цитометрия генетически модифицированных клеток линии HEK 293Т (6 репрезентативных клеток в 6 каналах: 1 – Hoechst 33258, 2 – eGFP, 3 – видимый свет, 4 – LAMP1, 5 – MLANA, 6 – FLAG[®]). Учет проводился на визуализирующем проточном цитометре Amnis ImageStream mkII (Cytex Biosciences, США) при увеличении $\times 60$; *b* – анализ экспрессии eGFP, белка MLANA и FLAG[®] (показано выделение одиночных клеток (singlets), ядросодержащих клеток и оценка в этом регионе количества трансдуцированных eGFP⁺ MLANA⁺ и eGFP⁺ FLAG[®] + клеток на цитограммах); *c* – ко-экспрессия зеленого флуоресцирующего белка eGFP (зеленый цвет) и белка MLANA (красный цвет); *d* – ко-локализация белка MLANA (красный цвет) и клеточных ядер (Hoechst 33258, голубой цвет). Флуоресцентная микроскопия ($\times 400$) генетически модифицированных клеток линии HEK 293Т спустя 72 ч после трансдукции

Fig. 2. Expression of target proteins in HEK 293T cells transduced with recombinant lentiviruses based on the pHR'-MLANA-FLAG[®]-LAMP1 vector: *a* – imaging flow cytometry analysis of genetically modified HEK 293T cells (6 representative cells in 6 channels: 1 – Hoechst 33258, 2 – eGFP, 3 – brightfield, 4 – LAMP1, 5 – MLANA, 6 – FLAG[®]); *b* – analysis of eGFP, MLANA and FLAG[®] protein expression (the gating of singlets and nucleated cells and evaluation of transduced eGFP⁺ MLANA⁺ and eGFP⁺ FLAG[®] + cells are shown on cytograms); *c* – coexpression of the fluorescent reporter protein eGFP (green) and MART-1 (APC, red), 72 h after transduction HEK 293T ($\times 400$); *d* – expression of MART-1 (APC, red) and visualization of nuclei with Hoechst 33258 (blue), 72 h after transduction of HEK 293T ($\times 400$)

Получение рекомбинантных лентивирусных частиц и оценка трансляционной активности генно-инженерных конструкций. Целевые фрагменты ДНК, кодирующие спроектированные генно-инженерные белки, были переклонированы из двух векторов на основе pUC57 со вставками MART1-FLAG[®] (472 п. н.) и MART1-FLAG[®]-LAMP1 (589 п. н.) в лентивирусный вектор экспрессии pHR-SINcPPT-SIEW второго поколения. В результате были получены рекомбинантные

векторы, названные pHR'-MLANA-FLAG[®] и pHR'-MLANA-FLAG[®]-LAMP1, правильность структуры которых была подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием.

Рекомбинантные псевдотипированные лентивирусы получали в культуре клеток HEK 293T путем ее ко-трансфекции пакующим вектором pCMV-dR8.91, вектором оболочки pMD2.G и одним из полученных рекомбинантных векторов экспрессии pHR'-MLANA-FLAG[®] и pHR'-MLANA-FLAG[®]-LAMP1 [8; 9]. В результате были получены препараты рекомбинантных лентивирусов с функциональным титром в диапазоне 3,0–4,0 логарифмов.

Пилотное испытание эффективности трансдукции такими лентивирусами и экспрессии трансгенов в модифицированных клетках было проведено с использованием клеточной линии HEK 293T, оптимально подходящей для решения поставленных задач. После трансдукции клеток HEK 293T транскрипционная/трансляционная активность сконструированных нами последовательностей подтверждалась методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. При этом учитывалась экспрессия репортерного флуоресцирующего белка eGFP и генно-инженерных белков MLANA-FLAG[®] и MLANA-FLAG[®]-LAMP1.

Как видно на рис. 2, *a*, экспрессия eGFP и MLANA в модифицированных клетках HEK 293T хорошо согласована. Более того, данные проточной цитометрии показывают, что среди eGFP-положительных клеток доля клеток, экспрессирующих MLANA и FLAG[®], превышает 80 % (рис. 2, *b*). Интересно, что в клетках HEK 293T, трансдуцированных трансгеном MLANA-FLAG[®]-LAMP1, интенсивность экспрессии белка LAMP1 в eGFP-положительных и eGFP-отрицательных не от-

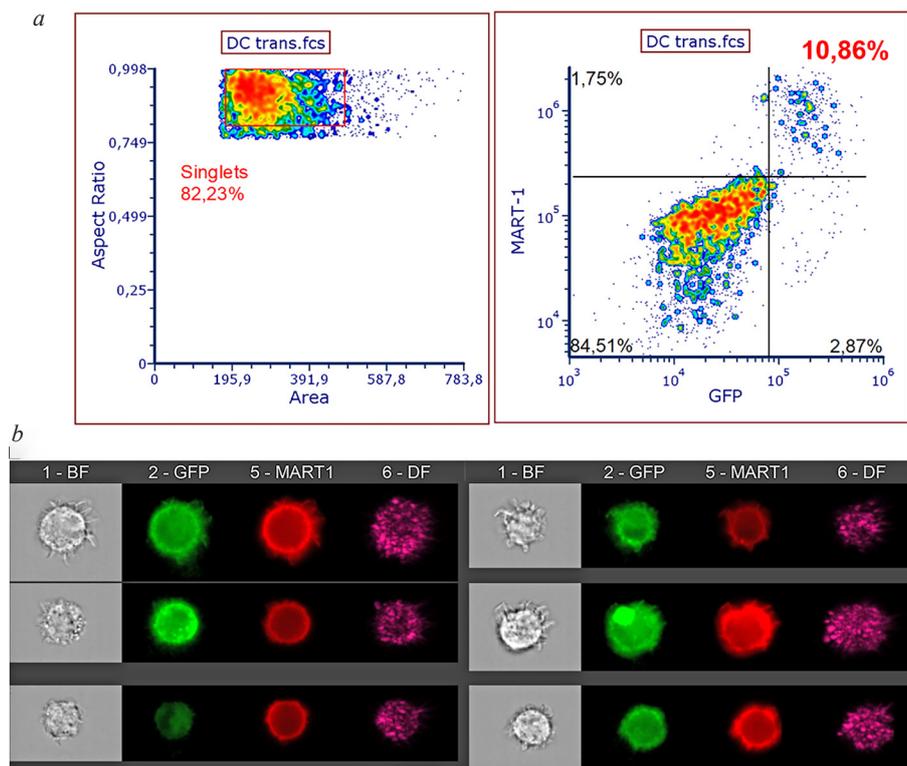


Рис. 3. Экспрессия целевых белков в ДК, трансдуцированных рекомбинантными лентивирусами на основе вектора pHR'-MLANA-FLAG[®]: *a* – анализ экспрессии eGFP и белка MLANA (показано выделение одиночных клеток (singlets) и оценка в этом регионе количества трансдуцированных eGFP⁺ MLANA⁺ ДК на цитограммах); *b* – визуализирующая проточная цитометрия генетически модифицированных ДК (показаны 3 репрезентативные клетки в 4 каналах: 1 – видимый свет, 2 – eGFP, 5 – MLANA, 6 – темное поле).

Учет проводился на визуализирующем проточном цитометре Amnis ImageStream mkII (Cytek Biosciences, США) при увеличении $\times 60$

Fig. 3. Expression of target proteins in DC transduced with recombinant lentiviruses based on the pHR'-MLANA-FLAG[®] vector: *a* – analysis of eGFP, MLANA protein expression (the gating of singlets and evaluation of transduced eGFP⁺MLANA⁺ DC in singlets gate); *b* – imaging flow cytometry analysis of genetically modified DC (shows 3 representative cells in 4 channels: 1 – brightfield, 2 – eGFP, 5 – MLANA, 6 – dark field)

личается. По-видимому, это обусловлено тем, что в клетках НЕК 293Т этот белок эндогенно экспрессируется на очень высоком уровне и дополнительный вклад трансгенного LAMP1 оказывается незначительным.

Согласно данным визуализирующей проточной цитометрии распределение eGFP, MLANA и FLAG® в модифицированных клетках носит равномерный диффузный характер (рис. 2, *c, d*). Интересно, что в клетках, экспрессирующих белок MLANA-FLAG®-LAMP1, не наблюдается преимущественная ассоциация антигена MLANA с лизосомами и/или поздними эндосомами. Наконец следует отметить, что в клетках НЕК 293Т экспрессия всех описанных трансгенов остается относительно стабильной на протяжении трех пассажей (данные не показаны).

Для подбора оптимальных условий трансдукции ДК на первом этапе проводилась оценка влияния Polybrene® в диапазоне концентраций 1–10 мкг/мл на жизнеспособность ДК с и без центрифугирования в течение 2 ч, что имитировало условия спинокуляции. Было установлено, что нетоксичными для ДК являются концентрации Polybrene® в диапазоне до 4 мкг/мл, центрифугирование не оказывало цитотоксического эффекта на ДК, клетки сохраняли жизнеспособность на уровне более 90 %. Использование концентрации Polybrene® более 4 мкг/мл приводило к резкому снижению жизнеспособности ДК – ниже 50 % (данные не показаны).

Была проанализирована эффективность трансдукции методом спинокуляции с множественностью инфицирования (МИ) в диапазоне 1–50 ед. Установлено, что при использовании МИ в диапазоне 1–30 ед. цитотоксический эффект на ДК не выявлялся, при использовании более высокой дозы лентивирусов жизнеспособность ДК падала ниже 90 %. При МИ 30 были получены наилучшие результаты с использованием обоих рекомбинантных лентивирусов, однако уровень трансдукции ДК не превышал 17 %. Из двух векторов наилучшие результаты получены с использованием рHR'-MLANA-FLAG® (рис. 3, *a, b*), уровень же трансдукции ДК с использованием рHR'-MLANA-FLAG®-LAMP1 не превышал 10 %.

Заключение. Нами получены и испытаны лентивирусные векторы экспрессии, кодирующие два генно-инженерных варианта белка MLANA, названных MLANA-FLAG® и MLANA-FLAG®-LAMP1. Рекомбинантные лентивирусы, продуцируемые клетками НЕК 293Т после ко-трансфекции последних одним из разработанных векторов экспрессии совместно с пакующим вектором рCMV-dR8.91 и вектором оболочки рMD2.G, способны переносить генетическую конструкцию в клетки линии НЕК 293Т и ДК. Транскрипционная и трансляционная активность сконструированных нами последовательностей в изучаемых клетках подтверждается методами флуоресцентной микроскопии и визуализирующей проточной цитометрии не только по наличию флуоресценции белка eGFP, но и по появлению в модифицированных клетках эктопических белков MLANA-FLAG® и MLANA-FLAG®-LAMP1, распознаваемых специфическими антителами. Эти данные указывают на то, что разработанные генетические конструкции могут быть использованы при условии дальнейшей доработки и исключения eGFP и маркерной вставки FLAG-tag для генетической модификации аутологичных ДК и разработки новых методов клеточной терапии меланомы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке гранта на исследование 1.17 ГПНИ «Биотехнологии-2» (№ 20220247 от 10.03.2022).

Acknowledgements. This research was supported by project grant 1.17 of the State program of scientific research «Biotechnology-2» (No. 20220247 dated 10 March 2022).

Список использованных источников

1. Всемирный день борьбы с меланомой [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://minzdrav.gov.by/ru/novoe-na-sayte/vsemirnyy-den-borby-s-melanomoy/>. – Дата доступа: 31.07.2024.
2. Efficacy of immune checkpoint inhibition in metastatic uveal melanoma: a systematic review and meta-analysis / J. P. Pham [et al.] // *Melanoma Research*. – 2023. – Vol. 33, N 4. – P. 316–325. <https://doi.org/10.1097/cmr.0000000000000900>
3. Gonzalez, H. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression / H. Gonzalez, C. Hagerling, Z. Werb // *Genes Dev*. – 2018. – Vol. 32. – P. 1267–1284. <https://doi.org/10.1101/gad.314617.118>
4. Применение биомедицинского клеточного продукта на основе моноцитарных дендритных клеток в лечении пациентов, страдающих раком мочевого пузыря: результаты клинического исследования / А. Е. Гончаров [и др.] // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сб. науч. тр. – Минск, 2021. – Вып. 11. – С. 205–215.

5. Dendritic Cell Vaccine Loaded with MG-7 Antigen Induces Cytotoxic T Lymphocyte Responses against Gastric Cancer / B. Zhu [et al.] // *J. Healthc. Eng.* – 2022. – Vol. 2022. – Art. 1964081. <https://doi.org/10.1155/2022/1964081>
6. GP96 and SMP30 Protein Priming of Dendritic Cell Vaccination Induces a More Potent CTL Response against Hepatoma / R. Huang [et al.] // *J. Healthc. Eng.* – 2022. – Vol. 2022. – Art. 2518847. <https://doi.org/10.1155/2022/2518847>
7. The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins / A. M. De Mazière [et al.] // *Traffic.* – 2002. – Vol. 3, N 9. – P. 678–693. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30909.x>
8. Высокоэффективный перенос и стабильная экспрессия двух генов при лентивирусной трансдукции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека / В. В. Гринева [и др.] // *Генетика.* – 2012. – Т. 48, № 3. – P. 389–400.
9. Вирусные векторы для стабильной трансдукции мезенхимальных стволовых клеток человека: системы на основе аденоассоциированных вирусов и лентивирусов / А. В. Шахбазов [и др.] // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* – 2008. – № 4. – P. 216–218.
10. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data / U. Omasits [et al.] // *Bioinformatics.* – 2014. – Vol. 30, N 6. – P. 884–886. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>
11. I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction / X. Zhou [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2022. – Vol. 17. – P. 2326–2353. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00728-0>
12. Park, H. CASP11 refinement experiments with ROSETTA / H. Park, F. DiMaio, D. Baker // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* – 2016. – Vol. 84, N S1. – P. 314–322. <https://doi.org/10.1002/prot.24862>
13. GalaxyRefine2: simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure / G. R. Lee [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47, N W1. – P. 451–455. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz288>
14. Abualrous, E. T. Major histocompatibility complex (MHC) class I and class II proteins: impact of polymorphism on antigen presentation / E. T. Abualrous, J. Sticht, C. Freund // *Curr. Opin. Immunol.* – 2021. – Vol. 70. – P. 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.04.009>
15. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules / A. Bonehill [et al.] // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, N 11. – P. 6649–6657. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6649>

References

1. *World Melanoma Day.* Available at: <https://minzdrav.gov.by/ru/novoe-na-sayte/vsemirnyy-den-borby-s-melanomoy/> (accessed 20 June 2024) (in Russian).
2. Pham J. P., On L., Ardolino L., Hurwitz J., Salaun H., Sim H.-W., Joshua A. M. Efficacy of immune checkpoint inhibition in metastatic uveal melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma Research*, 2023, vol. 33, no. 4, pp. 316–325. <https://doi.org/10.1097/cmr.0000000000000900>
3. Gonzalez H., Hagerling C., Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes and Development*, 2018, vol. 32, pp. 1267–1284. <https://doi.org/10.1101/gad.314617.118>
4. Hancharou A. Y., Prokhorov A. V., Timohina O. V., Antonevich N. G., Minich Y. S., Rynda A. G., Prokhorov V. A. The use of a biomedical cell product based on monocytic dendritic cells in the treatment of bladder cancer patients: results of a clinical research. *BGMU v avangarde meditsinskoj nauki i praktiki: sbornik nauchnykh trudov* [BSMU at the forefront of medical science and practice: collection of scientific papers]. Minsk, 2021, iss. 11, pp. 205–215 (in Russian).
5. Zhu B., Sun Y., Wei X., Zhou H., Cao J., Li Ch., Wu N. Dendritic Cell Vaccine Loaded with MG-7 Antigen Induces Cytotoxic T Lymphocyte Responses against Gastric Cancer. *Journal of Healthcare Engineering*, 2022, vol. 2022, art. 1964081. <https://doi.org/10.1155/2022/1964081>
6. Huang R., Pan J., Zhang Y., Qin Q., Chao N., Huang T., Chen Ch., Zhao F., Luo G. GP96 and SMP30 Protein Priming of Dendritic Cell Vaccination Induces a More Potent CTL Response against Hepatoma. *Journal of Healthcare Engineering*, 2022, vol. 2022, art. 2518847. <https://doi.org/10.1155/2022/2518847>
7. De Mazière A. M., Muehlethaler K., van Donselaar E., Salvi S., Davoust J., Cerottini J.-Ch., Lévy F., Slot J. W., Rimoldi D. The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. *Traffic*, 2002, vol. 3, no. 9, pp. 678–693. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30909.x>
8. Grinev V. V., Seviaryn I. N., Posrednik D. V., Kosmacheva S. M., Potapnev M. P. Highly efficient transfer and stable expression of two genes upon lentivirus transduction of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Russian Journal of Genetics*, 2012, vol. 48, pp. 336–346. <https://doi.org/10.1134/s1022795412030039>
9. Shakhbazov A. V., Seviaryn I. N., Goncharova N. V., Grinev V. V., Kosmacheva S. M., Potapnev M. P. Viral vectors for stable transduction of human mesenchymal stem cells: systems based on adeno-associated viruses and lentiviruses. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2008, vol. 146, pp. 531–533. <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0320-x>
10. Omasits U., Ahrens Ch. H., Müller S., Wollscheid B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 6, pp. 884–886. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>
11. Zhou X., Zheng W., Li Y., Pearce R., Zhang Ch., Bell E. W., Zhang G., Zhang Ya. I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 2022, vol. 17, pp. 2326–2353. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00728-0>
12. Park H., DiMaio F., Baker D. CASP11 refinement experiments with ROSETTA. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2016, vol. 84, no. S1, pp. 314–322. <https://doi.org/10.1002/prot.24862>
13. Lee G. R., Won J., Heo L., Seok Ch. GalaxyRefine2: simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure. *Nucleic Acids Research*, 2019, vol. 47, no. W1, pp. 451–455. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz288>

14. Abualrous E. T., Sticht J., Freund C. Major histocompatibility complex (MHC) class I and class II proteins: impact of polymorphism on antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*, 2021, vol. 70, pp. 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.04.009>

15. Bonehill A., Heirman C., Tuyaerts S., Michiels A., Breckpot K., Brasseur F., Zhang Y., Van der Bruggen P., Thielemans K. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *Journal of Immunology*, 2004, vol. 172, no. 11, pp. 6649–6657. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6649>

Информация об авторах

Антоневич Наталья Георгиевна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: antonevich.n@gmail.com. ORCID: 0000-0001-9535-7157.

Бадалян Ирина Артуровна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: irina1512.37533@gmail.com. ORCID: 0009-0002-8909-2767.

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4869-9864.

Титов Леонид Петрович – академик, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (ул. Казинца, 50, 220099, Минск, Республика Беларусь). E-mail: leotit310@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4524-3730.

Гринева Василий Викторович – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220045, Минск, Республика Беларусь). E-mail: grinev_vv@bsu.by. ORCID: 0000-0001-9981-7333.

Information about the authors

Antonevich Natalia G. – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antonevich.n@gmail.com. ORCID: 0000-0001-9535-7157.

Badalyan Iryna A. – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irina1512.37533@gmail.com. ORCID: 0009-0002-8909-2767.

Hancharou Andrei Y. – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4869-9864.

Titov Leonid P. – Academician, D. Sc. (Medicine), Professor, Chief Researcher. Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health (50, Kazinets Str., 220099, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leotit310@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4524-3730.

Grinev Vasily V. – Ph. D. (Biology), Associate Professor. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220045, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grinev_vv@bsu.by. ORCID: 0000-0001-9981-7333.