На правах рукописи



БРОВИН АНДРЕЙ НИКОЛАЕВИЧ

ОПТИМИЗАЦИЯ БЕЛКОВОГО ТРАНС-СПЛАЙСИНГА С ПОМОЩЬЮ ИНТЕИНОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Федеральная территория «Сириус»
2026

Работа выполнена в Научном центре трансляционной медицины автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»»

Научный руководитель: **Карабельский Александр Владимирович**, кандидат биологических наук, научный руководитель направления «Генная терапия», Научный центр трансляционной медицины, АНОО ВО «Университет «Сириус».

Защита состоится 08 декабря 2026 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета НТУ.1.5.3.29 на базе АНОО ВО «Университет «Сириус» по адресу 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНОО ВО «Университет «Сириус»: https://siriusuniversity.ru/sveden/science/obyavleniya-o-zashchitakh

Автореферат разослан 06 ноября 2026 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук  Егоров А. Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время терапия наследственных заболеваний стала возможна благодаря развитию вирусных векторных платформ. Для доставки генетических конструкций в основном используют векторы на основе лентивирусов или аденоассоциированных вирусов (AAV), а в последние несколько лет все чаще используют системы на основе липидных наночастиц. Безопасность и эффективность AAV векторов подтверждены в многочисленных клинических исследованиях, к настоящему моменту одобрены восемь препаратов для генозаместительной терапии.

Ограничение емкости генома AAV (~ 4,5 тысячи пар нуклеотидов) стала причиной проведения многочисленных исследований, направленные на решение проблемы терапии с использованием крупных генов. Наиболее универсальным способом на сегодняшний день является разделение терапевтической конструкции на составные части для упаковки в отдельные вирусные векторы. После трансдукции восстановление кодирующей последовательности или пептида происходит на уровне ДНК, РНК или посттрансляционно на уровне белка.

Одной из наиболее эффективных методик восстановления функциональной молекулы белка из частей является технология белкового транс-сплайсинга, которая реализуется за счет особого класса белков, называемых интеинами. Высокая скорость и аффинность взаимодействия интеинов, автокаталитическая активность и способность ковалентно соединять белковые последовательности сделали данную технологию популярной в различных областях биотехнологии.

С момента открытия интеинов в 1987 году область их применения постоянно расширялась, а за последние пять лет появилось множество примеров ее использования в генной терапии. Основной задачей данной работы являлось детальное изучение механизмов белкового транс-сплайсинга с целью создания в дальнейшем эффективных препаратов, доставляющих протяженные кодирующие последовательности генов в соматические клетки.

В качестве основного инструмента использовали молекулу зеленого флуоресцентного белка (GFP), которую необходимо было разделить на две части и далее восстановить *in vitro* в функциональный белок с помощью интеинов из ферментативной группы альфа-субъединицы третьей полимеразы (DnaE). В ходе работы были изучены механизмы белкового сплайсинга, подобраны условия, обеспечивающие повышение эффективности транс-сплайсинга при трансфекции и трансдукции клеток *in vitro* и *in vivo* в рамках разработки препарата для заместительной генной терапии одной из форм наследственной ретинопатии.

Степень разработанности темы исследования

В доступных базах данных не обнаружено публикаций на русском языке, полностью соответствующих тематике настоящего исследования. Три работы под авторством П.Л. Старокадомского носят описательный характер основных механизмов белкового сплайсинга и одного примера прикладного применения интеинов для очистки гормона роста человека. В иностранных базах данных тематика представлена в количестве более 1500 работ по различным вопросам, включающих фундаментальные и прикладные исследования.

Несмотря на большое количество работ в теме белкового сплайсинга, остается много неизученных областей, поскольку сборка рекомбинантных белков требует индивидуального подхода к каждому отдельно взятому варианту интеина и экстеина. Доступной методики или алгоритма для разработки генотерапевтических препаратов на основе интеинового транс-сплайсинга не существует. Для проверки работоспособности интеинов *in vitro* в большинстве статей используется культура клеток человека HEK293, что существенно ограничивает понимание эффективности механизма белкового сплайсинга.

Цель работы

Целью данной работы является изучение, применение и оптимизация механизма белкового транс-сплайсинга с помощью интеинов для создания новых эффективных препаратов генозаместительной терапии с использованием аденоассоциированных вирусных векторов.

Задачи работы

1. Выбор оптимальной интеиновой пары для эффективной сборки крупных белков с помощью применения технологии транс-сплайсинга.
2. Конструирование плазмид для визуализации и оценки эффективности белкового транс-сплайсинга в клетках человека на основе восстановления флуоресценции репортёрного белка.
3. Оптимизация условий трансфекции и трансдукции *in vitro* и *in vivo* для сборки целевой белковой молекулы в клетках человека.
4. Применение полученных результатов для создания прототипа препарата для генозаместительной терапии.
5. Проведение первичных экспериментов на мышах для оценки работоспособности генетических конструкций.

Научная новизна

В диссертационной работе изучены механизмы белкового транс-сплайсинга с помощью интеинов. Основной результат — разработка универсального алгоритма расчёта теоретических сайтов разделения экстеинового белка. Экспериментально найдены новые сайты для GFP и подтверждена работоспособность сайта 69/70; для ABCA4 найдено множество новых сайтов разделения и подтверждена работоспособность сайта 1150. Показано, что цистеин в положении C+1 важен, но не ключевой для восстановления экстеина.

Дополнительно исследовано кросс-реактивное взаимодействие интеинов группы DnaE: обнаружены новые комбинации, влияющие на эффективность транс-сплайсинга как положительно (NpuN+SspC), так и отрицательно (SspN+AvaC). Эти данные могут быть использованы для изучения структурных особенностей интеинов DnaE и роли аминокислот в положениях C6, C9, C21 и C32 каталитических доменов.

Продемонстрирована возможность раздельной интеиновой доставки GFP в AAV-векторах пятого серотипа на клетках HEK293, ARPE19, FbP13, что подтверждает единство механизма в большинстве типов клеток человека. В заключение апробирован способ раздельной сборки и доставки *ABCA4* в клетки сетчатки глаза.

Теоретическая значимость диссертационного исследования

Значимой теоретической составляющей работы является подробное описание общего алгоритма применения интеинов для получения разделенных двухвекторных систем на основе аденоассоциированных вирусов. Каждый из описанных этапов имеет ряд теоретических и практических особенностей, однако наиболее важным результатом является разработка и применение алгоритма по поиску сайтов для разделения целевой молекулы на экстеины.

Практическая значимость диссертационного исследования

Главной целью исследовательской работы является разработка и применение технологии транс-сплайсинга для создания генотерапевтических препаратов нового поколения с наибольшим выходом по количеству собранного белка после раздельной доставки. Основной результат заключается в получении прототипа препарата для терапии синдрома Штаргардта. Прототип был протестирован *in vitro* и *in vivo* и продемонстрировал свою эффективность.

Методология и методы исследования

В рамках данной работы были использованы методы молекулярной и клеточной биологии, гистологии, генной и белковой инженерии, биотехнологии, данные были обработаны с помощью методов математической статистики.

Для получения генетических конструкций использовали методы химического синтеза для получения праймеров, полимеразной цепной реакции для сборки и мутагенеза генетических конструкций, рестриктазно-лигазные методы клонирования, секвенирование по Сэнгеру для подтверждения корректности получаемых последовательностей.

Для изучения свойств кросс-реактивности использовали транзиентную химическую трансфекцию эукариотических клеток и методы биоаналитики (проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия).

Для получения AAV использовали суспензионную клеточную культуру HEK293, трансфекцию и культивирование клеток в бессывороточной среде, осветление культуральной жидкости, концентрирование и хроматографическую очистку вирусных частиц с последующим анализом титра методом ПЦР. Для оценки сборки молекулы белка после транс-сплайсинга использовали вестерн-блоттинг в случае *in vitro* экспериментов на клеточных культурах и иммуногистохимическое окрашивание в экспериментах *in vivo.*

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный программный код позволяет по аминокислотной последовательности анализировать белки для разделения на две части интеином DnaE. На основе работы данного алгоритма в работе впервые были обнаружены сайты разделения 47/48 для белка GFP и множество сайтов для белка ABCA4. В ходе экспериментальной проверки была доказана роль оптимального аминокислотного состава как на N-, так и на C-концевой части экстеина для прохождения реакции сплайсинга.

2. Работоспособность системы раздельной доставки GFP с помощью интеина Npu DnaE в AAV векторе пятого серотипа была продемонстрирована в клетках HEK293, ARPE19 и FbP13, что подтверждает единство работы механизма интеинового сплайсинга в клетках человека.

3. Свойство кросс-реактивного взаимодействия присутствует во всех сочетаниях между интеинами Ssp, Ava, Npu DnaE в случае использования общего сайта разделения GFP по сайту 69/70. Продемонстрировано, что пара SspN+AvaC полностью блокирует реакцию сплайсинга, а пара NpuN+SspC незначительно увеличивает выход реакции. Результат экспериментальных данных может далее быть использован для изучения структурных особенностей интеинов группы

DnaE в совокупности с результатами выравнивания аминокислотных последовательностей и определения роли аминокислот в положениях C6, C9, C21 и C32 в области каталитических доменов.

4. Сравнение форматов доставки генетического материала и методов введения препаратов в ткани сетчатки глаза демонстрирует преимущество вирусных векторных систем по сравнению с доставкой конструкций при помощи липидных наночастиц. Липидные наночастицы позволяют обеспечить экспрессию GFP с мРНК через 24 часа после введения, однако они локализуются в клетках пигментного эпителия. Вирусные частицы AAV восьмого серотипа эффективно трансдуцируют как клетки пигментного эпителия, так и фоторецепторы.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов была подтверждена методами математической статистики с учетом соблюдения условия трех биологических и трех технических повторов, достаточных для статистической проверки гипотез при анализе биологических данных.

Для апробации научных результатов были подготовлены и представлены устные сообщения на конференциях: VIII молодежная школа-конференция по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института Цитологии РАН (11–14 октября 2022 г., Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург), Конференция "Биохимия человека 2024" (17–19 октября 2024 года, Кафедра биохимии им. Т.Т. Берёзова Лаборатория экспериментальной онкологии НИИ молекулярной и клеточной медицины Медицинского института Российского университета дружбы народов, Москва), Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех 2026» (20–22 мая 2026 года, Научно-технологический университет «Сириус», ФТ Сириус), научная конференция в рамках XIII Российского Форума Биотехнологий OpenBio (21–25 сентября 2026 года, Наукоград Кольцово).

Личный вклад

Автором самостоятельно были получены все генетические конструкции для сборки GFP методом транс-сплайсинга, описываемые в работе. Дизайн, выполнение и анализ клеточных экспериментов были проведены автором самостоятельно. *In vivo* эксперименты по сравнению тропности AAV серотипов были проведены автором самостоятельно, начиная от внутриглазных инъекций до гистологических исследований и анализа изображений. Анализ, обработка данных, получение графиков и изображений проводились автором в программе GraphPad Prism 8.2.1 полностью самостоятельно. Тексты и черновики

приведенных публикаций на русском языке был составлен автором лично, в переводе на английский язык принимали участие все соавторы работ.

Дизайн генетических конструкций для препарата AAV8-ABCA4-Npu DnaE был составлен автором работы, а плазмиды были получены совместно с основным соавтором публикаций Сабанцевым М.О. в рамках написания и выполнения магистерской ВКР. *In vivo* эксперименты по тестированию препарата AAV8-ABCA4-Npu DnaE были выполнены основным соавтором публикаций Сабанцевым М.О. в рамках написания и выполнения магистерской ВКР.

Публикации

Материалы диссертационной работы отражены в четырех научных экспериментальных публикациях в журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science/Scopus, из которых две публикации Q1 и две в К1.

Объем и структура работы.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, разделов с описанием результатов работы, заключения, выводов, списка публикаций по теме диссертации, списка литературы (105 источников). Работа изложена на 123 страницах, содержит 33 рисунка и 8 таблиц.

Благодарности.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н. Карабельскому А.В., коллегам: к.б.н. Малоголовкину А.С., к.б.н. Егорову А.Д., соавторам: PhD Минской Е.С., к.х.н. Чувпило С.А., к.х.н. Гурееву М.А., Сабанцеву М.О. за совместную работу, поддержку и ценные комментарии, оказанные на всех этапах выполнения работы.

Также автор выражает благодарность сотрудникам ресурсных центров Генетической инженерии, Биотехнологических продуктов, Клеточных технологий, Доклинических исследований Университета «Сириус» за создание условий, необходимых для реализации научных проектов. Отдельно автор выражает благодарность заведующему лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова д.м.н. Макаревичу П.И. за помощь в проведении *in vivo* экспериментов и Потаповой А.М. за методическую помощь в проведении *in vivo* экспериментов. Также автор выражает благодарность заведующему лабораторией редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ» к.б.н. Смирнихиной С.А. за помощь в организации и проведении *in vitro* экспериментов на первичных клетках человека.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Интеины − группа вспомогательных белков, инициирующих и реализующих реакцию белкового сплайсинга. Своё название интеины получили от сокращения «internal protein» по аналогии интронами (по той же аналогии внешние по отношению к интеинам белки называют экстеинами) и часто используются в современной биотехнологии для различных задач. Наиболее востребованными инструментами на основе интеинов являются системы для визуализации, очистки белков, раздельной сборки крупных белковых комплексов (большие белки, антитела и т.д.).

Интеиновые системы белкового сплайсинга в основном обнаружены в цианобактериях (*Synechocystis species*, *Nostoc punctiforme* и др.). В биотехнологии используется относительно небольшая группа интеинов, которые связаны с бактериальными хеликазами DnaB, полимеразами DnaE и гиразами GyrA, GyrB. Связь интеинов с белками репликативного цикла позволяет регулировать процесс синтеза сложных и составных комплексов при наступлении неблагоприятных условий (повышенная температура, pH, концентрация ионов металлов) и возобновить при их нормализации. Клетка в критические моменты экономит множество энергетических ресурсов направленных на синтез крупных молекул и перераспределяет их в соответствии с защитными механизмами, направленными на выживание. При нормализации условий функция сплайсинга восстанавливается, что позволяет восстановить синтез и сборку полимераз, хеликаз и гираз, чтобы запустить репликацию вновь. Основное свойство интеинов, которое будет использоваться далее, заключается в автономности работы механизма транс-сплайсинга при температурах, близких к 37°C, что позволяет их применять для сборки белков в клетках человека и животных.

Основным свойством интеинов, которое было изучено в данной работе, является эффективность реакции сплайсинга, механизм которой определяется аминокислотным составом интеина и прилегающих к нему участков N- и C-экстеинов. Коротко рассмотрим основные положения реакции транс-сплайсинга, которая начинается с формирования двух несвязанных и разделенных в пространстве белковых молекул.

После трансляции N и C аминокислотной последовательности интеина формируются две диспропорциональные по размеру молекулы, имеющие противоположные заряды и ответные друг другу структурные блоки. В результате электростатических взаимодействий, которые обеспечивают притяжение молекул друг к другу, разделенные части “коллапсируются” в единую структуру, которая чаще всего представляется в виде разрешенных моделей. Пространственная близость каталитических доменов активирует взаимодействие аминокислот на N-концевом фрагменте, где далее за счет цис-конформации происходит N-S/N-O

ацильный сдвиг с разрывом исходной цепи и образованием высокоактивного эфира, который далее атакует гидроксильную группу на С фрагменте. В ходе S-N/O-N ацильного сдвига на С конце происходит циклизация аспарагина и формирование новой пептидной цепи. Таким образом, в ходе реакции формируется большая экстеиновая молекула и малая интеиновая молекула (14 кДа), что является основой для раздельной доставки и сборки больших молекул по частям.

Наиболее изученные природные интеины группы DnaE можно использовать в качестве модели для проверки гипотез о работе механизма белкового транс-сплайсинга. В качестве экстеина использовали флуоресцентный белок GFP, поскольку его можно визуализировать с помощью большого количества флуоресцентных систем. Первоочередной задачей было разделение целевого экстеинового белка на части с учетом цис-конформации экстеин-интеиновой структуры. Для решения данной задачи был разработан соответствующий алгоритм. Результаты работы алгоритма и экспериментальной проверки представлены на Рисунке 1.

В ходе сравнения трех сайтов 47/48, 69/70 и 127/128 было показано, что теоретические предсказания на основе алгоритмов и ранжирования по баллам (Рисунок 1A) могут предсказать наиболее благоприятную для сплайсинга комбинацию аминокислот, но не могут гарантировать ее итоговую работоспособность, и каждый вариант получаемой конструкции требует экспериментального подтверждения восстановления функций собираемого белка.

Ранее используемый сайт 69/70, который являлся положительным контролем, показал эффективность сборки всего в 7%, что является недостаточным для дальнейшего практического применения. Сайт 47/48 показал эффективность в 10% (Рисунок 1C), однако в клетках не было зарегистрировано явного флуоресцентного свечения (Рисунок 1B). Сайт 127/128 был использован в качестве отрицательного контроля, где сайт выбран произвольно относительно аминокислотного состава на основе пространственной структуры (делит молекулу на две равные части). В итоге эксперимента интеин Ssp DnaE проявил контекстную зависимость от состава аминокислот на экстеиновых сайтах, что говорит о специфичности активации и прохождения реакции транс-сплайсинга.

A

Позиция в рейтинге	Последовательность сайта разделения	Оценка сайта по баллам	Позиция N-1/C+1 амино кислоты	Использован ранее в литературе
1	GVQCFS	55,64	69/70	Tornabene et al., 2019
2	KFICTT	52,32	47/48	
3	LPVPWP	34,32	55/56	
4	KSAMPE	30,25	86/87	Khoo et al., 2020
10	GDVNGH	19,7	21/22	
11	ADKQKN	19,64	156/157	Kanno et al., 2011 Tasfaout et al., 2024
76 positions are skipped				
87	KGIDFK	5,93	127/128	Ozawa et al., 2006
98 positions are skipped				
185	TTLTYG	2,8	64/65	Khoo et al., 2020
49 positions are skipped				
234	LVELDG	0,82	17/18	

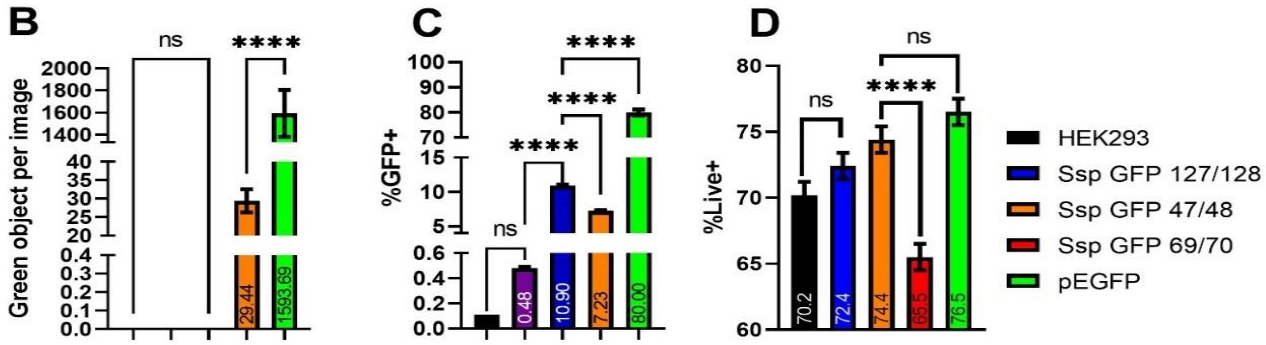


Рисунок 1 – Решение задачи по разделению белка с помощью интеинов группы DnaE на примере GFP. **A** — рейтинговая таблица сайтов разделения белка по расчётам алгоритма, **B-D** – результат экспериментальной проверки после трансфекции HEK293, сборка осуществлялась с помощью интеина Ssp DnaE**,** **B** — анализ зеленых объектов с помощью Incucyte, **C –** анализ доли GFP+ клеток в ходе проточной цитометрии**, D -** анализ доли живых клеток в ходе проточной цитометрии, HEK293 — нетрансфицированный контроль клеток; pEGFP — положительный контроль с трансфекцией целого GFP, статистическая значимость: ns — различия незначимы; **** — $p < 0{,}0001$

Для увеличения показателя эффективности протестировали различные концентраций компонентов трансфекционной смеси. По исходному протоколу трансфекции использовали по 1 мкг каждой из плазмид при соотношении PEI:ДНК в пропорции 1:1 и добавляли на прикрепленные клетки в количестве 1 млн на лунку 6-ти луночного планшета. В ходе оптимизации также варьировали максимальную суммарную нагрузку плазмидной ДНК в диапазоне от 0,5 до 3 мкг, соотношение PEI:ДНК в диапазоне от 1:1 до 8:1 и способ добавления смеси к клеткам. Результат экспериментов представлен на Рисунке 2.

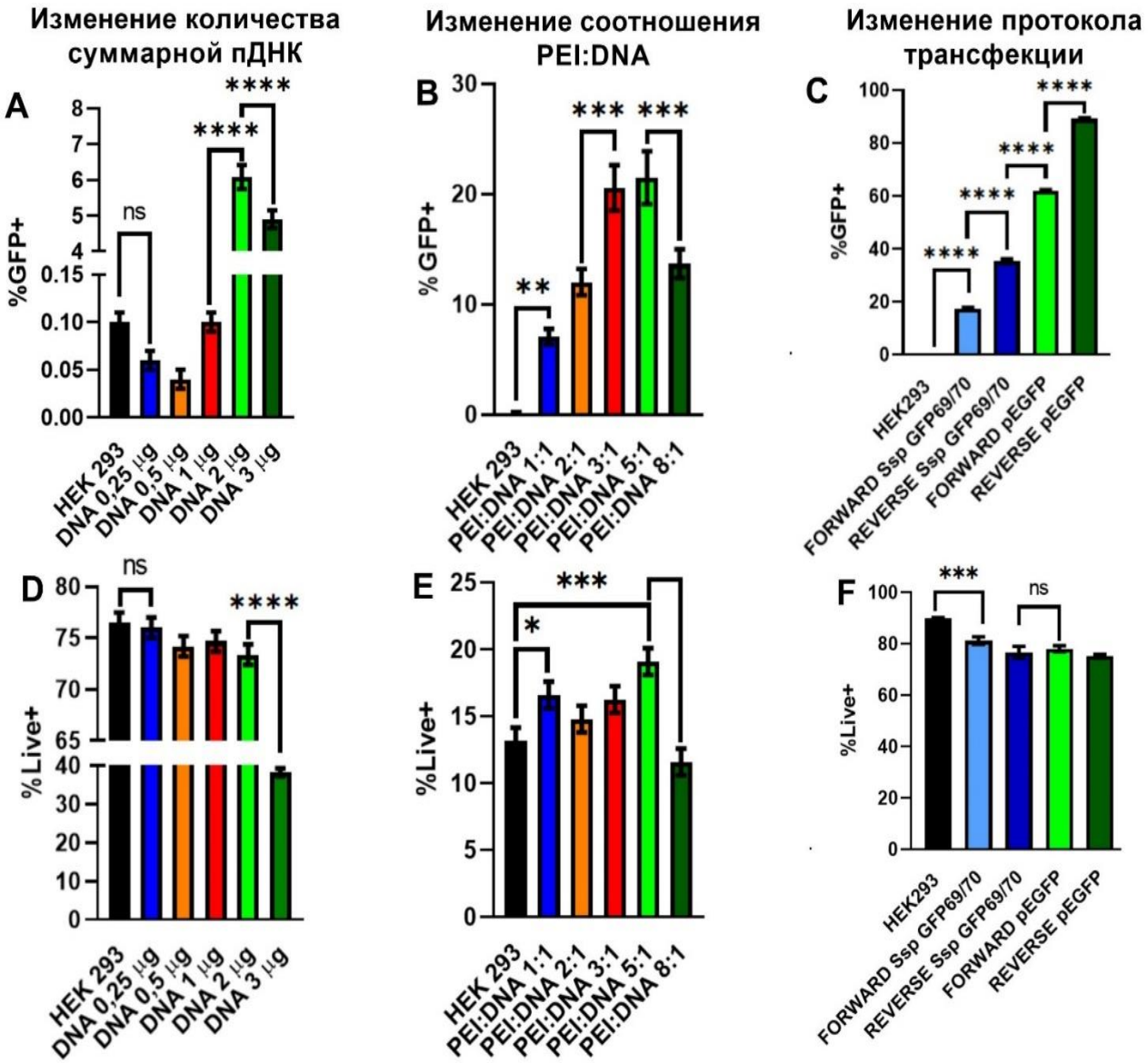


Рисунок 2 – Оптимизация условий трансфекции в клетках HEK293 с помощью конструкций с разделенным GFP по сайту 69/70 с помощью интеина Ssp DnaE. **A, D** — влияние количества суммарной плазмидной ДНК на эффективность трансфекции, оцениваемую по доле GFP-положительных клеток (% GFP^+), и жизнеспособность клеток (% живых клеток) в ходе проточной цитометрии.
B, E — влияние соотношения PEI:ДНК на эффективность трансфекции и жизнеспособность клеток соответственно. **C, F** — сравнение эффективности и оценка жизнеспособности клеток прямого и обратного протоколов трансфекции для конструкций Ssp GFP 69/70 после трансфекции различными конструкциями.

В ходе оптимизации концентраций были найдены условия, увеличивающие эффективность трансфекции и сплайсинга до оптимального значения, при котором не происходит существенного падения жизнеспособности клеток (Рисунок 2 A-B, D-E). Важно отметить, что каждый следующий шаг использовал результаты предыдущего для создания накопительного эффекта. Итоговый протокол трансфекции с применением соотношения PEI:ДНК 5:1 и суммарной массы ДНК в 2 мкг в случае Ssp DnaE позволил повысить эффективность трансфекции и сборки до уровня 35% для клеток HEK293, что было все еще не достаточным для дальнейшего практического применения.

Для увеличения эффективности сборки GFP по тем же сайтам разделения молекулы были использованы интеины той же ферментативной группы Ava DnaE и Npu DnaE, обладающие более высокой скоростью сплайсинга и способные повысить выход целевого белка (Рисунок 3D). При сравнительном анализе множественных выравниваний последовательностей (Рисунок 3A) была выявлена разница в длине N-фрагмента медленных и быстрых интеинов на 20 аминокислот, влияющая на скорость сплайсинга. Особенно хорошо это видно в структурах Ssp 1ZDE и Npu 4KL5, где различие представлено отдельной неструктурированной петлёй на C конце молекулы (Рисунок 3B, C).

Другим важным наблюдением стала практически полная консервативность четырёх аминокислот в начале N-фрагмента A-домена и конце C-фрагмента G-домена, отвечающих за катализ сплайсинга. Мутации в этих областях могут влиять на эффективность реакции аналогично вариациям экстеиновых остатков, поскольку они входят в каталитический центр, обозначенный зелёным цветом (Рисунок 3B, C). Менее очевидна роль вариабельных аминокислот в областях, окружающих каталитические центры, влияние которых можно оценить при анализе кросс-реактивных взаимодействий.

Исследование кросс-реактивности интеинов группы DnaE возможно, поскольку аминокислоты каталитических доменов A, B, G и F совпадают, а экстеины идентичны благодаря дизайну конструкций с учётом контекстной зависимости реакции транс-сплайсинга. Для этого были дополнительно получены плазмидные пары в том же дизайне, что и конструкции GFP 69/70 Ssp DnaE. Затем по оптимизированному протоколу для HEK293 была проведена одновременная трансфекция всех вариантов сочетаний N- и C-фрагментов внутри пар и между парами.

В результате комбинация NpuN+NpuC обеспечивала 80% эффективности сборки GFP, тогда как остальные пары демонстрировали сопоставимую или меньшую эффективность (Рисунок 3E). При этом SspN+AvaC практически полностью блокировала реакцию сплайсинга, а SspN+NpuC обеспечивала 50% GFP-положительных клеток. Различия в C-фрагментах трёх интеинов Ssp, Ava и Npu минимальны и сосредоточены в положениях C6, C9, C21 и C32 между активными центрами F- и G-доменов.

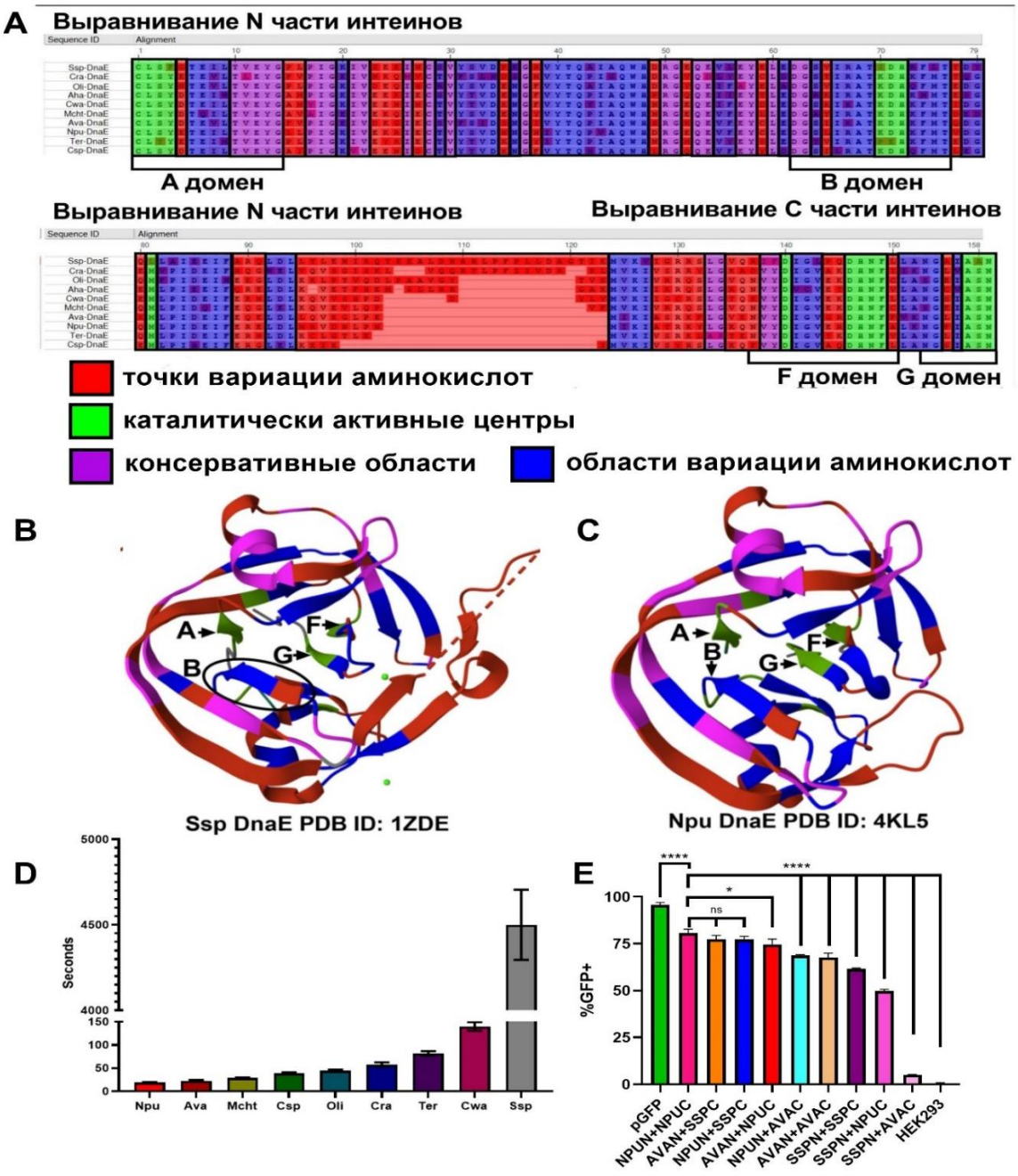


Рисунок 3 — Исследование структурных и кросс-реактивных свойств интеинов группы DnaE. **A** — множественное выравнивание аминокислотных последовательностей десяти интеинов DnaE. **B** – модель интеина Ssp DnaE 1ZDE, **C** - модель интеина Npu DnaE 4KL5. Цветами выделены области наибольшей и наименьшей вариации аминокислот с указанием структурных доменов A, B, F,G. **D** — данные о скорости реакции сплайсинга для различных интеинов DnaE. **E** — доля GFP-положительных клеток (% GFP^+) после трансфекции HEK293 по оптимизированному протоколу при использовании различных комбинаций N- и C-фрагментов интеинов группы DnaE для изучения свойства кросс-реактивности. ns — различия статистически незначимы; * — $p < 0{,}05$; **** — $p < 0{,}0001$

По итогу оптимизации трансфекции и изучению кросс-реактивных свойств интеинов группы DnaE на паре NpuN+NpuC DnaE в комбинации с сайтом разделения GFP по сайту 69/70 количество GFP^+ клеток достигало 80%, что может быть использовано для дальнейших терапевтических применений. Для более комплексной характеризации процессов сборки белковых молекул на примере GFP провели вестерн-блот анализ для образцов клеток HEK293 после трансфекции по оптимизированному протоколу плазмидными конструкциями GFP 69/70 Npu DnaE. Результат анализа представлен на Рисунке 4.

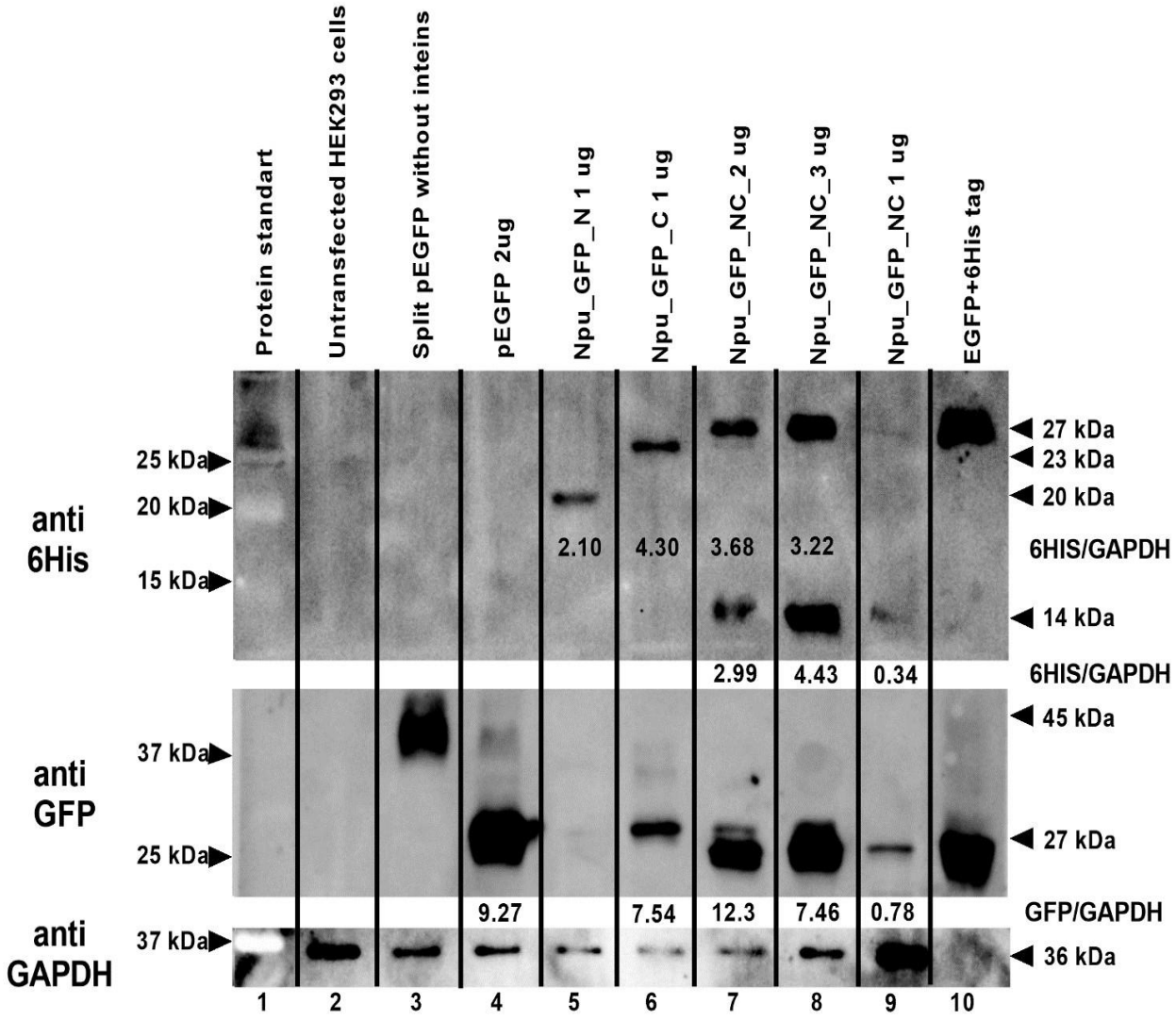


Рисунок 4 — Результаты вестерн-блоттинга со специфическими антителами: верхняя панель — мембрана с антителами anti-6His, средняя панель — мембрана с антителами anti-GFP, нижняя панель — мембрана с антителами anti-GAPDH

Анализ вестерн-блота с последовательным окрашиванием мембраны антителами anti-6His, anti-GFP и anti-GAPDH показал, что anti-6His детектирует как предсплайсинговые (на уровне 20 и 25 кДа), так и постсплайсинговые формы (на уровне 27 кДа для целого GFP и 16 кДа для целого интеина).

Для проверки специфичности антител и работоспособности системы белкового сплайсинга использовали следующие контроли: очищенный EGFP_6His_tag для anti-GFP (дорожка 10), pAAV-CMV-GFP для контроля трансфекции (дорожка 4), разделённый GFP без интеинов для оценки автосплайсинга (дорожка 3) и не трансфицированные HEK293 для anti-GAPDH (дорожка 2).

Нормализация по GAPDH выявила примерно двукратное превышение синтеза C-части над N-частью. При увеличении количества плазмид в 1,5 раза возрастало накопление C-фрагмента и снижалось количество зрелого GFP, что указывало на ограничение эффективности сплайсинга.

Окрашивание anti-GFP показало, что разделённый GFP без интеинов образует нефункциональный продукт нестандартного размера (40 kDa). Среди пред-сплайсинговых продуктов детектируется преимущественно C-часть, содержащая больший фрагмент GFP. Наблюдение дополнительной полосы выше GFP свидетельствует о накоплении C-части, избыток которой не вступил в реакцию сплайсинга.

Таким образом, вестерн-блот анализ подтвердил непропорциональный синтез N- и C-фрагментов и ограничение эффективности их сборки. Изменение соотношения плазмид до N:C 2:1 при сохранении общего количества ДНК позволит компенсировать данную диспропорцию и может быть использовано для более эффективного сплайсинга.

Полученные результаты, наряду с восстановлением флуоресценции GFP по данным микроскопии и цитометрии, подтверждают работоспособность системы и возможность её дальнейшего применения для раздельной доставки GFP с использованием двух AAV-векторов, что стало следующим этапом тестирования системы интеинов в сочетании с векторами в качестве платформы для раздельной доставки генов.

В качестве вектора для клеточных экспериментов использовали AAV пятого серотипа, который обладает широким тропизмом и позволяет трансдуцировать большинство типов клеток, полученных из разных органов и тканей. В качестве клеточных линий для проверки факта сборки белка с помощью интеинов после раздельной доставки были использованы: HEK293, ARPE19, FbP13. Результаты трансдукции представлены на Рисунке 5.

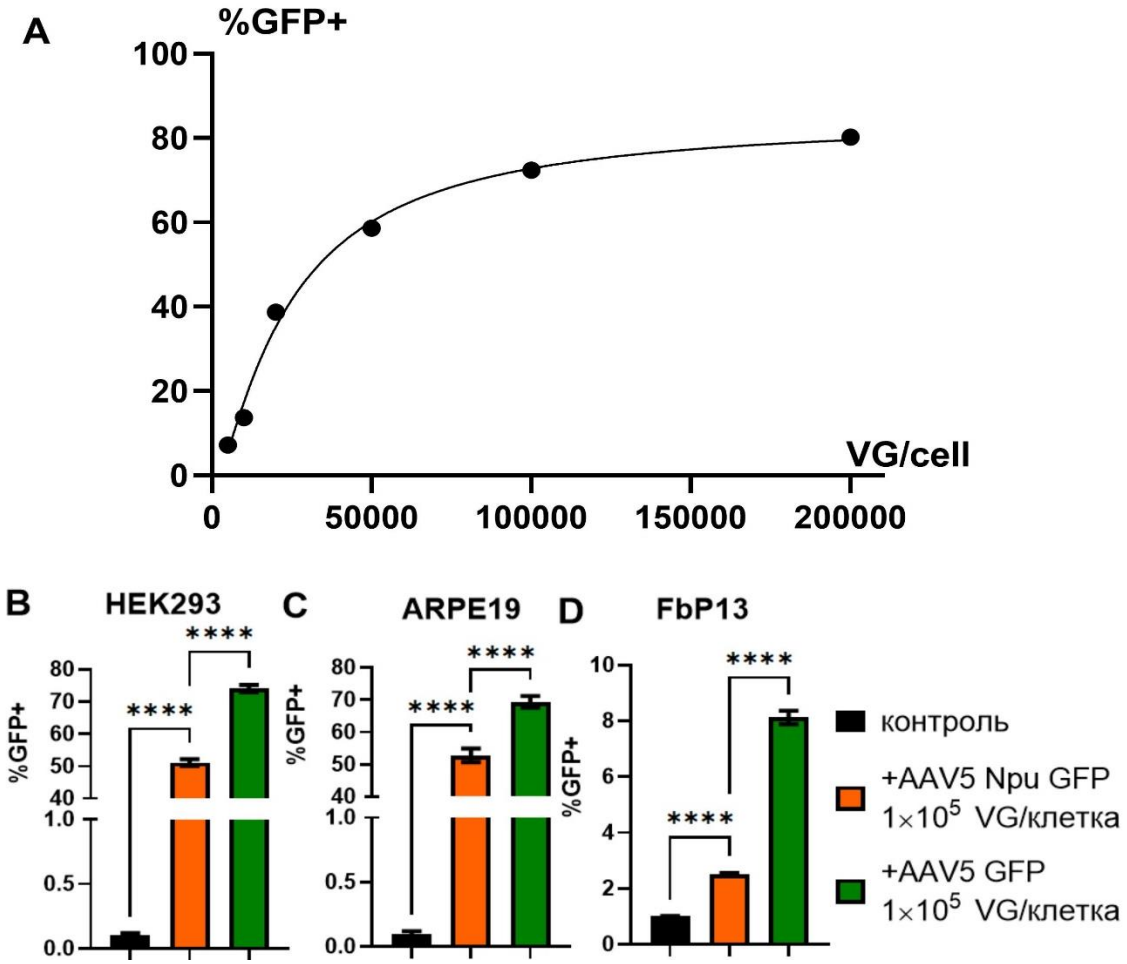


Рисунок 5 – Анализ клеток после трансдукции с помощью AAV5:
A — зависимость эффективности трансдукции HEK293 от дозы AAV5 GFP; эффективность оценивали по доле GFP-положительных клеток (% GFP^+).
B–D — сравнение эффективности трансдукции клеток HEK293 (B), ARPE19 (C) и FbP13 (D) векторами AAV5-Npu N+C GFP и AAV5-GFP в дозе 1×10^5 VG/клетку для каждого препарата.

В первой серии экспериментов производили трансдукцию клеточной линии HEK293 с помощью AAV5 GFP для определения оптимальной дозы (Рисунок 5A). В результате эксперимента, при котором к одинаковому количеству клеток добавляли препарат AAV5 GFP в дозах от 2×10^3 до 2×10^5 VG на клетку было показано, что максимальная эффективность трансдукции (80%) достигается при максимальной дозе 2×10^5 VG на клетку, однако при дозе в 1×10^5 VG на клетку эффективность составляет 72%. Из-за нелинейного изменения эффективности для дальнейших экспериментов было принято решение использовать дозу 1×10^5 VG на клетку как достаточную для визуализации терапевтического эффекта предотвращающую цитотоксический эффект.

Для сравнительного эксперимента на клетках человека использовали дозу 1×10^5 VG на клетку для препарата AAV5 GFP и аналогичную дозу для каждого компонента AAV5 GFP Npu N+C. В результате эксперимента для клеточных линий HEK293 и ARPE19 количество трансдуцированных клеток составляло 50% при трансдукции AAV5 GFP Npu N+C, а для AAV5 GFP - 70% (Рисунок 5 B,C). Эффективность трансдукции фибробластов FbP13 была значительно ниже, 2% при трансдукции с AAV5 GFP Npu N+C, 8% при использовании AAV5 GFP (Рисунок 5 D). В данном случае очевидно, что трансдукция проходит с низкой эффективностью из-за низкой тропности вируса AAV5 к данному типу клеток, однако качественно сборка GFP подтверждается и в этом случае. Таким образом, в рамках данного эксперимента было показано, что белковый транс-сплайсинг с помощью интеинов проходит в большинстве типов клеток человека и выбор серотипа необходимо производить индивидуально для каждой ткани и с высокой специфичностью.

Полученной экспериментальной информации было достаточно для получения генотерапевтического препарата на основе интеина Npu DnaE. Из литературного обзора стало очевидно, что наиболее востребованными мишенями являются гены *F8*, *DMD* и ряд офтальмологических мишеней, мутации в которых приводят к наследственным ретинопатиям (*ABCA4*, *CEP290*). Офтальмологические мишени отличаются наибольшим разнообразием генов и вариантов мутаций, а также удобством работы с клетками глаза, которые отличаются высокой степенью дифференцировки, низкой или практически нулевой пролиферацией и изолированностью от основной иммунной системы организма. Приведенные факторы позволяют использовать относительно небольшие дозы препарата, эффект от которых будет максимально долговременным в случае успешной доставки в ткани глаза.

В большинстве современных работ сравнивается несколько подходов к терапии различных форм ретинопатий. В данной работе был выбран ген *ABCA4*, который является большим геном (6,8 тысяч пар оснований), кодирующим белок ретинальной флиппазы, которая реализует транспорт токсичных продуктов метаболизма ретиноидных производных. Нарушение транспорта таких соединений, как A2E, способствует их накоплению в сетчатке, что сопровождается постепенной дегенерацией фоторецепторов и снижением зрительных функций. К настоящему времени разработано несколько принципиальных методов терапии данного заболевания с помощью доставки *ABCA4* в вирусных векторах и липидных наночастицах. Аналогичное сравнительное исследование применимости двух платформ доставки было проведено *in vivo* на модели мышей C57BL/6. Результаты экспериментов по анализу эффективности трансдукции разными серотипами, сравнению платформ доставки трансгенов и способов введения представлены на Рисунке 6.

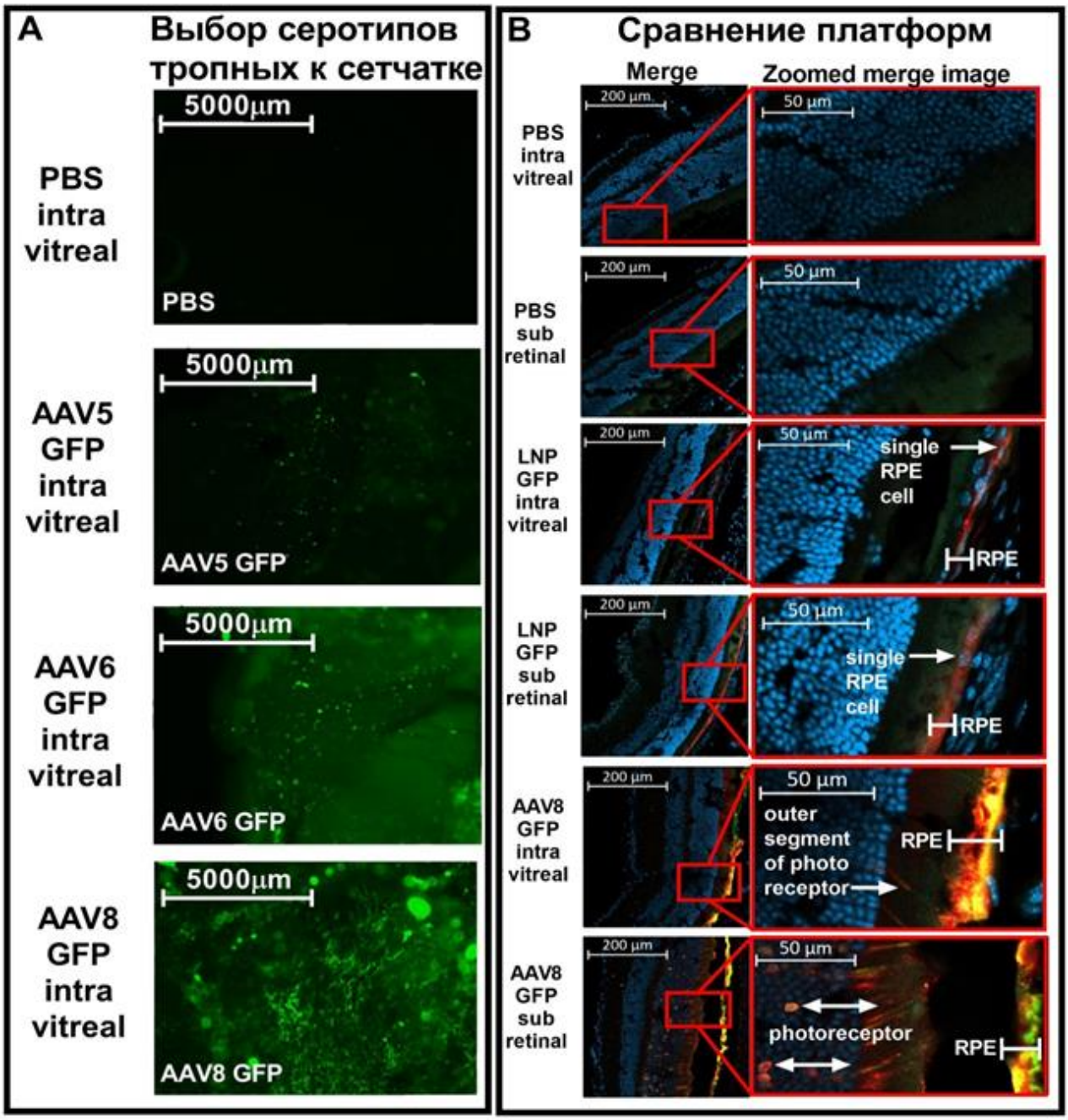


Рисунок 6 – *In vivo* эксперименты по выбору оптимального метода доставки генетических конструкций, кодирующих GFP, в ткани глаз и анализ их биораспределения по слоям сетчатки: **A** — выбор наиболее тропного к сетчатке серотипа AAV; для введения использовали 1 мкл препарата AAV5-GFP, AAV6-GFP и AAV8-GFP с дозой 1×10^8 VG на один глаз при интравитреальном введении, **B** — сравнение платформ и методов введения генотерапевтических препаратов для доставки GFP с помощью AAV8 и липидных наночастиц, кодирующих мРНК GFP (100 нг на один глаз), анализ биораспределения по слоям сетчатки. Цветами выделено: синим – клеточные ядра, зеленым – сигнал от GFP, красным сигнал от антител anti-GFP, конъюгированных с Alexa 647.

В результате эксперимента было показано, что при интравитреальном введении препарата AAV с дозой 1×10^8 VG на глаз через 14 дней можно получить достаточный для анализа сигнал, который демонстрирует разницу в трансдуцирующей способности AAV к клеткам глаза при анализе целой сетчатки под флуоресцентным микроскопом после быстрой фиксации (Рисунок 6 панель А). Данного качественного эксперимента было достаточно, чтобы выбрать среди природных AAV восьмой серотип

Для сравнения платформ и методов введения использовали AAV8-GFP, доставляющие оцДНК GFP, с дозой 1×10^8 VG на один глаз и ЛНЧ, доставляющие мРНК GFP, с дозой 100 нг на один глаз. Дополнительно проводили сравнение способов введения препаратов: субретинально и интравитреально. В результате экспериментов можно сделать однозначный вывод об эффективности субретинальных инъекций для каждого типа препаратов, поскольку данный тип введения позволяет точнее локализовать препарат ближе к целевым слоям сетчатки, в то время как при интравитреальном происходит менее эффективная диффузия препарата при перемешивании с внутриглазной жидкостью.

Сравнение платформ показало, что система доставки на основе ЛНЧ способна доставить мРНК в слои пигментного эпителия (Рисунок 6, панель В, 3-4 ряд). Использование AAV8 позволило получить сигнал от GFP в зеленом (собственная флуоресценция GFP) и красном канале флуоресценции (от антител anti-GFP конъюгированных с AF647) в слое пигментного эпителия для интравитреального и слое фоторецепторов для субретинального введения. При этом сигнал наблюдали равномерно распределённым примерно на половину всей сетчатки.

Таким образом, в ходе *in vivo* экспериментов было показано, что оптимальной платформой для доставки кодирующих последовательностей и дальнейшего долгосрочного синтеза белка в целевых слоях сетчатки, в фоторецепторах, эффективнее всего использовать AAV8 при субретинальном введении. Эти данные использовали для получения и тестирования прототипа препарата для терапии синдрома Штаргардта (Рисунок 7).

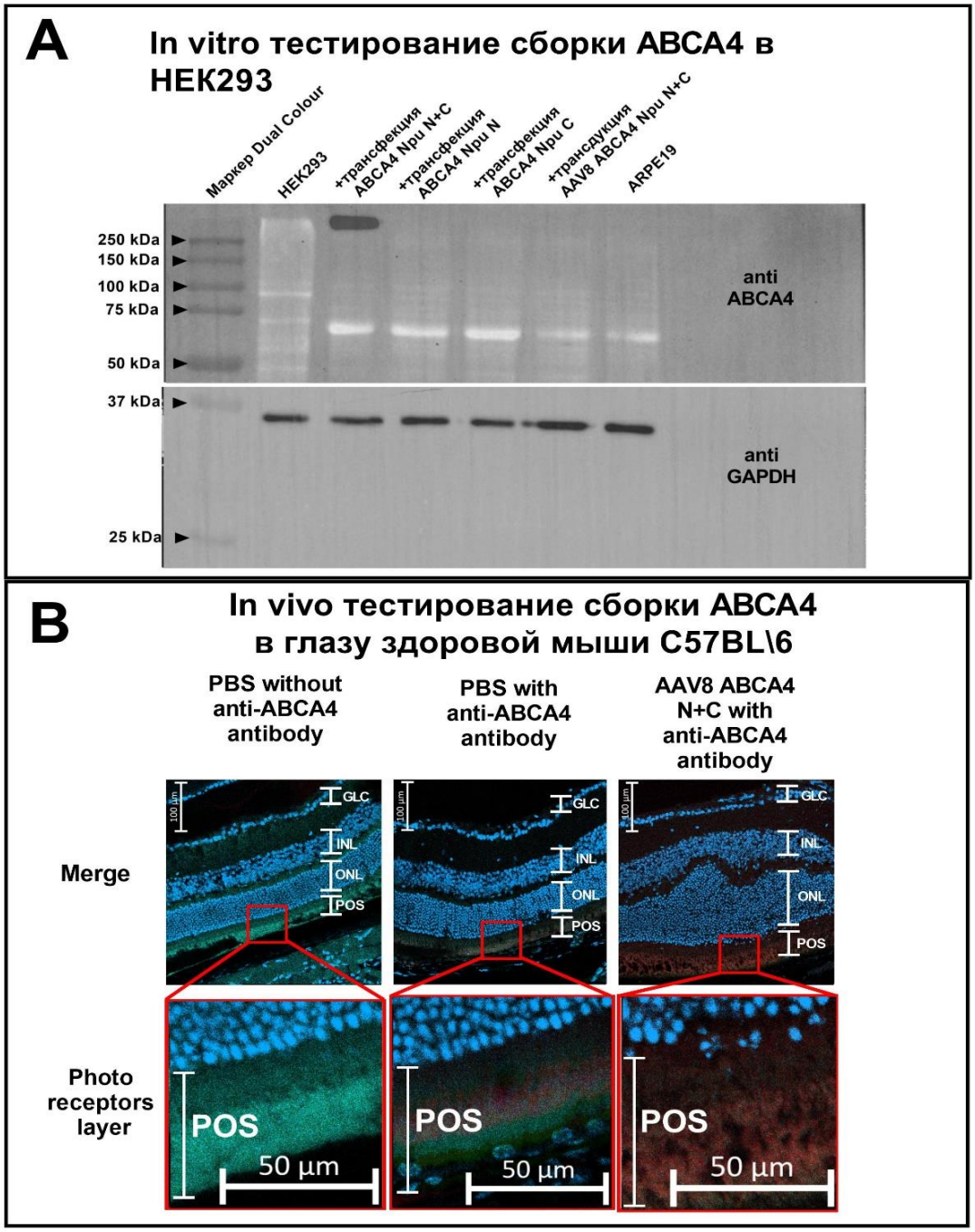


Рисунок 7 – *In vitro* и *in vivo* анализ экспрессии и сборки ABCA4.
A - *in vitro* тестирование сборки ABCA4 после трансфекции и трансдукции HEK293 методом вестерн-блоттинга, антителами детектируется только полная форма белка (черная полоса на 260 kDa – целевой белок ABCA4, белые полосы – результат неспецифического окрашивания всех белков с FITC для визуализации дорожек), **B** — гистологическая оценка сборки ABCA4 в сетчатке здоровых мышей линии C57BL\6 после введения AAV8-ABCA4 N+C с увеличенным изображением участка слоя фоторецепторов.

В результате экспериментальной работы был получен прототип препарата для терапии синдрома Штаргардта. Препарат представляет собой комбинацию двух векторов AAV8 ABCA4 Npu N и C, которые обеспечивают раздельный синтез белка ABCA4 (сайт разделения 1150) и его последующую сборку с помощью интеинов Npu DnaE (Рисунок 7 панель A). Отметим, что anti-ABCA4 антитела детектируют только полную форму белка, полученную после сборки. В остальных случаях сигнал не детектируется, что означает отсутствие белка ABCA4 в клеточных линиях HEK293 и ARPE19 в достаточном объеме для детекции антителами. Предсплайсинговые формы также не детектировались антителами против целевого белка ABCA4 и против 6-His, что, возможно, говорит о недоступности данного эпитопа для выбранных антител.

В результате субретинальных инъекций наблюдается аналогичный результат, однако основной проблемой детекции является кросс-реактивность антител с эндогенным белком мыши (Рисунок 7 панель B). Моноклональные мышиные антитела anti-ABCA4 3F4 (Santa Cruz, sc-65672) детектируют как эндогенный мышиный, так и экзогенный белок человека, поэтому после окрашивания антителами контрольного образца без введений детектируется ненулевой сигнал от эндогенного белка в области фоторецепторов (Рисунок 7, панель B, фото в центре). В случае раздельной доставки AAV8 ABCA4 Npu N+C после инъекции сигнал распределяется более равномерно и с большей интенсивностью по всей ширине слоя фоторецепторов (Рисунок 7, панель B, фото справа). В дальнейшем планируется проведение экспериментов на нокаутных животных по гену ABCA4 и подтверждение функций белка биохимическими методами по изменению уровня A2E в исследуемых образцах. В случае успешной активации данного каскада ожидается снижение количество токсичных метаболитов A2E, что увеличивает вероятность сохранения зрительных функций глаза, которые возможно будет проверить с помощью поведенческих тестов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в рамках диссертационной работы система интеинового транс-сплайсинга на основе интеина Npu DnaE была изучена и оптимизирована для сборки и раздельной доставки модельных (GFP) и терапевтических белков (ABCA4). Основные результаты исследования, отражающие его научную новизну, представлены ниже в соответствии с ранее сформулированными положениями, выносимыми на защиту.

Эффективность интеинового транс-сплайсинга подтверждена высоким выходом восстановленного белка (на примере GFP) как на уровне трансфекции (до 80%) после оптимизации протокола, разработанного в данной работе, так и на уровне трансдукции (до 50%). Механизмы белкового сплайсинга универсальны и едины для большинства типов человеческих клеток (в работе представлены клетки HEK293, ARPE19, FbP13), однако для их активации необходимо соблюдение ключевого условия – оптимального аминокислотного состава экстеинов.

В работе был предложен алгоритм, который позволяет на основе аминокислотной последовательности белка прогнозировать потенциальные сайты разделения, однако восстановление функциональной активности белка не может быть достоверно предсказано исключительно биоинформатическими методами, поскольку эффективность транс-сплайсинга зависит от комплекса структурных и биохимических факторов. Поэтому после анализа необходимо проводить экспериментальную проверку как минимум двух наиболее вероятных сайтов сплайсинга, поскольку восстановление структуры не всегда гарантирует восстановление функций, что было продемонстрировано на примере GFP.

Следует отдельно отметить, что проверка данных гипотез удобна в случае малых или модельных белков и затруднительна для сборки крупных белковых конструкций из-за технических сложностей синтеза и ограниченного инструментария в виде антител для проверки восстановления структур. При этом восстановление структуры не означает восстановление функций, что требует разработки функциональных тестов под каждую молекулу отдельно.

Важным этапом разработки является выбор способа доставки генетических конструкций. Наилучший результат был получен при использовании вектора AAV8. Аденоассоциированные вирусы являются проверенной и удобной платформой для раздельной таргетной доставки крупных генов, а интеины - эффективным и универсальным инструментом сборки белковых комплексов, позволяющих решить проблему заместительной терапии крупных генов на примере ABCA4.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, входящих в наукометрические базы Web of Science и Scopus:

1. **Brovin, A.,** Minskaia, E., Sabantsev, M., Chuvpilo, S., & Karabelsky, A. Protein trans-splicing: optimization of intein-mediated GFP assembly as a model for the development of gene therapy //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2024. – Т. 12. – С. 1488912.
2. Sabantsev, M. O., **Brovin, A. N.***, Gureev, M. A., Porozov, Y. B., Chuvpilo, S. A., & Karabelsky, A. V., Application of Rational Design and Molecular Metadynamics for the Estimation of Changes in Trans-Splicing Efficiency during the Mutagenesis of Ssp DnaE Intein //ACS Bio Med Chem Au 2025, Т. 5, № 4, С. 738–752
3. **Brovin, A. N.,** Sabantsev, M. O., Gureev, M. A., Chuvpilo, S. A., & Karabelsky, A. V., «Intein cross-reactivity enable modulation of trans-splicing efficiency» //Biological Communications. – 2025. – Т. 70. – №. 4. – С. 255-267.
4. **Бровин А.Н.,** Сабанцев М.О., Игнатьева Е.В., Байбарин К.А., Карабельский А.В. Современные генетические технологии для терапии синдрома Штаргардта. Часть 1. Невирусные методы доставки терапевтических конструкций. Офтальмология. 2026;23(3):512-520. https://doi.org/10.18008/1816-5095-2026-3-512-520

Публикации в сборниках трудов конференций:

1. Бровин А.Н., Карабельский А.В., Разработка тест системы для апробации методов доставки крупных генов с помощью аденоассоциированных вирусных векторов //Цитология. материалы viii молодежной школы-конференции по молекулярной биологии и генетическим технологиям института цитологии ран (11–14 октября 2022 г., институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург) – 2022 – Т.64, №7, С. 611-780.
2. Бровин А.Н., Сабанцев М.О., Чувпило С.А., Минская Е.С., Егоров А.Д., Карабельский А.В Тест-система визуализации белкового транс-сплайсинга молекулы gfp с интеинами группы dnae для задач генной терапии наследственных заболеваний, ассоциированных с крупными генами // Биохимия человека: материалы всероссийской конференция с международным участием, 17–19 октября 2024 г – 2024 – С.102