На правах рукописи



ДАХНЕВИЧ АНАСТАСИЯ ЯРОСЛАВОВНА

Направленная эволюция ортогональных пар аминоацил–тРНК–синтетаз/тРНК для встройки неприродных аминокислот в пептиды при помощи биосинтеза

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:

Иванов Роман Алексеевич, PhD по специальности «Молекулярная иммунология», Председатель Учёного совета Университета «Сириус», директор Научного центра трансляционной медицины, научный руководитель направления «Медицинская биотехнология».

Защита состоится 8 декабря 2026 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета НТУ.1.5.3.22 в 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 «5» ноября 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук — Сырочева А.О.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

В природе белки состоят из 22 аминокислот, из которых 20 являются основными, а две – дополнительными: селеноцистеин и пирролизин. Помимо протеиногенных, в природе существует более 500 неприродных аминокислот (НПА), которые не встраиваются в белки посредством рибосомального синтеза. НПА, введенные в аминокислотную последовательность, обеспечивают наличие нехарактерных химических групп, что может обеспечить рекомбинантным белкам уникальные свойства, создает возможности их селективной химической модификации и расширяет перспективы применения. Согласно метаанализам и систематическим обзорам, в мировой медицинской практике одобрено и находится на разных стадиях клинических испытаний более ста десяти белковых препаратов, содержащих различные неприродные аминокислотные фрагменты.

Данный подход обладает рядом преимуществ: высокой эффективностью, возможностью автоматизации процесса, сокращением времени синтеза и упрощением выделения целевого продукта. К основным недостаткам относятся высокая стоимость синтеза, значительный расход дорогостоящих реагентов и органических растворителей, а также образование большого количества химических отходов, что ограничивает экономическую и экологическую эффективность метода. Развивающимся направлением современной биофармацевтики стало расширение генетического кода с помощью инженерных ортогональных пар тРНК и аминоацил–тРНК–синтетаз (АРС), что дает возможность осуществлять сайт–специфическое встраивание неприродных аминокислот в рекомбинантные белки и пептиды в процессе их трансляции клетками–продуцентами. Таким образом, НПА может быть прецизионно направлена в любую заранее выбранную позицию в ходе наработки в традиционных экспрессионных системах. Такой подход не только снижает стоимость синтезируемых субстанций, но и расширяет возможности получения белков и пептидов большего размера, имеющих сложную пространственную организацию.

Для сайт–направленного включения НПА в белки требуется наличие в клетке соответствующих механизмов. Одним из важнейших элементов расширения генетического кода является наличие свободного кодона, в настоящее время используется амбер стоп–кодон из–за его малой распространенности. Помимо свободного кодона, важным является наличие ортогональных пар АРС/тРНК. Ортогональными являются те АРС, которые не взаимодействуют с протеиногенными аминокислотами и тРНК клетки–хозяина, при этом комплементарны синтетическому аппарату клетки и избирательно распознают одну из НПА в качестве субстрата. Ортогональные пары АРС/тРНК были найдены и адаптированы к модельным объектам в начале века. Наибольшее распространение получила пирролизил–тРНК–синтетаза (PylRS) из архей рода *Methanosarcina*. Эта АРС является полностью ортогональной, так как не имеет перекрестных взаимодействий с эндогенными элементами системы трансляции ни у бактерий, ни у эукариот, обладает большим карманом связывания аминокислот в активном центре и лишена домена редактирования, что важно для распознавания большого количества НПА. В то же время $тРНК_{Pyl}$ является природным супрессором амбер стоп–кодона, при этом антикодон не является элементом идентичности для PylRS, вследствие чего данную систему можно использовать для перекодирования UAG–кодона. Для дальнейшего развития технологии актуальной задачей

становится оптимизация синтетаз для повышения эффективности их работы как с точки зрения селективности, так и с точки зрения биохимических характеристик.

Одним из путей решения этой задачи является использование методов направленной эволюции. В период с 2017 по 2020 год был разработан метод PACE (фаг–ассоциированная непрерывная эволюция), успешно адаптированный для работы с АРС. Суть метода заключается в организации зависимости скорости размножения фага от активности гена интереса, встроенного в его геном. Несмотря на небольшой срок использования, метод продемонстрировал высокую эффективность. Однако до сих пор он применяется лишь в нескольких зарубежных научных центрах. Оптимизация данного метода и разработка новых ортогональных пар АРС/тРНК позволят расширить возможности генетически направленного включения НПА в белки.

Особый интерес представляют НПА с азидогруппой, обеспечивающие селективную конъюгацию посредством реакции азид–алкинового циклоприсоединения (SPAAC) в мягких условиях без медных катализаторов. Такой подход позволяет контролировать положение модификации и стехиометрию продукта, снижая образование позиционных изомеров и повышая однородность белковых конъюгатов. Применение данного подхода для функционализации поверхности липидных наночастиц (ЛНЧ) белками позволяет целенаправленно изменять их взаимодействие с клетками, повышать специфичность связывания с клетками–мишенями и улучшать адресность доставки мРНК. Это открывает перспективы для разработки систем доставки терапевтических молекул в Т–лимфоциты для CAR–T–терапии *in vivo*, а также в бета–клетки островков Лангерганса для создания новых подходов к профилактике и лечению сахарного диабета 1–го типа. Перспективность метода подтверждается клиническими исследованиями белковых препаратов с азидосодержащими НПА в составе (NCT04829604 и NCT04009681), а его универсальность может быть продемонстрирована на примере получения функциональных пептидов и биотерапевтических препаратов с заранее заданными свойствами.

Целью работы является создание биотехнологической платформы для разработки и производства инновационных лекарственных препаратов на основе белков с неприродными аминокислотами. Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оптимизация протокола направленной эволюции при помощи бактериофагов для повышения специфичности пар АРС/тРНК для встраивания целевых НПА и улучшения каталитических характеристик;
2. Изучение роли аминокислотных замен эволюционировавших вариантов PylRS с использованием функционального тестирования и структурного моделирования;
3. Исследование эффективности включения НПА в белки при помощи вариантов PylRS с использованием флуоресцентной тест–системы;
4. Разработка лабораторной технологии получения Exe4, пептидного агонистов GLP–1 рецептора, и рекомбинантного DARPin, специфичного к мышиному CD8, с 4–Азидо–L–фенилаланином;
5. Разработка метода функционализации липидных наночастиц белками с использованием безмедного азид–алкинового циклоприсоединения;
6. Исследование фармакологической активности полученных липидных наночастиц на клеточных моделях GLP–1R– и CD8–положительных клеток;

Научная новизна исследования заключается в разработке и валидации метода расширения генетического кода бактерий с использованием платформы направленной эволюции.

Реализована стратегия направленной эволюции как нативной пирролизил–тРНК–синтетазы *Methanosarcina mazei* (MmPylRS), так и химерного белка на основе N–домена *Methanosarcina*

barkeri и С домена *Methanosarcina mazei* (ChPylRS) с двойной аминокислотной заменой Asn346Ala/Cys348Ala с заданной специфичностью к четырем производным фенилаланина и тирозина: О–аллил–L–тирозина, О–метил–L–тирозина, 4–азидо–L–фенилаланина и 2–хлоро–L–фенилаланина. В работе оптимизирован протокол фаг–ассоциированной эволюции PANCE посредством интеграции циклов отрицательной селекции, проводимой в отсутствие целевых НПА, что позволило эффективно подавлять неспецифическую активность ортогональных АРС.

В результате направленной эволюции тРНК–синтетазы идентифицирован ряд новых, ранее не описанных в литературе аминокислотных замен. В частности, обнаружена конвергентно возникшая во всех эволюционных линиях замена Met300Thr в каталитическом домене MmPylRS. Показано, что появление гидроксильной группы треонина в положении 300 перестраивает сеть водородных связей активного центра фермента, стабилизируя объемные ароматические радикалы аналогов тирозина и фенилаланина, использованных в данном исследовании.

Впервые разработана и структурно охарактеризована панель из четырех уникальных ортогональных синтетаз с субстратной специфичностью: AllYPylRS, MethYPylRS, AzFPylRS и 2ClFPylRS (в структурном каркасе химерного белка ChPylRS). Новые замены в N–домене (Glu88Lys, Arg55Cys, Asp2Asn), согласно предложенному механизму, способствуют перераспределению связей с тРНК с N– на С–домен, приводя к образованию более стабильного комплекса АРС–тРНК. Также установлена роль ряда новых аминокислотных замен С–домена (например, Glu210Lys, Glu357Lys, Asn280Asp), в расширении субстратного кармана, образовании новых водородных связей с карбоксильной группой производных тирозина и стабилизации третичной структуры фермента.

Кроме того, в работе впервые осуществлен биосинтез функциональных белков DARPin, специфичных к мышиному антигену CD8 (mCD8) и пептидных агонистов GLP–1 рецептора, несущих направлено встроенный 4–азидо–L–фенилаланин (pAzF) на С–конце молекулы, что открывает новый биотехнологический путь для их последующей конъюгации с липидными наночастицами для таргетной доставки мРНК.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных представлений о пластичности и границах адаптивности трансляционного аппарата живых систем. Результаты исследования раскрывают молекулярные механизмы эволюционной перестройки аминоацил–тРНК–синтетаз II класса под новые аминокислоты, содержащие пара–, мета– и орто–замещенные бензольных колец.

Практическая значимость диссертационного исследования определяется созданием готовой технологической платформы для высокоэффективной биоортогональной модификации белковых молекул. Сконструированная серия рекомбинантных штаммов–продуцентов *E. coli*, экспрессирующих оптимизированные пары PylRS/тРНК$_{Pyl}$, позволяет осуществлять препаративную наработку полноразмерных целевых белков с уровнем встраивания НПА в диапазоне 89–98%.

Разработанные модифицированные белки DARPin anti–mCD8 и Exe4 с остатком pAzF на С–конце молекулы успешно применены для сайт–направленной безмедной клик–химической конъюгации (SPAAC) с липидными наночастицами (ЛНЧ), что обеспечивает адресную доставку терапевтических мРНК в CD8 и GLP–1R положительные клетки.

Методология и методы исследования диссертационной работы базируются на фундаментальных принципах молекулярной биологии, белковой инженерии и направленной эволюции ферментов, реализуемых через концепцию расширения генетического кода бактерий путем создания искусственных ортогональных пар «аминоацил–тРНК–синтетаза/тРНК».

Экспериментальная стратегия исследования основана на модернизации платформы фаг–ассоциированной эволюции PANCE за счет интеграции прерывистых циклов негативной селекции, что обеспечивает элиминацию фоновой активности ферментов к каноническим аминокислотам. В данной работе используется широкий спектр молекулярных методов клонирования (например, изотермической сборки с помощью Gibson Assembly, SLIC или Golden Gate Assembly) для создания генетических векторов; микробиологические методы скрининга клонов на селективных средах и оптимизации условий ферментации штаммов–продуцентов E. coli; биоинформатические подходы для высокопроизводительного секвенирования (NGS, Illumina MiSeq) эволюционных пулов и конформационного 3D–моделирования активных центров синтетаз (AlphaFold3, PyMOL). Оценка эффективности супрессии амбер–кодона осуществлялась флуоресцентным анализом репортерного белка sfGFP, а препаративное выделение и очистка целевых молекул DARPin anti–mCD8 и пептидов GLP–1 выполнялись методами металлоаффинной (Ni–IMAC), ионообменной хроматографии и высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии. Достоверность и точность сайт–специфического встраивания неприродных аминокислот подтверждались методами электрофореза (SDS–PAGE) и времяпролетной масс–спектрометрии. Для создания конъюгатов белков, содержащих pAzF, использовались методы биоортогональной химии для проведения реакций азид–алкинового циклоприсоединения (SPAAC) с целью направленной клик–конъюгации полученных модифицированных белков и пептидов с ЛНЧ.

Положения, выносимые на защиту.

1. Аминокислотные замены в MmPylRS обеспечивают изменение субстратного профиля синтетазы в сторону O–аллил–L–тирозина (Asp2Asn, Glu88Lys, Ala107Thr, Asn280Asp, Met300Thr, Asn346Ala, Cys348Ala, Asn420Ser), O–метил–L–тирозина (Met17Leu, Glu39Lys, Pro109Ser, Met300Thr, Glu337Lys, Asn346Ala, Cys348Ala, Asp408Gly) и 4–азидо–L–фенилаланина (Asp2Asn, Arg55Cys, Met300Thr, Tyr306His, Asn346Ala, Cys348Ala, Glu357Lys), обеспечивая десятикратное повышение эффективности включения соответствующих неприродных аминокислот по сравнению с исходной синтетазой, не проходившей эволюцию, при сохранении кросс–специфичности к структурно сходным субстратам.
2. Химерная двухсубъединичная PylRS, объединяющая N–концевой фрагмент PylRS *Methanosarcina barkeri* (остатки 1–102) с заменами His62Tyr, Ala100Ser и Pro101Arg и вторую субъединицу, содержащую фрагмент PylRS *M. barkeri* (остатки 107–149) и фрагмент PylRS *M. mazei* (остатки 185–454) с заменами Asn241Ser, Glu249Lys, Met300Thr, Asn346Ala и Cys348Ala, обеспечивает селективное включение 2–хлоро–L–фенилаланина в белки при помощи биосинтеза.
3. Сайт–специфическое включение 4–азидо–L–фенилаланина в белки Exe4 и DARPin mCD8 позволяет проводить их биоортогональную конъюгацию и последующую функционализацию липидных наночастиц, обеспечивая рецептор–зависимое таргетирование GLP–1R–положительных и CD8–положительных клеток и повышение эффективности трансфекции.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается применением современных молекулярно–биологических, биоинженерных, биохимических и клеточно–биологических методов, включая генетическое конструирование, секвенирование, гетерологичную экспрессию рекомбинантных белков, хроматографическую очистку и функциональное тестирование полученных пептидов на клеточных моделях. Достоверность полученных данных подтверждается

использованием контрольных образцов, проведением независимых экспериментальных повторов и применением адекватных методов статистической обработки.

Результаты диссертационной работы были представлены на итоговой аттестации научного центра трансляционной медицины АНОО ВО «Университет «Сириус», а также в формате устного доклада на Саммите разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех», 2026, Федеральная территория «Сириус», Россия.

Личный вклад автора

Основной объем экспериментальных исследований выполнен автором лично либо при его непосредственном участии. Автором проведен анализ литературы, разработан и оптимизирован протокол PANCE с интеграцией циклов негативной селекции, сконструированы плазмидные векторы, проведены молекулярно–генетические исследования, анализ белков и валидация протокола SPAAC. Совместно с соавторами соответствующих публикаций выполнены селекция фаговых популяций, подготовка и биоинформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования, структурное моделирование вариантов PylRS, оптимизация ферментации и выделение модифицированных белков и пептидов, а также эксперименты с наночастицами in vitro. Автор принимал непосредственное участие в интерпретации масс–спектрометрических данных. Подготовка научных публикаций, патентных заявок, диссертации и автореферата осуществлена автором лично; научный руководитель Иванов Р.А. и соавторы принимали непосредственное участие в обсуждении результатов, их интерпретации и подготовке совместных публикаций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 154 страницах и построена по следующему плану: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и обсуждения, выводы, приложение. Библиографический список включает 211 источников. Работа проиллюстрирована 43 рисунками и содержит 5 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

3.1 Разработка и валидация платформы направленной эволюции PylRS

Наиболее часто используемыми ферментами для включения НПА являются пирролизил–тРНК–синтетазы, выделенные из *M. mazei* и *M. barkeri*. В качестве исходных ферментов для начала эволюции были взяты MmPylRS из *M. mazei* и химерный белок ChPylRS, который содержит 1–102 аминокислоты пирролизил–тРНК–синтетазы *M. barkeri* с аминокислотными заменами A100S и P101R, другая содержит от N– к C–концу 107–149 аминокислоты пирролизил–тРНК–синтетазы *M. barkeri* и 185–454 аминокислоты пирролизил–тРНК–синтетазы *M. mazei*. Для получения варианта PylRS, который с большей эффективностью включает НПА с бензольным кольцом, в активный центр кармана связывания аминокислоты были введены аминокислотные замены Asn346Ala и Cys348Ala (нумерация аминокислот относительно полноразмерной последовательности MmPylRS). Схематическое изображение показано на рисунке 1A.

Два гена синтетаз в дальнейшем использовались в работах по направленной эволюции в отношении четырех производных фенилаланина и тирозина, представленных на рисунке 1B. MmPylRS_mut применяли в эксперименте с O–Allyl–L–Tyr (AllYPylRS), O–Methyl–L–Tyr (MethYPylRS), p–Azido–L–Phe (AzFPylRS), тогда как ChPylRS_mut подвергали эволюции в отношении 2–Chloro–Phe (2ClFPylRS).

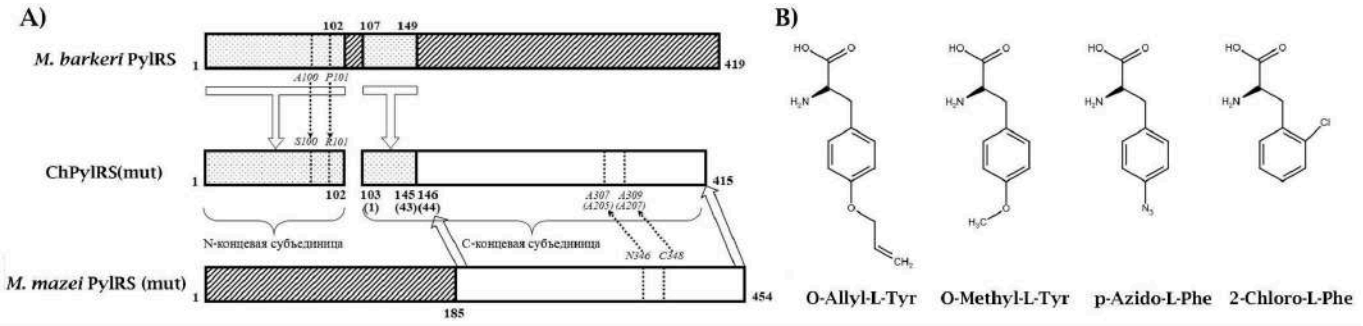


Рисунок 1 – **(A)** Структура PylRS с внесенными аминокислотными заменами, использованная в данном исследовании. **(B)** Структуры неприродных аминокислот, использованных в данном исследовании

При фаг–ассоциированной эволюции (PANCE) жизнеспособность фага напрямую зависит от эффективности работы целевого белка, кодируемого его геномом. Для реализации метода PANCE ген gIII в бактериофаге заменен геном, кодирующим целевой белок PylRS. Клетки–хозяева содержат вспомогательную плазмиду (AP) с геном gIII. Для генов интереса с низкой начальной активностью, к которым относится PylRS, необходимо несколько раундов положительной селекции с постепенно возрастающим давлением отбора (рисунок 2A).

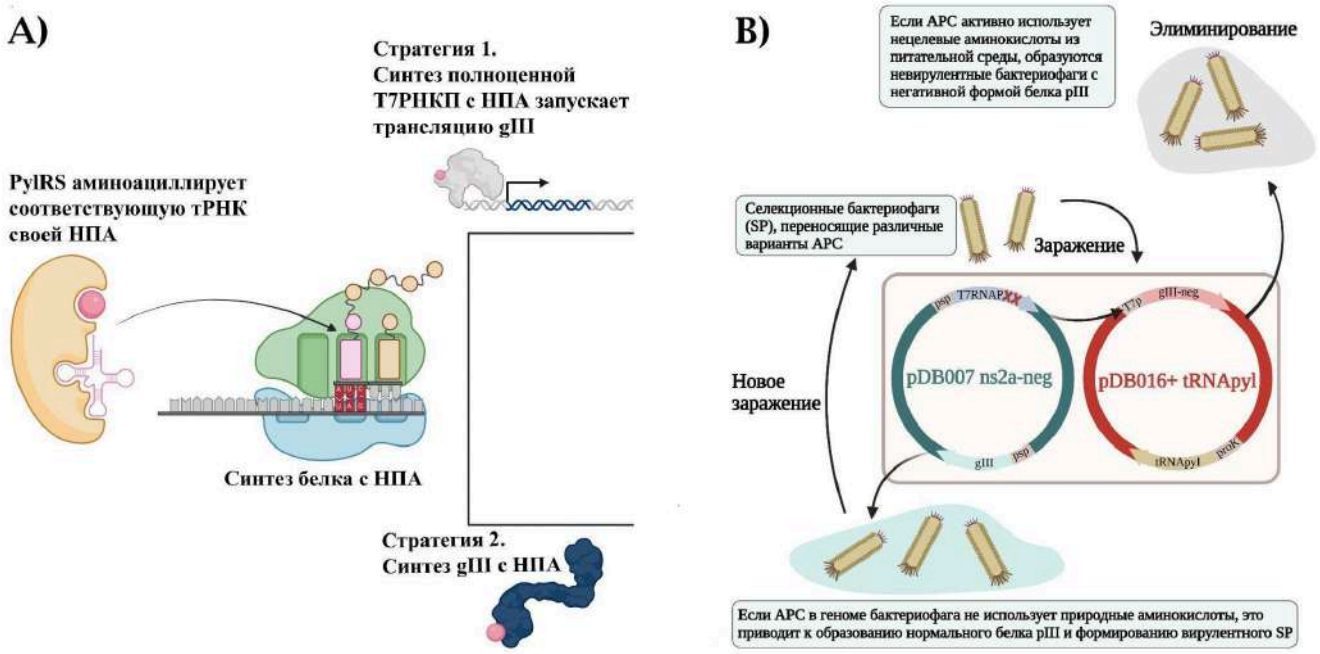


Рисунок 2 – **(A)** Стратегии связывания активности PylRS с жизнеспособностью бактериофага. Стратегия 1: аминоацилирование $тРНК_{Pyl}$ НПА обеспечивает трансляцию полноразмерной РНК–полимеразы T7 из транскрипта, содержащего амбер стоп–кодоны. Затем РНК–полимераза T7 запускает экспрессию gIII при помощи промотора T7 (PT7). Стратегия 2: аминоацилирование $тРНК_{Pyl}$ НПА позволяет транслировать полноразмерный pIII из мРНК gIII, содержащей амбер стоп–кодон. **(B)** Отрицательная селекция: используется плазмида с доминантно–отрицательной формой gIII (gIII–neg) без амбер–стоп–кодонов под контролем промотора T7; T7RNAP под контролем psp. Совместно экспрессируется с интактным gIII под контролем psp

Направленная эволюция методом PANCE проходил в четыре этапа с постепенным усилением селективного давления. На первом этапе (стратегия 1) клетки *E. coli* S2060 трансформированные двумя AP, в которых амбер стоп–кодон располагался в гене

Т7–РНК–полимеразы (Т7–РНКП), а ген gIII находился под контролем Т7–промотора. Такой подход максимизировал продукцию белка pIII: каждое событие встраивания НПА в ответ на амбер стоп–кодон приводило к образованию нескольких транскриптов gIII, облегчая репликацию фагов на старте. На втором этапе (стратегия 2) жесткость отбора возрастала: клетки содержали одну АР с $тРНК_{Pyl}$ и геном gIII с одним амбер–кодоном. Выживание бактериофага в такой системе напрямую зависело от способности PylRS включать НПА в pIII при исходной концентрации субстрата 10 мМ (5 мМ для oAllylY). На третьем и четвертом этапах в gIII были введены два и три стоп–кодона соответственно. Кроме того, на финальном этапе концентрацию НПА ступенчато снижали до 2 мМ, что позволило отобрать наиболее эффективные варианты PylRS. Адаптация PylRS оценивалась по росту титра бактериофага, который служит маркером сохранения базовой активности фермента в ходе эволюции, но не его специфичности.

Для элиминации вариантов PylRS с субоптимальными свойствами был разработан новый протокол отрицательного отбора, который проводился вручную как отдельный этап после каждого этапа положительного отбора, без добавления НПА. Для этого были сконструированы две плазмиды: pDB007ns2a–neg (содержит интактный ген gIII и ген $Т7^{-}$РНКП под контролем промотора фагового шока) и pDB016+tRNApyl (несет укороченный вариант gIII (gIII–neg) под контролем $Т7^{-}$промотора и $тРНК_{Pyl}$). Включение природной аминокислоты ферментом PylRS во время трансляции Т7–РНКП ведет к экспрессии gIII–neg и ингибированию сборки вирулентных фагов. В этих условиях отрицательного отбора выживание целевых SP зависит от плазмиды pDB007ns2a–neg, обеспечивающей сборку инфекционных вирионов для продолжения эволюционной линии (рисунок 2B).

После каждого этапа положительного отбора были проведены несколько раундов отрицательного отбора. Его эффективность была оценена по различию титров фагов в присутствии и отсутствии НПА методом ПЦР–РВ. Различие в 1,5–2 порядка и более считали достаточным для перехода к следующему этапу, меньшие значения – признаком возможного избегания отрицательного отбора. Итеративная стратегия обратной связи обеспечивала строгий отбор и снижала вероятность обогащения библиотек вариантами с природными аминокислотами, компенсируя неопределенность уровня экспрессии pIII/gIII–neg.

3.2 Оценка эффективности отобранных вариантов PylRS

Для оценки функциональных свойств полученных ферментов была использована система репортерного белка sfGFP, содержащего TAG–кодон в позиции 27. В отсутствие соответствующей НПА трансляция полноразмерного белка была существенно ограничена, тогда как ее добавление приводило к выраженному увеличению флуоресценции. Нормализация проводилась по оптической плотности культуры, а также путем вычитания фоновых сигналов среды с и без добавления НПА для соответствующих культур. Для каждой линии было протестировано более 22 клонов, а результаты для лучших из них представлены на рисунке 3. Все четыре эволюционировавших варианта PylRS демонстрировали более чем десятикратный рост активности с добавлением соответствующей НПА в среду по сравнению с исходным ферментом. Уровень флуоресценции наиболее удачных клонов превышал 50% от положительного контроля.

Принципиально важным результатом стало сочетание высокой активности с субстратной специфичностью. Для каждого из четырех вариантов максимальная активность наблюдалась в присутствии соответствующей НПА. Вместе с тем было показано, что структурно близкие субстраты могут частично распознаваться одной синтетазой. Так, AllYPylRS сохраняла заметную активность в отношении 2–ClF, а AzFPylRS демонстрировала сопоставимую эффективность

включения pAzF и 2–ClF. Эти результаты показывают, что направленная эволюция позволила существенно изменить субстратные свойства PylRS, однако достигнутая специфичность зависела от химической природы конкретной НПА.

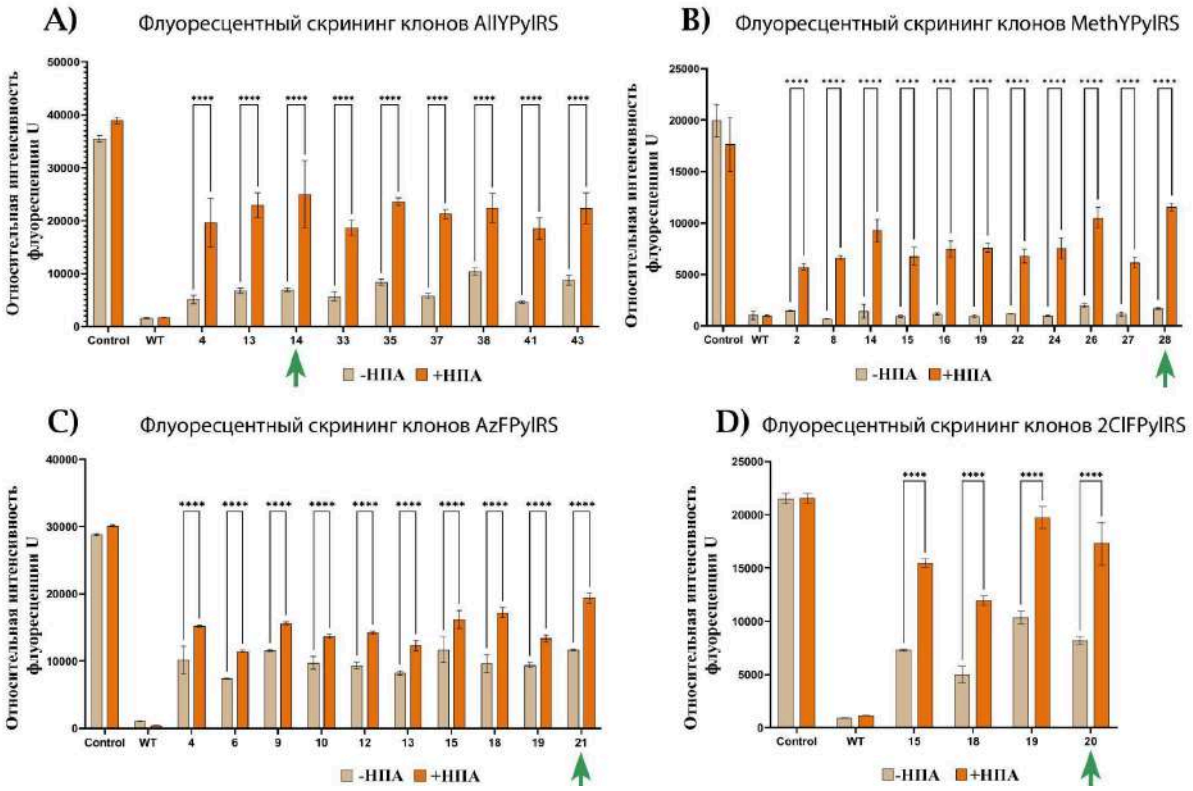


Рисунок 3 – Измерения флуоресценции наиболее активных вариантов с добавлением и без добавления **(A)** O–аллил–L–тирозина (AllYPylRS), **(B)** O–метил–L–тирозина (MethYPylRS), **(C)** 4–азидо–L–фенилаланина (AzFPylRS) и **(D)** 2–хлорфенилаланина (2ClFPylRS). Положительный контроль: клетки, экспрессирующие sfGFP без стоп–кодона. WT: клетки, содержащие исходную PylRS, которая не подвергалась PANCE (MmPylRS_mut для O–аллил–L–тирозина, O–метил–L–тирозина и 4–азидо–L–фенилаланина; ChPylRS_mut для 2–хлорфенилаланина). Данные представлены как среднее значение ± SD (n=6). ****p<0,0001. Для обработки использованы односторонний дисперсионный анализ, тест множественного сравнения по Шидаку. Зеленые стрелки указывают на клоны, выбранные для дальнейшего анализа

Для окончательной проверки специфичности включения НПА был проведен масс-спектрометрический анализ очищенного sfGFP. Во всех исследованных вариантах была подтверждена ожидаемая молекулярная масса белка, соответствующая включению целевой НПА в заданную позицию. Доля полноразмерного белка с необходимой заменой превышала 89% от общего пула идентифицированных форм sfGFP (рисунок 4).

		AllYPylRS	MethYPylRS	AzFPylRS	2ClFPylRS
Название	**Масса**				
sfGFP	27452.6	4.1	1.3	9.6	10.7
sfGFP_F27oAllylY	27508.7	**95.9**			
sfGFP_F27oMetY	27482.6		**98.7**		
sfGFP_F27pAzF	27493.6			**90.4**	
sfGFP_F272-ClF	27486.6				**89.3**

Рисунок 4 – Относительные значения доли sfGFP, содержащего целевую НПА, полученные методом масс–спектрометрического анализа

Полученные результаты подтвердили, что отобранные варианты PylRS обеспечивают не только повышение активности в клеточном репортерном анализе, но и эффективное сайт–специфическое включение соответствующих НПА в белок.

3.3 Структурный анализ выявленных аминокислотных замен PylRS

В общей сложности в рамках исследования было проведено около 50 поколений направленной эволюции. Для каждой из четырех НПА была сформирована независимая эволюционная линия. Анализ методов высокопроизводительного секвенирования последовательностей эволюционировавших вариантов PylRS выявил ряд аминокислотных замен, возникавших как независимо в отдельных линиях, так и конвергентно (рисунок 5).

AllYPylRS						
Замена	Asp2Asn	Glu88Lys	Ala107Thr	Asn280Asp	Met300Thr	Asn420Ser
Локализация	Карман связывания с тРНК в NTD	Карман связывания с тРНК в NTD	Вариабельный линкер между NTD и CTD	Каталитический домен	Каталитический домен Активный центр	Каталитический домен Активный центр
Возможное значение	Образует карман для связывания тРНК	Образует карман для связывания тРНК	Изменение гибкости междоменного линкера	Стабилизация конструкции	Образует карман для связывания аминокислоты.	Образует карман для связывания аминокислоты.
Соответствие M.mazei	Asp2	Glu88	Ala107	Asn280	Met300	Asn420
MethYPylRS						
Замена	Met17Leu	Glu39Lys	Pro109Ser	Met300Thr	Glu337Lys	Asp408Gly
Локализация	Карман связывания с тРНК в NTD	Карман связывания с тРНК в NTD	Вариабельный линкер между NTD и CTD	Каталитический домен Активный центр	Каталитический домен Мотив 2	Каталитический домен Активный центр
Возможное значение	Образует карман для связывания тРНК	Образует карман для связывания тРНК	Изменение гибкости междоменного линкера	Образует карман для связывания аминокислоты.	Образует карман для связывания аминокислоты.	Образует карман для связывания аминокислоты.
Соответствие M.mazei	Met17	Glu39	Pro109	Met300	Glu337	Asp408
AzFPylRS						
Замена	Asp2Asn	Arg55Cys	Ile250Ile	Met300Thr	Tyr306His	Glu357Lys
Локализация	Карман связывания с тРНК в NTD	Карман связывания с тРНК в NTD	Каталитический домен Мотив 1	Каталитический домен Активный центр	Каталитический домен Активный центр	Каталитический домен
Возможное значение	Образует карман для связывания тРНК	Образует карман для связывания тРНК		Образует карман для связывания аминокислоты.	Образует карман для связывания аминокислоты.	Стабилизация конструкции
Соответствие M.mazei	Asp2	Arg55	Ile250Ile	Met300	Tyr306	Glu357
2ClFPylRS						
Замена	His62Tyr	Asn202Ser	Glu210Lys	Met261Thr		
Локализация	Карман связывания с тРНК в NTD	Каталитический домен	Каталитический домен Мотив 1	Каталитический домен Активный центр		
Возможное значение	Образует карман для связывания тРНК	Стабилизация конструкции	Участвует в связывании с АТФ	Образует карман для связывания аминокислоты.		
Соответствие M.mazei	His62	Asn241	Glu249	Met300		

Рисунок 5 – Аминокислотные замены PylRS, возникшие в результате PANCE, и их локализация в белке, а также соответствующие аминокислотные остатки в *M. mazei*, определенные методом множественного выравнивания последовательностей. Замены, обнаруженные с помощью секвенирования на платформе Illumina MiSeq, выделены зеленым цветом. Замены, обнаруженные в лучших по итогам флуоресцентного скрининга клонах, методом секвенирования по Сэнгеру, выделены красным цветом. Замены, возникшие независимо во всех клонах, выделены синим цветом

Анализ эволюционировавших вариантов PylRS показал, что адаптация фермента затрагивает как активный центр, так и области, обеспечивающие взаимодействие с $тРНК_{Pyl}$. Наиболее значимой оказалась конвергентная замена Met300Thr, независимо возникшая во всех четырех эволюционных линиях. Моделирование предполагает формирование дополнительного взаимодействия с карбоксильной группой производных тирозина. Ее раннее появление и высокая частота на первых этапах эволюции указывают на то, что эта замена может обеспечивать общее преимущество при адаптации PylRS к ароматическим НПА. Для оценки функционального вклада было проведено введение данной замены в исходный MmPylRS_mut вариант (рисунок 6).

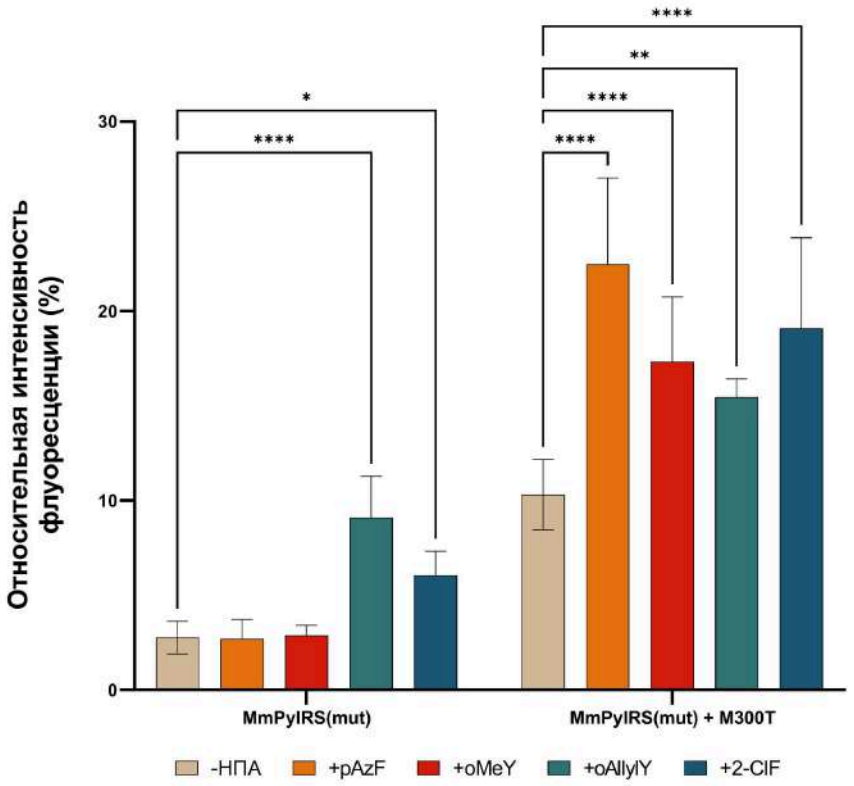


Рисунок 6 – Относительная интенсивность флуоресценции с и без добавления O–аллил–L–тирозина, O–метил–L–тирозина, 4–азидо–L–фенилаланина и 2–хлорфенилаланина для MmPylRS_mut и MmPylRS_mut с внесенной аминокислотной заменой Met300Thr. Данные представлены как среднее значение ± SD (n=9). *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001. Для обработки использованы односторонний дисперсионный анализ, тест множественного сравнения по Шидаку

Введение Met300Thr MmPylRS_mut в приводило к заметному увеличению активности по отношению ко всем исследованным НПА. При этом максимальная активность наблюдалась для pAzF (~22%), однако для остальных субстратов также сохранялись достаточно высокие значения (15–19%). Был сделан вывод о том, что Met300Thr не повышает сродство к одной конкретной НПА, а проявлялся в виде общего существенного повышения активности синтетазы в отношении различных производных фенилаланина и тирозина. Следовательно, введение данной замены приводит к увеличению сродства PylRS к широкому спектру НПА, тогда как остальные замены, вероятно, в большей степени определяют субстратную специфичность фермента.

Наряду с данной аминокислотной заменой выявлен ряд, ранее не учитывающихся при рациональном проектировании PylRS, включая Met17Leu, Glu39Lys, Glu88Lys, Asn202Ser,

Glu210Lys, Glu337Lys, Ala107Thr, Asn280Asp, Asp408Gly и Asn420Ser. Структурный анализ показал, что эти замены действуют комплексно: перестраивают взаимодействие PylRS с тРНК$_{Pyl}$ и одновременно изменяют геометрию субстрат–связывающего кармана. Полученные данные демонстрируют, что направленная эволюция позволяет выявлять ранее неочевидные детерминанты активности и специфичности PylRS. Это открывает новые возможности для углубленного изучения PylRS и создает основу для исследования других субстратов.

3.5 Разработка платформы сайт–специфической функционализации липидных наночастиц на основе DARPin с pAzF

Следующим этапом диссертационного исследования стала разработка платформы адресной доставки мРНК с использованием белков с pAzF. В качестве модельного таргетирующего лиганда был выбран DARPin, специфичный к рецептору mCD8. На С–конце сайт–специфически был введен pAzF, что обеспечивало единственную определенную точку последующей конъюгации без необходимости дополнительной химической модификации белка.

Конъюгацию при помощи азид-алкильного циклоприсоединения проводили на примере флуоресцентной меткой Cy5. Конъюгат был успешно применен для окрашивания Т$^-$клеток, выделенных из первичных спленоцитов мыши (рисунок 7). Популяция CD8+ Т$^-$клеток давала интенсивный сигнал в канале Cy5 и четко отделялась от популяции CD4$^-$клеток. Этот анализ подтверждает успешную конъюгацию Cy5 с белком, а также то, что данная модификация не препятствует эффективному связыванию DARPin с эпитопом рецептора CD8.

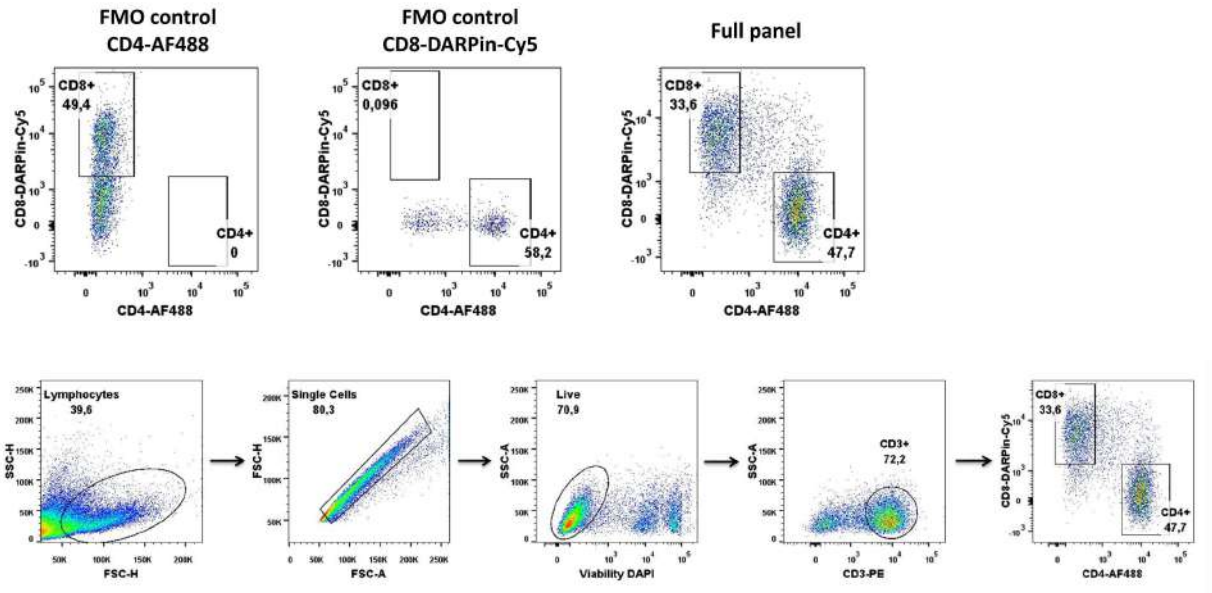


Рисунок 7 – Стратегия гейтирования при проточной цитометрии мышиных Т–клеток. После гейтирования по параметрам светорассеяния и исключения дуплетов (FSC–A/FSC–H) жизнеспособные (DAPI$^-$) CD3+–Т–клетки анализировали на предмет экспрессии CD4 (с использованием коммерческих антител) и CD8. Для детекции CD8 применяли DARPin, конъюгированный с флуорофором Cy5

Полученный DARPin–pAzF ковалентно соединялся с липидом DSPE–PEG–DBCO методом SPAAC, после чего был встроен в предварительно сформированные липидные наночастицы, которые включали два ионизируемых липида (SM–102 и ALC–0315 в эквимолярном соотношении), холестерин, DSPC и DMG–PEG–2000 в молярном соотношении 23,15:23,15:42,7:9,4:1,6 соответственно (платформа LNP–5). Такой подход позволил объединить генетически заданную точность модификации белка с контролируемой функционализацией поверхности наночастиц. Оптимизация состава наночастиц показала, что поствставка конъюгата в буфере Tris–HCl pH 7,5 позволяла сохранить их физико–химические характеристики. Оптимальная композиция включала 0,10 мол.% липидированного белка.

DARPin ЛНЧ характеризовались размером около 83 нм и PDI ~0,10. В функциональных экспериментах декорированные DARPin ЛНЧ, содержащие мРНК eGFP, обеспечивали выраженное преимущественное трансфицирование CD8+–лимфоцитов при минимальной трансфекции CD4+–клеток (рисунок 8).

Принципиально важным было сравнение различных способов функционализации ЛНЧ. Анализ экспрессии eGFP в CD4+ и CD8+ клетках показал, что недекорированные ЛНЧ (1,7 ± 0,07), а также ЛНЧ с пассивным декорированием неспецифически трансфицируют обе популяции лимфоцитов. Напротив, целенаправленная конъюгация обоих вариантов анти-CD8 DARPin приводила к резкому увеличению доли eGFP-позитивных событий в целевой популяции CD8+ лимфоцитов, приводили к значительному увеличению показателя селективности до ~90 и одновременно снижала неспецифическую трансфекцию CD4+ лимфоцитов до фонового уровня (рисунок 7B). Блокирование CD8–рецептора приводило примерно к 20–кратному снижению трансфекции, что подтверждало рецептор–зависимый характер адресной доставки.

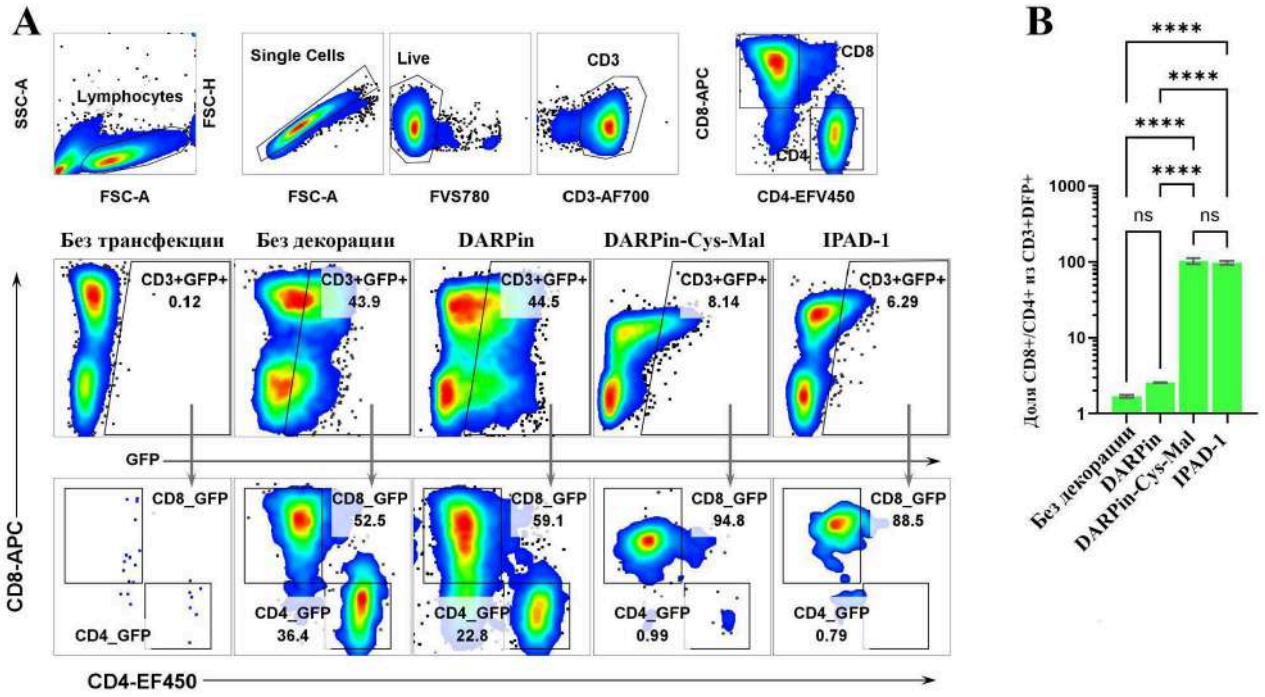


Рисунок 8 – Специфичность ЛНЧ, нацеленного на CD8. **(A)** Стратегия гейтирования и репрезентативные графики, демонстрирующие экспрессию GFP в CD3+ Т–клетках и распределение между CD8+ и CD4+ подгруппами после обработки. **(B)** Соотношение CD8/CD4 среди CD3+/GFP+ лимфоцитов (n=3). Данные представлены как среднее значение ± SD. *p < 0,02, **p<0,005, ns – незначимо. Для обработки использованы односторонний дисперсионный анализ, тест множественного сравнения по Шидаку

Эти наблюдения подчеркивают, что результат трансфекции целевых систем ЛНЧ определяется сложным взаимодействием множества параметров. Выбор ионизируемого липида является критическим фактором, определяющим эффективность доставки, но его недостаточно для обеспечения специфичности к типу клеток. Не менее важен и метод декорирования: пассивная адсорбция целевых белков не обеспечивает селективности, тогда как ковалентная конъюгация с помощью четко определенных химических соединений обеспечивает стехиометрическое, ориентированное отображение лиганда на поверхности ЛНЧ.

3.4 Разработка платформы сайт–специфической функционализации липидных наночастиц на основе Exe4 с pAzF

В качестве второго модельного объекта для функционализации поверхности ЛНЧ был выбран эксендин-4 (Exe4). Для включения pAzF в его аминокислотную последовательность было выбрано 40-е положение, которое оказывает минимальное влияние на конформацию пептида.

С использованием ортогональной системы AzFPylRS был разработан и оптимизирован подход к получению целевого пептида Exe4–pAzF. Для эффективного синтеза была создана конструкция, кодирующая тиоредоксин А (TRX-A) и 6-His-метку на N-конце Exe4. Для последующего эффективного удаления фьюжн–тага между последовательностями Exe4 и TRX-A был клонирован сайт протеолиза энтеропептидазы. Оптимизация производства энтеропептидазы также проводилась в рамках данного исследования.

Функциональная активность полученного варианта Exe4–pAzF оценивалась с использованием стабильной репортерной клеточной линии HEK293T-CREluc-GLP1R-GFP. Относительная активность модифицированного пептида достигала 82,2% от нативного Exe4. Статистически значимых различий между Exe–4 и Exe4–pAzF по активности в отношении GLP-1R не выявлено, что свидетельствует о сохранении функциональных свойств пептида после введения pAzF в 40-е положение.

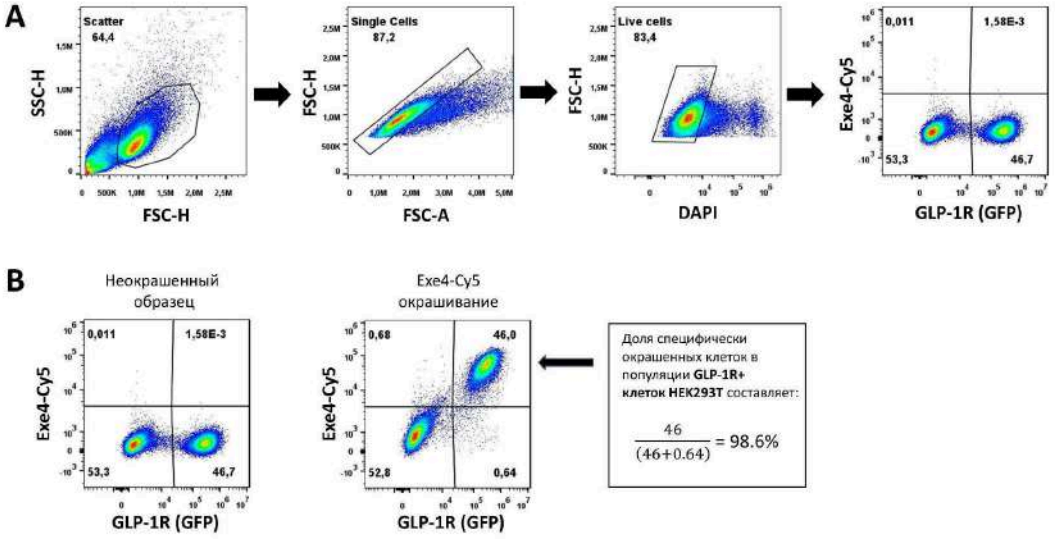


Рисунок 9 – Цитофлуориметрический анализ связывания Exe–4–Cy5 со смешанной культурой HEK293 wt и HEK293 GLP–1R: **(A)** репрезентативная стратегия гейтирования окрашенных клеточных образцов **(B)** распределение клеток, окрашенных конъюгатом при разведении 1:200, по сигналу от GFP (GLP1–R) и сигналу от флуоресцентной метки Cy5

Моделирование реакции SPAAC проводилось с использованием Cy5-DBCO. Показана высокая специфичность полученного конъюгата в отношении клеток, экспрессирующих GLP-1R, при отсутствии существенного неспецифического связывания с клетками HEK wt, не экспрессирующими данный рецептор (рисунок 9).

Для инкапсуляции мРНК–Kate2S использовалась ранее разработанная платформа LNP–5 с добавлением субфталоцианина бора(III) с аксиальной 4–карбоксифенокси–группой (sPcPHBA) в молярном соотношении 1:100 ко всем липидам, входящим в состав частиц. Указанное соединение является флуоресцентным красителем, необходимым для оценки связывания частиц с клетками. Поствставка Exe4 с липидом осуществлялась по ранее разработанному для DARPin протоколу в количестве 0,10 мол.% с последующим диализом против буфера Tris–HCl.

Специфичность таргетирования оценивалась *in vitro* в монокультурах HEK293T wt и HEK293T GLP1R+ GFP+, а также в ко–культуре, где отдельно рассматривались GFP− (wt) и GFP+ (GLP1R+) субпопуляции. Нетрансфицированные клетки служили отрицательным контролем. Через 24 ч после трансфекции методом проточной цитометрии была оценена доля Kate2S+ клеток (%), sPcPHBA+ клеток (%) и средняя интенсивность флуоресценции Kate2S (MFI) среди живых клеток (DAPI−) в соответствии со стратегией гейтирования, приведенной на рисунке 10.

При анализе ко–культуры клеток на окрашивание sPcPHBA, входящим в состав ЛНЧ статистически достоверных различий в MFI sPcPHBA+ клеток между группами обнаружено не было (рисунок 10C). Связывание ЛНЧ с клеточной мембраной, регистрируемое по сигналу sPcPHBA, само по себе не свидетельствует о проникновении частиц в клетку, высвобождении РНК из эндосом и трансляции белка с матрицы РНК. В связи с этим более репрезентативными показателями успешной трансфекции являются доля Kate2S+ клеток и медианная интенсивность флуоресценции (MFI) по белку Kate2S.

В ко–культуре добавление ЛНЧ без декорации обеспечивало 84,5% Kate2S+ клеток с MFI 3475,3 среди дикотипных клеток HEK293T wt (рисунок 10B). Декорирование ЛНЧ–Exe4 привело к небольшому увеличению доли Kate2S+ клеток до 88,8%, при этом MFI (Kate2S) статистически значимо снизилась до 2955. Блокировка GLP–1R снижала MFI до 1961,3 при доле Kate2S+ клеток 85,0% (рисунок 10D).

При анализе GLP–1R+ клеток в составе ко–культуры трансфекция немодифицированными ЛНЧ давала 70,1% Kate2S+ клеток с MFI 1987,3 (рисунок 10B). Использование ЛНЧ–Exe4 приводило к статистически достоверному повышению доли Kate2S+ клеток до 91,7% и выраженному почти пятикратному увеличению MFI до 8432,0. Предварительная блокировка GLP–1R снижала долю Kate2S+ клеток до 48,9% и MFI до 1138,7 (рисунок 10D). Таким образом, в ко–культуре таргетный эффект ЛНЧ–Exe4 был специфичен для GLP1R–экспрессирующих клеток, что подтверждает рецептор–опосредованное усиление трансфекции с использованием декорированных частиц.

На основе полученных данных по таргетной доставке мРНК при помощи ЛНЧ, фунционализированных DARPin и Exe4, можно сделать вывод, что подход, основанный на сайт-специфичном включении pAzF в аминокислотную последовательность целевого белка с последующей биоортогональной конъюгацией на поверхности ЛНЧ, представляет собой универсальную платформенную технологию. Благодаря высокой селективности и мягким условиям реакции азидно-алкинового циклоприсоединения этот метод позволяет осуществлять контролируемую, пространственно направленную функционализацию наноносителей, открывая возможности для гибкого декорирования поверхности наночастиц.

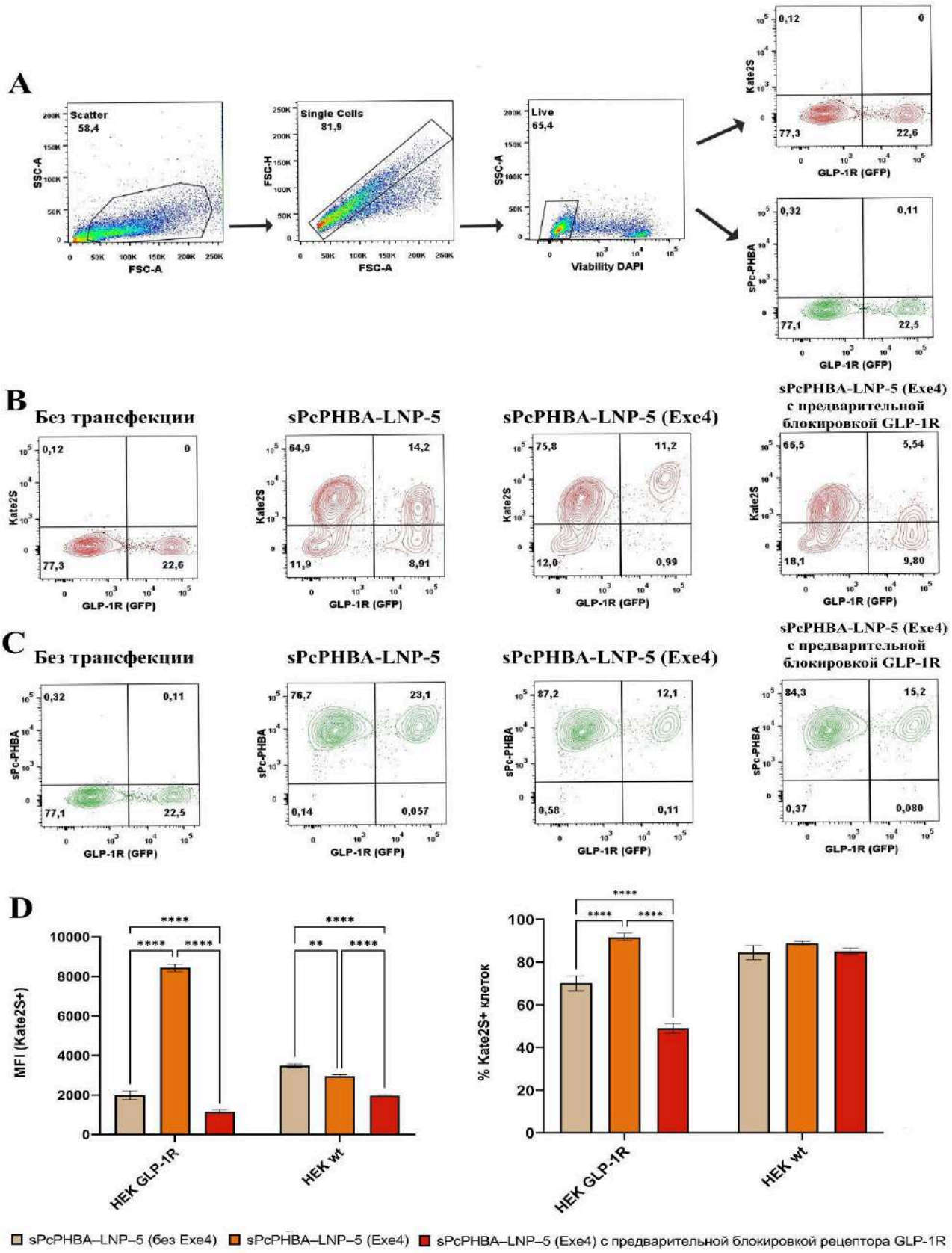


Рисунок 10 – Специфичность ЛНЧ, нацеленных на GLP–1R. **(A)** Стратегия гейтирования и репрезентативные графики, демонстрирующие экспрессию Kate2S **(B)** и окрашивание sPcPHBA **(C)** в ко–культуре клеток HEK wt и HEK GLP–1R(GFP)+ **(D)** MFI и количество Kate2S+ клеток в ко–культуре (n=3). Данные представлены как среднее значение ± SD. **p<0,01, ****p<0,0001. Для обработки использованы односторонний дисперсионный анализ, тест множественного сравнения по Шидаку

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной диссертационной работы была успешно реализована и оптимизирована многоступенчатая схема направленной эволюции пирролизил–аминоацил–тРНК–синтетаз с использованием метода PANCE. Ключевым нововведением стала разработка протокола негативного отбора, в котором селекция в отсутствие НПА проводилась после каждого этапа позитивного отбора, что обеспечивало эффективное подавление неспецифических или «условно активных» вариантов фермента, способных функционировать без целевого субстрата. Этот итеративный подход, основанный на чередовании этапов, направленных на усиление целевой функции и устранение вариантов с субоптимальными свойствами, существенно повышал селективное давление в пользу синтетаз, активность которых действительно зависит от присутствия НПА. Весь процесс контролировался с помощью стандартизированных параметров: оптической плотности культуры, времени культивирования и титра инфекционных вирусных частиц, что обеспечивало воспроизводимый и управляемый отбор вариантов синтетаз с улучшенными каталитическими свойствами и строгой субстратной специфичностью. В результате были получены варианты PylRS, адаптированные к четырем ароматическим НПА: O–метил–L–тирозину (oMeY), 4–азидо–L–фенилаланину (pAzF), O–аллил–L–тирозину (oAllylY) и 2–хлор–L–фенилаланину (2–ClF).

Полученные варианты фермента – AllYPylRS, MethYPylRS, AzFPylRS и 2ClFPylRS – характеризуются повышенной активностью включения соответствующих НПА по сравнению с исходными вариантами, не проходившими эволюцию. Масс–спектрометрический анализ подтвердил образование полноразмерного sfGFP с соответствующей НПА в заданной позиции. Для исследованных вариантов синтетаз доля белка, содержащего целевую НПА, превышала 89% среди идентифицированных продуктов. Эти результаты подтверждают высокую активность разработанных систем расширения генетического кода и демонстрируют возможность использования модифицированных PylRS для получения белков с НПА.

Одновременно было установлено, что повышение активности PylRS не всегда сопровождается ростом его субстратной специфичности. Анализ перекрестной реактивности показал, что некоторые эволюционировавшие варианты сохраняют значительную активность в отношении структурно родственных НПА. В частности, AzFPylRS сохраняла высокую активность как в отношении своего основного субстрата pAzF (35,2%), так и других НПА: oMeY (29,5%), oAllylY (27%) и 2–ClF (26,2%), а MethYPylRS – в отношении oMeY и pAzF на уровне 34,7 и 30,7% соответственно. Полученные результаты показывают, что активность и субстратная специфичность PylRS могут изменяться независимо друг от друга, что необходимо учитывать при создании синтетаз с заданными свойствами.

Новизна данного исследования заключается в оптимизации методологии, позволяющей получать новые оригинальные варианты синтетаз с улучшенными свойствами. Анализ последовательностей выявил аминокислотные замены в различных функциональных областях PylRS, включая карман связывания аминокислоты, N– и C–концевые домены фермента. Полученные данные указывают на то, что повышение активности PylRS к выбранным НПА может быть связано не только с изменениями непосредственно в области кармана связывания аминокислоты, но и с перестройкой взаимодействий между отдельными участками фермента и тРНК. Такие изменения могут свидетельствовать о зависимости селективного преимущества

отдельных замен от генетического фона и указывать на возможное наличие эпистатических взаимодействий между ними. Сравнение независимых эволюционных траекторий выявило сочетание конвергентных и субстрат–специфичных изменений. Повторное появление отдельных замен может свидетельствовать о существовании общих адаптивных решений, повышающих функциональную активность PylRS в отношении ароматических НПА, тогда как различия в составе и динамике других замен между вариантами, специфичными к oAllylY, oMeY, pAzF и 2–ClF, указывают на последующую адаптацию фермента к структурным особенностям конкретного субстрата. Результаты эволюции и скрининга APC показывают, что взаимодействие между НПА и ферментом может усиливаться множественными аминокислотными заменами, которые формируют и тонко настраивают селективность и активность. Это открывает новые возможности для углубленного изучения PylRS и создает основу для исследования других субстратов.

Особый интерес представляет аминокислотная замена Met300Thr, которая независимо возникала в нескольких эволюционных линиях. Ее раннее появление и высокая частота на первых этапах эволюции позволяют предположить, что данная замена может обеспечивать общее преимущество при адаптации PylRS к ароматическим НПА. Вместе с тем отсутствие полной фиксации Met300Thr на поздних этапах эволюции указывает на то, что она, вероятно, не является единственным определяющим фактором повышения активности и может представлять собой одну из ранних адаптивных замен, после которой происходит дальнейшая оптимизация фермента за счет дополнительных изменений. Данные функционального тестирования напрямую подтверждают выводы, полученные на основе анализа динамики накопившихся замен и 3D–моделирования. Аминокислотная замена Met300Thr не повышает сродство к одной конкретной НПА, а приводит к общему существенному повышению активности синтетазы в отношении производных фенилаланина и тирозина, использованных в данном исследовании. Введение данной аминокислотной замены увеличивает сродство PylRS к выбранным НПА, тогда как остальные замены, вероятно, в большей степени определяют субстратную специфичность фермента.

Практическая значимость полученных результатов особенно очевидна для pAzF–содержащих белков, поскольку азидогруппа предоставляет возможность последующей биоортогональной модификации белка. Возможность такого применения была продемонстрирована на примере двух белков: Exe4 и DARPin mCD8. Полученные белки с pAzF в составе сохраняли способность взаимодействовать с соответствующими рецепторами и могли быть сайт–специфически модифицированы посредством безмедной клик–химической реакции SPAAC с DBCO–содержащими соединениями.

Модифицированные DARPin и Exe4 использовались для функционализации липидных наночастиц. Белки с азидогруппой предварительно конъюгировали с DSPE–PEG–DBCO посредством SPAAC, после чего полученный белок–липидный конъюгат вводили в предварительно сформированные ЛНЧ методом поствставки. Показано, что добавление конъюгата белка с липидом в концентрации 0,10 мол.% от общего содержания липидов с последующим диализом против буфера 25 мМ Tris pH 7,5, позволяет эффективно модифицировать поверхность наночастиц без существенного нарушения их физико–химических характеристик.

Функциональные исследования показали, что полученные DARPin–ЛНЧ обеспечивали эффективное и селективное таргетирование CD8 положительных клеток. По сравнению с немодифицированными частицами и системами с пассивной адсорбцией белка ковалентно модифицированные DARPin–ЛНЧ демонстрировали повышенный уровень трансфекции CD8+ клеток при минимальном воздействии на клетки, не экспрессирующие CD8. Блокирование

CD8–рецептора существенно снижало эффективность трансфекции, что подтверждает рецептор–зависимый механизм таргетирования.

Декорирование липидных наночастиц Exe4 также обеспечивает рецептор–опосредованное повышение эффективности трансфекции клеток, экспрессирующих GLP–1R. Усиление экспрессии репортерного белка Kate2S, проявляющееся увеличением доли Kate2S–положительных клеток и интенсивности флуоресценции, существенно снижается при предварительном блокировании GLP–1R. Полученные результаты подтверждают потенциал эксендин–4–модифицированных липидных наночастиц для таргетной доставки РНК в GLP–1R–положительные клетки. Таким образом, было показано, что подход, основанный на сайт–специфическом включении pAzF в аминокислотную последовательность целевого белка с его последующей биоортогональной конъюгацией на поверхности ЛНЧ, представляет собой универсальную платформенную технологию.

Совокупность полученных в настоящей работе результатов подтверждает перспективность разработанных систем PylRS не только как инструментов для сайт–специфического введения НПА, но и как основы для последующего создания функционально модифицированных белков и нанобиотехнологических платформ. Выявленные аминокислотные замены и особенности их эволюционной динамики могут быть использованы для рационального проектирования PylRS с заданными характеристиками активности и субстратной специфичности, а разработанный подход PANCE – для получения синтетаз, способных эффективно распознавать и включать другие НПА. Перспективными направлениями дальнейшей работы являются повышение субстратной специфичности полученных PylRS, количественная оценка механизмов действия выявленных замен, а также применение разработанных систем для создания адресной доставки биомолекул.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизирован протокол направленной эволюции пирролизиновых аминоацил–тРНК–синтетаз (PylRS) на основе фаг–ассоциированной эволюции PANCE, включающий этап отрицательной селекции после каждого раунда положительного отбора и контроль её эффективности в присутствии и отсутствии неприродных аминокислот (НПА), что позволяет получать высокоактивные варианты PylRS при одновременном снижении фонового неспецифического аминоацилирования.
2. Получены варианты PylRS, адаптированные к включению O–метил–L–тирозина (oMeY), O–аллил–L–тирозина (oAllylY), 4–азидо–L–фенилаланина (pAzF) и 2–хлор–L–фенилаланина (2–ClF) в белки, причем доля полноразмерного sfGFP с целевой НПА превышает 89% среди идентифицированных полноразмерных продуктов по данным масс–спектрометрического анализа.
3. Обнаруженные аминокислотные замены в последовательности синтетаз, ранее не рассматривавшиеся в качестве мишеней для рационального проектирования, затрагивают не только карман связывания субстрата, но и перестраивают взаимодействия между отдельными участками фермента и тРНК, что указывает на сложный эпистатический характер формирования активности и специфичности к новому субстрату.
4. Показано, что конвергентно возникшая аминокислотная замена Met300Thr в каталитическом домене MmPylRS повышает активность синтетазы в отношении производных тирозина и фенилаланина. В совокупности с анализом эволюционных

траекторий и результатами структурного моделирования это указывает на роль Met300Thr в общей адаптации MmPylRS к ароматическим НПА, тогда как дополнительные замены могут вносить вклад в настройку субстратной специфичности.

5. Сайт–специфическое включение 4–азидо–L–фенилаланина в Exe4 и DARPin mCD8 обеспечивает возможность их биоортогональной конъюгации с DBCO–содержащими соединениями посредством реакции SPAAC без изменения их специфичности по отношению к соответствующему рецептору.
6. Разработанный метод поствставки белок–липидных конъюгатов Exe4 и DARPin mCD8 в предварительно сформированные липидные наночастицы (ЛНЧ) в концентрации 0,10 мол.% от общего содержания липидов с последующим диализом против буфера 25 мМ Tris, pH 7,5, обеспечивает ковалентную функционализацию поверхности ЛНЧ при сохранении их физико–химических характеристик.
7. Функционализация ЛНЧ конъюгатами Exe4 и DARPin mCD8 повышает эффективность трансфекции GLP–1R– и CD8–положительных клеток. Снижение эффективности трансфекции при блокировании соответствующих рецепторов подтверждает рецептор–опосредованное повышение эффективности трансфекции целевой популяции клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По теме научного исследования было опубликовано 3 научных работы в журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ:

1. **Dakhnevich A,** Kazakova A, Iliushin D, Ivanov RA. Pyrrolysine Aminoacyl–tRNA Synthetase as a Tool for Expanding the Genetic Code. Int J Mol Sci. 2025 Jan 10;26(2):539. doi: 10.3390/ijms26020539. PMID: 39859254; PMCID: PMC11764691.
2. **Dakhnevich A**, Miasoutova S, Iliushin D, Rozanov A, Ivanov R. Expanding the genetic code: phage–driven evolution of pyrrolysyl–synthetase for site–specific incorporation of synthetic phenylalanine and tyrosine derivatives. Front Mol Biosci. 2026 Mar 17;13:1737987. doi: 10.3389/fmolb.2026.1737987. PMID: 41924351; PMCID: PMC13035772.
3. **Dakhnevich, A.**; Pateev, I.; Skvortsov, I.A.; Yarmachkova, S.; Shevyrev, D.; Chubarova, A.; Gasina, M.; Cherepanova, N.; Siaglova, E.D.; Reshetnikov, V.; et al. Genetic Code Expansion Enables Oriented, Site–Specific Conjugation of DARPins to Lipid Nanoparticles for Selective mRNA Delivery to CD8+ T Cells. Int. J. Mol. Sci. 2026, 27, 7755. https://doi.org/10.3390/ijms27177755