

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-86

**ИНВЕРТИРОВАННЫЕ КОНЦЕВЫЕ ПОВТОРЫ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА
ДЕМОНСТРИРУЮТ ПРОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ
В ГАМКЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ *IN VITRO****

**INVERTED TERMINAL REPEATS OF THE ADENO-ASSOCIATED VIRUS DEMONSTRATE
PROMOTER ACTIVITY IN GABAERGIC NEURONS *IN VITRO***

Е. А. Лунев¹⁻³, Е. А. Воловиков⁴, С. В. Попов⁵, Т. В. Егорова^{1,2}, М. В. Бардина¹⁻³

¹Институт биологии гена РАН, Москва

²ООО «Марлин Биотех», Сочи

³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва

⁴Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю. М. Лопухина, Москва

⁵Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Минздрава России, Москва

Е. А. Lunev¹⁻³, Е. А. Volovikov⁴, S. V. Popov⁵, T. V. Egorova^{1,2}, M. V. Bardina¹⁻³

¹Institute of Gene Biology RAS, Moscow

²Marlin Biotech, LLC, Sochi

³Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Moscow

⁴Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, FMBA of Russia, Moscow

⁵Endocrinology Research Center, Moscow

✉ e.lunev.marlin@gmail.com

Аннотация

Используя подход высокопроизводительного РНК-секвенирования, мы обнаружили промоторную активность ITR второго серотипа ААВ в трансдуцированных ГАМКергических нейронах, полученных из ИПСК.

Abstract

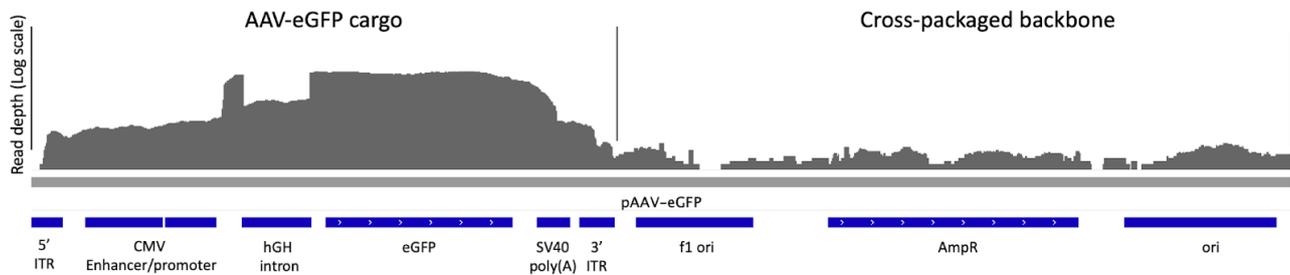
We detected the ITR promoter activity of the AAV2 in transduced iPSCs-derived GABAergic neurons by RNAseq analysis.

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (рААВ) являются перспективным вектором для генной терапии благодаря своей безопасности и свойству эффективно доставлять генетический материал в клетки-мишени. Геном ААВ фланкирован инвертированными концевыми повторами (ITR), которые участвуют в репликации и упаковке вирусного генома. Известно, что эти последовательности также способны проявлять промоторную активность [1]. Недавние исследования на приматах показали, что неспецифическая транскрипция под контролем ITR в нейронах мозжечка способна приводить к неврологическим нарушениям [2]. Экспрессия с последовательностей ITR в различных тканях и типах клеток мало изучена и может зависеть от дизайна рекомбинантного вектора. Целью нашего исследования являлось тестирование промоторной активности ITR второго серотипа ААВ в ГАМКергических нейронах *in vitro*. Геном рААВ состоял из CMV промотора с одноименным энхансером, hGH интрона, гена *GFP* и сигнала полиаденилирования SV40 и был фланкирован ITR второго серотипа ААВ. Для трансдукции клеток геном рААВ был упакован в вирусные капсиды серотипа DJ. ГАМКергические нейроны, полученные направленной дифференцировкой из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, заражали в количестве 2×10^{12} геномных копий на лунку 12-луночного планшета. Экспрессию маркера ГАМКергических нейронов *GAD67* подтверждали с помощью кПЦР, эффективность трансдукции контролировали за счет экспрессии репортерного гена *GFP*. В результате РНК-секвенирования обогащенной полиаденилированными транскриптами библиотеки было получено более 200 000 000 прочтений на образец. Прочтения выравнивали на референсный транскриптом GRCh38 (Ensembl), дополненный последовательностью целевой плазмиды, используемой при производстве рААВ. Как и ожидалось, наибольшее количество прочтений было картировано на область *GFP*, поскольку экспрессия этого гена находилась под контролем сильного CMV промотора (см. рисунок). Однако значительное количество прочтений также картировалось на регионы генома рААВ, примыкающие

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 23-25-00323).

© Е. А. Лунев, Е. А. Воловиков, С. В. Попов, Т. В. Егорова, М. В. Бардина, 2024

к ITR. Кроме того, часть прочтений выравнивалась на кросс-упакованный плазмидный остов, содержащий ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации плазмидного вектора. Полученные нами результаты подтверждают промоторную активность ITR второго серотипа AAV в ГАМКергических нейронах и подчеркивают важность учета этого эффекта в нейробиологических исследованиях. В свою очередь, модификации рекомбинантного AAV-вектора, направленные на снижение промоторной активности ITR, позволят повысить безопасность генотерапевтического препарата.



Пример покрытия последовательности провирусного вектора pAAV-eGFP прочтениями, полученными по результатам РНК-секвенирования трансдуцированных ГАМКергических нейронов

Литература

1. Earley L. F., Conatser L. M., Lue V. M. et al. Adeno-Associated Virus Serotype-Specific Inverted Terminal Repeat Sequence Role in Vector Transgene Expression // *Human Gene Therapy*. 2020. Vol. 31, No. 3-4. P. 151-162.
2. Keiser M. S., Ranum P. T., Yrigollen C. M. et al. Toxicity after AAV delivery of RNAi expression constructs into nonhuman primate brain // *Nat. Med.* 2021. Vol. 27, No. 11. P. 1982-1989.