

Poster P.16.115

INTEIN-MEDIATED PROTEIN TRANS-SPLICING EXPANDS ADENO-ASSOCIATED VIRUS TRANSFER CAPACITY IN THE RETINA

Tornabene P.*^[1], Trapani I.^[1], Minopoli R.^[2], Centrulo M.^[2], Lupo M.^[2], De Simone S.^[2], Tiberi P.^[2], Dell'Aquila F.^[2], Marrocco E.^[2], Iodice C.^[2], Iuliano A.^[2], Gesualdo C.^[3], Rossi S.^[3], Giaquinto L.^[2], Albert S.^[4], Hoyng C.^[5], Polishchuk E.^[2], Cremers F.^[4], Surace E.^[2], Simonelli F.^[3], De Matteis A.^[2], Polishchuk R.^[2], Auricchio A.^[6]

^[1]Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli ~ Medical Genetics, Department of Translational medicine, Federico II University, Naples ~ Italy, ^[2]Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli ~ Italy, ^[3]Eye Clinic, Multidisciplinary Department of Medical, Surgical and Dental Sciences, "Federico II" University ~ Naples ~ Italy, ^[4]Department of Human Genetics and Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Center ~ Nijmegen ~ Netherlands, ^[5]Department of Ophthalmology and Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Center ~ Nijmegen ~ Netherlands, ^[6]Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli ~ Department of Advanced Biomedicine, Federico II University, Naples ~ Italy

Retinal gene therapy with AAV vectors is safe and effective, yet it is limited by AAV cargo capacity of about 5 kb. To overcome this limitation we explored the use of intein-mediated protein trans-splicing to reconstitute large proteins in the retina. Inteins work as independent peptides fused to the C- and N-termini of two host proteins (i.e. the two halves of a large protein) and mediate their association in a multistep autocatalytic process.

To test protein trans-splicing in the retina, we generated two AAV vectors separately encoding each of the two halves of either the reporter EGFP protein or large therapeutic proteins flanked by split-inteins. These include ABCA4 and CEP290, respectively defective in Stargardt disease (STGD1) and Leber congenital amaurosis 10 (LCA10), two severe and common inherited blinding diseases. We identified in each protein optimal splitting points for the generation of AAV-intein constructs which take into account both amino acid residue requirements for trans-splicing to occur, as well as the preservation of the native protein domains.

Upon co-administration of both AAV split-intein vectors, full-length proteins were reconstituted in the mouse and pig retina as well as in human retinal organoids derived from induced pluripotent stem cells. Importantly, the levels of large protein reconstitution achieved reduced lipofuscin accumulation and retinal degeneration in the mouse models of STGD1 and LCA10, respectively.

Our data support the use of intein-mediated protein trans-splicing in combination with AAV subretinal delivery for gene therapy of inherited blindness due to mutations in large genes.

Il trans-splicing proteico mediato dalle inteine espande la capacità di trasferimento del virus adeno-associato nella retina.

La terapia genica retinica con vettori adeno-associati (AAV) è sicura ed efficace, tuttavia è limitata da una capacità di carico dei vettori AAV di circa 5 kb. Per superare questa limitazione abbiamo esplorato l'uso di un meccanismo di ricostituzione proteico mediato dalle inteine per ricomporre nella retina, proteine di grandi dimensioni. Le inteine funzionano come peptidi indipendenti fusi alle estremità C e N di due proteine ospiti (cioè le due metà di una grande proteina) e mediano la loro associazione in un processo autocatalitico a più fasi.

Per testare il trans-splicing delle proteine nella retina abbiamo generato due vettori AAV che codificano separatamente ciascuna delle due metà della proteina reporter EGFP o di grandi proteine terapeutiche affiancate da una metà inteina. Queste proteine sono ABCA4 e CEP290, rispettivamente

mutati nella malattia di Stargardt (STGD1) e amaurosi congenita di Leber di tipo 10 (LCA10), due gravi e comuni malattie ereditarie che inducono cecità. In ogni proteina abbiamo identificato i punti di rottura ottimali per la generazione dei costrutti AAV-intein che tengono conto sia dei requisiti dei residui amminoacidici necessari per il trans-splicing, sia della conservazione dei domini delle proteine native.

A seguito della co-somministrazione di entrambi i vettori AAV split-intein, le proteine a lunghezza intera sono state ricostituite nella retina di topo, maiale e negli organoidi retinici umani derivati da cellule staminali pluripotenti indotte. È importante sottolineare che i livelli della proteina ricostituita sono sufficienti a ridurre l'accumulo di lipofusina e la degenerazione della retina rispettivamente nei modelli murini di STGD1 e LCA10.

I nostri dati supportano l'uso del meccanismo di ricostituzione delle proteine mediata dalle inteine in combinazione con la somministrazione subretinica dei vettori AAV per la terapia genica della cecità ereditaria dovuta a mutazioni in geni di grandi dimensioni.

None

Sindrome di Stargardt, Amaurosi congenita di Leber di tipo 10

Coordinator: Alberto Auricchio

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

Telethon Project (nr):

TIGEM

Disease Name:

Stargardt Disease, Leber Congenital Amaurosis 10

Keywords:

Inherited retinal disease, AAV intein, Gene therapy