

ТРАНСДУКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО
ВИРУСНОГО ВЕКТОРА ГИППОКАМПА МЛЕКОПИТАЮЩИХ
В КЛЕТКИ МОЗЖЕЧКА МОЛОДИ КЕТЫ *ONCORHYNCHUS KETA*

© 2020 г. М. Е. Стуканёва^{1, *}, Е. В. Пушина^{1, 2}, А. А. Варакин¹

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского, ДВО РАН,
г. Владивосток, Россия

²Институт физиологии им. А. Богомольца, Национальной Академии Наук Украины,
Киев, Украина

*E-mail: stykanyova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.2020 г.

После доработки 09.06.2020 г.

Принята к публикации 05.07.2020 г.

Целью данной работы было исследование возможности трансдукции рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора гиппокампа млекопитающих (гAAV) в клетки мозжечка годовалой молоди кеты (*Oncorhynchus keta*) через месяц после интрапаренхиматозной инъекции. Введение 0.2 мкл гAAV в дорсальную область тела мозжечка молоди кеты сопровождалось мониторингом состояния рыб и последующим исследованием мозжечка с помощью флуоресцентной микроскопии. Полученные нами результаты демонстрируют, что гAAV способен эффективно инфицировать клетки мозжечка молоди кеты. Средний размер трансдуцированных клеток составлял 5 и 7 мкм. При трансдукции гAAV в структуры мозжечка было установлено, что наибольшая концентрация клеток характерна для центральной части инъекции и по мере удаления от нее диффузно снижается. На периферии инъекции находится большое число GFP-позитивных гранул, что свидетельствует о начале деградации клеток в ходе иммунного ответа. Результаты исследования демонстрируют, что гAAV способен трансдуцировать субпопуляции клеток, удаленные от зоны инъекции, это предполагает его распространение с помощью диффузии, а также внутриклеточного транспорта.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирус, *Oncorhynchus keta*, мозжечок, антероградный транспорт, костистая рыба, трансдукция

DOI: 10.31857/S0869813920100118

Встраивание нового гена для восстановления дикого типа (добавление гена), коррекция измененного генома (редактирование гена) и ингибирование/инактивация мутантного гена является одним из перспективных методов при лечении заболеваний ЦНС [1, 2]. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV) рассматривается как перспективный вектор в генной терапии человека [3]. Он способен инфицировать постмитотические клетки, обеспечивая простую и безопасную доставку генов в ЦНС [4, 5]. гAAV – непатогенный вирус с одноцепочечной ДНК, лишенный оболочки, который не может осуществлять автономную репликацию или завершение своего жизненного цикла без аденовируса [6, 7]. гAAV трансдуцирует клетки, преодолев три физиологических барьера: плазматическую мембрану, эндосомальную мембрану и ядерную оболочку [8]. Вирусные частицы попадают в

ядро в течение 20 ч, накапливаясь преимущественно в перинуклеарном компартменте [9]. Было показано, что гAAV осуществляют эффективную и стабильную клеточную трансдукцию без возникновения немедленного иммунного ответа или индукции цитотоксичности [10, 11]. Поскольку они считаются непатогенными, это снизило требования к уровню биобезопасности при работе с гAAV по сравнению с другими популярными вирусными векторными системами [12].

Помимо разработки терапевтических методов, вирусы бешенства, простого герпеса, лентивирусы и гAAV успешно используются нейробиологами при визуализации нервных цепей *in vivo* [10, 13]. Длительная трансдукция гAAV может наблюдаться через месяцы и годы после первичной инъекции в ЦНС [14, 15]. У приматов экспрессия генов в постмитотических клетках сохранялась более 6 лет [16]. Нативная флуоресценция при инъекции гAAV не требует обязательного дополнительного гистохимического окрашивания и позволяет получить статичное или динамическое изображение из зоны инъекции [17, 18]. Другое преимущество гAAV-опосредованной экспрессии флуоресцентного белка заключается в том, что инфицированные клеточные тела полностью маркируются. Это позволяет точно определить место инъекции и проанализировать, какие типы нейронов имеют проекции аксонов [14]. гAAV могут инфицировать постмитотические клетки, такие как нейроны, что ускорило развитие новых методов манипуляции и реконструкции нервных цепей *in vivo* [10, 13]. В дальнейшем использование гAAV может расширить наши знания о картировании путей нейронов в интактной и поврежденной ЦНС млекопитающих [19].

В настоящее время активно исследуется трансдукция гAAV в клетки мозга млекопитающих и самым распространенным модельным объектом является мышь (*Mus musculus*) [20]. Но, как было показано при оценке токсичности, даже такой классический объект исследований имеет некоторые отличия от метаболизма человека [20]. Костистые рыбы используются в качестве модельных животных *in vivo* в различных областях молекулярной генетики, таких как биология развития [21] и нейробиология [22, 23]. Введение аденовирусных векторов в их мозг способствует генетическому анализу функций нервных клеток и нейронов в составе отдельных нервных цепей [24]. Несмотря на столь перспективное направление, на сегодняшний день существует не так много исследований, демонстрирующих, что человеческий гAAV может инфицировать нервные клетки в мозге костистых рыб [24]. Таким образом, молодая кета может рассматриваться в качестве модельного объекта для оценки свойств аденовирусных векторов в доклинических исследованиях.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проводили на 10 годовалых особях молоди кеты с длиной тела 11–12.5 см и массой 25–35 г. Животные были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода в 2019 г. Все экспериментальные манипуляции были проведены в соответствии с правилами, регулируемые уставом Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН и Этической комиссией, регламентирующей гуманное обращение с экспериментальными животными. Кету содержали в аквариуме с аэрируемой морской водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением за сутки. Соотношение освещенного и темного периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде составляло 7–10 мг/дм³, что соответствует нормальному насыщению. Для выявления трансдукции клеток использовали гAAV, который кодирует ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). В большинстве клинических исследований ЦНС векторы гAAV вводят путем интрапаренхиматозной инъекции [25, 26]. Мы осуществляли введение гAAV при долговременной экспозиции в течение месяца путем интрапаренхиматозной инъекции в дорсаль-

ную область тела мозжечка. Животные были разделены на две группы. Рыбам в контрольной группе ($n = 5$) был введен в мозжечок 0.2 мкл раствора 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.2), экспериментальной группе вводили 0.2 мкл гAAV ($n = 5$). Во всех контрольных экспериментах GFP-позитивная реакция отсутствовала.

Сразу после инъекции животных выпускали в аквариум с морской водой для их восстановления и дальнейшего мониторинга. После инъекции двигательная активность рыб существенно повышалась: они выпрыгивали из воды и совершали вращательные движения. Далее рыбы были анестезированы в растворе трикаин метансульфоната MS-222 (Sigma-Aldrich, США) в течение 10–15 мин при комнатной температуре. Животные выводились из эксперимента и подвергались эвтаназии методом быстрой декапитации. После анестезии внутрочерепную полость обездвиженного животного префиксировали с помощью шприца 4%-ным раствором параформальдегида, приготовленным на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2). После префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в 4%-ом растворе параформальдегида в течение двух часов при 4°C. Затем в течение двух суток выдерживали в 30%-ном растворе сахарозы при 4°C (с семикратной сменой раствора). Серийные фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм изготавливали на замораживающем микротоме Cryo-star HM 560 MB (Carl Zeiss, Германия). Для исследования каждый третий фронтальный срез мозжечка помещали на предметное стекло и заключали в глицерин.

Визуализация экспрессии GFP была проведена на микроскопе Axiovert 200-M (Carl Zeiss, Германия) в режиме флуоресц. с использованием зеленого светофильтра (488 нм). Измерения проводили в 5 случайно выбранных микроскопических полях для каждой области исследования. Микрофотографии препаратов получали с помощью цифровой камеры Axiovert 200. Обработку полученных данных проводили с использованием программы AxioVision и в графическом редакторе Corel Photo-Paint 12. Количественную обработку полученных результатов выполняли с использованием программных пакетов Statistica 12 и Microsoft Excel 2010. Все данные представлены в виде: среднее \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

GFP полностью заполняет тела инфицированных гAAV клеток [19] и, демонстрируя интенсивную флуоресценцию, позволяет точно определить область инъекции. В мозжечке молодежи контрольной группы экспрессия GFP не была выявлена (рис. 1A).

Результаты проведенного исследования показывают, что гAAV векторы способны опосредовать эффективную трансдукцию клеток в мозжечке при интрапаренхиматозной инъекции. Подавляющее большинство GFP+ клеток во всех зонах мозжечка имели размер 4–5 мкм (табл. 1). Встречались единичные крупные GFP+ клетки, размером 7 мкм (табл. 1).

Через месяц после введения гAAV в дорсальную область тела мозжечка в месте инъекции было выявлено максимальное число GFP+ клеток (рис. 1C, 1D). Площадь их распределения составляла 53.5 ± 4.7 мкм² в ростральной части и 25.3 ± 2.3 мкм² в каудальной части мозжечка (рис. 2A).

Трансдуцированные клетки формировали крупное скопление с равномерным распределением по всей области инъекции, как в молекулярном, так и в гранулярном слоях, что свидетельствует об обширном повреждении тканей.

С помощью фазового контраста было показано, что область инъекции содержит темные включения, которые, очевидно, соответствуют GFP+ клеткам (рис. 1C). При трансдукции гAAV в структуры мозжечка наибольшая концентрация клеток наблюдалась в центральной части инъекции и по мере удаления от нее диффузно

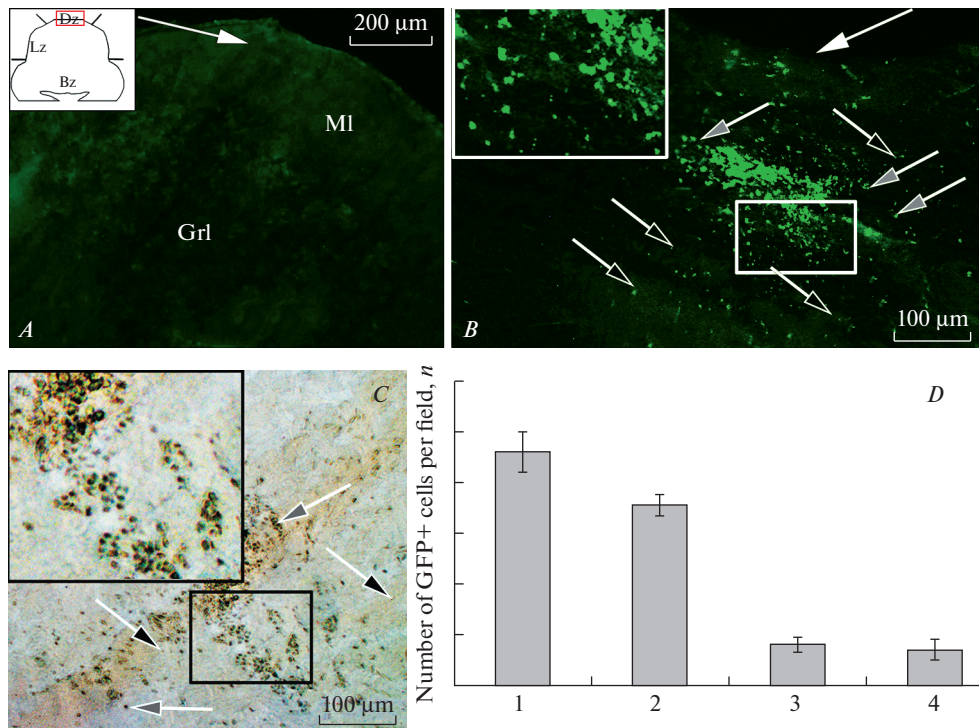


Рис. 1. Распределение зеленого флуоресцентного белка (GFP) в мозжечке молодежи кеты. *A* – общий вид контрольного среза при введении фосфатного буфера; *B* – область инъекции через месяц после введения rAAV, флуоресценция. Белой стрелкой обозначено место инъекции rAAV, серыми стрелками обозначены GFP+ клетки, черными – GFP+ гранулы; *C* – микрофотография области введения rAAV в режиме фазового контраста, серыми стрелками обозначены GFP+ клетки, черными – GFP+ гранулы; *D* – соотношение GFP+ клеток после введения rAAV, 1 – инъекция в ростральную часть мозжечка, 2 – инъекция в каудальную часть, 3 – латеральная зона, 4 – базальная зона. MI – молекулярный слой, Grl – гранулярный слой, Dz – дорсальная зона, Lz – латеральная зона, Bz – базальная зона.

Fig. 1. Distribution of green fluorescent protein (GFP) in the cerebellum of juvenile *O. keta*. *A* – general view of a control slice with the introduction of phosphate buffer; *B* – injection area one month after the introduction of rAAV, fluorescence. The white arrow indicates the injection site of rAAV, the gray arrows indicate GFP+ cells, the black arrows indicate GFP+ granules; *C* – microphotography of the rAAV injection area in the phase contrast mode, gray arrows indicate GFP+ cells, black arrows indicate GFP+ granules; *D* – ratio of GFP+ cells after rAAV administration, 1 – injection in the rostral part of cerebellum, 2 – injection in the caudal part of cerebellum, 3 – lateral zone, 4 – basal zone. MI – molecular layer, Grl – granular layer, Dz – dorsal zone, Lz – lateral zone, Bz – basal zone.

снижалась. Помимо GFP+ клеток на периферии области инъекции были расположены менее интенсивно маркированные GFP+ гранулы. Их размеры приведены в таблице. Максимальное число GFP+ клеток находилось в ростральной части и постепенно снижалось в каудальной части мозжечка. В ростральной и каудальной частях мозжечка число гранул было сходным (рис. 2*B*). Наши результаты демонстрируют, что rAAV не распространяется равномерно по всему мозжечку, но встраивается в области, удаленные от зоны инъекции. Так, в небольшом количестве были выявлены отдельные GFP+ клетки в молекулярном слое латеральной и базальной зон. Доля GFP+ клеток составляла не более 7.5%.

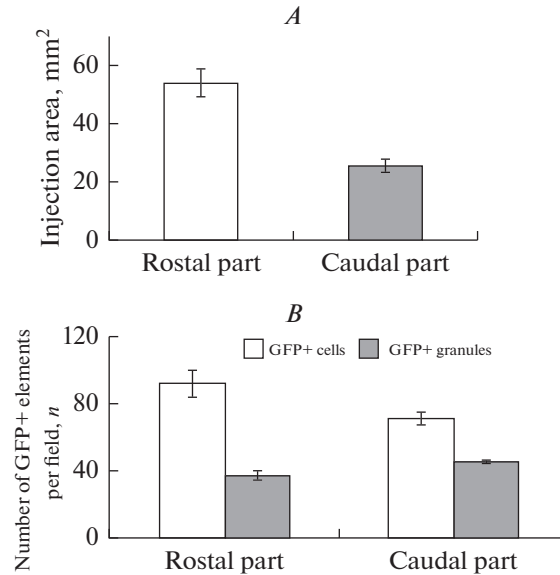


Рис. 2. *A* – Распределение GFP+ клеток, показана площадь инъекции (мм²) через месяц после введения rAAV; *B* – соотношение распределения GFP+ клеток и GFP+ гранул. Белые столбцы обозначают роstralную часть, серые столбцы – каудальную ($n = 5$ в каждой группе).

Fig. 2. *A* – Distribution of GFP+ cells, shows the injection area (mm²) one month after the introduction of rAAV; *B* – the ratio of the distribution of GFP+ cells and GFP+ granules. White columns indicate the rostral part, gray columns indicate the caudal part ($n = 5$ in each group).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При планировании эксперимента с введением вектора необходимо, чтобы прошло достаточно времени для достижения видимой экспрессии генов. Было показано, что две недели после инъекции в мозг мыши – достаточный срок для трансдукции нейронов, определяемой по интенсивной флюоресценции их тел и выявлению аксонов [19]. При удалении от зоны инъекции было установлено большое число гранул, что может свидетельствовать о начале деградации клеток в ходе иммунного

Таблица 1. Морфометрические параметры* клеток ($M \pm SD$) мозжечка молодежи кеты *O. keta* через месяц после введения rAAV

Table 1. Morphometric parameters* of cells ($M \pm SD$) of the cerebellum of juvenile chum *O. keta* one month after the introduction of rAAV

	Область инъекции Injection area	Дорсальная зона Dorsal zone	Латеральная зона Lateral zone	Базальная зона Basal area
Клетки молекулярного слоя Molecular layer cells	5 ± 0.5/4.3 ± 0.4 8.2 ± 0.9/7.1 ± 0.5	5.1 ± 0.4/4.4 ± 0.6 8 ± 0.5/6.4 ± 0.5	5.3 ± 0.3/4.8 ± 0.5 7.6 ± 0.6/6.2 ± 0.3	5.1 ± 0.1/5 ± 0.1 7.5 ± 0.5/6.7 ± 0.5
Клетки гранулярного слоя Granular layer cells	5.1 ± 0.3/4.3 ± 0.2	–	–	–
Гранулы Granules	2 ± 0.1/2.1 ± 0.1	–	–	–

* – большой и малый диаметр клеток. Размеры клеток приведены как средние значения их большого и малого диаметров, указанные через косую черту.

* – large and small diameter of cells. Cell sizes are given as average values of their large and small diameters, indicated through a slash.

ответа. С другой стороны, такой паттерн распределения вирусных частиц может свидетельствовать о диффузном способе их распространения. После вирусной трансдукции и начала экспрессии трансгена, иммунный ответ может привести к очистке трансдуцированных клеток с последующей потерей экспрессии генов и развитием воспаления в ЦНС [3]. При введении серотипа AAV-9 или GFP в стриатум или таламус крысы развивался полный адаптивный иммунный ответ. Усиливалась регуляция МНС II в глии, а также лимфоцитарная инфильтрация и воспаление, что приводило к потере значительного числа нейронов и генерации антител против трансгенов [27]. Клеточно-опосредованный иммунный ответ также наблюдался после внутричерепной инъекции вектора AAV1-GFP у приматов (*Macaca fascicularis*) [28] и инъекции AAV5- α -1-идурунидазы у собаки с синдромом Гурлера [29]. Данные на млекопитающих показывают, что в дальнейших исследованиях необходимо учитывать появление иммунного ответа на чужие белки, экспрессируемые векторами AAV [3].

Мы предполагаем, что непосредственное введение вектора в ростральную часть мозжечка объясняет большое количество GFP экспрессирующих клеток в этой зоне. Далее вектор путем диффузии распределялся в каудальную часть, где число клеток было снижено (рис. 2B). В мозге мыши гAAV трансдуцируют как митотические, так и постмитотические клетки [30]. Большая часть серотипов AAV демонстрирует нейрональный тропизм, но некоторые из них также способны трансдуцировать и глиальные клетки [12], в зависимости от экспрессии капсидных белков [31]. Лечение генетических заболеваний ЦНС вызывает затруднения из-за непроницаемости гематоэнцефалического барьера и поражений обширных областей мозга [32]. Интрапаренхиматозная инъекция проникает через гематоэнцефалический барьер, в результате чего экспрессия трансгена ограничена небольшим (1–3 мм) местом введения [33]. Считается, что основным способ распространения вектора в ЦНС – аксональный транспорт, в ретроградном и/или anterogradном направлении [30]. Антероградный транспорт гAAV векторов характеризуется трансдукцией клеток в той области мозга, в которую не была введена инъекция, но которая содержала проекции аксонов от нейронов, находящихся в области инъекции. Напротив, при ретроградном транспорте происходит трансдукция нейронов, расположенных в области мозга вдали от места инъекции, но непосредственно иннервирующих место введения [30].

В мозжечке молодых кеты область распространения GFP+ клеток в месте инъекции составляла 0.4–0.6 мм. Наши данные демонстрируют, что гAAV способен трансдуцировать субпопуляции клеток, удаленных от зоны инъекции. Мы предполагаем, что отсутствие трансдуцированных клеток между удаленными зонами и областью инъекции объясняется тем, что трансдукция происходит не только путем диффузии, но и с помощью anterogradного транспорта. Так, в небольшом количестве были выявлены отдельные гAAV+ клетки в молекулярном слое латеральной и базальной зон (рис. 1D). Возможность вектора трансдуцировать клетки путем anterogradного транспорта способствует его более широкому распространению в ЦНС [34]. По предварительным оценкам полная трансдукция всего мозга человека в младенческом периоде развития для лечения лизосомных нарушений памяти требует от 50 до 350 инъекций [35, 33]. Перенос гена на большие расстояния от места инъекции и нацеливание его на уже известные проекции в головном мозге способно снизить число инъекций [36]. Подобное свойство имеет потенциальные преимущества для лечения генетических заболеваний, при которых поражается весь мозг [37]. В исследовании на приматах (*cynomolgus*) нейроны, удаленные от места инъекции, также были трансдуцированы, что указывало на аксонный транспорт вектора, трансгена или трансгенного продукта [38].

При инъекции серотипа гAAV-2 в кору или глубокие ядра мозжечка мыши сообщалось об эффективной трансдукции клеток Пуркинье. Авторы предполагают, что вирусный вектор распространялся ретроградно по аксонам в тела клеток Пуркинье из глубоких ядер мозжечка [39]. Паренхиматозная инъекция мозжечка примата (*Callithrix jacchus*) интенсивно трансдуцировала клетки коры мозжечка и его афференты, такие как нейроны мостовых ядер, вестибулярное ядро и нижнее оливарное ядро [40]. В мозжечке молодежи кеты после инъекции гAAV отсутствовали GFP+ экспрессирующие клетки Пуркинье и эвридендронидные нейроны.

Таким образом, полученные нами, путем прямого введения гAAV, результаты демонстрируют, что он способен инфицировать клетки мозжечка молодежи кеты. Видимо, трансдукция клеток мозжечка молодежи кеты осуществляется как локально в зоне инъекции, путем диффузии, так и антероградно. Полученные нами данные являются предварительными и необходимо проводить дальнейшие исследования для выяснения фенотипа GFP+ клеток и особенностей развития иммунного ответа.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке ННЦМБ ДВО РАН (госконтракт № 120к-19 от 14.11.2019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang L.L.F., Dang L., Liang C., Wang C., He B., Liu J., Li D., Wu X., Xu X., Lu A., Zhang G. *In Vivo* Delivery Systems for Therapeutic Genome Editing. *Int. J. Mol. Sci.* 17. pii: E626. 2016.
2. Lundstrom K. Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases.* 6(2): E42. 2018.
3. Ojala D.S., Amara D.P., Schaffer D.V. Adeno-associated virus vectors and neurological gene therapy. *Neuroscientist.* 21(1): 84–98. 2015.
4. Towne C., Schneider B.L., Kieran D., Redmond D.E., Aebischer P. Efficient transduction of non-human primate motor neurons after intramuscular delivery of recombinant AAV serotype 6. *Gene Ther.* 17(1): 141–146. 2010.
5. Hollis E.R., Kadoya K., Hirsch M., Samulski R.J., Tuszynski M.H. Efficient retrograde neuronal transduction utilizing self-complementary AAV1. *Mol. Ther.* 16(2): 296–301. 2008.
6. Buller R.M., Janik J.E., Sebring E.D., Rose J.A. Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* 40(1): 241–247. 1981.
7. Kay C.N., Ryals R.C., Aslanidi G.V., Min S.H., Ruan Q., Sun J., Dyka F.M., Kasuga D., Ayala A.E., Van Vliet K., Agbandje-McKenna M., Hauswirth W.W., Boye S.L., Boye S.E. Targeting photoreceptors via intravitreal delivery using novel, capsid-mutated AAV vectors. *PLoS One* 2013;8(4): e62097.
8. Harbison C.E., Chiorini J.A., Parrish C.R. The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol.* 16(5): 208–214. 2008.
9. Bartlett J.S., Wilcher R., Samulski R.J. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 74(6): 2777–2785. 2000.
10. Enquist L.W., Card J.P. Recent advances in the use of neurotropic viruses for circuit analysis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13(5): 603–606. 2003.
11. Vannucci L., Lai M., Chiappesi F., Ceccherini-Nelli L., Pistello M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* 36(1): 1–22. 2013.
12. Aschauer D.F., Kreuz S., Rumpel S. Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. *PLoS One.* 8(9): e76310. 2013.
13. Parr-Brownlie L.C., Bosch-Bouju C., Schoderboeck L., Sizemore R.J., Abraham W.C., Hughes S.M. Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms. *Front Mol. Neurosci.* 8: 14. 2015.
14. Chamberlin N.L., Du B., de Lacalle S., Saper C.B. Recombinant adeno-associated virus vector: use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain Res.* 793(1–2): 169–175. 1998.
15. Hadaczek P., Eberling J.L., Pivrotto P., Bringas J., Forsayeth J., Bankiewicz K.S. Eight years of clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV2-hAADC. *Mol. Ther.* 18(8): 1458–1461. 2010.
16. Rivera V.M., Gao G.P., Grant R.L., Schnell M.A., Zoltick P.W., Rozamus L.W., Clackson T., Wilson J.M. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood.* 105(4): 1424–1430. 2005.

17. Marik S.A., Yamahachi H., McManus J.N., Szabo G., Gilbert C.D. Axonal dynamics of excitatory and inhibitory neurons in somatosensory cortex. *PLoS Biol.* 8(6): e1000395. 2010.
18. Mittmann W., Wallace D.J., Czubyko U., Herb J.T., Schaefer A.T., Looger L.L., Denk W., Kerr J.N. Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons *in vivo*. *Nat. Neurosci.* 14(8): 1089–1093. 2011.
19. Harris J.A., Oh S.W., Zeng H. Adeno-associated viral vectors for anterograde axonal tracing with fluorescent proteins in nontransgenic and cre driver mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* 1(20): 1–18. 2012.
20. Lootens L., Meuleman P., Pozo O.J., Van Eenoo P., Leroux-Roels G., Delbeke F.T. uPA+/+-SCID mouse with humanized liver as a model for *in vivo* metabolism of exogenous steroids: methandienone as a case study. *Clin. Chem.* 55(10): 1783–1793. 2009.
21. Furutani-Seiki M., Wittbrodt J. Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech. Dev.* 121(7–8): 629–637. 2004.
22. Asakawa K., Suster M. L., Mizusawa K., Nagayoshi S., Kotani T., Urasaki A., Kishimoto Y., Hibi M., Kawakami K. Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(4): 1255–1260. 2008.
23. Neuhauss S.C., Biehlmaier O., Seeliger M.W., Das T., Kohler K., Harris W.A., Baier H. Genetic disorders of vision revealed by a behavioral screen of 400 essential loci in zebrafish. *J. Neurosci.* 19(19): 8603–8615. 1999.
24. Suehiro Y., Kinoshita M., Okuyama T., Shimada A., Naruse K., Takeda H., Kubo T., Hashimoto M., Takeuchi H. Transient and permanent gene transfer into the brain of the teleost fish medaka (*Oryzias latipes*) using human adenovirus and the Cre-loxP system. *FEBS Lett.* 584(16): 3545–3549. 2010.
25. Duarte-Neves J., Gonçalves N., Cunha-Santos J., Simões A.T., den Dunnen W.F., Hirai H., Kügler S., Cavadas C., Pereira de Almeida L. Neuropeptide Y mitigates neuropathology and motor deficits in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum. Mol. Genet.* 24(19): 5451–5463. 2015.
26. Simões A.T., Gonçalves N., Koeppen A., Déglon N., Kügler S., Duarte C.B., Pereira de Almeida L. Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease. *Brain.* 135(Pt 8): 2428–2439. 2012.
27. Ciesielska A., Hadaczek P., Mittermeyer G., Zhou S., Wright J.F., Bankiewicz K.S., Forsayeth J. Cerebral infusion of AAV9 vector-encoding non-self proteins can elicit cell-mediated immune responses. *Mol. Ther.* 21(1): 158–166. 2013.
28. Hadaczek P., Forsayeth J., Mirek H., Munson K., Bringas J., Pivrotto P., McBride J.L., Davidson B.L., Bankiewicz K.S. Transduction of nonhuman primate brain with adeno-associated virus serotype 1: vector trafficking and immune response. *Hum. Gene Ther.* 20(3): 225–237. 2009.
29. Ciron C., Desmaris N., Colle M.A., Raoul S., Joussemet B., Vérot L., Ausseil J., Froissart R., Roux F., Chérel Y., Ferry N., Lajat Y., Schwartz B., Vanier M.T., Maire I., Tardieu M., Moullier P., Heard J.M. Gene therapy of the brain in the dog model of Hurler's syndrome. *Ann. Neurol.* 60(2): 204–213. 2006.
30. Saraiva J., Nobre R.J., Pereira de Almeida L. Gene therapy for the CNS using AAV: The impact of systemic delivery by AAV9. *J. Control Release.* 241: 94–109. 2016.
31. Alves S., Nascimento-Ferreira I., Auregan G., Hassig R., Dufour N., Brouillet E., Pedroso de Lima M.C., Hantraye P., Pereira de Almeida L., Déglon N. Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PLoS One.* 3(10): e3341. 2008.
32. Cearley C.N., Wolfe J.H. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.* 13(3): 528–537. 2006.
33. Cunningham J., Pivrotto P., Bringas J., Suzuki B., Vijay S., Sanftner L., Kitamura M., Chan C., Bankiewicz K.S. Biodistribution of adeno-associated virus type-2 in nonhuman primates after convection-enhanced delivery to brain. *Mol. Ther.* 16(7): 1267–1275. 2008.
34. Castle M.J., Perlson E., Holzbaur E.L., Wolfe J.H. Long-distance axonal transport of AAV9 is driven by dynein and kinesin-2 and is trafficked in a highly motile Rab7-positive compartment. *Mol. Ther.* 22(3): 554–566. 2014.
35. Vite C.H., Passini M.A., Haskins M.E., Wolfe J.H. Adeno-associated virus vector-mediated transduction in the cat brain. *Gene Ther.* 10(22): 1874–1881. 2003.
36. Hsiao C.D., Hsieh F.J., Tsai H.J. Enhanced expression and stable transmission of transgenes flanked by inverted terminal repeats from adeno-associated virus in zebrafish. *Dev. Dyn.* 220(4): 323–336. 2001.
37. Tervo D.G., Hwang B.Y., Viswanathan S., Gaj T., Lavzin M., Ritola K.D., Lindo S., Michael S., Kuleshova E., Ojala D., Huang C.C., Gerfen C.R., Schiller J., Dudman J.T., Hantman A.W., Looger L.L., Schaffer D.V., Karpova A.Y. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron.* 92(2): 372–382. 2016.
38. Salegio E.A., Kells A.P., Richardson R.M., Hadaczek P., Forsayeth J., Bringas J., Sardi S.P., Passini M.A., Shihabuddin L.S., Cheng S.H., Fiandaca M.S., Bankiewicz K.S. Magnetic resonance

- imaging-guided delivery of adeno-associated virus type 2 to the primate brain for the treatment of lysosomal storage disorders. *Hum. Gene Ther.* 21(9): 1093–1103. 2010.
39. Kaemmerer W.F., Reddy R.G., Warlick C.A., Hartung S.D., McIvor R.S., Low W.C. In vivo transduction of cerebellar Purkinje cells using adeno-associated virus vectors. *Mol. Ther.* 2(5): 446–457. 2000.
40. Matsuzaki Y., Konno A., Mukai R., Honda F., Hirato M., Yoshimoto Y., Hirai H. Transduction Profile of the Marmoset Central Nervous System Using Adeno-Associated Virus Serotype 9 Vectors. *Mol. Neurobiol.* 54(3): 1745–1758. 2017

Transduction of the Recombinant Adeno-Associated Mammalian Hippocampal Virus Vector in Cells of the Cerebellum of Juvenile *Oncorhynchus keta*

M. E. Stukaneva^{a,*}, E. V. Pushchina^{a,b}, and A. A. Varaksin^a

^aZhirmunsky National Scientific Center for Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, Russia

^bBogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

*e-mail: stykanyova@mail.ru

The aim of this work was to study the possibility of transduction of the recombinant adeno-associated mammalian hippocampal virus (rAAV) into the cells of the cerebellum of the one-year-old juvenile of *Oncorhynchus keta* one month after intraparenchymal injection. The introduction of 0.2 µl of rAAV into the dorsal region of the cerebellar body of *O. keta* salmon was accompanied by monitoring of the condition of the fish and subsequent examination of the cerebellum using fluorescence microscopy. Our results demonstrate that rAAV is able to effectively infect the cerebellum cells of juvenile *O. keta*. The average size of the transduced cells was 5 and 7 µm. During transduction of rAAV into the structures of the cerebellum, it was found that the highest concentration of cells is characteristic of the central part of the injection and diffusely decreased with distance from it. At the periphery of the injection there is a large number of GFP-positive granules, which indicates the onset of cell degradation during the immune response. The results of the study demonstrate that rAAV is able to transduce subpopulations of cells distant from the injection zone, which suggests its distribution through diffusion, as well as intracellular transport.

Keywords: adeno-associated virus, *Oncorhynchus keta*, cerebellum, anterograde transport, bony fish, transduction

ЦИТИРОВАТЬ:

Стуканёва М.Е., Пушина Е.В., Вараксин А.А. Трансдукция рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора гиппокампа млекопитающих в клетки мозжечка молодой кеты *Oncorhynchus keta*. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(11): 1412–1420.

DOI: 10.31857/S0869813920100118

TO CITE THIS ARTICLE:

Stukaneva M.E., Pushchina E.V., Varaksin A.A. Transduction of the Recombinant Adeno-Associated Mammalian Hippocampal Virus Vector in Cells of the Cerebellum of Juvenile *Oncorhynchus keta*. *Russian Journal of Physiology.* 106(11): 1412–1420.

DOI: 10.31857/S0869813920100118