

МАРКИРОВАНИЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫМИ ВИРУСНЫМИ ВЕКТОРАМИ ГИППОКАМПА МЫШИ НЕЙРОНОВ МЕЗЕНЦЕФАЛИЧЕСКОГО ТЕГМЕНТУМА МОЛОДИ ТИХООКЕАНСКОЙ КЕТЫ *ONCORHYNCHUS KETA*

© 2021 г. Е. В. Пушина^{1,2,*}, И. А. Капустянов¹, Е. В. Шамшурина¹, А. А. Вараксин¹

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

² Институт физиологии им. Богомольца Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

*e-mail: puschina@mail.ru

Поступила в редакцию 09.10.2020 г.

После доработки 31.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

В настоящее время данные о наличии аденовирусных рецепторов у рыб весьма ограничены. В работе использовали мышинные рекомбинантные аденовирусные векторы (гAAV) с кальциевым сенсором GCaMP6m, которые обычно используются для дорсального CA1 гиппокампа мышей, но ранее не применялись для доставки генов в мозге рыб. Цель работы заключалась в оценке способности маркирования гAAV гиппокампа мышей клеток мозга молоди кеты и последующего определения фенотипа гAAV-маркированных клеток методом конфокальной микроскопии. Доставка гена *in vivo* осуществлялась с помощью внутричерепной инъекции GFP-содержащего вектора непосредственно в область мезенцефалического тегмента годовалой молоди кеты *Oncorhynchus keta*. Оценка уровня инфекционной эффективности была произведена через 1 нед после инъекции вектора. Методом конфокальной сканирующей микроскопии была проведена оценка экспрессии аденоассоциированного вектора в различных зонах тегмента молоди *O. keta* с последующим ИГХ анализом нейронспецифического протеина NuCD в сочетании с окрашиванием DAPI. Результаты анализа показали колокализацию клеток, экспрессирующих аденовирусный вектор с зеленой флуоресценцией с нейронспецифическим протеином NuCD с красной флуоресценцией. Результаты свидетельствуют, что клетки тегмента молоди кеты, экспрессирующие AAV, относятся к нейронспецифичной линии клеток мозга кеты, что свидетельствует о способности гиппокампальных аденовирусов млекопитающих инфицировать нейроны ЦНС рыб. Таким образом, специфичные для гиппокампа AAV млекопитающих могут встраиваться в нейроны мозга рыб с последующей экспрессией вирусных протеинов, и, очевидно, нейроны тегмента молоди кеты содержат гомолог аденовирусного рецептора млекопитающих.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирус, аденовирусный вектор большой емкости, система доставки, *Oncorhynchus keta*, тегментум, NuCD

DOI: 10.31857/S0044452921010071

Исследование закономерностей функционирования нейронных сетей в онтогенезе и их способности встраивать новые элементы в течение жизни является актуальным вопросом нейробиологии. Успешное выполнение подобных нейробиологических исследований требует эффективных и точных методов. В связи с этим рекомбинантные аденоассоциированные вирусные векторы (AAV) являются эффективными инструментами, которые можно использовать как для нацеливания, так и для манипулирования определенными подтипами нейронов (определяющихся на основе экспрессии генов, местоположения и связей) и ненейрональных клеток в нервной системе [1].

В нейробиологических исследованиях аденовирусные векторы используются для различных целей, в частности для маркирования отдельных нейронов и нейрональных популяций [2], отслеживания линии нейрональных клеток [3] и модулирования функции нейронов [4]. В качестве модельных животных для перспективных нейрогенных исследований все чаще используются костистые рыбы [5–7]. Подобные исследования актуальны для молекулярной генетики в различных других областях, таких как биология развития [8] и неврология [5, 9]. Таким образом, использование вирусных векторов на рыбах способствует дальнейшему генетическому анализу нейронных функций и исследованиям нейрогенеза у взрослых животных.

GCaMPs – генетически кодируемые показатели кальция, содержащие флуорофор, которые состоят из зеленого флуоресцентного белка (GFP), ассоциированного с кальмодулином и пептидом M13 [10]. После связывания кальция с системой кальмодулин-M13 возникают конформационные изменения в полученном белковом комплексе, что приводит к увеличению флуоресценции GFP. GCaMP6, в частности, является одним из новых генетически кодируемых показателей кальция, с более высоким отношением сигнала к шуму и улучшенной временной кинетикой по сравнению с предыдущими поколениями кальциевых индикаторов [10]. Существует много доступных серотипов аденоассоциированных вирусов (AAV), каждый из которых включает в себя отдельный вирусный белок капсида и обеспечивает различные характеристики трансдукции в пределах мозга [11]. Некоторые серотипы AAV транспортируются по нейрональным проекциям инъекцируемого ядра или области мозга [12].

Мы предположили, что инъекция переносимого вектора AAV в тегментальную область молодички *O. keta* приведет к широкому распространению репортерного гена, тем самым охватывая большую область мезенцефалического тегмента, включающую различные типы клеток. Цель работы заключалась в оценке способности маркирования рекомбинантным аденовирусом (rAAV) гиппокампа мышей CA1 клеток мозга молодички *Oncorhynchus keta* и последующем определении фенотипа rAAV-маркированных клеток методом конфокальной микроскопии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе было использовано 10 годовалых особей молодички тихоокеанской кеты *Oncorhynchus keta* в возрасте одного года, с длиной тела 13–15.5 см и массой 45–55 г. Животные были получены с Рязновского экспериментального производственного рыбозавода в 2019 г. Молодь кеты содержали в аквариуме с аэрируемой пресной водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением в течение суток. 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. Все экспериментальные манипуляции с животными были проведены в соответствии с правилами, регулируемые уставом ННЦБМ, и Этической комиссией, регламентирующей гуманное обращение с экспериментальными животными.

Введение аденовирусного вектора. В работе использовали готовые рекомбинантные аденоассоциированные вирусы гиппокампа мыши AAV1.Camc2a.GCaMP6f.WPRE.bGHpA (Пало-Альто, США). Упаковка, очистка и определение вектор-

ных титров были выполнены Стенфордским университетом (Inscopix, США). Рекомбинантные векторы очищали с использованием метода осаждения CsCl, и титры геномной копии были определены, как описано ранее [13]. Титры инъекций были оптимизированы по концентрации и составу были 1.68E + 13 µg/ml, что функционально подтверждено для кальциевой визуализации пирамидных нейронов в дорсальном CA1 гиппокампе мыши.

После анестезии каждому животному в область правого полушария тегмента с помощью шприца Гамильтона вводили 0.2 µl раствора рекомбинантного AAV на PBS ($n = 5$ для каждой группы). Контрольные животные получали 0.2 µl 0.1 М PBS ($n = 5$). Непосредственно после нанесения повреждения животных выпускали в аквариум для восстановления и дальнейшего мониторинга.

После внутрочерепной инъекции в область мезенцефалического тегмента в течение 1 ч проводили видеомониторинг изменений двигательной и поведенческой активности у рыб в экспериментальной группе. Через 1 нед животные выводились из эксперимента и подвергались эвтаназии методом быстрой декапитации. Головной мозг префиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2). После префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в том же растворе в течение 2 ч при температуре 4°C. Затем в течение двух суток промывали в 30%-м растворе сахарозы при 4°C, с пятикратной сменой раствора. Серийные фронтальные срезы мозга кеты толщиной 50 мкм изготавливали с помощью замораживающего микротомы (Cryo-star HM 560 MV, Thermo Scientific, США), монтировали на полилизинные предметные стекла (Биовитрум, Россия).

Иммунофлуоресцентное маркирование. С целью выявления нейронспецифичного протеина NuCD на срезах мозга, содержащих маркированные AAV клетки, применялось маркирование соответствующими первичными мышинными антителами фирмы Chemicon (clone: AD2.38; Chemicon Billerica, MA, США) в разведении 1:300. Срезы преинкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% неиммунной сыворотки лошади, 0.01% Tween 20 (Sigma, США) и 0.1% БСА (Sigma, США). Затем срезы инкубировали с первичными антителами при температуре 4°C в течение 48 ч. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали с ослиными вторичными антителами против Ig мыши, конъюгированными с Alexa 546 (Invitrogen, США, разведение 1:300). Для расчета процента иммунопозитивных нейронов, кроме метки к NuCD, производилось окрашивание раствором DAPI ядер всех клеток на срезе (Invitrogen, США, D9542, конечное разведение DAPI 0.01 мкг/мл на PBS).

Таблица 1. Соотношение* NuCD-иммунопозитивных и AAV-маркированных нейронов в мезенцефалическом тегментуме молодежи кеты *O. keta* через 1 неделю после однократного введения аденовирусного вектора

Область мозга	AAV %	HuCD %	AAV+HuCD %
Дорсальная часть гипоталамич. бухты	37.2	80.5	23.3
Дорсолатеральный тегментум	35	87.8	18.5
Посткомиссуральная область	48	81.1	24.4
Дорсомедиальный тегментум	44.1	80	27.5
Мезенцефалическая ретикулярная формация	65	85.7	48.5

*Долю маркированных нейронов определяли как их отношение к общему числу ядер, окрашенных DAPI, которое принимали за 100%.

Негативный контроль проводили при отсутствии первичных антител, препараты заключали в глицерин и оконтуривали с помощью лака.

Микроскопия. В работе для визуализации и проведения морфологического анализа был использован моторизированный инвертированный микроскоп, исследовательского класса с флюоресцентным модулем и приставкой улучшенного контрастирования при работе с люминесценцией Axiovert 200 M с модулем ApoTome (Carl Zeiss, Германия). Для более детального исследования тегментальной области в трехмерном пространстве с использованием мультиспектрального (с несколькими флуорохромами) режима работы исследовали GFP/HuCD/DAPI колокализацию с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 NLO с модулем высокого разрешения Эйрискан (Carl Zeiss, Германия).

Для исследования микрофотографии препаратов и анализ материала осуществляли с помощью программы Axio Vision (Carl Zeiss, Германия). Измерения проводили при использовании объективов с увеличением $\times 10$, $\times 20$, и $\times 40$ в 10 случайно выбранных полях зрения для каждой области исследования. Подсчет количества иммуномаркированных клеток на поле зрения осуществляли при увеличении $\times 200$. Морфометрический анализ параметров клеточных тел (измерение большого и малого диаметров сомы нейронов) проводили с помощью программного обеспечения микроскопа Axio Vision. Подсчет производили в 10 случайно выбранных измеренных областях (1 микроскопическое поле составляло 0.12 мм^2) при 200-кратном увеличении у каждого животного. Среднее определяли путем усреднения пропорций, полученных от пяти животных.

Количественная обработка материала была выполнена с помощью программ "Описательная статистика" Microsoft Excel 2010 и Statistica 12. Плотность распределения и размерные характеристики клеток оценивались с помощью методов вариационной статистики. Для количественной оценки результатов находились средние значения малого и большого диаметров клеток и стандартное отклонение ($M \pm SD$).

Для ранжирования маркированных элементов в соответствии с размерными группами все данные по измеренным клеткам/ядрам были разделены на неперекрывающиеся размерные группы (табл. 2) и представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Через 1 нед. после инъекции аденовирусного вектора в область мезенцефалического тегментума в мозге молодежи кеты AAV-маркированные клетки были идентифицированы в передней бухте гипоталамуса, дорсолатеральном тегментуме, посткомиссуральной области, дорсомедиальном тегментуме и мезенцефалической ретикулярной формации (табл. 1).

На рис. 1a–1d представлены Z-стеки, на которых показаны результаты сканирования срезов мозга по различным каналам: окрашивание DAPI среза мозга с указанием области, содержащей GFP/HuCD-маркированные клетки (рис. 1a, пиктограмма). Результаты показали, что AAV встраивались в нейронах и/или ядрах различных типов тегментальной области и идентифицировались по экспрессии GFP-белков. Иммунофлуоресценция наблюдалась главным образом в телах нейронов (рис. 1b). AAV-специфичные для гиппокампа мыши были выбраны для первоначальной оценки векторной трансдукции и биораспределения в области мезенцефалического тегментума молодежи кеты. Вектор вводился в средний мозг, расположенный между конечным мозгом и мозжечком молодежи кеты в возрасте 1 года, и через 1 неделю визуализировался на трансверсальных срезах мозга с использованием конфокальной микроскопии. В результате окрашивания DAPI на срезах мозга идентифицировались ядра клеток и в некоторых случаях тела небольших нейронов (рис. 1a). Поскольку у молодежи кеты в перивентрикулярной зоне тегментума присутствует большое количество незрелых (бластных) форм клеток, характеризующихся высокими ядерно-цитоплазматическими отношениями (крупные ядра и узкий ободок цитоплазмы), то в данном случае при окрашивании DAPI красились

Таблица 2. Морфометрические параметры* маркированных нейронов ($M \pm SD$) в мезенцефалическом тегментуме молодки кеты *O. keta* через 1 нед после однократного введения аденовирусного вектора

Область мозга	DAPI размер ядер/клеток мкм	AAV размер ядер/клеток мкм	HuCD размер клеток мкм	AAV+HuCD размер ядер/клеток мкм
Дорсальная часть гипоталамич. бухты	$4.9 \pm 0.3/3.4 \pm 0.4$	$6.2 \pm 0.6/6.2 \pm 0.5$	$8.7 \pm 0.4/6.0 \pm 0.8$	$6.5 \pm 0.2/5.6 \pm 0.4$
	$4.2 \pm 0.1/3.1 \pm 0.3$	$4.9 \pm 0.3/4.6 \pm 0.4$	$7.4 \pm 0.4/5.8 \pm 1.9$	$4.8 \pm 0.5/4.6 \pm 0.6$
	$3.8 \pm 0.1/2.9 \pm 0.3$	$4.5 \pm 0.1/3.6 \pm 1.1$	$6.1 \pm 0.3/5.1 \pm 0.6$	$3.8 \pm 0.2/3.2 \pm 0.5$
	$3.1 \pm 0.4/2.8 \pm 0.2$	$3.6 \pm 0.2/3.1 \pm 0.3$	$4.9 \pm 0.3/4.4 \pm 0.1$	$3.2 \pm 0.2/2.7 \pm 0.3$
Дорсолатеральный тегментум	$4.8 \pm 0.3/3.2 \pm 0.5$	$5.9 \pm 0.6/4.7 \pm 0.2$	$5.6 \pm 0.3/4.2 \pm 0.5$	$5.5 \pm 0.6/4.3 \pm 0.8$
	$4.2 \pm 0.2/3.1 \pm 0.3$	$4.9 \pm 0.1/3.6 \pm 0.4$	$4.7 \pm 0.2/3.6 \pm 0.4$	$4.5 \pm 0.3/3.8 \pm 0.6$
	$3.7 \pm 0.1/2.8 \pm 0.3$	$4.4 \pm 0.1/3.6 \pm 0.4$	$4.3 \pm 0.2/3.3 \pm 0.4$	$3.9 \pm 0.1/3.5 \pm 0.2$
	$3.2 \pm 0.2/2.7 \pm 0.5$	$3.6 \pm 0.2/2.8 \pm 0.3$	$3.5 \pm 0.2/2.8 \pm 0.3$	
Посткомиссуральная область	$5.3 \pm 0.2/4.0 \pm 0.5$	$8.8 \pm 0.4/6.6 \pm 0.2$	$7.8 \pm 2.1/5.9 \pm 2.6$	$5.7 \pm 0.4/3.5 \pm 0.5$
	$4.5 \pm 0.2/3.8 \pm 0.4$	$5.2 \pm 0.3/3.3 \pm 0.8$	$4.6 \pm 0.2/3.7 \pm 0.4$	$4.6 \pm 0.3/3.4 \pm 0.4$
	$3.7 \pm 0.3/3.4 \pm 0.4$	$3.0 \pm 0.3/2.3 \pm 0.3$	$3.7 \pm 0.3/2.8 \pm 0.5$	$3.8 \pm 0.1/3.2 \pm 0.5$
Дорсомедиальный тегментум	$7.8 \pm 0.4/5.0 \pm 0.6$	$10.8 \pm 0.3/8.0 \pm 0.7$	$26.1 \pm 1.3/13.4 \pm 1.5$	$8.3 \pm 0.7/6.4 \pm 0.8$
	$5.9 \pm 0.6/4.4 \pm 0.5$	$8.7 \pm 0.1/6.6 \pm 0.5$	$11.0 \pm 0.7/7.3 \pm 2.0$	$6.3 \pm 0.8/5.1 \pm 0.6$
	$4.5 \pm 0.5/3.6 \pm 0.2$	$7.2 \pm 0.4/5.5 \pm 0.6$	$8.3 \pm 0.6/6.4 \pm 1.2$	$4.5 \pm 0.2/3.8 \pm 0.6$
		$5.9 \pm 0.5/4.7 \pm 0.7$	$6.5 \pm 0.6/5.2 \pm 0.9$	
Мезенцефалическая ретикулярная формация	$5.4 \pm 0.3/3.8 \pm 0.3$	$5.8 \pm 0.3/4.4 \pm 0.7$	$5.7 \pm 0.4/4.3 \pm 0.7$	$5.7 \pm 0.5/4.5 \pm 0.2$
	$4.2 \pm 0.3/3.3 \pm 0.4$	$4.8 \pm 0.3/3.9 \pm 0.8$	$4.7 \pm 0.2/3.7 \pm 0.7$	$4.4 \pm 0.3/4.1 \pm 0.4$
	$3.4 \pm 0.3/2.7 \pm 0.1$		$4.0 \pm 0.3/3.5 \pm 0.4$	

*Значения большого и малого диаметров ядер либо клеточных тел. Данные ранжированы по убыванию. Размеры маркированных ядер составляли от 3 до 4.5 мкм [20], более крупные элементы представляли клетки различных размерных типов.

как ядра, так и в некоторых случаях небольшие нейроны (рис. 1а). Подобное свойство окрашивания DAPI нейробластов было выявлено также в работах на млекопитающих [14].

Обнаружен четкий сигнал GFP в 44.1% клеток (табл. 1), сосредоточенных в области дорсомедиального тегментума (рис. 1б). Морфометрические параметры ($M \pm SD$) ядер и клеток различных областей среднего мозга, в которых была выявлена экспрессия AAV, приведены в табл. 2. Результаты исследования показывают, что среди маркированных клеток в различных областях среднего мозга преобладали нейроны небольшого размера, а также более мелкие частицы (рис. 1б, 1с). Результаты иммунофлуоресцентного маркирования нейронального протеина HuCD показали локализацию метки в нейронах различного размера (рис. 1с, табл. 2). Исследование наложения Z-стеков маркирования DAPI, GFP и HuCD показало, что в области дорсомедиального тегментума обнаружена колокализация GFP и HuCD в 27.5% клеток (рис. 1д, табл. 1). В различных областях тегментума соотношение GFP/HuCD клеток отличалось, достигая

максимального значения в клетках мезенцефалической ретикулярной формации (табл. 1). Таким образом, колокализация зеленого флуоресцентного протеина и маркера нейрональной специализации была обнаружена во всех областях мезенцефалона, экспрессирующего AAV.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусные векторы представляют большой клинический интерес благодаря их высокой эффективности, особенно когда генетический материал предназначен для достижения ядра. Аденовирус был одним из первых вирусов, которые были адаптированы в качестве вектора генной терапии [15]. Эти вирусы без оболочки, имеющие капсиды икосаэдрической формы размером до 100 нм и линейные двухцепочечные геномы ДНК размером около 36 кб, обеспечивают высокую генетическую стабильность и эффективность инфекции в различных типах клеток [15]. Попадая внутрь клетки, вирусные капсиды разлагаются запрограммированным

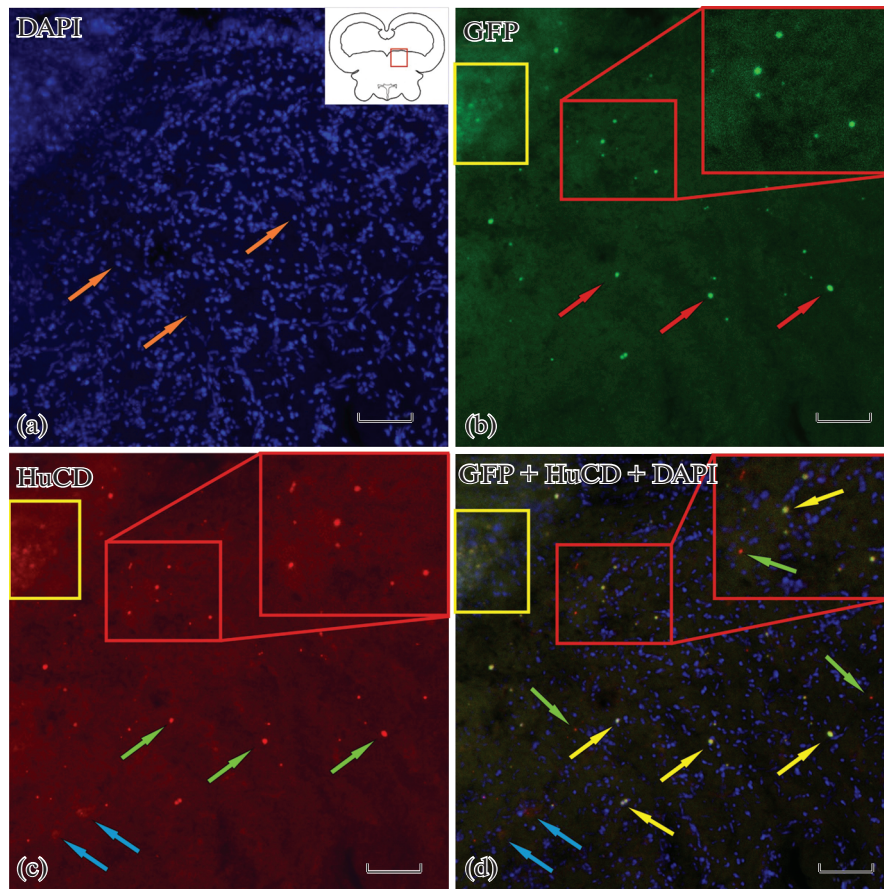


Рис. 1. Z-стеки, демонстрирующие иммуномечение HuCD области дорсомедиального тегмента молодежи кеты *Oncorhynchus keta* через 1 неделю после однократного введения AAV. а – окрашивание DAPI, оранжевыми стрелками показаны ядра клеток, в левом верхнем углу на пиктограмме показана схема мезенцефалона с исследуемой областью (в красном квадрате). б – экспрессия зеленого флюоресцентного протеина (GFP) в клетках тегмента (красные стрелки); скопление интенсивно маркированных клеток показано в красном прямоугольнике (увеличенный фрагмент на врезке), в желтом прямоугольнике – умеренно маркированные клетки. с – иммунофлюоресценция протеина HuCD в нейронах тегмента, зелеными стрелками показаны интенсивно маркированные мелкие нейроны, голубыми – умеренно маркированные крупные нейроны, остальные обозначения как на б, д – оптическое наложение трех каналов окрашивания DAPI/GFP/HuCD, показывающее области колокализации GFP/HuCD в нейронах (желтые стрелки). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм.

образом и ведут геномы в ядро, где они остаются в эписомальном состоянии.

Результаты настоящего исследования показали, что аденоассоциированный вектор гиппокампа мышей эффективно экспрессируется в различных клетках среднего мозга молодежи кеты. Использование конфокальной микроскопии прямым методом показывает, что GFP-экспрессирующие клетки, появляющиеся в результате однократной векторной трансдукции, широко распределены и могут быть колокализованы с нейрональным протеином HuCD. Полученные результаты свидетельствуют, что GFP экспрессирующие клетки тегмента молодежи кеты имеют нейрональный фенотип. Однако в различных областях тегмента молодежи кеты доля колокализации GFP/HuCD в клетках отличается (табл. 1). Мы полагаем, что это может определяться различными причинами, в частности режи-

мом конфокальной визуализации маркированных клеток, условиями проведения иммунофлюоресцентного маркирования, различной проницаемостью ткани для антител и т.д.

В исследованиях на различных позвоночных было установлено, что аденовирусные векторы вызывают менее токсичный эффект, чем некоторые другие вирусы, однако не являются инертными по отношению к врожденному [16] или адаптивному иммунитету и могут также влиять на внутриклеточную активность [17]. Согласно некоторым данным нейротоксические эффекты наблюдаются в случае системной доставки аденовируса или через прямые инъекции в ЦНС, а также в субретинальное пространство сетчатки [18, 19]. Результаты настоящего исследования показывают, что рекомбинантный AAV гиппокампа мышей при однократном введении в мезенцефалон молодежи кеты не оказывает за-

метного токсического влияния на клетки мозга рыб в исследованном временном периоде, что позволяет использовать данный вектор в качестве эффективного инструмента для доставки генетического материала в клетки мозга молоди кеты как потенциальной модели для нейрогенных исследований. Тем не менее учитывая, что данные исследования носят предварительный характер и нуждаются в последующем экспериментальном подтверждении, мы планируем проведение дальнейшей оценки ненейрональных фенотипов AAV-экспрессирующих клеток в мозге молоди лососевых рыб. Таким образом, аденоассоциированный вектор может эффективно трансдуцироваться и поддерживать экспрессию трансгенов в нейронах мозга молоди кеты при однократном введении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке ННЦМБ ДВО РАН (госконтракт № 120к-19 от 11.14.2019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haery L., Deverman B.E., Matho K.S., Cetin A., Woodard K., Cepko C., Guerin K.I., Rego M.A., Ersing I., Bachle S.M., Kamens J., Fan M. Adeno-associated virus technologies and methods for targeted neuronal manipulation. *Front. Neuroanat.* 13:93. 2019. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00093>
2. Hashimoto M., Mikoshiba K. Neuronal birthdate-specific gene transfer with adenoviral vectors. *J. Neurosci.* 24: 286–296. 2004.
3. Hashimoto M., Mikoshiba K. Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the “birthdate” of Purkinje cells. *J. Neurosci.* 23: 11342–11351. 2003.
4. Zhao H.Q., Ivic L., Otaki J.M., Hashimoto M., Mikoshiba K., Firestein S. Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science.* 279: 237–242. 1998.
5. Guliás P., Guerra-Varela J., Gonzalez-Aparicio M., Rico-baraza A., Vales A., Gonzalez-Aseguinolaza G., Hernandez-Alcoceba R., Sánchez L. *Danio rerio* as model organism for adenoviral vector evaluation. *Genes.* 10: 1053. 2019. <https://doi.org/10.3390/genes10121053>
6. Kawasaki T., Saito K., Mitsui K., Ikawa M., Yamashita M., Taniguchi Y., Takeda S., Mitani K., Sakai N. Introduction of a foreign gene into zebrafish and medaka cells using adenoviral vectors. *Zebrafish.* 6: 253–258. 2009. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0596>
7. Rainbow A.J., Zacal N.J. Expression of an adenovirus encoded reporter gene and its reactivation following UVC and oxidative damage in cultured fish cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 84: 455–466. 2008.
8. Furutani-Seiki M., Wittbrodt J. Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech. Dev.* 121: 629–637. 2004.
9. 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. U.S.A.* 105: 1255–1260. 2008.
10. Broussard G.J., Liang R., Tian L. Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Front. Mol. Neurosci.* 7: 97. 2014. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00097>
11. Cearley C.N., Wolfe J.H. Transduction characteristics of adenoassociated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.* 13: 528–537. 2006.
12. Cearley C.N., Wolfe J.H. A single Injection of an adeno-associated virus vector into nuclei with divergent connections results in widespread vector distribution in the brain and global correction of a neurogenetic disease. *J. Neurosci.* 27 (37) : 9928–9940. 2007.
13. Gao G., Qu G., Burnham M.S., Huang J., Chirmule N., Joshi B., Yu Q.C., Marsh J.A., Conceicao C.M., Wilson J.M. Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* 11:2079–2091. 2000.
14. Колос Е.А., Коржевский Д.Э. Влияние теплового демаскирования антигена на качество флуоресцентной окраски ДНК в гистологических срезах. *Мед. Акад. ж.* 18: (1) 71–76. 2018. [Kolos E.A., Korzhevskij D.E. Vliyanie teplovogo demaskirovaniya antigena na kachestvo fluorescentnoj okraski DNK v gistologicheskikh srezah. *Med. Akad. J.* 18: (1) 71–76. 2018. (in Russ)].
15. Crustal R. Adenovirus: The first effective *in vivo* gene delivery vector. *Hum. Gene Ther.* 25: 3–11. 2014.
16. Rogers G.L., Martino A.T., Aslanidi G.V., Jayandharan G.R., Srivastava, A., Herzog R.W. Innate immune responses to AAV vectors. *Front. Microbiol.* 2:194. 2011. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00194>
17. Mingozzi F., High K.A. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr. Gene Ther.* 11: 321–330. 2011. <https://doi.org/10.2174/156652311796150354>
18. Hinderer C., Bell P., Vite C.H., Louboutin P.J., Grant R., Bote E. Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 1:14051. 2014. <https://doi.org/10.1038/mtm.2014.51>
19. Xiong W., Wu D.M., Xue Y., Wang S.K., Chung M.J., Ji X. AAV cis-regulatory sequences are correlated with ocular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116: 5785–5794. 2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821000116>
20. Candal E., Anadon R., DeGrip W.J., and Rodriguez-Molde I. Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Dev. Brain Res.* 154:101–119. 2005.

LABELING OF MESENCEPHALIC TEGMENTAL NEURONS IN A JUVENILE PACIFIC CHUM SALMON *ONCORHYNCHUS KETA* WITH MOUSE HIPPOCAMPAL ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTORS

E. V. Pushchina^{a,b,#}, I. A. Kapustyanov^a, E. V. Shamshurina^a, and A. A. Varaksin^a

^a Zhirmunsky National Research Center for Marine Biology, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

^b Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

[#]e-mail: puschina@mail.ru

Currently, the data on the presence of adenoviral receptors in fish are very limited. We used mouse recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV) with a calcium sensor GCaMP6m, which are typically used for the CA1 region of the mouse dorsal hippocampus but have not previously been used for gene delivery in the fish brain. The aim of this work was (1) to assess the ability of the mouse hippocampal rAAV to label brain cells in a juvenile chum salmon *Oncorhynchus keta* and (2) to determine the phenotype of rAAV-labeled cells. In vivo gene delivery was carried out through intracranial injection of the GFP-tagged rAAV directly into the mesencephalic tegmentum of a yearling chum salmon. The level of infectious efficacy was assessed 1 week after the injection of the vector. Using confocal scanning microscopy, rAAV-GFP expression was assessed in various tegmental regions of a juvenile *O. keta*, followed by the localization of the neuron-specific protein HuCD tagged with orange-fluorescent Alexa Fluor 546. An immunohistochemical analysis combined with DAPI staining revealed rAAV/HuCD colocalization in various neurons of the mouse mesencephalic tegmentum. This finding provides evidence that rAAV-expressing tegmental cells in the juvenile chum salmon refer to a neuron-specific line of brain cells, indicative of the ability of mammalian hippocampal adenoviruses to infect neurons of the fish central nervous system. Thus, mammalian hippocampus-specific rAAVs can incorporate into fish brain neurons with subsequent expression of the viral proteins. It appears that tegmental neurons in a juvenile chum salmon contain a homologue of the mammalian adenoviral receptor.

Keywords: Adeno-associated virus, high-capacity adenoviral vector, delivery system, *Oncorhynchus keta*, tegmentum, HuCD