УДК [616.988:602.6]:616.83
DOI: 10.34215/1609-1175-2022-1-46-55

Вирусные векторы в трансгенных исследованиях: перспективы использования для лечения болезней ЦНС и генной терапии

Е.В. Пущина, И.А. Капустянов, А.А. Вараксин

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

Вирусные переносчики представляют большой клинический интерес из-за их высокой эффективности, позволяющей находить практическое применение в генной терапии. В обзоре приводятся современные данные исследований на различных видах рыб в качестве потенциальных моделей для использования вирусных векторов. В ходе изучения высокопроизводительных аденовирусных векторов получены данные об устойчивой экспрессии трансгенов в организме Danio rerio и других видов рыб. Рассмотрены особенности применения аденоассоциированных векторов в исследовании транснейронального переноса белка глюкоронидазы в проекционных нейронах вентральной тегментальной области и стриатума для лечения метаболической недостаточности при мукополисахаридозе VII. Принимая во внимание широкий репертуар генетически модифицированных линий Danio rerio, этические аспекты и допустимость этой модели в нейрогеннных исследованиях, очевидно, что Danio rerio, как и другие виды рыб, могут быть альтернативой для ранней стадии доклинической оценки эффективности вирусных векторов.

Ключевые слова: *аденовирус, генный таргетинг, Danio rerio, генная терапия, вентральная тегментальная область, глюкоронидаза*

Поступила в редакцию 08.02.2022. Получена после доработки 21.02.2022. Принята к печати 25.02.2022.

Для цитирования: Пущина Е.В., Капустянов И.А., Вараксин А.А. Вирусные векторы в трансгенных исследованиях: перспективы использования для лечения болезней ЦНС и генной терапии. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2022;1: 46–55. doi: 10.34215/1609-1175-2022-1-46-55

Для корреспонденции: Пущина Евгения Владиславовна – д-р биол. наук, профессор РАН, главный научный сотрудник лаборатории Клеточной дифференциации Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17); ORCID: 0000-0003-0388-3147; e-mail: puschina@mail.ru

Viral Vectors in Transgenic Research: Prospects for the Treatment of CNS Diseases and Gene Therapy

E.V. Pushchina, I.A. Kapustyanov, A.A. Varaksin

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Summary: Viral vectors are of great clinical interest due to their high efficiency, which allows them to find practical applications in gene therapy. The review presents current research data on various fish species as potential models for the use of viral vectors. During the study of high-performance adenoviral vectors data on the stable expression of transgenes in the body of Danio rerio and other fish species was obtained. The features of the use of adeno-associated vectors in the study of transneuronal transfer of the glucuronidase protein in the projection neurons of the ventral tegmental area and striatum to treat metabolic insufficiency in case of mucopolysaccharidosis VII are considered. Taking into consideration the wide set of genetically modified Danio rerio strains, ethical aspects, and the acceptability of applying this model in neurogenic studies, it is clear that Danio rerio, as well as other fish species, can be used as an alternative for early preclinical evaluation of the efficiency of viral vectors.

Keywords: *adenovirus, gene targeting, Danio rerio, gene therapy, ventral tegmental area, glucuronidase*

Received 08 February 2022; Revised 21 February 2022; Accepted 25 February 2022

For citation: Pushchina E.V., Kapustyanov I.A., Varaksin A.A. Viral Vectors in Transgenic Research: Prospects for the Treatment of CNS Diseases and Gene Therapy. *Pacific Medical Journal.* 2022;1:46–55. doi: 10.34215/1609-1175-2022-1-46-55

Corresponding author: Evgeniya V. Pushchina, PhD of Biological Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of Cellular Differentiation A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences (17 Palchevsky St., Vladivostok, 690041, Russian Federation); ORCID: 0000-0003-0388-3147; e-mail: puschina@mail.ru

Вирусные векторы обеспечивают универсальную систему переноса генов млекопитающих и широко используются не только в клинических исследованиях генной терапии [1], но и в фундаментальных [2]. Недавние изыскания показали, что они могут быть эффективными инструментами для внедрения чужеродных генов через гомологичные рекомбинации [3]. Аденовирус (Ad) эффективно вводит двуцепочечную ДНК в клетки, экспрессирующие вирусный и аденовирусный рецептор Коксаки (CAR), но при этом не интегрируется в геном хозяина [4]. Хелпер-зависимые аденовирусные векторы с удаленным вирусным геномом обладают низкой цитотоксичностью и поэтому могут быть использованы при более высоких

© *Пущина Е.В., Капустянов И.А., Вараксин А.А., 2022*

инфекционных титрах. Расширенная способность клонирования вспомогательных аденовирусов облегчает высокоэффективную репарацию генов с помощью гомологичной рекомбинации в мышиных эмбриональных стволовых клетках и эмбриональных стволовых клетках приматов [5, 6].

Другой тип представляет аденоассоциированный вирус (AAV), который способен внедряться в одноцепочечную ДНК клеток с низкой частотой интеграции в геном хозяина [1, 2], также является перспективным вектором для генного таргетинга и используется для коррекции доминирующей мутации в мезенхимальных стволовых клетках у пациентов с несовершенным остеогенезом [7].

В недавних исследованиях установлена эффективность инфекции переносчиков вирусов млекопитающих, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов и лентивирусов к клеточной линии Сертоли и эмбриональной клеточной линии данио *Danio rerio* [8]. Среди протестированных вирусных векторов аденовирусы показали наиболее высокую эффективность инфекции в клетках данио *D. rerio* [9]. Аденовирусный переносчик был также инфицирован в соматической линии клеток семенника медаки *Oryzias latipes*, которая создавалась на основе p53-дефицитных мутантов [10]. В этих исследованиях было обнаружено, что Ads могут успешно инфицировать культивируемые эмбриональные клетки данио. Таким образом, из результатов исследований видно, что аденовирусный вектор может быть использован в качестве хромосомно-неинтегрируемой векторной системы в клетки *D. rerio* [11].

В последние несколько десятилетий для изучения развития позвоночных появились две удобные генетические системы на моделях телеостей: данио *D. rerio*, у которого успешно был осуществлен крупномасштабный химический мутагенез [11], и медаки *O. latipes* с долгой историей использования в генетических экспериментах, где было установлено множество спонтанных и индуцированных мутаций [12]. Значительные достижения были получены, в частности, при культивировании мужских зародышевых клеток, и трансплантации ядра, как в клетки данио [8,9], так и медаки [10, 13]. Результаты этих исследований показали, что некоторые из данных методов позволяют передавать генетические изменения зародышевой линии. Очевидно преимущество от использования подобной методологии в дальнейшем, однако с ограничениями систем, которые могли бы успешно и эффективно ввести чужую, способную рекомбинировать с эндогенными гомологичными последовательностями, ДНК в модельные организмы. Такие методы пока находятся в состоянии разработки, хотя некоторые из упомянутых выше вирусных векторов, вероятно, подойдут для подобных целей несмотря на то, что ранее они не были доступны для использования на моделях рыб.

Чтобы разработать неинтеграционную вирусную векторную систему для рыб, проводили оценку эффективности инфекции Ad и AAV векторов в клетках данио на основе лентивиральных векторов. Результаты показали, что Ad вектор может быть использован для внедрения чужеродного гена в клетки данио с гораздо большей эффективностью, чем лентивиральные векторы [14]. Кроме того, Ad векторы эффективно заражают не только соматические клетки медаки, но и сперматозоиды, и сперматоциты данио *in vitro* с низкой эффективностью. Установлено, что Ad вектор млекопитающих может инфицировать клетки как данио, так и медаки [14]. Таким образом, была обоснована возможность применения данной векторной системы, по крайней мере на данио, хотя ее эффективность по-прежнему в 1000 раз ниже, чем в клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши. С помощью GFP репортера была обнаружена вирусная инфекция, однако, вполне возможно, что ее эффективность недооценивается из-за низкой флуоресценции или отсутствия экспрессии GFP. По этой причине CMV промотор, широко использующийся в клетках млекопитающих, не может эффективно применяться для клеток данио. В действительности, в подобных экспериментах наблюдались мозаичные узоры экспрессии CMV промотор-усиленного GFP трансгенных данио и низкие уровни экспрессии GFP в клетках, инфицированных небольшим количеством Ad векторов [15]. Использование более эффективного промотора и более чувствительного метода обнаружения, в частности мониторинга Cre-экспрессии Ad вектора или количественных ПЦР, скорее всего, позволит более точно оценивать эффективность вирусной трансдукции.

В отличие от инфицирования с помощью Ad, в популяции клеток данио было получено меньше, чем ожидалось GFP-положительных клеток, инфицированных вирусом везикулярного стоматита G (VSV-G) на основе лентивируса [16]. Было установлено, что ретровирус MoMLV-VSV-G, имеющий тот же белок оболочки, инфицирует значительно эффективнее и облегчает мутагенные вставки в клетки данио [17]. Следовательно, маловероятно, что низкая эффективность лентивируса является результатом связывания поверхности клетки [18]. Чтобы в будущем использовать интеграза-дефектный лентивирус, необходимо будет определить внутри- и межклеточные процессы, которые происходят после связывания в клетках данио или медаки. Результаты этих исследований показали, что эффективность Ad-инфекции сильно варьирует между клетками данио и медаки [14]. Ads инфицируют клетки данио в несколько сотен раз эффективнее, чем клетки медаки, тем не менее, эффективность инфицирования клеток медаки многократно усиливается при использовании магнитных частиц.

Важные данные были добыты при определении гомолога гена рецептора Коксаки (CAR) мыши в базе данных данио (73,1% идентичности), но высокая идентичность с генами мыши не характерна для генов медаки [14]. Известно, что линия клеток радужной

форели CHSE-214 имеет более высокий тропизм к Ad, чем другие линии клеток карпа, белого осетра, толстоголового пескаря, морского окуня и тилапии, и обладает высокой гомологией CAR, что необходимо для присоединения Ad [19]. Тропизм к Ad, вероятно, имеет видо-специфический характер. Хотя рецептор у медаки, связывающий Ad, неизвестен. Более низкая эффективность инфекции для Ad вируса у медаки может быть вызвана низким сродством к Ad млекопитающих и/или низким уровнем экспрессии рецептора. Таким образом, в будущем представляет интерес определить, повышает ли эффективность Ad инфекции у данио, и медаки введение гена CAR млекопитающих [14].

Есть несколько сообщений, в которых мужские зародышевые клетки мышей были признаны устойчивыми к инфекции Ad в отличие от клеток Сертоли, при введении Ad вирусов в семенные канальцы [20, 21]. Даже в условиях культуры клеток после прямого воздействия на зрелую сперму мыши *in vitro* Ad векторами наблюдались признаки инфекции [20]. Однако недавно получены сведения об успешной трансдукции сперматогенных стволовых клеток Ad векторами с помощью метода высокой чувствительности [21]. Расхождения могут быть обусловлены стадиями развития, на которых мужские половые клетки были инфицированы вирусами. Необходимо учитывать, что мужские половые клетки теряют способность к инфицированию Ad вирусом во время развития [20]. Согласно другим данным сперматогонии и сперматоциты данио могут быть инфицированы Ad переносчиками *in vitro*, но при этом инфицирована лишь небольшая часть сперматогоний и ни одного сперматозоида [22]. Впрочем, пока нет сведений о способностях сперматогониальных стволовых клеток к инфицированию вирусом у данио, тем не менее, вполне возможно, что мужские зародышевые клетки постепенно теряют эту компетенцию во время эмбриогенеза. В контексте эффективного получения трансгенной спермы следует определить стадии, на которых эти клетки восприимчивы к вирусным инфекциям. Таким образом, есть необходимость проведения соответствующих анализов методом высокой чувствительности [21].

Недавно появились данные, что насекомые, не интегрирующие вектор бакуловируса, могут использоваться для трансдукции чужеродного гена в клетки данио [23] и медаки [24]. Наличие неинтегрируемых вирусных векторов будет способствовать внедрению двойной ДНК в клетки организмов эффективно и мягко. Это перспективные методологии, применяемые при выполнении генетических манипуляций не только для гомологичной рекомбинации, но и для доставки специфических генов, в частности, нуклеазы цинковых пальцев или Cre-рекомбиназы.

Вирусные векторы широко востребованы в области генной терапии, при клинических испытаниях, проводимых каждый год для лечения различных патологий человека, с использованием все большего числа фармакологических средств, одобренных регулирующими органами [1, 25]. Однако доклиническое тестирование достаточно длительное и дорогостоящее, особенно на этапе развития [26]. В настоящее время общепринятым модельным организмом является мышь *Mus musculus* [27], но существуют немногочисленные исследования, в которых задействованы альтернативные модели, в частности *Danio rerio* для тестирования аденовирусных векторов *in vivo* [11]. В результате этих исследований были получены данные об эффективной трансдукции аденовирусных векторов E1/E3 при внутричерепном введении эмбрионам *Danio rerio* [11]. Необходимо подчеркнуть, что вспомогательные (высокопроизводительные) аденовирусные векторы позволяют устойчиво экспрессироваться трансгену в организме *D. rerio*. Принимая во внимание широкий репертуар генетически модифицированных линий *D. rerio*, этические аспекты и допустимость этой модели в нейрогенных исследованиях, очевидно, что *D. rerio*, как и другие виды рыб, может быть эффективной альтернативой для ранней стадии доклинических оценок аденовирусных векторов [11, 14, 19].

Генная терапия направлена на лечение или профилактику различных заболеваний человека с помощью генетических материалов и разнообразных подходов [28]. На сегодняшний день существует несколько механизмов для введения желаемого генетического материала в клетку-мишень, таких как физические методы (электропорация, микроинъекция и т.д.), химические методы (невирусные векторы) и вирусные векторы [29]. Вирусные переносчики представляют большой клинический интерес из-за их высокой эффективности, особенно когда генетический материал предназначен для достижения ядра [28]. Аденовирус был одним из первых для адаптации в качестве вектора генной терапии [26]. Эти вирусы, с капсидами размером 100 нм и линейными двуцепочечными геномами ДНК около 36 Кб, обеспечивают генетическую стабильность и высокую эффективность внедрения в различные типы клеток [29]. Оказавшись внутри клетки, вирусные капсиды деградируют запрограммированным образом и встраивают геномы в ядро клетки-мишени, где они остаются в эписомальном состоянии [30]. Ранние версии векторов E1/E3 первого поколения являются полезными инструментами для генетической передачи *in vitro*, но их использование *in vivo* ограничено стратегией вакцинации из-за короткой продолжительности экспрессии трансгена [11]. В основном это связано с тем, что остаточная экспрессия вирусных генов в трансдуцированных клетках вызывает цитотоксические иммунные реакции [31]. В отличие от этого аденовирусные векторы третьего поколения, также известные как векторы высокой емкости (HC-AdV), лишены всех вирусных кодирующих генов, только сохраняя две цис-действующие последовательности: инвертированный концевой повтор (ITRs) и упаковочные сигналы (ψ) [31]. Помимо расширенной способности к клонированию, эти векторы могут длительное время поддерживать экспрессию трансгена *in vivo* в органах

с медленным клеточным циклом, таких как печень [25] или мозг [32].

В области нейробиологии Ad векторы используются для маркировки различных популяций нейронов [31, 33], отслеживания клона нервных клеток [30, 33] и модуляции функции нейронов [34].

Введение аденоассоциированного вируса в ядра тегментума мыши приводят к его широкому распространению в мозге и потенциальной коррекции нейрогенетических заболеваний

Аденоассоциированный вирусный вектор-опосредованный перенос нормальной ДНК может исправить метаболические дефекты в месте инъекции, но лечение всего мозга требует широко распространенной доставки нормальных гена и/или белка. Современные методы требуют нескольких инъекций для широкого распространения вектора. Впрочем, некоторые векторы AAV могут транспортироваться по нейрональным путям, связанным с областью инъекции. Таким образом, таргетинг широко рассредоточенных систем в ЦНС может обеспечиваться путем рассеивания генов с ограниченного числа участков. Эта гипотеза была протестирована в вентральной тегментальной области (VTA), являющейся областью мезенцефалона с многочисленными эфферентными и афферентными проекциями [35]. Одна инъекция приводила к переносу генома вектора к участкам проекции в дистальных частях мозга. По сравнению с инъекциями в стриатум, инъекция VTA создавала более высокие уровни ферментов во многих областях мозга. После инъекции VTA наиболее широко распространялся вектор серотипа AAV-9, тем не менее, наблюдалась транспортировка и других серотипов AAV-Rh.10 и AAV-1.

Существует несколько серотипов доступных аденоассоциированных вирусов (AAV), каждый включает различные вирусные белки капсида и служит связующим звеном разных характеристик трансдукции в мозге [35, 36]. Некоторые серотипы AAV транспортируются по нейрональным проекциям инъецированного ядра [35, 36]. Было выдвинуто предположение, что инъекция транспортируемого вектора в мультипроекционный регион мозга приведет к широкому распространению терапевтического гена, тем самым осуществляя эффекты терапевтической коррекции в большом объеме нервной ткани с помощью одной инъекции [37].

Чтобы проверить это, AAV вводили в вентральную тегментальную область (VTA), группу ядер с дивергентными эфферентными и афферентными проекциями. Инъекции AAV-1, AAV-9, или AAV-Rh.10, экспрессирующих ДНК для лизосомального фермента – глюкоронидазы (GUSB), в результате переноса генома на дистальных проекционных участках VTA. Кроме того, некоторые лизосомальные ферменты сами по себе могут быть транспортированы по нейрональным путям, и это приводит к доставке ферментов даже на более дальние расстояния в мозге [38]. Таким образом, два транспортных механизма в состоянии работать синергетически, что заметно повышает эффект потенциальной терапевтической коррекции с помощью одной инъекции [35, 39]. AAV-9 приводил к увеличению числа трансдуцированных клеток во многих проекционных участках VTA и более высоким уровням экспрессии ферментов в мозге. Проекции из стриатума были менее обширны, чем из VTA, и инъекции того же объема AAV-9 в стриатуме перенесли мРНК только к стриатальным проекциям; гораздо меньше экспрессии фермента было выявлено при инъекции в стриатум по сравнению с инъекцией в VTA [35].

Чтобы проверить, в какой степени инъекция AAV в VTA может влиять на коррекцию патологии болезни, использовали мышиную модель заболевания лизосомального хранения мукополисахаридоза VII (MPS VII), вызванного мутациями в гене GUSB. При однократной инъекции AAV-9 GUSB в VTA животных MPS VII в результате коррекции лизосомального хранения во всех регионах мозга животные были обследованы через 2 месяца после инъекции.

В настоящее время установлено, что лечение с использованием векторов AAV требует от 50 до 350 инъекционных участков, чтобы достичь широкого распространения лизосомального фермента в мозге младенцев [40]. Для применения векторов в лечении метаболических расстройств должны быть разработаны особые стратегии генной терапии, при которых терапевтические ген или белок могут достичь всего мозга путем более ограниченного количества инъекций.

Лизосомальные ферменты транспортируются в некоторых аксональных путях в результате коррекции патологии заболевания в дистальных участках инъекции [38,39]. Однако области между инъецированным участком и дистальным участком доставки фермента посредством внутриклеточного транспорта по-прежнему имеют значительные лизосомальные хранилища [38], предполагая, что только ограниченный объем мозга может быть исправлен исключительно с помощью фермента транспорта.

Некоторые векторные серотипы AAV являются посредниками при переносе генома в ретроградном направлении [35]. Векторный транспорт AAV-9 приводит к увеличению распределения ферментов GUSB [36] по сравнению с исследованиями, в которых вектор не был транспортирован [35].

В ранних исследованиях применяли транспортные возможности AAV для достижения более широкого распространения вирусных векторов и ферментов [37, 38]. В таком случае предполагалось, что инъекция транспортируемого вектора в область с несколькими разнонаправленными проекциями может организовать транспорт вдоль этих проекций для распределения терапевтического гена в большем объеме мозга [39, 40]. VTA был выбран потому, что имеет ретро- и антероградные проекции к большинству областей мозга. Данные о ретроградных [41] и антероградных [42, 43] мишенях VTA свидетельствуют, что большинство проекционных областей является реципрокным.

Отчасти по этой причине было невозможно окончательно определить, в каком направлении осуществлялся транспорт. Однако инъекция AAV-1 или AAV-9 привела к идентификации вектор-положительных клеток в антероградных мишенях VTA в большей степени, чем при инъекции AAV-Rh.10 [37]. К тому же паттерн экспрессии вектор-положительных клеток после инъекции AAV-9 или AAV-1, похоже, соответствует антероградным паттернам [43], предполагая, что антероградный транспорт может способствовать наблюдаемому распределению. Нахождение вектора мРНК в телах клеток в области стриатарной антероградной проекции интересно, поскольку в антероградном направлении вектор свободно транспортируется и принимается местными клетками в составе антероградной проекции [41, 43]. Необходимы дополнительные исследования для определения механизма, в результате которого это происходит.

Особенности транспортировки генома вектора в дистальные нейроны пока не ясны. Знание скорости, с которой происходит транспортировка, может обеспечить понимание потенциальных механизмов использующих вектор [42]. При вхождении вектора AAV в клетку первым этапом становится избавление от оболочки для раскрытия генома AAV, после чего происходит повторный синтез ДНК вируса. Обнаружение мРНК в транс-индуцированных клетках – процесс, занимающий от нескольких дней до недели – зависит от используемого серотипа [44]. Ковалентное маркирование цианином-3 (Cy3) AAV векторов обеспечивает надежный способ отслеживания местоположения вирионов AAV в ранние периоды времени после инъекции [45]. Маркированный вектор Cy3 переносился к мишеням проекционных областей между 1 и 24 ч после инъекции. Частицы, маркированные Cy3, идентифицировались вне ядра в дистальных телах клеток, что может быть связано с задержкой, необходимой для ввода генетического материала в ядро [46].

Результаты генетического таргетинга Cy3 показали, что в течение 1 месяца мРНК определялись в большинстве регионов, тем не менее, сигнал Cy3 был выявлен не во всех проекционных зонах VTA, в частности GUSB мРНКне идентифицировался в миндалине [37]. Отсутствие сигнала на некоторых проекционных участках может отражать порог обнаружения частиц. В качестве альтернативной гипотезы можно предположить: поскольку механизм транспорта для этого вектора неизвестен, транспортировка вектора может занять больше времени в одних регионах, чем в других.

Частицы, маркированные Cy3, были обнаружены в коре, где в течение 1 месяца после инъекции не были выявлены мРНК [45]. Присутствие маркированных частиц вектора Cy3 в дистальных сайтах поддерживает идею о том, что транспортируется сам вектор, а не GUSB мРНК [46]. Таким образом, распространение в течение 24 часов после инъекции, допускает, что действует быстрый аксональный транспорт, при участии микротрубочек и других компонентов цитоскелета. Векторы AAV, включая AAV-Rh.10, как было показано, связываются с микротрубочками, опосредованно взаимодействуя с динеином, чтобы облегчить проникновение в ядро [47]. Возможно, что ретроградный и антероградный аксональный транспорт векторов AAV также микротрубочко-зависимые процессы, осуществляемые с помощью молекулярных двигателей кинезина, который движется в антероградном направлении, или MAP-1C (микротрубо-ассоциированный белок 1С), который движется в ретроградном направлении [48].

Вектор AAV-9 был транспортирован в проекционные участки VTA и стриатум в разных количествах [47]. Это, вероятно, связано с особенностями проецирования в различные регионы VTA или стриатума или может быть обусловлено другими ограничениями на транспортировку, в частности, инъекционным областям может потребоваться минимальное количество проекционных волокон для обнаружения векторного транспорта. Два региона, которые получили несколько клеток от инъекции VTA, включают лобную кору и глубокие мозжечковые ядра, и эти регионы, как было установлено, имеют меньше проекционных волокон, чем другие регионы, такие как хабенула или спинной шов [43].

Способность фермента GUSB транспортироваться по нейрональным проекциям увеличивает потенциальное расстояние ферментативной коррекции от места инъекции [37]. Тем не менее по-прежнему существуют ограничения в степени коррекции, потому что фермент GUSB, как полагают, переносит только прямые проекции синтеза ферментов клеткой. Пределы распространения ферментов в мозге очевидны после инъекции в стриатум, который не имеет обширных дистальных или контралатеральных проекций [41]. Инъекция вектора в этот регион вызывала перенос вирусного генома в проекционные области, но поскольку данные проекции не являются длинноаксонными, уровни ферментов, в результате, были высокими только вблизи места инъекции. Инъекция в область с широко распространенными проекциями, такими как VTA, позволяет транспортироваться AAV вектору в дистальные проекционные участки VTA, где клетки могли осуществлять синтез фермента, который дополнительно транспортировался к проекционным участкам этих клеток, что в конечном результате привело к распределению ферментов GUSB по всему мозгу после одной инъекции небольшого объема [40].

Таким образом, мышь с синдромом MPS VII представляет эффективную модельную систему, в которой тестируются векторы генной терапии. Фенотип мыши во многом соответствует таковому при болезни человека [49]. Анализ результатов инъекций в VTA с AAV-9 GUSB животным синдромом MPS VII через 2 месяца показал, что уровни лизосомальных ферментов не отличались от контрольных мышей во всех областях мозга. В этих экспериментах в мозг мыши (массой около 400 мг) вводили 1 мкл вектора; для сравнения,

мозг годовалого ребенка (массой 800 г) потребует инъекции 2 мл для пропорционального распределения вектора. Не исключено также, что инъекции менее 1 мкл было бы достаточно для транспортировки вектора и экспрессируемых им ферментов, которые были обнаружены в ходе эксперимента. Лечение генетических нарушений ЦНС все еще затруднено из-за инвазивного характера требуемых методов лечения. Ориентируясь на те отделы мозга, которые имеют обширные проекции, можно увеличить рассеивание транспортируемых векторов AAV от ограниченного числа инъекций.

Использование энхансерных аденовирусных векторов на модели Danio rerio

На протяжении многих лет для оценки векторов генной терапии был установлен широкий спектр модельных организмов. В этом смысле использование рыб в качестве модельного организма по сравнению с мышами имеет ряд преимуществ. В частности, рыбам небольших размеров во взрослом состоянии требуется меньше места для обслуживания, облегчаются манипуляции, и появляется возможность работы с большим числом животных по более низкой цене [11, 14]. Другим преимуществом является воспроизводство рыб. Каждая пара *Danio rerio* может производить сотни яиц в неделю, которые могут быть оплодотворены извне с последующим независимым от матери эмбриональным развитием. Это позволяет анализировать ранние этапы эмбрионального развития и последующие стадии онтогенеза на протяжении всего процесса. Эмбриональное и постэмбриональное развитие рыб происходит довольно быстро, предоставляя возможности обнаружения любой аномалии в течение нескольких дней [50]. При этом генетические аномалии, такие как нокауты и нокдауны *Danio rerio* легко получить, и около 70% генов кодирования белка человека, связанных с болезнями, имеют эквивалентный ген в *Danio rerio*, что позволяет ученым изучить болезни человека в больших масштабах [51].

Исследование трансдукции векторов первого поколения и HC-Ad репортерного гена люциферазы в эмбрионах *Danio rerio* показало, что векторы E1/E3 и HC-Ad (Ad-EGFP и HCA-EGFP, соответственно) разработаны с тем же промотором и капсидом, и таким образом, следует ожидать эквивалентные уровни экспрессии этих генов [11]. Несмотря на то, что генный тропизм был сходным, количество трансдуцированных особей статистически достоверно отличалось ($p < 0,05$). Подобная изменчивость была обусловлена различными концентрациями для каждого вектора. Микроинъектор, с помощью которого осуществляли подачу вектора, работал с фиксированным давлением, но не с фиксированным объемом. Кроме того, необходимо учитывать, что интенсивность экспрессии GFP в трансдуцированных клетках могла повлиять на геном вектора. Сильные вирусные энхансеры, присутствующие в векторах E1/E3, могут усиливать экспрессию трансгена в отличие от векторов HC-Ad. Более сильная экспрессия в инфицированных клетках с Ad-EGFP может облегчить визуализацию в флуоресцентном микроскопе, способствуя восприятию более высокой скорости трансдукции [11].

Результаты исследования летальности не показали отличий между обработкой различными типами векторов, выживаемость рыб составила более 80%. В этих наблюдениях была исключена острая токсичность, наступающая в результате инфекции при введении вирусных генов. E1/E3-удаленные векторы сохранили большинство вирусных генов в составе генома, в отличие от HC-Ads. Хотя транскрипция этих генов была активирована E1A, остаточная экспрессия описана в отсутствии области E1 в клетках млекопитающих. Поэтому в рамках экспериментальных условий клетки, инфицированные Ad-EGFP, могут экспрессировать аденовирусные белки, а также большее количество зеленого флюоресцентного белка (GFP), по сравнению с HCA-EGFP. Оба элемента могут поставить под угрозу жизнеспособность трансдуцированных клеток. Хотя они не оказали заметного влияния на раннее развитие эмбрионов *Danio rerio*, сценарий был совершенно иным, когда выживание исследовалось в долгосрочной перспективе. Увеличение смертности при этом наблюдалось после 72 л.с. Это было связано с изменениями окружающей среды и тем, что *Danio rerio* обладают высоким репродуктивным уровнем, поэтому можно было бы ожидать, что индивидуальное выживание эмбрионов будет снижаться. Однако все особи, обработанные Ad-EGFP, погибали до 11 dpi и демонстрировали более апатичное поведение с медленными движениями, становясь легкодоступными для отлова. В отличие от этого, более 30% рыб с экспрессией HCA-EGFP, при наблюдении в течение 35 дней характеризовались нормальным поведением. Для таких отличий были установлены потенциальные причины. Вполне возможно, что высокий уровень экспрессии GFP в клетках, инфицированных Ad-EGFP, вызывал накопительную токсичность в клетках, что не было очевидно в течение первых 72 л.с. [52]. Теоретически, участие клеточной иммунной реакции против GFP или вирусных эпитопов, экспрессируемых клетками, маловероятны, учитывая, что инъекция была выполнена при 48 л.с., когда эмбрионы имеют незрелую иммунную систему [53]. Тем не менее не исключена возможность того, что иммунная толерантность не была полностью установлена в условиях анализа, и сохранение антигенной экспрессии вызвало поздние иммунные реакции [54]. В этом отношении основным отличием между клетками, инфицированными HCA-EGFP и Ad-EGFP, оказалось наличие аденовирусных антигенов в последнем, которые были описаны как отличная цель для цитотоксических реакций у млекопитающих [55]. Таким образом, накопительная клеточная токсичность, вызываемая вирусными белками, и/или высокая экспрессия GFP была наиболее вероятным объяснением снижения выживаемости

данио, инфицированных Ad-EGFP, хотя не исключены иммунные реакции против остаточной вирусной экспрессии генов.

Наконец, что касается поддержания экспрессии трансгена вектором HC-Ad, установлен флуоресцентный мониторинг до 32 дней. То есть для клинического применения повторные введения должны быть примерно в этот период времени, предполагая аналогичные показатели репликации клеток в области интереса [32]. Тем не менее другие исследования на грызунах и других млекопитающих показали долгосрочные экспрессии в течение одного года [25]. Вероятно, это связано с более высокой клеточной скоростью репликации у эмбрионов по сравнению со взрослым человеком, у которого наблюдается эффект «разбавления трансгенов». Установлено, что потеря экспрессии соответствует второй половине эмбрионального перехода от личинки в ювенильную стадию (которая прошла через три дня после оплодотворения, примерно до 30 дней после оплодотворения), период, когда они также значительно увеличились в размерах и морфологии, поддерживает это объяснение [11].

Аденорецепторы и их аналоги для доставки аденовирусных векторов в клетки рыб

Проводились исследования с оценкой эффективности аденовирусных векторов для доставки генов в клетки рыб как *in vitro*, так и *in vivo*. В этих работах использовались переносчики аденовируса человека серотипа 5 (Ad), которые применяются в клинических испытаниях на человеке, но не были оценены для доставки генов в клетки рыб [14], так как на сегодняшний день еще мало известно о вирусных рецепторах в клетках рыб, в частности аденорецепторах Ad (Ad5Luc1) и Ad (Ad5LucRGD) с природным тропизмом к рецептору аденовируса Коксаки (CAR). Экспрессия гена была обнаружена в клеточных линиях с помощью обоих векторов [56]. Предполагается, что эти клетки обладают гомологом CAR, который является связующим звеном прикрепления Ad, похожим на аналог этого рецептора в клетках млекопитающих. В этих исследованиях использовали несколько методов доставки гена *in vivo*, со значительной экспрессией, через внутримышечную инъекцию, хотя эффективность инфекции была сравнительно низкой. Таким образом, было установлено, что некоторые клеточные линии костистых рыб способны к трансдукции аденовирусного вектора, и одна клеточная линия экспрессировала человеческий серотип гомолога аденовирусного рецептора, способствующего AdV инфекции. Исследования *in vivo* показали, что мышцы радужной форели могут быть заражены Ad векторами, предлагая стратегию альтернативной доставки генов для этого животного [19].

Исследования в области генной терапии были ассоциированы с резким увеличением диапазона стратегий доставки генов, доступных для достижения трансдукции *in vivo* [28, 50, 51]. Среди используемых векторных стратегий рекомбинантные, репликационно некомпетентные аденовирусы (Ad) в настоящее время являются преобладающими векторными агентами, оцениваемыми в клинических испытаниях [27]. Преобладание Ad в этой обстановке служит прямым следствием относительно более высоких уровней доставки генов, достижимых с этим агентом по сравнению с другими системами. Кроме того, векторы Ad могут быть легко произведены в высоком титре, имеют удобный трансген емкости упаковки и, как правило, оказываются безопасными в испытаниях.

Аденовирусы, как известно, заражают все классы позвоночных и, как установлено, считаются относительно непатогенными для низших позвоночных [9, 11-14, 19]. Таким образом, эти агенты могут очень подходить для передачи генов в клетки рыб при вакцинации или в других экспериментальных исследованиях, где есть интерес к экспрессии конкретных генов [57]. Кроме того, в последнее время было много технологических достижений в разработке векторов Ad, в частности в отношении генетически модифицированного тропизма, который может значительно улучшить инфекционность базового вектора [58].

Простое и эффективное средство доставки генетического материала в клетки и живые организмы является ценным активом для исследований, связанных с регулируемой экспрессией определенных генных продуктов, доставкой вакцин и генным таргетингом. В настоящее время клеточная трансдукция в клетки костистых рыб проводится, как правило, с помощью решений ионной проницаемости и электропорации в клеточной культуре и посредством прямого контакта с плазмидной ДНК животных [58]. Результаты проведенных исследований показали потенциальные преимущества применения вирусных векторов для переноса в клетки рыб как *in vitro*, так и *in vivo* с экспрессией интересующего гена. Тем не менее эффективность трансдукции *in vivo* оказалась гораздо меньше, чем для этих же переносчиков у лабораторных штаммов крыс и мышей [59].

Аденовирусные векторы в испытаниях на людях содержат природный рецептор-связывающий домен, который направляет прикрепление вируса к CAR на поверхности клетки [58]. После первичной привязки вирион далее опосредуется через взаимодействие между мотивами аргинилглициласпарагиновой кислоты (RGD-мотивами) в пентонном белке в основании волокна и клеточных интегринах [60]. В отсутствие CAR эти вирусы, как считают, могут использовать RGD-интегриновое взаимодействие в качестве средства первичного связывания, хотя и менее эффективно, чем с CAR [61]. В исследованиях с привлечением различных установленных линий клеток человека, первичных линий и опухолевого материала человека, было установлено, что определенные ткани являются рефрактерными для инфекции Ad из-за дефицита CAR [62]. Как более широко экспрессируемые интегрины, эффективность трансдукции многих из этих клеток была улучшена

с использованием тропизм-модифицированных векторов, в которых интегрин-связывание RGD мотива был генетически включен в высокодоступный HI-цикл области домена ручки [63]. Эти модифицированные векторы, как ожидается, будут востребованы в испытаниях на человеке очень скоро. В настоящее время ничего не известно об экспрессии CAR в клетках рыб, но предполагается, что, если CAR (или его гомолог) присутствовали на некоторых клеточных линиях, вполне вероятно, что интегрины будут более широко экспрессироваться. Результаты исследований *in vitro* подтвердили эту гипотезу, потому что большинство линий было более легко инфицировано RGD-модифицированными векторами; однако *in vivo* не было выявлено значительного улучшения экспрессии с вектором RGD [61]. Причина этого отсутствия эффективности *in vivo* требует дальнейшего изучения. Учитывая вышесказанное и результаты анализов на основе обнаружения экспрессии генов, активность промотора CMV выглядит проблематично [64]. Тем не менее результаты *in vitro* свидетельствуют о том, что промотор был активен в клетках рыб, и ранее было показано, что основанные на CMV промоторе векторы достигли экспрессии генов *in vivo* у рыб при доставке в виде плазмид с использованием внутримышечных инъекций и/или генной пушки [65].

Еще одним фактором может быть температура. Хотя предпринимались попытки решить эту проблему, некоторые исследования дали отрицательные результаты из-за плохой жизнеспособности клеточных линий при температурах, необходимых для поддержания жизнеспособности живых рыб. Исследование вируса Семлики для доставки генов в клетки рыб в культуре показало гораздо меньшую эффективность при низких температурах [66]. Вполне возможно, что в недавно обнаруженный Ad белого осетра *Acipenser transmontanus* [26] может быть адаптирован как более эффективный вектор для решения этих задач.

Одним из самых интересных результатов было открытие функционального гомолога CAR в клетках рыб, в первую очередь на клеточной линии лосося CHSE-214. На сегодняшний день CAR человека и мыши (hCAR и mCAR, соответственно) были клонированы и охарактеризованы [67]. CAR относится к иммуноглобулину (Ig) суперсемейства рецепторов, и описанные версии обладают двумя внеклеточными Ig-подобными доменами. В настоящее время нормальная функция CAR неизвестна. Усилия по созданию CAR-нокаутных мышей до сих пор не увенчались успехом, предполагая, что CAR может регулировать некоторые критические функции в эмбриогенезе. Вызывают интерес некоторые данные, свидетельствующие о том, что потеря CAR у опухолевых клеток связана с формированием более злокачественного фенотипа [68]. Если существование CAR-подобных молекул у рыб (pCAR) будет подтверждено, это может стать еще одним доказательством того, что критически важные функции требуют эволюционного сохранения.

Несмотря на возможность использования рекомбинантных Ad векторов для трансдукции в клетки рыб в культуре, применение человеческого серотипа Ad для доставки генов в живых рыб в настоящее время не практично. Перенос Ad векторов может быть полезен для специфической экспрессии в мышцах, или если доставка по этому пути имеет некоторые преимущества экспрессии, например, для вакцин. Тем не менее эти результаты показывают, что гены могут быть доставлены и экспрессируются с помощью рекомбинантного Ad вектора, при 37˚C в клетки рыб, при условиях, необходимых для инфицирования человека. Показано, что виды Ad, недавно изолированные в клетках рыб, не вызывают какого-либо патогенеза у молоди белого осетра, что позволяет относительно просто отслеживать развитие Ad вектора человека в клетках рыб [26-28]. Это дает возможность для манипулирования вирусной привязкой или реинжинирингом естественных Ad рыбы стратегией массовой иммунизации. Таким образом, возможна разработка для трансдукции путем погружения или некоторыми аналогичными средствами.

Заключение

Результаты исследований последних лет показали, что использование новых модельных объектов на животных, и в частности рыбах, способствует развитию трансгенных технологий и способно обеспечить новые подходы для лечения некоторых заболеваний ЦНС, а также в генной и клеточной терапии. Вышеприведенные результаты говорят о возможности применения Ad векторов для заражения клеток костистых рыб в условиях культуры и с помощью прямых инъекций в мышцу рыб. Данный метод генетической трансдукции является функциональным, тем не менее, в дальнейшем необходимо разрешить несколько вопросов, касающихся модификации вируса для того, чтобы метод стал практическим средством доставки и экспрессии генов в живых рыб. Простое и эффективное средство доставки генетического материала в клетки и живые организмы станет ценным активом для исследований, связанных с регулируемой экспрессией определенных генных продуктов, доставкой вакцин и генным таргетингом. В настоящее время клеточная трансдукция в клетки костистых рыб проводится, как правило, посредством решений ионной проницаемости и электропорации в клеточной культуре и с использованием прямого контакта с плазмидной ДНК животных. Результаты проведенных исследований указывают на потенциальные преимущества вирусных векторов для переноса в клетки рыб как *in vitro*, так и *in vivo* с экспрессией интересующего гена, что дает возможность для манипулирования вирусной привязкой или реинжинирингом естественных стратегией массовой иммунизации. Таким образом, перспективна разработка для трансдукции путем погружения или другими аналогичными средствами.

Конфликт интересов: *авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.*

Источник финансирования: *работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90091.*

Литература / References

1. dos Santos Coura R., Beyer Nardi N. A role for adeno-associated viral vectors in gene therapy. *Gen. Mol. Biol.* 2008; 31: 1–11.
2. 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.* 2019; 13: 93.
3. Ricobaraza A., Gonzalez-Aparicio M., Mora-Jimenez L., Lumbreras S., Hernandez-Alcoceba R. High-capacity adenoviral vectors: expanding the scope of gene therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 3643.
4. Bopegamage, S., Berakova, K., Gomocak, P., Baksova, R., Galama, J., Hyoty, H., Tauriainen, S. Primary Site of Coxsackievirus B Replication in the Small Intestines: No Proof of Peyer's Patches Involvement. *Microorganisms.* 2021; *9:* 2600.
5. Ohbayashi F., Balamotis M.A., Kishimoto A., Aizawa E., Diaz A., Hasty P. Correction of chromosomal mutation and random integration in embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102: 13628–13633.
6. Suzuki K., Mitsui K., Aizawa E., Hasegawa K., Kawase E., Yamagishi T. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105: 13781–13786.
7. Chamberlain J.R., Schwarze U., Wang P.R., Hirata R.K., Hankenson K.D., Pace J.M. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfect. *Science.* 2004; 303: 1198–1201.
8. Kurita K., Burgess S.M., Sakai N. Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of in vitro-cultured sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101:1263–1267.
9. Lee K-Y., Huang H., Ju B., Yang Z., Lin S. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20:795–799.
10. Hong Y., Liu T., Zhao H., Xu H., Wang W., Liu R. Establishment of a normal medaka fish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004;101:8011–8016.
11. Gulías P., Guerra-Varela J., Gonzalez-Aparicio M., Ricobaraza A., Vales A., Gonzalez-Aseguinolaza G., Hernandez-Alcoceba R., Sánchez L. *Danio rerio* as model organism for adenoviral vector evaluation. *Genes.* 2019; 10:1053.
12. Furutani-Seiki M., Wittbrodt J. Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech. Dev.* 2004;121:629–637.
13. Wakamatsu Y., Ju B., Pristyaznhyuk I., Niwa K., Ladygina T., Kinoshita M. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98:1071–1076.
14. 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.* 2009;6:553–558.
15. Takehashi M., Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Ogura A., Shinohara T. Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;104:2596–2601
16. Mirow M, Schwarze LI, Fehse B, Riecken K. Efficient Pseudotyping of Different Retroviral Vectors Using a Novel, Codon-Optimized Gene for Chimeric GALV Envelope. *Viruses.* 2021;13(8):1471.
17. Amsterdam A., Hopkins N. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trend. Genet.* 2006;22:473–478.
18. Harrold, I., Carbonneau, S., Moore, B.M., Nguyen, G., Anderson, N.M., Saini, A.S., Kanki, J.P., Jette, C.A., & Feng, H. Efficient transgenesis mediated by pigmentation rescue in zebrafish. *BioTechniques*, 2016; 60(1), 13–20.
19. Overturf K., LaPatra S., Reynolds P.N. The effectiveness of adenoviral vectors to deliver and express genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish. Dis.* 2003;26:91-101.
20. Watanabe S., Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Matoba S., Ogura A., Shinohara T. In Vivo Genetic Manipulation of Spermatogonial Stem Cells and Their Microenvironment by Adeno-Associated Viruses. Stem Cell Reports. 2018. Vol. 10 (5), 1551-1564.
21. Kojima Y., Hayashi Y., Kurokawa S., Mizuno K., Sasaki S., Kohri K. No evidence of germ-line transmission by adenovirus-mediated gene transfer to mouse testes. *Fertil. Steril.* 2008;89:1448–1454.
22. Kanatsu-Shinohara M., Ogura A., Ikegawa M., Inoue K., Ogonuki N., Tashiro K. et al. Adenovirus-mediated gene delivery and in vitro microinsemination produce offspring from infertile male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;99:1383–1388.
23. Wagle M., Jesuthasan S. Baculovirus-mediated gene expression in zebrafish. *Mar. Biotechnol.* 2003;5:58-63.
24. Yan Y., Du J., Chen T., Yi M., Li M., Wang., Li C.M., Hong Y. Establishment of medaka fish as a model for stem cell-based gene therapy: efficient gene delivery and potential chromosomal integration by baculoviral vectors. *Exp. Cell. Res.* 2009;315:2322–2331.
25. Brunetti-Pierri N., Ng T., Iannitti D., Cioffi W., Stapleton G., Law M., Breinholt J. Transgene expression up to 7 years in non-human primates following hepatic transduction with helper-dependent adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 2013;24:761–765.
26. Crustal R. Adenovirus: The first effective in vivo gene delivery vector. *Hum. Gene Ther.* 2014;25:3-11.
27. Russell W.C. Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* 2000;81:2573-2604.
28. Lundstrom K. Viral vectors in gene therapy. *Diseases*. 2018;6:42.
29. Wang L., Li F., Dang L., Liang C., He B., Liu J. *In vivo* delivery systems for therapeutic genome editing. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17:626.
30. Hashimoto M., Mikoshiba K. Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the «birth date» of Purkinje cells. *J. Neurosci*. 2003;23:11342–11351.
31. Cwetsch A.W., Pinto B., Savardi A., Cancedda L. In vivo methods for acute modulation of gene expression in the central nervous system. Prog Neurobiol. 2018; 168: 69-85.
32. Barcia C., Jimenez-Dalmaroni M., Kroeger K., Puntel M., Rapaport A., Larocque D., King G. One-year expression from high-capacity adenoviral vectors in the brains of animals with pre-existing anti-adenoviral immunity: Clinical implications. *Mol. Gene Ther.* 2007;15:2154–2163.
33. Hashimoto M., Mikoshiba K. Neuronal birthdate-specific gene transfer with adenoviral vectors. *J. Neurosci.* 2004;24:286–296.
34. Francia S, Lodovichi C. The role of the odorant receptors in the formation of the sensory map. BMC Biol. 2021; 19(1) :174.
35. 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*. 2006;13:528–537.
36. Burger C., Gorbatyuk O.S., Velardo M.J., Peden C.S., Williams P., Zolotukhin S., Reier P.J., Mandel R.J., Muzyczka N. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol. Ther.* 2004;10:302–317.
37. 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.* 2007;27;9928–9940.

38. Passini M.A., Lee E.B., Heuer G.G., Wolfe J.H. Distribution of a lysosomal enzyme in the adult brain by axonal transport and by cells of the rostral migratory stream. *J. Neurosci.* 2002;22:6437–6446.
39. Luca T., Givogri M.I., Perani L., Galbiati F., Follenzi A., Naldini L., Bongarzone E.R. Axons mediate the distribution of arylsulfatase A within the mouse hippocampus upon gene delivery. *Mol. Ther.* 2005;12:669–679.
40. Vite C.H., McGowan J.C., Niogi S.N., Passini M.A., Drobatz K.J., Haskins M.E., Wolfe J.H. Effective gene therapy for an inherited CNS disease in a large animal model. *Ann. Neurol*. 2005;57: 355–364.
41. Geisler S., Zahm D.S. Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J. Comp. Neurol.* 2005;490;270–294.
42. Poisson C.L., Engel L., Saunders B.T. Dopamine Circuit Mechanisms of Addiction-Like Behaviors. Front Neural Circuits. 2021;15:752420.
43. Yetnikoff L., Lavezzi H.N., Reichard R.A., Zahm D.S. An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. Neuroscience. 2014;282:23-48.
44. Hauck B., Zhao W., High K., Xiao W. Intracellular viral processing, not single-stranded DNA accumulation, is crucial for recombinant adenoassociated virus transduction. *J. Virol*. 2004;78:13678–13686.
45. Ding W., Zhang L.N., Yeaman C., Engelhardt J.F. rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion. *Mol. Ther.* 2006;13:671–682.
46. Zengel J., Carette J.E. Structural and cellular biology of adeno-associated virus attachment and entry. *Adv. Virus Res*. 2020;106:39-84.
47. Kelkar S., De B.P., Gao G., Wilson J.M., Crystal R.G., Leopold P.L. A common mechanism for cytoplasmic dynein-dependent microtubule binding shared among adeno-associated virus and adenovirus serotypes. *J. Virol.* 2006;80:7781–7785.
48. Canty J.T., Tan R., Kusakci E., Fernandes J., Yildiz A. Structure and Mechanics of Dynein Motors. *Annu. Rev. Biophys*. 2021 May 6;50:549-574.
49. Derrick-Roberts A.L., Pyragius C.E., Kaidonis X.M., Jackson M.R., Anson D.S., Byers S. Lentiviral-mediated gene therapy results in sustained expression of β-glucuronidase for up to 12 months in the gus(mps/mps) and up to 18 months in the gus(tm(L175F)Sly) mouse models of mucopolysaccharidosis type VII. *Hum. Gene Ther*. 2014;25(9):798-810.
50. Albain J., Zon L.I. Of fish and men: Using zebrafish to fight human diseases. *Trends Cell Biol.* 2013;23:584–586.
51. Howe K., Clark M., Torroja C., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J., Humphray S., McLaren K., Matthews L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496:498–503.
52. Lam S.H., Chua H.L., Gong Z., Lam T.J., Sin Y.M. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: A gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol*. 2004;28:9–28.
53. Zhang B., Shimada Y., Hirota T., Ariyoshi M., Kuroyanagi J., Nishimura Y., Tanaka T. Novel immunologic tolerance of human cancer cell xenotransplants in zebrafish. *Transl. Res*. 2016;170;89–98.
54. Zirger J.M., Puntel M., Bergeron J., Wibowo M., Moridzadeh R., Bondale N., Barcia C., Kroeger K.M., Liu C., Castro M.G. Immune-mediated loss of transgene expression from virally transduced brain cells is irreversible, mediated by IFNγ, perforin, and TNFα, and due to the elimination of transduced cells. *Mol. Ther.* 2012;20:808–819.
55. Bonehill A., Heirman C., Thielemans K. Genetic approaches for the induction of a CD4+ T cell response in cancer immunotherapy. *J Gene Med*. 2005;7(6):686-95.
56. Kim S., Lee K., Kim M.D., Kang S., Joo C.W., Kim J.M., Kim S.H., Yu S.S., Kim S. Factors affecting the performance of different long terminal repeats in the retroviral vector. *Biochem. Biophys. Res*. Commun. 2006;343(4):1017-22.
57. Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev. Med. Virol*. 2009;19(3):165-78.
58. Myhre S., Henning P., Friedman M., Ståhl S., Lindholm L., Magnusson M.K. Re-targeted adenovirus vectors with dual specificity; binding specificities conferred by two different Affibody molecules in the fiber. *Gene Ther*. 2009;16(2):252-61.
59. Kurachi S., Koizumi N., Sakurai F., Kawabata K., Sakurai H., Nakagawa S., Hayakawa T., Mizuguchi H. Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. Gene Ther. 2007;14(3):266-74.
60. Meyer K.J., Pellack D., Hedberg-Buenz A., Pomernackas N., Soukup D., Wang K., Fingert J.H., Anderson M.G. Recombinant adenovirus causes prolonged mobilization of macrophages in the anterior chambers of mice. *Mol. Vis*. 2021; 27:741-756.
61. Einfeld D.A., Schroeder R., Roelvink P.W., Lizonova A., King C.R., Kovesdi I., Wickham T.J. Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *J. Virol.* 2001;75:11284–11291.
62. Lewis T.B., Glasgow J.N., Glandon A.M., Curiel D.T., Standaert D.G. Transduction of brain dopamine neurons by adenoviral vectors is modulated by CAR expression: rationale for tropism modified vectors in PD gene therapy. *PLoS One*. 2010;5(9):e12672.
63. Stepanenko A.A., Chekhonin V.P. Tropism and transduction of oncolytic adenovirus 5 vectors in cancer therapy: Focus on fiber chimerism and mosaicism, hexon and pIX. Virus Res. 2018; 257:40-51.
64. Ballesteros N.A., Alonso M., Saint-Jean S.R., Perez-Prieto S.I. An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (Oncorrhynchus mykiss). *Fish Shellfish Immunol*. 2015;45(2):877-88.
65. Lee J.Y., Hirono I.I., Aoki T. Stable expression of a foreign gene, delivered by gene gun, in the muscle of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Mar. Biotechnol*. 2000;2:254–258.
66. Puglia A.L., Rezende A.G., Jorge S.A., Wagner R., Pereira C.A., Astray R.M. Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. *J. Virol. Methods*. 2013;193(2):647-52.
67. Herrmann L., Schelletter L., Hoffrogge R., Niehaus K., Rudolph V., Farr M. Human Coxsackie- and adenovirus receptor is a putative target of neutrophil elastase-mediated shedding. Mol Biol Rep. 2022 Feb 5. doi: 10.1007/s11033-022-07153-2.
68. Chung J., Kim K.H., An S.H., Lee S., Lim B.K., Kang S.W., Kwon K. Coxsackievirus and adenovirus receptor mediates the responses of endothelial cells to fluid shear stress. *Exp Mol Med*. 2019;51(11):1-15.