

Сведения о выполненных работах в 2018 году
по проекту «**Неинвазивная визуализация естественного и индуцированного
нейрогенеза**», поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 18-15-00229

Руководитель д-р биол. наук Ходанович Марина Юрьевна

В течение первого года выполнения проекта были проведены теоретические и экспериментальные исследования по следующим направлениям:

- теоретические исследования по проектированию и выбору различных вариантов вирусных векторов,
- постановка и оптимизация новой для лаборатории техники интрацеребральных микроинъекций,
- эксперименты по введению вирусных векторов в мозг,
- иммуногистохимическое исследование экспрессии белков генов-репортеров для сравнения эффективности и специфичности разных типов вирусных векторов.

В рамках задачи 1 «Проектирования и синтеза различных вариантов вирусного вектора, предназначенного для маркирования новых нейронов *in vivo*» выполнен большой объем теоретических исследований по проектированию генетические вектора, которые при введении в мозг будут вызывать синтез ферритина только в молодых нейронах, присутствие которого можно будет выявить при помощи МРТ-сканирования. Теоретические задачи, которые были решены на этом этапе работ, включали подбор конкретных ДНК последовательностей для вставки в генетический вектор (промотор даблкортина, ген ферритина, ген зеленого флуоресцентного белка для дополнительного контроля специфичности), выбор типа вирусов для получения генетических векторов, их конструирование с учетом предельного размера вставки. В результате на основе лентивирусов и аденоассоциированных вирусов были спроектированы следующие генетические вектора: LV-DCX-eGFP-T2A-FerrH, AAV(2-9)-DCX-FerrH, AAV(2-9)-DCX-eGFP.

Для решения задачи 2 «Оптимизация процедуры введения вирусного вектора в мозг экспериментальных животных» научным коллективом была проведена большая работа по постановке методики процедуры введения вирусных векторов в мозг для эффективного заражения клеток в субвентрикулярной зоне вблизи боковых желудочков, являющейся основной зоной нейрогенеза в мозге. Для этого была модернизирована имеющаяся стереотаксическая установка, отработаны процедуры определения стереотаксических координат микроинъекции. Наиболее точное попадание произошло при выборе следующих координат: расстояние от Брегма 0.0 мм, латерально от срединного шва 3.5 мм, угол наклона 18.7°, глубина введения 4.67 мм. Экспериментально были определен объем вводимого раствора вирусных частиц, который не должен отрицательно повлиять на состояние тканей и в тоже время должен обеспечить успешную работу вирусных частиц. Экспериментально установлено, что при используемой нами концентрации вируса (примерно 10^8 частиц на 1 миллилитр) объем в 1 микролитр, вводимый в течение 10 минут, достаточен для высокоэффективного заражения клеток субвентрикулярной зоны

(до 40%) и одновременно вызывает наименьшие повреждения мозговой ткани. В результате проведения экспериментов был создан и оптимизирован протокол интрацеребральной инъекции вирусного вектора в субвентрикулярную зону.

Для решения задачи 3 «Сравнение различных вирусов в отношении эффективности и специфичности заражения молодых нейронов» были проведены серии микроинъекций с векторами на основе различных типов вирусов - лентивируса и аденоассоциированного вируса. Нами были использованы векторы:

- аденоассоциированный вирус 2/9 серотипа, несущий ген eGFP под контролем промотора СAG (концентрация $9 \cdot 10^8$ в 1 миллилитре) - AAV2/9-CMV-eGFP;
- лентивирус, несущий ген eGFP под контролем промотора FUGW (концентрация $9 \cdot 10^8$ в 1 миллилитре) - LV-FUGW-eGFP;
- лентивирус, несущий ген TagGFP2 под контролем промотора CMV (концентрация $9 \cdot 10^6$ в 1 миллилитре) - LV-CMV-TagGFP2;
- лентивирус, несущий ген тяжелой цепи человеческого ферритина под контролем неспецифического вирусного промотора CMV (концентрация $9 \cdot 10^8$ в 1 миллилитре) - LV-CMV-FerrH.

В результате обработки экспериментальных данных и валидации проведенных микроинъекций мы получили разный уровень экспрессии трансгенов. Предварительные исследования *in vitro* показали хороший уровень экспрессии TagGFP2, однако в исследованиях *in vivo* вектор, несущий ген TagGFP2, показал наименее выраженный уровень экспрессии зеленого флюоресцентного белка. В то же время остальные векторы, несущие трансгены eGFP или Ferr, показали высокий уровень экспрессии. Как и ожидалось, поскольку вирусные векторы содержали неспецифические промоторы, они активно заражали не только молодые нейроны, но и другие типы клеток.

Для исследования эффективности и специфичности заражения молодых нейронов в субвентрикулярной зоне вирусными частицами мы провели иммуногистохимическое исследование, маркировав срезы мозга антителами к даблкортину. Сравнение эффективности и специфичности разных типов вирусов в отношении молодых нейронов показало, что лентивирусный и адено-ассоциированный вирусный векторы различаются как по эффективности, так и по специфичности заражения молодых нейронов. Оказалось, что лентивирусный вектор имеет более высокую эффективность, но меньшую специфичность заражения, по сравнению с адено-ассоциированным. Дополнительно, мы провели сравнение специфичности экспрессии в молодых нейронах двух разных генов-репортеров: ферритина и eGFP. Проведенный анализ показал, что, хотя оба лентивируса с одинаковой эффективностью заражали молодые нейроны, экспрессия гена ферритина в молодых нейронах была существенно выше экспрессии eGFP. Этот результат дополнительно подтверждает правильность выбора гена ферритина, как гена-репортера для прижизненной визуализации нейрогенеза в мозге.