

УДК 615.012.6

Эффективная трансдукция нейронов головного мозга лентивирусными векторами, очищенными ионообменной хроматографией

© 2020 Е.В. ШАБУРОВА¹, Д.А. ЛАНШАКОВ^{1*}¹ ФГБНУ ФИЦ «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

*e-mail: dmitriylanshakov@gmail.com, lanshakov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.04.2020 г.

После доработки 18.06.2020 г.

Принята к публикации 12.09.2020 г.

Разработка методов наработки и очистки вирусных векторов для генетической терапии остается одним из самых значимых и актуальных направлений в современной биологии и медицине. Также в последнее время востребованы препараты, несущие нейротрофические факторы мозга, такие как BDNF. Однако вирусные векторы для генотерапии должны удовлетворять определенным критериям, в число которых входит высокая титражность и возможность введения *in vivo*. Кроме того, для создания таких векторов требуются экономически эффективные, недорогие и доступные для стандартных лабораторий методы. Нами проведено сравнительное исследование разных методов очистки лентивирусных векторов, кодирующих BDNF. Наивысший вирусный титр был получен при очистке вектора преципитацией PEG 6000 с последующей анионообменной хроматографией на двух колонках отечественного производства. После инъекции в головной мозг неонатального крысенка очищенных только преципитацией PEG лентивирусов были обнаружены аномальные агрегаты трансдуцированных нейронов. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости предлагаемой дополнительной стадии хроматографической очистки.

Ключевые слова: лентивирусный вектор, BDNF, ионообменная хроматография, генетическая терапия, PEG

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-5-89-97

Заболеваемость психическими расстройствами в последнее десятилетие растет быстрыми темпами [1–4]. Развитие этих заболеваний и предрасположенность к ним определяется как наследственными и генетическими факторами, так и средовыми и онтогенетическими [5–7]. В частности, события раннего постнатального периода определяют последующее развитие центральной нервной системы (ЦНС) [5]. Стрессовые воздействия в критические периоды развития предрасполагают к развитию психических расстройств при взрослении, однако молекулярные механизмы, определяющие эту предрасположенность, пока до конца не изучены [8]. Для создания нового поколения лекарственных средств,

а также применения генотерапии в этой области медицины важно в деталях понимать молекулярные механизмы, лежащие в основе нарушений формирующегося психоэмоционального здоровья. Нейротропные факторы, в особенности мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), — ключевые молекулы, принимающие участие в выживании развивающихся нейронов и образовании новых связей и синапсов [9]. На сегодняшний день трансдукция ленти- и аденоассоциированными вирусами получила широкое распространение при разработке средств для генетической терапии различных заболеваний, включая неврологические [10, 11]. Лентивирусы, в том числе

Список сокращений: ПФК — префронтальная кора; ЦНС — центральная нервная система; BDNF — мозговой нейротрофический фактор; DTT — дитиотреитол; PBS — фосфатно-солевой буфер; PEG — полиэтиленгликоль; TBS (Tris-buffered saline) — трис-солевой буфер; VSV-G — белок G вируса герпесного стоматита; WPRE — посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка.

и вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), — это род вирусов семейства *Retroviridae* [12]. Обычно для улучшения трансдукции используются псевдотипированные вирусные частицы, на поверхности которых экспрессирован гликопротеин оболочки вируса везикулярного стоматита (VSV-G) [13, 14]. Псевдотипирование повышает селективность вируса. Так, лентивирус с гликопротеином вируса *Chikungunya* при введении в гиппокамп таргетно трансдуцировал нейроны зубчатой извилины [15], а лентивирус с гликопротеином вируса бешенства не просто избирательно трансдуцировал нейроны, но и индуцировал ретроградный транспорт, что расширяет возможности терапии [16]. Интерес к лентивирусам в качестве переносчиков генетической информации обусловлен их специфическими свойствами: (1) они могут нести вставку размером в 12–15 т. п. о. [17], в то время как, например, аденоассоциированные вирусы ограничены 5 т. п. о. [18]; (2) сравнительно низкая иммуногенность по сравнению с другими РНК-вирусами [19]; (3) длительная экспрессия трансгена [19]. Кроме того, имея большой геном, лентивирусы, кроме гена интереса, могут также нести тканеспецифичные промоторы, что позволяет селективно воздействовать на клетки вплоть до субпопуляций нейронов [20], а также дополнительно кодировать рекомбинантные транскрипционные активаторы для усиления транскрипции, по типу GAL4-NF-κB [21].

Несмотря на существующие разногласия по поводу безопасности генотерапии лентивирусными векторами [22, 23], она продолжает применяться при лечении больных и пополняется все новыми вирусными конструктами. Так, векторы, кодирующие нейротрофические факторы NGF и GDNF, в комбинации с ксенотрансплантатами из первичных фибробластов либо стволовых клеток проходят клинические испытания для лечения таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера (NCT00017940) [24], а также бокового амиотрофического склероза (NCT02943850) [25]. Препарат для лечения болезни Паркинсона proSavin, в основе которого лежит лентивирусная система доставки трех генов, также находится на стадии клинических испытаний (NCT00627588, NCT01856439) [10]. У взрослого человека сигналинг нейротрофических факторов снижает гибель нейронов и улучшает нейропластичность и память [26]. Однако постоянная интенсификация нейротрофинами не всегда дает положительный результат [27], поэтому важной задачей для последующей генотерапии является получение вирусных векторов с индуцибельной экспрессией, запускаемой лигандами типа

доксидина (Tet-On, Tet-Off системы) [28] или светом в оптогенетических конструктах [29].

С одной стороны, некоторые исследователи считают, что векторы с такой регуляцией являются четвертым поколением лентивирусных векторов, так как отличаются повышенной безопасностью и эффективностью трансдукции [23]. С другой стороны, эффективная трансдукция нейронов головного мозга, как и любых других клеток, достигается высоким титром, а также чистотой вводимых препаратов. Обычно для получения очищенных лентивирусов с высоким титром ($> 10^7$ трансдуцированных единиц (ТУ)/мл) используют ультрацентрифугирование больших объемов вирусосодержащей среды [30], но это дорогостоящая процедура с использованием оборудования, которое нельзя назвать общедоступным [31]. Кроме того, обычно такой метод нуждается в дополнительных процедурах (разбавление и смена буфера, концентрирование, полировка [32], и т. д.), что может приводить к увеличению затрат, нежелательной контаминации и потерям продукта на любой из стадий, а также к снижению вирусности итоговых векторов вследствие хрупкости вирусного капсида [33].

Чем больше шагов в протоколе очистки вируса, тем большее число циклов заморозки/оттаивания проходит препарат на промежуточных стадиях, что также значительно увеличивает потери трансдуцирующих вирусных частиц [32, 34]. В качестве альтернативы мы предлагаем рассмотреть более простые методы: преципитацию полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6 кДа (PEG 6 000) и последующую анионообменную хроматографию. Целью исследования была отработка приемлемого для ординарных лабораторий метода получения лентивирусных частиц с высоким титром для введения в мозг лабораторных животных.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Создание индуцибельных лентивирусных векторов для экспрессии в нейронах

Для создания плазмидного вектора за основу брали плазмиду pCW57-MCS1-P2A-MCS2 (GFP) (Addgene No 80 924), которая содержит доксицилиндуцибельную систему Tet-On, элементы лентивирусного вектора, а также ген turboGFP, экспрессирующийся под контролем промотора гена фосфоглицераткиназы человека (hPGK). Для замены hPGK-промотора на специфичный для нейронов промотор гена синапсина человека (hSyn) вектор обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *AsuNHI/HindIII* (отбирали бóльший фрагмент размером 7 237 п. о.) и *AsuNHI*

Праймеры, использованные в работе
Sequences of primers used

Праймер	Последовательность 5'→3'
BDNF_F	CATATCGGCCACCAAAGACTCG
BDNF_R	CAACGGCAACAAACCACAAC
AsuNHbdnf_F	TGACGCTAGCAGATCTATGACCATCCTTTTCCTTAC
Salbdnf_R	TAGATGGCGCGCCGTCGACGCGGCCGCCTATCTTCCCCTTTTAATGGT
WPRE_F	TCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGT
WPRE_R	ACAACACCACGGAATTGTCAGTGC

Примечание: WPRE — посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка; F — прямой праймер; R — обратный праймер.

Note: WPRE is a posttranscriptional regulatory element of marmot hepatitis virus; F is forward primer, and R is reverse primer.

FspI (отбирали фрагмент длиной 155 п.о.). Затем оба фрагмента лигировали для создания вектора без hPGK-промотора. В получившуюся плазмиду по сайтам рестрикции *MluI/BamHI* вводили последовательность hSyn-промотора из плазмиды pAAV-hSyn-hChr2(H134R)-mCherry (Addgene No 26976). Этот вектор использовали в качестве контрольного. Последовательность, кодирующую белок BDNF, получали при помощи ПЦР, где в качестве матрицы брали 2 мкл разведенной 1/10 библиотеки первой цепи кДНК коры мозга крысы, по 0,2 мкМ праймеров (прямой BDNF_F и обратный BDNF_R; табл. 1). ПЦР-продукт размером 1 164 п.о. клонировали в вектор pAL-TA («Евроген», Россия), методом ПЦР-мутагенеза с помощью праймеров AsuNHbdnfF и SalbdnfR (табл. 1) вводили сайты клонирования *AsuNHI/SalI* и, наконец, целевую последовательность переносили в финальный вектор.

Сборка псевдотипированных лентивирусных частиц

Культуру клеток НЕК-293Т поддерживали в соответствии со стандартными протоколами на среде DMEM («Панэко», Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Biosera, Франция), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина («Панэко»). За сутки до трансфекции клетки НЕК-293Т высевали в пять 15-сантиметровых чашек Петри (для выделения одного вируса) с плотностью $9 \cdot 10^6$ клеток на чашку. Клетки трансфицировали 60 мкг плазмидной ДНК в 10 мл среды OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, США) трансген: psPAX2 : pMD2.G в молярном соотношении 4:2:1 и оставляли на ночь. Молярное соотношение полиэтиленimina (1 мкг/мкл) (Polysciences, США) к ДНК составляло 3:1. По окончании трансфекции культуральную среду меняли на свежую и инкубировали в ней клетки в течение 48 ч, после чего среду собирали, осветляли центрифугированием при

4 000 g и 4 °С в течение 15 мин и фильтровали (диаметр пор 0,4 мкм).

Очистка лентивируса

Вирусные частицы осаждали из культуральной среды с помощью PEG 6 000 («Диаэм», Россия) по методу, описанному Kutner и др. [35]. Полученный осадок либо ресуспендировали в 400 мкл PBS (группа PEG), либо подвергали ультрафильтрации на центрифужных концентраторах Amicon Ultra-4 (100 кДа) согласно инструкции производителя (Merck (Millipore), США) для смены буфера на PBS и концентрирования до объема около 400 мкл (группа PEG+ultra), либо разводили в 30 мл TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 группы Sulfo и TA). Для последних двух групп проводили дополнительную стадию очистки на сильнокислотных катионообменниках с привитыми сульфогруппами ДИАПАК-Сульфо («Биохиммак», Россия) и на сильноосновных анионообменниках с привитыми четвертичными аммониевыми группами ДИАПАК-ТА («Биохиммак») соответственно. Для этого один или два соединенных концентрирующих патрона промывали 20 мл TBS, наносили 30 мл раствора, содержащего лентивирусные частицы (здесь и далее: скорость потока ~1,6 мл/мин), и промывали 40 мл TBS с меньшей концентрацией соли (100 mM NaCl). После этого с помощью шприца каждый патрон промывали отдельно: сначала 1,5 мл TBS с 0,5 M NaCl, а затем 4,5 мл TBS с 1,5 M NaCl. Для элюатов групп Sulfo и TA после этой процедуры проводили ультрафильтрацию, как описано выше для группы PEG+ultra. Аликвоты (10 мкл) всех 4 групп хранили при температуре -70 °С.

Определение титра вируса методом ПЦР в реальном времени

Содержание лентивируса в образце определяли по числу копий *цис*-регуляторного

посттранскрипционного элемента вируса гепатита сурка, WPRE, входящего в состав сконструированного лентивирусного вектора. Суммарную РНК выделяли из 10-мкл аликвоты полученных образцов лентивирусов, используя набор RNeasy Mini kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя. РНК элюировали с колонки 20 мкл воды, свободной от РНКаз, после чего 9 из 20 мкл отбирали в реакцию обратной транскрипции с 20 мкМ праймера WPRE_R (табл. 1), 20 мМ dNTPs, 40 мМ DTT, 100 U ревертазы MMLV («Евроген»). ПЦР в реальном времени проводили на приборе ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific), используя мастер-микс qPCRMix-HS SYBR+LowROX («Евроген») и 20 мкМ каждого из праймеров: WPRE_F, WPRE_R (табл. 1), — в следующем режиме: стадия первичной денатурации при 95 °С в течение 5 мин и затем денатурация при 95 °С 15 с, отжиг и элонгация при 60 °С 1 мин, — цикл повторяли 50 раз. Титр вирусного препарата (вирусные частицы/мл, или в. ч./мл) пересчитывали с учетом всех разведений, исходя из числа копий вирусной РНК, определенной по калибровочной кривой, построенной для серийных разведений плазмиды с известным числом копий того же конструкта.

Количественное определение вирусной РНК в мозге крыс

Тотальную РНК выделяли из гомогенатов тканей префронтальной коры (ПФК) крысят через 7 сут после введения лентивирусов в эту область мозга с использованием набора RNeasy Mini kit (Qiagen) и очищали от примеси ДНК обработкой ДНКазой I, свободной от РНКаз (Sigma-Aldrich, Германия). Концентрацию РНК определяли на приборе NanoDrop 2 000 (Thermo Fisher Scientific), качество и чистоту РНК оценивали электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Для реакции обратной транскрипции брали 1 мкг тотальной РНК, 100 U ревертазы MMLV («Евроген»), 20 мМ dNTPs, 40 мМ DTT, 10 мкМ праймеров олиго(dT)₁₅ («Евроген»), 10 мкМ праймеров Random(dN)₁₀ («Евроген»). Полученную кДНК разводили в 10 раз водой и использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени с праймерами WPRE_F и WPRE_R (табл. 1). ПЦР в реальном времени проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл разведенной кДНК, 0,2 мкМ каждого праймера и 5 мкл мастер-микс qPCRMix-HS SYBR+LowROX («Евроген»). Анализ проводили на приборе ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Реакцию проводили в режиме двухступенчатого цикла, описанного выше. Число копий мРНК гена WPRE определяли по нормировочной кривой для

серии разведений плазмиды с известным числом копий того же конструкта.

Трансдукция лентивирусных частиц *in vivo*

В эксперимент брали по два животных для каждой группы векторов, а также дополнительно 4 животных для группы ТА. Лентивирусы вводили крысятам на второй день жизни под холодным наркозом в область ПФК, согласно атласу [36], при помощи стереотаксического прибора (J&K Seiko Electronic, Co, Ltd., Китай). По очертаниям швов черепа, которые у неонатальных крысят просвечивают через кожу, по координатам AP+1,6 мм, ML+0,8 мм, DV — 2 мм определяли область прокола. Затем 2 мкл вирусного препарата вводили в течение 7 мин при помощи шприца с иглой калибра 30 Ga (Hamilton, США) и шприцевого насоса (LongerPump, Китай). После манипуляций крысят возвращали к матери на следующие 3 суток.

Гистологическое исследование и микроскопия

Через 3 сут после введения лентивируса крысят усыпляли авертином и транскардиально перфузировали PBS («Росмедбио», Россия), а затем 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich). Мозг фиксировали в том же фиксаторе в течение 4 ч, а затем инкубировали в течение ночи в 30%-ном растворе сахарозы («Медиген», Россия) для криопротекции. После замораживания готовили срезы толщиной 25 мкм на криостате MICROM HM350 (Carl Zeiss group, Германия), монтировали на предметные стекла, высушивали, промывали PBS («Росмедбио») и закрепляли поливиниловым спиртом (Mowiol; Sigma-Aldrich) с последующим монтированием покровного стекла. Для визуализации ядер в Mowiol добавляли краситель DAPI (Sigma-Aldrich) в концентрации 1 мкг/мл. Препараты анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 780 NLO (Carl Zeiss group).

Анализ экспрессии белка BDNF *in vivo*

Для оценки экспрессии BDNF в мозге крыс брали по 6 животных для опытной и контрольной группы. После введения контрольного или опытного вирусных векторов в первый день жизни крысенка, экспрессию индуцибельного гена *Bdnf* активировали подкожным введением доксицилина в дозе 0,2 мг/кг ежедневно с 3 по 8 сутки жизни животного. На восьмой день животных выводили из эксперимента и оценивали экспрессию белка BDNF. Белок выделяли из гомогенатов ПФК, которые получали механической гомогенизацией в лизирующем буфере [37]. Электрофорез, иммуноблоттинг и иммунодетекцию белка BDNF проводили по ранее описанной методике [37].

Статистическая обработка результатов

Статистические расчеты выполняли в программе STATISTICA 10.0. Достоверность различий рассчитывали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для сравнения методов очистки использовали непараметрический тест Краскела-Уоллиса. Результат считался статистически значимым при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мы провели сравнительный анализ нескольких методов очистки лентивирусов. По данным ПЦР в реальном времени, максимальный выход (порядка 10^9 вирусных частиц/мл, в.ч./мл) удалось получить при двухстадийной очистке лентивирусных векторов: преципитацией PEG 6 000 с последующей анионообменной хроматографией на двух анионообменных колонках (группа TA, $p = 0,0001$, тест Краскела-Уоллиса; рис. 1). Выход вирусных частиц в группе Sulfo (очистка PEG-преципитацией с последующей катионообменной хроматографией) был в три раза ниже, а в группах PEG и PEG+ultra, очищенных PEG-преципитацией, в пять раз меньше (около $2 \cdot 10^8$ в.ч./мл), чем в группе TA (рис. 1).

Можно предположить, что высокий выход лентивируса при использовании анионообменной хроматографии связан с общим отрицательным зарядом белка VSV-G на псевдотипированном лентивирусе в условиях эксперимента — при pH 8,0 [38], а также зарядом связанных с ним гликанов [39] и остаточных белков материнской клетки, входящих в состав оболочки вирусной частицы [40]. Стоит отметить, что способность VSV-G к слиянию мембран при трансдукции не зависит от гликозилирования, а определяется протонированием остатков His148 и His149 в узком диапазоне pH 5,8–6,2, характерном для эндосом [41]. Также общим отрицательным зарядом оболочки лентивирусов можно объяснить улучшение результатов трансдукции в присутствии катионных полимеров, например полибре-на, который нейтрализует отрицательные заряды на поверхности вируса и клетки, тем самым увеличивая вероятность нахождения вирусной частицы вблизи клеточной мембраны [42].

Мы исследовали влияние емкости хроматографических колонок на выход вируса и количество вирусной РНК в трансдуцированных тканях. При очистке вирусных векторов с помощью PEG-преципитации и последующей анионообменной хроматографии с использованием одной колонки объемом 1 мл концентрация вируса составляла $5,02 \cdot 10^6$ в.ч./мл ($p = 0,005$, тест

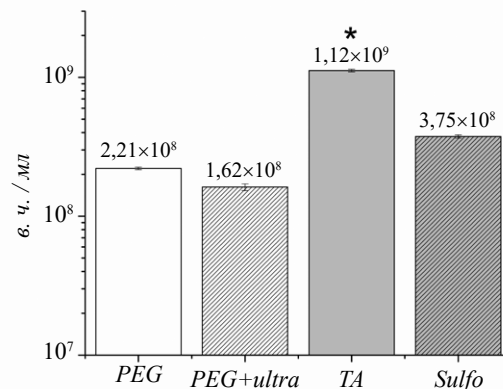


Рис. 1. Выход псевдочастиц лентивируса в препаратах, очищенных преципитацией PEG (PEG), преципитацией PEG с последующей ультрафильтрацией (PEG+ultra), преципитацией PEG с последующей ионообменной хроматографией на двух колонках с анионообменной (TA) или катионообменной (Sulfo) смолой и ультрафильтрацией. * $p < 0,001$ — достоверное отличие группы TA относительно остальных групп; $p = 0,0001$, тест Краскела-Уоллиса.

Fig. 1. The yield of lentivirus pseudo-particles in samples purified by PEG precipitation (PEG), PEG precipitation followed by ultrafiltration (PEG+ultra), PEG precipitation followed by ion exchange chromatography on two columns with the anion (TA) or cation (Sulfo) exchanger and ultrafiltration. * $p < 0,001$ — significant difference in titer of the TA group relative to other groups; $p = 0,0001$, Kruskal-Wallis test.

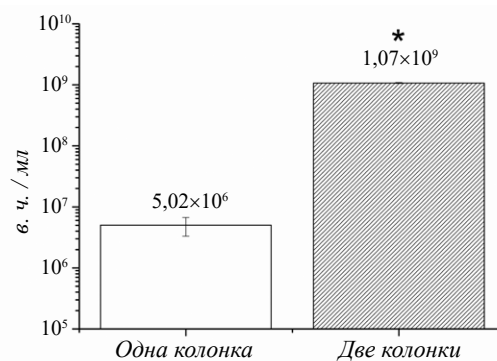


Рис. 2. Влияние емкости анионообменного носителя на выход очищенного лентивируса. * $p < 0,01$, тест Манна-Уитни.

Fig. 2. Influence of the capacity of the anion-exchange carrier on the yield of purified lentivirus. * $p < 0,01$, Mann-Whitney test.

Манна-Уитни; рис. 2). Однако при том же методе очистки, но с последовательным соединением двух одномиллилитровых концентрирующих патронов выход увеличивался до 10^9 в.ч./мл (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии емкости хроматографического носителя на выход лентивируса.

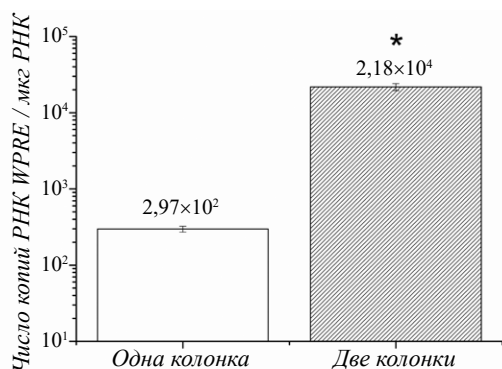


Рис. 3. Содержание вирусной РНК в префронтальной коре головного мозга крысят, трансдуцированных препаратом лентивируса, очищенным на одной или двух анионообменных колонках. * $p < 0,01$, тест Манна-Уитни.

Fig. 3. The amount of viral RNA in prefrontal cortex of rat pups transduced with the lentivirus purified on a single or double anion exchange column. * $p < 0,01$, Mann-Whitney test.

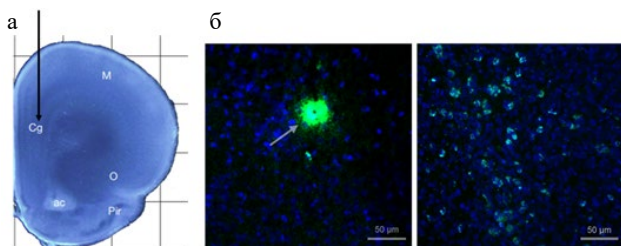


Рис. 4. Трансдукция нейронов префронтальной коры очищенными лентивирусными векторами. **a** — Схематичное изображение места введения лентивируса в мозг. **b** — Репрезентативные микрофотографии срезов префронтальной коры неонатальных крысят после введения лентивирусных векторов, преципитированных PEG (группа PEG, слева) и дополнительно очищенных анионообменной хроматографией (группа ТА, справа). Стрелкой показаны агрегаты нейронов.

Fig. 4. Transduction of prefrontal cortex neurons with purified lentiviral vectors. **a** — Schematic representation of lentivirus injection site in the brain. **b** — Representative microphotographs of prefrontal cortex of neonatal rat pups after administration of lentiviral vectors purified by PEG precipitation (PEG group, left) and followed by anion exchange chromatography (TA group, right). The arrow shows neuron aggregates.

С целью оценки экспрессии сконструированного псевдовируса в нейронах крыс в мозг неонатальных крысят вводили одинаковый объем очищенных указанными выше способами лентивирусных векторов. Количественное определение вирусной РНК проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени с праймерами к одному из элементов вирусного конструкта, а именно к *WPRE*. Показано, что

в ПФК крыс экспрессия лентивирусов, очищенных на двух анионообменных колонках, на два порядка выше, чем при использовании только одного патрона ($p = 0,002$, тест Манна-Уитни; рис. 3).

Проведена качественная оценка состояния нейронов на срезах головного мозга крыс (рис. 4а) после инъекции вирусных частиц, очищенных одним из четырех методов. При инъекции вирусных векторов из групп PEG и PEG+ultra, то есть PEG-преципитированными без и с последующей ультрафильтрацией соответственно, были обнаружены аномальные агрегаты трансдуцированных нейронов, превышающие размер средней клетки, преимущественно в области ПФК (рис. 4б, слева). Возможно, при введении этих препаратов оставшийся в пробах PEG вызывает слияние трансдуцированных клеток [30]. Подобных артефактов не наблюдалось в группах с дополнительным этапом очистки на ионообменных колонках (рис. 4б, справа).

С целью оценки эффекта от индукции экспрессии очищенного лентивирусного вектора на синтез нейротрофина векторы из группы ТА стереотаксически вводили однодневным крысятам в ПФК, после чего активировали экспрессию при помощи инъекций доксицилина. По результатам иммуноблотинга можно заключить, что введение в ПФК крыс лентивирусных псевдочастиц с геном *Bdnf*, очищенных на двух хроматографических патронах с анионообменной смолой, сопровождается повышенной экспрессией зрелой формы белка BDNF (M_r 14 кДа) по сравнению с контрольной группой животных, трансдуцированных контрольным вектором без гена *Bdnf* ($p = 0,011$, тест Манна-Уитни; рис. 5б).

Таким образом, предложен эффективный способ лабораторной очистки лентивирусных векторов, кодирующих нейротрофический фактор мозга: преципитация PEG 6 000 с последующей анионообменной хроматографией. Отметим, что при увеличении емкости анионообменного носителя удастся повысить выход вируса. В экспериментах *in vivo* продемонстрировано, что введение очищенных таким образом частиц лентивируса, содержащих ген *Bdnf*, в мозг неонатальных крысят сопровождается увеличением экспрессии зрелой формы нейротропного белка BDNF.

Заметим, что в отличие от аффинных сорбентов, на которых обычно проводят очистку лентивирусов [31, 33]: гепарин-сефарозы, Capto DeVirS (GE Healthcare, США), Capto Lentil Lectin (GE Healthcare), — носители для ионообменной хроматографии, использованные нами, отечественного производства, что немаловажно при оценке себестоимости процесса. Введение стадии

ультрафильтрации позволяет сконцентрировать вирусы и одновременно поменять буфер элюата на более физиологичный без дополнительных дорогостоящих установок, как это необходимо в широко используемом методе тангенциальной фильтрации [43]. Разработанная нами методология позволяет получать высокотитражные препараты лентивируса, подходящие для трансдукции нейронов *in vivo*, за меньшее число шагов, чем предлагают схожие протоколы [30, 32]. Однако следует отметить, что этот метод отработывали на вирусах, псевдотипированных VSV-G, а значит, он может не подойти для других модификаций лентивирусов [34]. Очистка лентивирусов предложенным методом в перспективе может быть масштабирована до промышленного формата, что важно для производства лекарственных препаратов, хотя для соответствия получаемых продуктов строгим стандартам генотерапии [33, 44] необходимо провести ряд серьезных исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта № 0259-2019-0003-С-01.

СООТВЕТСТВИЕ ЭТИЧЕСКИМ СТАНДАРТАМ

Все процедуры проводили в соответствии с Международными Европейскими стандартами по биоэтике (86/609-ЕЕС), Российскими правилами работы с лабораторными животными (№ 267 19.06.2003) и разрешением Комитета по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vigo D., Thornicroft G., Atun R. Estimating the true global burden of mental illness. *Lancet Psychiat.*, 2016, 3(2), 171–178. doi: 10.1016/S2215-0366(15)00505-2
2. Breland J.Y., Frayne S.M., Timko C., et al. Mental health and obesity among veterans: a possible need for integrated care. *Psychiatr. Serv.*, 2020, 71(5), 506–509. doi: 10.1176/appi.ps.201900078
3. Ursano R.J., Herberman Mash H.B., Kessler R.C., et al. Factors associated with suicide ideation in US army soldiers during deployment in Afghanistan. *JAMA Netw. Open*, 2020, 3(1), e1919935. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.19935

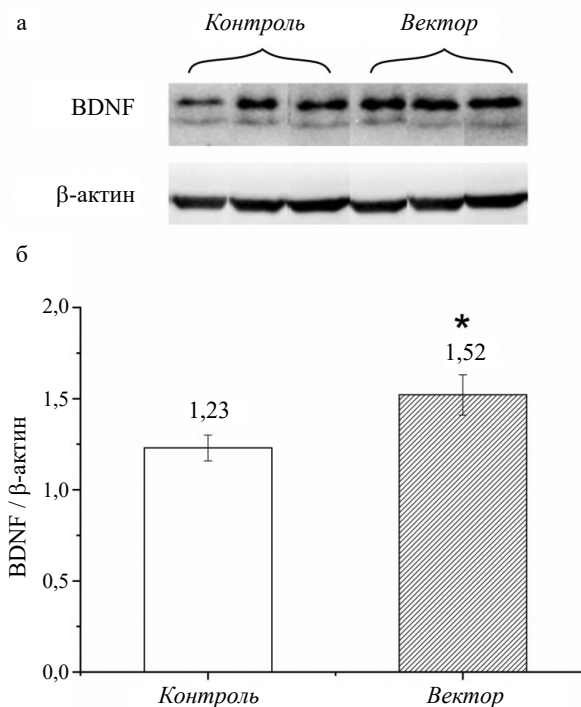


Рис. 5. Экспрессия BDNF в префронтальной коре крысят после трансдукции лентивирусных частиц, содержащих ген *Bdnf* (Вектор) и не содержащих *Bdnf* (Контроль). Иммуноблоттинг с антителами против зрелой формы BDNF (14 кДа) и β -актина (а) и анализ относительного содержания BDNF к β -актину (б). * $p < 0,05$, тест Манна-Уитни.

Fig. 5. BDNF expression in the prefrontal cortex of rat pups after transduction with lentiviral particles containing *Bdnf* (Vector) and without it (Control). Immunoblotting with antibodies against mature BDNF form (14 kDa) and β -actin (a), and analysis of the relative content of BDNF to β -actin (b). * $p < 0,05$, Mann-Whitney test.

4. Andersen L.S., Joska J.A., Magidson J.F., et al. Detecting depression in people living with HIV in South Africa: the factor structure and convergent validity of the South African Depression Scale (SADS). *AIDS Behav.*, 2020, 1–8. doi: 10.1007/s10461-020-02787-4
5. Amiri A., Coppola G., Scuderi S., et al. Transcriptome and epigenome landscape of human cortical development modeled in organoids. *Science*, 2018, 362(6420), eaat6720. doi: 10.1126/science.aat6720
6. Polioudakis D., de la Torre-Ubieta L., Langerman J., et al. A single-cell transcriptomic atlas of human neocortical development during mid-gestation. *Neuron*, 2019, 103(5), 785–801. doi: 10.1016/j.neuron.2019.06.011
7. Zhong S., Zhang S., Fan X., et al. A single-cell RNA-seq survey of the developmental landscape of the human prefrontal cortex. *Nature*, 2018, 555(7697), 524–528. doi: 10.1038/nature25980
8. Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Dexamethasone-induced acute excitotoxic cell

- death in the developing brain. *Neurobiol. Dis.*, 2016, 91, 1–9. doi: 10.1016/j.nbd.2016.02.009
9. Menshanov P.N., Lanshakov D.A., Dygalo N.N. proBDNF is a major product of *bdnf* gene expressed in the perinatal rat cortex. *Physiol. Res.*, 2015, 64(6), 925–934. doi: 10.33549/physiolres.932996
 10. Domanskyi A., Saarma M., Airavaara M. Prospects of neurotrophic factors for Parkinson's disease: comparison of protein and gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, 2015, 26(8), 550–559. doi: 10.1089/hum.2015.065
 11. Palfi S., Gurruchaga J.M., Lepetit H., et al. Long-term follow-up of a phase I/II study of ProSavin, a lentiviral vector gene therapy for Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, 2018, 29(3), 148–155. doi: 10.1089/humc.2018.081
 12. Tang H., Kuhen K.L., Wong-Staal F. Lentivirus replication and regulation. *Annu. Rev. Genet.*, 1999, 33(1), 133–170. doi: 10.1146/annurev.genet.33.1.133
 13. Cronin J., Zhang X.-Y., Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr. Gene Ther.*, 2005, 5(4), 387–398. doi: 10.2174/1566523054546224
 14. Joglekar A.V., Sandoval S. Pseudotyped lentiviral vectors: one vector, many guises. *Hum. Gene Ther. Methods*, 2017, 28(6), 291–301. doi: 10.1089/hgtb.2017.084
 15. Eleftheriadou I., Dieringer M., Poh X.Y., et al. Selective transduction of astrocytic and neuronal CNS subpopulations by lentiviral vectors pseudotyped with Chikungunya virus envelope. *Biomaterials*, 2017, 123, 1–14. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.023
 16. Kato S., Sugawara M., Kobayashi K., et al. Enhancement of the transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene delivery through the point mutation of fusion glycoprotein type E.J. *Neurosci. Methods*, 2019, 311, 147–155. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.10.023
 17. Kumar M., Keller B., Makalou N., Sutton R.E. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, 2001, 12(15), 1893–1905. doi: 10.1089/104303401753153947
 18. Chamberlain K., Riyad J.M., Weber T. Expressing transgenes that exceed the packaging capacity of adeno-associated virus capsids. *Hum. Gene Ther. Methods*, 2016, 27(1), 1–12. doi: 10.1089/hgtb.2015.140
 19. Kalesnykas G., Kokki E., Alasaarela L., et al. Comparative study of adeno-associated virus, adenovirus, baculovirus and lentivirus vectors for gene therapy of the eyes. *Curr. Gene Ther.*, 2017, 17(3), 235–247. doi: 10.2174/1566523217666171003170348
 20. Yizhar O., Adamantidis A. Cell type-specific targeting strategies for optogenetics. In: *Optogenetics: A Roadmap. Neuromethods*. Eds Strohm, Albrecht. New York, NY: Humana Press, 2018, vol. 133, 25–42. doi: 10.1007/978-1-4939-7417-7_2
 21. Liu B.H., Yang Y., Paton J.F.R., et al. GAL4-NF-kappaB fusion protein augments transgene expression from neuronal promoters in the rat brain. *Mol. Ther.*, 2006, 14(6), 872–882. doi: 10.1016/j.ymt.2006.05.020
 22. Martianova E., Aniol V.A., Manolova A.O., et al. Activation of microglia associated with lentiviral transduction: a semiautomated method of assessment. *Acta Histochem.*, 2019, 121(3), 368–375. doi: 10.1016/j.acthis.2019.01.008
 23. Zheng C.-X., Wang S.-M., Bai Y.-H., et al. Lentiviral vectors and adeno-associated virus vectors: useful tools for gene transfer in pain research. *Anat. Rec.*, 2018, 301(5), 825–836. doi: 10.1002/ar.23723
 24. Tuszynski M.H., Thal L., Pay M., et al. A phase I clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat. Med.*, 2005, 11(5), 551–555. doi: 10.1038/nm1239
 25. Thomsen G.M., Avalos P., Ma A.A., et al. Transplantation of neural progenitor cells expressing glial cell line-derived neurotrophic factor into the motor cortex as a strategy to treat amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells*, 2018, 36(7), 1122–1131. doi: 10.1002/stem.2825
 26. Song X., Zhou B., Cui L., et al. Silibinin ameliorates A β 25–35-induced memory deficits in rats by modulating autophagy and attenuating neuroinflammation as well as oxidative stress. *Neurochem. Res.*, 2017, 42(4), 1073–1083. doi: 10.1007/s11064-016-2141-4
 27. Hu Y., Russek S.J. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J. Neurochem.*, 2008, 105(1), 1–17. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05237.x
 28. Shishkina G.T., Lanshakov D.A., Bannova A. V., et al. Doxycycline used for control of transgene expression has its own effects on behaviors and Bcl-xL in the rat hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2018, 38(1), 281–288. doi: 10.1007/s10571-017-0545-6
 29. Lanshakov D.A., Drozd U.S., Dygalo N.N. Optogenetic stimulation increases level of antiapoptotic protein Bcl-xL in neurons. *Biochemistry (Moscow)*, 2017, 82(3), 340–344. doi: 10.1134/S0006297917030129
 30. Segura M.M., Kamen A.A., Garnier A. Overview of current scalable methods for purification of viral vectors. *Methods Mol. Biol.*, 2011, 737, 89–116. doi: 10.1007/978-1-61779-095-9_4
 31. Jiang W., Hua R., Wei M., et al. An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 13875. doi: 10.1038/srep13875
 32. Bandeira V., Peixoto C., Rodrigues A.F., et al. Downstream processing of lentiviral v vectors: releasing bottlenecks. *Hum. Gene Ther. Methods*, 2012, 23(4), 255–263. doi: 10.1089/hgtb.2012.059
 33. Merten O.W., Hebben M., Bovolenta C. Production of lentiviral vectors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2016, 3, 16017. doi: 10.1038/mtm.2016.17

34. Ruscic J., Perry C., Mukhopadhyay T., et al. Lentiviral vector purification using nanofiber ion-exchange chromatography. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2019, 15, 52–62. doi: 10.1016/j.omtm.2019.08.007
35. Kutner R.H., Zhang X.-Y., Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat. Protoc.*, 2009, 4(4), 495–505. doi: 10.1038/nprot.2009.22
36. Khazipov R., Zaynutdinova D., Ogievetsky E., et al. Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates. *Front. Neuroanat.*, 2015, 9(DEC), 161. doi: 10.3389/fnana.2015.00161
37. Bannova A. V., Menshanov P.N., Dygalo N.N. The effect of lithium chloride on the levels of brain-derived neurotrophic factor in the neonatal brain. *Neurochem. J.*, 2019, 13(4), 344–348. doi: 10.1134/s1819712419030048
38. Ferlin A., Raux H., Baquero E., et al. Characterization of pH-sensitive molecular switches that trigger the structural transition of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the postfusion state toward the prefusion state. *J. Virol.*, 2014, 88(22), 13396–13409. doi: 10.1128/jvi.01962-14
39. Abeyratne-Perera H.K., Ogharandukun E., Chandran P.L. Complex-type N-glycans on VSV-G pseudotyped HIV exhibit “tough” sialic and “brittle” mannose self-adhesions. *Soft Matter.*, 2019, 15(22), 4525–4540. doi: 10.1039/c9sm00579j
40. Segura M.M., Garnier A., Di Falco M.R., et al. Identification of host proteins associated with retroviral vector particles by proteomic analysis of highly purified vector preparations. *J. Virol.*, 2008, 82(3), 1107–1117. doi: 10.1128/jvi.01909-07
41. Carneiro F.A., Stauffer F., Lima C.S., et al. Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(16), 13789–13794. doi: 10.1074/jbc.M210615200
42. Davis H.E., Rosinski M., Morgan J.R., Yarmush M.L. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys. J.*, 2004, 86(2), 1234–1242. doi: 10.1016/S0006-3495(04)74197-1
43. Tinch S., Szczer K., Swaney W., et al. A scalable lentiviral vector production and purification method using mustang Q chromatography and tangential flow filtration. *Methods Mol. Biol.*, 2019, 1937, 135–153. doi: 10.1007/978-1-4939-9065-8_8
44. Schweizer M., Merten O.-W. Large-scale production means for the manufacturing of lentiviral vectors. *Curr. Gene Ther.*, 2010, 10(6), 474–486. doi: 10.2174/156652310793797748

Effective Transduction of Brain Neurons with Lentiviral Vectors Purified by Ion-Exchange Chromatography

E.V. SHABUROVA¹ and D.A. LANSKOV^{1*}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090, Russia*

**e-mail: dmitriylanshakov@gmail.com, lanshakov@bionet.nsc.ru*

Received April 23, 2020

Revised June 18, 2020

Accepted September 12, 2020

Abstract—The development of methods for purification viral vectors for gene therapy is one of the most important and urgent problems of modern biology and medicine. Recently, drugs that carry cerebral neurotrophic factors, such as BDNF, have become increasingly popular. However, viral drugs for gene therapy should meet certain requirements, including high titer and applicability for in vivo studies. At the same time, the creation of such vectors requires cost-effective, inexpensive and affordable methods for standard laboratories. This study compares various methods for purification of lentiviral vectors encoding the brain neurotrophic factor, BDNF. The highest titer ($1.12 \cdot 10^9$ /mL) was obtained via PEG 6 000 precipitation followed by anion-exchange chromatography on two columns of sorbents containing quaternary ammonium groups. Abnormal aggregates of transduced neurons were detected after lentiviruses purified only by PEG precipitation were injected into the brain of a newborn rat. This fact confirms the necessity of the proposed additional chromatographic purification stage.

Key words: lentivirus, BDNF, ion exchange chromatography, gene therapy, PEG

Funding—This work was financially supported by budgetary funding project no. 0259-2019-0003-C-01.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-5-89-97