

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Биологический факультет

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н.И. Пирогова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации
Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для
биомедицины

На правах рукописи

Галиакберова Аделя Альбертовна

**Подходы к моделированию нейрогенеза *in vitro* при помощи
индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека**

1.5.22 – Клеточная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук
Исаев Николай Константинович

кандидат биологических наук
Дашинимаев Эрдэм Баирович

Москва – 2024

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ	5
1.1. Актуальность темы исследования.....	5
1.2. Степень разработанности темы исследования	6
1.3. Цели и задачи исследования.....	8
1.4. Объект и предмет исследования	9
1.5. Научная новизна полученных результатов	9
1.6. Научная и практическая значимость работы	10
1.7. Методология и методы исследования	10
1.8. Положения, выносимые на защиту.....	11
1.9. Степень достоверности результатов.....	11
1.10. Апробация результатов работы.....	12
1.11. Публикации	12
1.12. Личный вклад автора в проведение исследования.....	12
1.13. Финансовая поддержка	12
1.14. Структура и объем диссертации	13
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
2.1. Нейрогенез и нейральные стволовые клетки.....	14
2.1.1. Эмбриональный нейрогенез.....	14
2.1.2. Эмбриональный глиогенез.....	17
2.1.3. Нейрогенез во взрослом мозге млекопитающих	19
2.1.4. Контроль активности нейральных стволовых клеток.....	21
2.2. Сигнальные пути, задействованные в нейрогенезе.....	24
2.3. Плюрипотентные стволовые клетки как источник для получения нейральных культур <i>in vitro</i>	30
2.4. Методы дифференцировки нейронов <i>in vitro</i> из плюрипотентных стволовых клеток.....	31
2.4.1. Метод с DUAL SMAD ингибированием	33
2.4.2. Методы дифференцировки с помощью гиперэкспрессии транскрипционных факторов	37

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
3.1. Составные среды, использованные в работе	44
3.2. Культивирование ИПСК.....	45
3.3. Получение ИПСК-KYOU, экспрессирующих TetON-NGN2. Приготовление лентивирусов и лентивирусная трансдукция	46
3.4. Нейральная дифференцировка ИПСК методом с DUAL SMAD ингибированием	48
3.5. NGN2-индуцированная нейральная дифференцировка ИПСК.....	48
3.6. Выделение РНК	49
3.7. Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени.....	50
3.8. Секвенирование РНК	53
3.9. Секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq).....	55
3.10. Иммуноцитохимическое окрашивание и количественный анализ флуоресцентных фотографий.....	57
3.11. Микросъемка в фазовом контрасте.....	59
3.12. Кальциевый имиджинг.....	59
4. РЕЗУЛЬТАТЫ	61
4.1. Дифференцировка ИПСК в нейроны с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием	61
4.1.1. Общий дизайн эксперимента	62
4.1.2. Морфология спонтанно дифференцированных из НСК нейральных культур	64
4.1.3. Кальциевая активность нейральных культур, спонтанно дифференцированных из НСК-KYOU-GCaMP6s.....	66
4.1.4. Сравнение нейральных культур, спонтанно дифференцированных из разных линий НСК.....	68
4.1.5. Анализ изменения нейральных культур KYOU и AFS17 при длительном культивировании НСК.....	72
4.1.6. Результаты анализа секвенирования тотальной РНК нейральных культур KYOU и AFS17 при длительном культивировании НСК.....	77
4.1.7. Результаты анализа секвенирования РНК единичных клеток нейральных культур KYOU при длительном культивировании НСК.....	79

4.2. Дифференцировка ИПСК в нейроны с индукцией экзогенной гиперэкспрессии NGN2 на основе известного протокола с лентивирусной доставкой и селекцией.....	84
4.2.1. Общий дизайн эксперимента	84
4.2.2. Получение трансгенных линий ИПСК-KYOU-TetON-NGN2 и оптимизация протокола нейральной дифференцировки	85
4.2.3. Анализ NGN2-индуцированных нейральных культур методом иммуноцитохимического окрашивания и количественной ПЦР	88
4.2.4. Кальциевая активность NGN2-индуцированных нейральных культур.....	90
4.3. Сравнение нейральных культур, полученных из ИПСК-KYOU методом с DUAL SMAD ингибированием и методом с индукцией экзогенной гиперэкспрессии NGN2	97
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	108
5.1. Исследование спонтанно дифференцированных нейральных культур, полученных через стадию НСК с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием	108
5.2. Гиперэкспрессия NGN2 в ИПСК при помощи лентивирусной доставки и системы регуляции транскрипции TetON позволяет получить нейрофизиологически активные нейральные культуры.....	113
5.3. Нейральные культуры, полученные из ИПСК с помощью двух разных подходов, значительно отличаются друг от друга	118
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
7. ВЫВОДЫ.....	128
8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	129
9. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ	130
9.1. Статьи	130
9.2. Тезисы докладов	130
10. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	131
ПРИЛОЖЕНИЕ	168

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность темы исследования

Изучение эмбрионального нейрогенеза человека, как и выделение первичных культур нейронов и нейральных стволовых клеток (НСК) человека, затруднено по этическим причинам. В связи с этим получение НСК и нейронов *in vitro* является очень актуальным направлением не только для изучения нейрогенеза, но также для моделирования различных заболеваний нервной системы и поиска способов и путей их коррекции.

В классическом понимании нейрогенез – это многоступенчатый процесс развития нейронов из клеток-предшественников. Наиболее активно нейрогенез протекает в эмбриональном периоде, когда формируются все типы нейронов организма. Тем не менее он продолжается в течение раннего постнатального периода, а также и во взрослом мозге. В качестве клеток-предшественников выступают мультипотентные НСК, которые способны к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток, такие как нейроны, астроциты и олигодендроциты.

Нейрогенез *in vitro* – искусственный нейрогенез, который отличается от такового, протекающего в мозге (*in vivo*). Однако оба процесса приводят к одному и тому же – получению (генерации) дифференцированных нейронов.

Наиболее подходящим источником НСК и/или нейронов *in vitro* являются культуры плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) в частности, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). ИПСК характеризуются длительной способностью к самообновлению и наличием потенциала к дифференцировке в любой тип клеток трех зародышевых слоев (Hanna et al., 2010). Поскольку эти клетки обладают неограниченным пролиферативным потенциалом, их можно поддерживать в культуре при определенных условиях в течение многих лет (Hanna et al., 2010).

Помимо того, что *in vitro* культуры нейронов и НСК, полученные из ИПСК, дают возможность изучать фундаментальные процессы нейрогенеза, эти клетки могут быть использованы для моделирования различных неврологических и нейродегенеративных заболеваний, в том числе генетически наследуемых (Bahmad et al., 2017; Dashinimaev et al., 2017; de Rus Jacquet et al., 2021; Valadez-Barba et al., 2020; Okano et al., 2022). Следует отметить, что в настоящее время проводятся многочисленные исследования, направленные на использование таких клеток для лечения различных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофической склероз, рассеянный склероз, множественная системная атрофия и т.д. (Garitaonandia et al., 2016; Bordoni et al., 2018; Ford et al., 2020). Кроме того, культуры НСК или нейронов, дифференцированные из ИПСК от здоровых доноров и от доноров с заболеваниями, могут быть использованы в качестве тест-систем для поиска потенциальных лекарственных веществ, изучения их терапевтического эффекта и механизма воздействия на клетки нервной системы человека (Benchoua et al., 2021; Okano et al., 2022).

Одной из основных проблем в данной области является выбор подхода и протокола дифференцировки нейронов и способов их культивирования. Поэтому выявление основных преимуществ и недостатков различных подходов, а также их сравнение, является актуальной задачей современной клеточной биологии.

1.2. Степень разработанности темы исследования

Существует большое разнообразие различных подходов и протоколов дифференцировки ИПСК в нейроны *in vitro* (Chambers et al., 2009; Galiakberova, Dashinimaev, 2020; Zhang et al., 2013). Поскольку не всегда получаемые культуры содержат только нейроны, в данной работе результат дифференцировки ИПСК в нейральном направлении будет обозначаться термином «нейральная культура».

Одним из наиболее популярных подходов на сегодняшний день является метод с DUAL SMAD ингибированием, разработанный Chambers и коллегами в

2009 году (Chambers et al., 2009). Данный метод основан на ингибировании двух путей активации SMAD-сигналинга (Lefty/Activin/TGF β - и BMP-сигнальных путей) в плюрипотентных стволовых клетках с помощью малых молекул (Smith et al., 2008; Yu et al., 2008b; Chambers et al., 2009). В результате такого ингибирования происходит дифференцировка ПСК в клетки нейроэктодермы и их производные – нейральные стволовые клетки. Полученные НСК могут быть культивированы в течение некоторого количества пассажей или направлены в терминальную дифференцировку. Такой подход в каком-то смысле имитирует поэтапные процессы нейрогенеза. В результате можно получить нейральные культуры, в которых, однако, присутствуют не только нейроны разных типов, но и различные нейральные предшественники, а также глиальные клетки (Chambers et al., 2009). Кроме того, хотя данный подход является простым, он занимает достаточно длительное время.

Другим популярным подходом к дифференцировке ИПСК в нейроны является нейральная индукция с помощью экзогенной гиперэкспрессии в клетке транскрипционных факторов, определяющих нейрональную судьбу, таких как NGN2 (Zhang et al., 2013; Lin et al., 2021). В протоколах экзогенной гиперэкспрессии гена *NGN2* могут использоваться плазмиды, вирусы, синтетическая мРНК или технологии CRISPR-редактирования генома для получения конститутивной, индуцируемой или временной экспрессии. Наиболее известным и используемым протоколом является лентивирусная трансдукция ИПСК с системой TetON для регулируемой тетрациклин-зависимой экспрессии трансгена (Urlinger et al., 2000; Zhang et al., 2013). Индукция временной гиперэкспрессии *NGN2* в ИПСК приводит к их быстрой дифференцировке в нейроны, не задерживая клетки на стадии предшественников. При этом получаемые нейральные культуры в основном состоят из нейронов и не содержат глиальных клеток (Zhang et al., 2013). Несмотря на быстроту и эффективность, данный метод является трудоемким ввиду необходимости получения трансгенных ИПСК, экспрессирующих *NGN2* в составе системы TetON.

Хотя оба вышеупомянутых подхода получения нейронов достаточно активно используются и изучаются, не всегда у исследователей есть понимание, какой подход следует использовать для конкретных задач. Кроме того, у каждого из подходов существует множество различных протоколов и модификаций, от которых может зависеть конечный результат применения данных подходов.

1.3. Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования является изучение и сравнение двух разных подходов к дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в нейроны в условиях *in vitro*: подхода на основе протокола с DUAL SMAD ингибированием и подхода на основе экзогенной гиперэкспрессии *NGN2*.

Задачи исследования:

1) Получить нейральные культуры из разных линий ИПСК человека при помощи метода с DUAL SMAD ингибированием, охарактеризовать их гетерогенность различными методами, а также исследовать влияние длительности культивирования НСК на получаемые нейральные культуры при помощи анализа данных общих транскриптомов и данных секвенирования РНК единичных клеток.

2) Оптимизировать известный протокол дифференцировки ИПСК в нейроны с индукцией экзогенной гиперэкспрессии *NGN2* на основе лентивирусной доставки трансгена в составе тетрациклин активируемой системы TetON и исследовать кальциевую активность полученных нейральных культур.

3) При помощи методов количественной ОТ-ПЦР и анализа транскриптомных данных сравнить нейральные культуры, полученные из одной линии ИПСК, но при помощи разных подходов: подхода на основе протокола с DUAL SMAD ингибированием и подхода на основе экзогенной гиперэкспрессии *NGN2*.

1.4. Объект и предмет исследования

Объектом исследования данной диссертационной работы являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека. Предметом исследований диссертации являются клеточный состав и функциональная зрелость нейральных культур, дифференцированных из ИПСК с помощью разных методов.

1.5. Научная новизна полученных результатов

В результате выполнения данной работы впервые было показано влияние длительности культивирования НСК, полученных из ИПСК подходом с DUAL SMAD ингибированием, на изменение общих транскриптомных профилей, а также клеточного разнообразия в спонтанно дифференцированных из них нейральных культурах. Нами было показано, что в процессе длительного культивирования линии НСК-KYOU наблюдается значимое истощение популяций глиальных клеток в нейральных культурах, спонтанно дифференцированных из данных НСК. При этом, хотя нейральные культуры, полученные таким способом из разных линий ИПСК, отличаются между собой, имеется общая тенденция изменения их транскриптомных профилей с увеличением пассажей соответствующих линий НСК.

Мы получили NGN2-индуцированные нейроны из ИПСК с помощью оригинально модифицированного протокола дифференцировки с лентивирусной трансдукцией. Впервые на модели с генетически кодируемым кальциевым индикатором GCaMP6s нами было показано, что культура NGN2-индуцированных нейронов является функционально активной, отвечает на воздействие глутамата и демонстрирует наличие активных глутаматных NMDA и AMPA и/или каинатных рецепторов. При этом приток кальция в цитозоль обусловлен только ионотропными рецепторами к глутамату, но не метаботропными.

Впервые было проведено сравнение транскриптомных профилей нейральных культур, полученных двумя разными подходами: подходом с дифференцировкой нейральных культур через стадию НСК, полученных из ИПСК методом с DUAL

SMAD ингибированием, а также подходом с экзогенной гиперэкспрессией *NGN2* на основе лентивирусной доставки трансгена в составе тетрациклин активируемой системы TetON.

1.6. Научная и практическая значимость работы

Данная работа раскрывает преимущества и недостатки основных подходов дифференцировки ИПСК в нейральные культуры *in vitro*. Эти недостатки должны учитываться исследователями при выборе оптимального протокола под конкретные цели. Кроме того, была разработана модель *NGN2*-индуцированных нейральных культур, экспрессирующих флуоресцентный кальциевый индикатор *GCaMP6s*, который позволяет визуализировать специфическую кальциевую активность нейронов. Также полученные данные вносят вклад в понимание фундаментальных основ дифференцировки ИПСК в нейральном направлении, которые в дальнейшем будут полезны для разработки оптимальных нейральных моделей для скрининга лекарств, а также изучения нейрогенеза и заболеваний нервной системы.

1.7. Методология и методы исследования

Исследования, представленные в данной работе, основываются на современных методологических подходах. Выбор используемых методов обоснован предварительным анализом данных литературы, степенью разработанности данной темы, а также постановкой цели и задач исследования.

Работа выполнена с применением методов клеточной и молекулярной биологии. Анализ данных проводился с помощью релевантных методов статистической обработки данных. Преимуществом настоящей работы также является использование современных методов молекулярной биологии и биоинформатики.

1.8. Положения, выносимые на защиту

1) Спонтанная нейральная дифференцировка НСК, полученных из ИПСК с помощью подхода с DUAL SMAD ингибированием, приводит к получению гетерогенных нейральных культур, состав которых зависит от изначальной линии ИПСК. Клеточный спектр получаемых таким образом нейральных культур достоверно и значимо изменяется с увеличением длительности культивирования НСК.

2) Модифицированный протокол дифференцировки ИПСК в нейральном направлении при помощи лентивирусной доставки NGN2 в составе тетрациклин регулируемой системы TetON позволяет получать функционально зрелые нейральные культуры человека, нейрофизиологическую активность которых можно изучать на модели с кальциевым индикатором GCaMP6s.

3) Разные подходы к дифференцировке ИПСК в нейральном направлении имеют свои преимущества и недостатки, что обуславливает их применимость для определенных научных задач. Подход с DUAL SMAD ингибированием позволяет получать более широкий спектр типов нейронов, а также глию, однако нейроны требуют длительного созревания, а сами культуры являются гетерогенными. Подход с экзогенной гиперэкспрессией NGN2 при помощи лентивирусной доставки трансгена в составе системы TetON позволяет получать относительно чистые культуры более зрелых нейронов, однако подход является трудоемким, а спектр клеточных типов довольно сильно ограничен.

1.9. Степень достоверности результатов

Результаты диссертационной работы характеризуются высокой степенью достоверности. Автором работы был проведён глубокий анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования, что позволило сформировать понимание темы, а также подобрать наиболее эффективные методики и протоколы для проведения экспериментов. Все эксперименты были проведены с применением стандартизированных методик, качественных реактивов

и материалов. Полученные данные были обработаны с помощью статистического анализа с использованием адекватных критериев, что позволило грамотно интерпретировать результаты.

1.10. Апробация результатов работы

Результаты работы были представлены на Конференции молодых ученых «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ» в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (Москва, 12-14 октября 2021 года), а также на III международной конференции “StemCellBio-2023: Трансляционная медицина – спектр возможностей” (Санкт-Петербург, 17-18 ноября 2023 года).

1.11. Публикации

По теме и материалам работы было опубликовано 4 печатных работы, в том числе 1 обзорная статья. Все статьи опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М. В. Ломоносова. Список публикаций представлен в разделе 9.

1.12. Личный вклад автора в проведение исследования

Автору диссертационного исследования принадлежит основная роль в анализе данных литературы, формулировке целей и задач исследования, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке данных, кроме биоинформатического анализа данных транскриптомов и статистической обработки данных иммуноцитохимического окрашивания. Автор принимал непосредственное участие в написании подготовке тезисов и публикаций.

1.13. Финансовая поддержка

Работа была поддержана грантом № 075-15-2019-1789 от Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, выделенного Центру высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины.

1.14. Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка публикаций, списка литературы и приложения. Работа изложена на 173 страницах машинописного текста, содержит 35 рисунков и 3 таблицы.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. *Нейрогенез и нейральные стволовые клетки*

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Galiakberova A. A., Dashinimaev E. B. Neural Stem Cells and Methods for Their Generation From Induced Pluripotent Stem Cells in vitro // Front Cell Dev Biol. — 2020. — Vol. 8. — P. 815.

Нейральные стволовые клетки (НСК) – это общее название мультипотентных недифференцированных клеток, способных к самообновлению и генерации всех типов нейронов, олигодендроцитов и астроглии. Нейрональные стволовые клетки, или нейрональные прогениторные клетки (НПК) – это стволовые клетки, коммитированные к дифференцировке только в нейроны.

2.1.1. *Эмбриональный нейрогенез*

НСК играют главную роль как в эмбриональном, так и во взрослом нейрогенезе – многоступенчатом процессе развития нейронов из клеток-предшественников. В соответствии с гипотезой, выдвинутой в обзоре Alvarez-Buylla et al., 2001, в периоде эмбрионального нейрогенеза существует несколько типов клеток, которые можно назвать НСК. Нейроэпителий (НЭ) – эпителиальные клетки вентрикулярной зоны (ВЗ) нервной трубки, обладающие апикально-базальной полярностью. Апикальный отросток этих клеток контактирует с вентрикулярной поверхностью, а базальный отросток с противоположной, пиальной поверхностью нервной трубки. Самообновление этих клеток происходит путем симметричного деления (Williams, Price, 1995), когда генерируются две одинаковые стволовые клетки. При асимметричном же делении образуются одна стволовая клетка, а вторая – более дифференцированный нейрональный предшественник либо нейрон (Huttner, Brand, 1997). Для НЭ клеток характерны такие маркеры, как ZO-1, Sox2, Nestin, Hes1, Hes3 и др.

Нейроэпителиальные клетки нервной трубки затем трансформируются в другой тип НСК – радиальную глию (РГ) (Malatesta et al., 2000). Радиальные глиальные клетки — это гетерогенная популяция НСК, имеющая в цитоплазме

гранулы гликогена и морфологию, сходную с астроглиальными клетками, но одновременно обладающую свойствами НЭ. Эти клетки, как и нейроэпителиальные, имеют апикально-базальную полярность, оставаясь в контакте с пиальной и вентрикулярной поверхностями, и демонстрируют наличие классических нейроэпителиальных маркеров, таких как Nestin, Vimentin. Однако белки плотных соединений окклюдины и ZO-1, присутствующие в НЭ клетках, в РГ заменяются белками клеточной адгезии, такими как N-кадгерины (Aaku-Saraste et al., 1996), а экспрессия *Hes3* сменяется повышением экспрессии *Hes5* (Kageyama et al., 2008a). При этом может детектироваться наличие глиальных маркеров, таких как астроцит-специфический транспортер глутамата (GLAST), липидсвязывающий белок мозга (BLBP (Fabp7)), глутаматсинтаза (GS), S100 β и другие (Akimoto et al., 1993; Shibata et al., 1997; Gotz et al., 1998; Hartfuss et al., 2001; Patro et al., 2015). Также РГ клетки характеризуются экспрессией *Sox2*, *Pax6*, *Hes1* (Kageyama et al., 2008a; Malatesta et al., 2008). При этом присутствие GFAP детектируется лишь в некоторых РГ (Pollen et al., 2015). Было показано, что РГ клетки составляют довольно гетерогенную популяцию, которая в процессе развития может изменять свои морфологию и профиль экспрессии генов, поэтому список маркеров может быть шире и зависеть от региона развивающегося мозга (Malatesta et al., 2008; Pollen et al., 2015). Как и нейроэпителиальные клетки, РГ-клетки способны к асимметричному и симметричному делению. Асимметричное деление дает начало дочерней РГ-клетке и либо более дифференцированной промежуточной прогениторной клетке (ППК), либо терминально дифференцированной клетке (Noctor et al., 2004).

В эмбриональном нейрогенезе клетки радиальной глии прямо или косвенно производят большинство нейронов центральной нервной системы (ЦНС) (Malatesta et al., 2003; Noctor et al., 2004). Тип ППК, которые являются предшественниками нейронов, называют базальными или нейрональными промежуточными прогениторными клетками (НППК). НППК это клетки часто с мультиполярной морфологией, которые в основном заселяют субвентрикулярную зону нервной

трубки (Noctor et al., 2004). НППК обладают ограниченным пролиферативным потенциалом и способны только к симметричному делению с образованием либо двух нейронов, либо двух дочерних НППК. Этот тип клеток характеризуется профилем экспрессии, отличным от РГ клеток, однако он зависит от региона развивающегося мозга. Так, кортикальные НППК могут быть охарактеризованы экспрессией таких генов как *Tbr2*, *Cux1* и *Cux2*, но не *Pax6* (Hevner et al., 2001; Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004; Kowalczyk et al., 2009).

РГ клетки дают начало не только клеткам нейронального дифферона, но и олигодендроцитам, астроцитам и их предшественникам (deAzevedo et al., 2003; Malatesta et al., 2003), а также эпендимным клеткам, выстилающим поверхность желудочков и спинномозгового канала (Spassky et al., 2005) (Рис. 1).

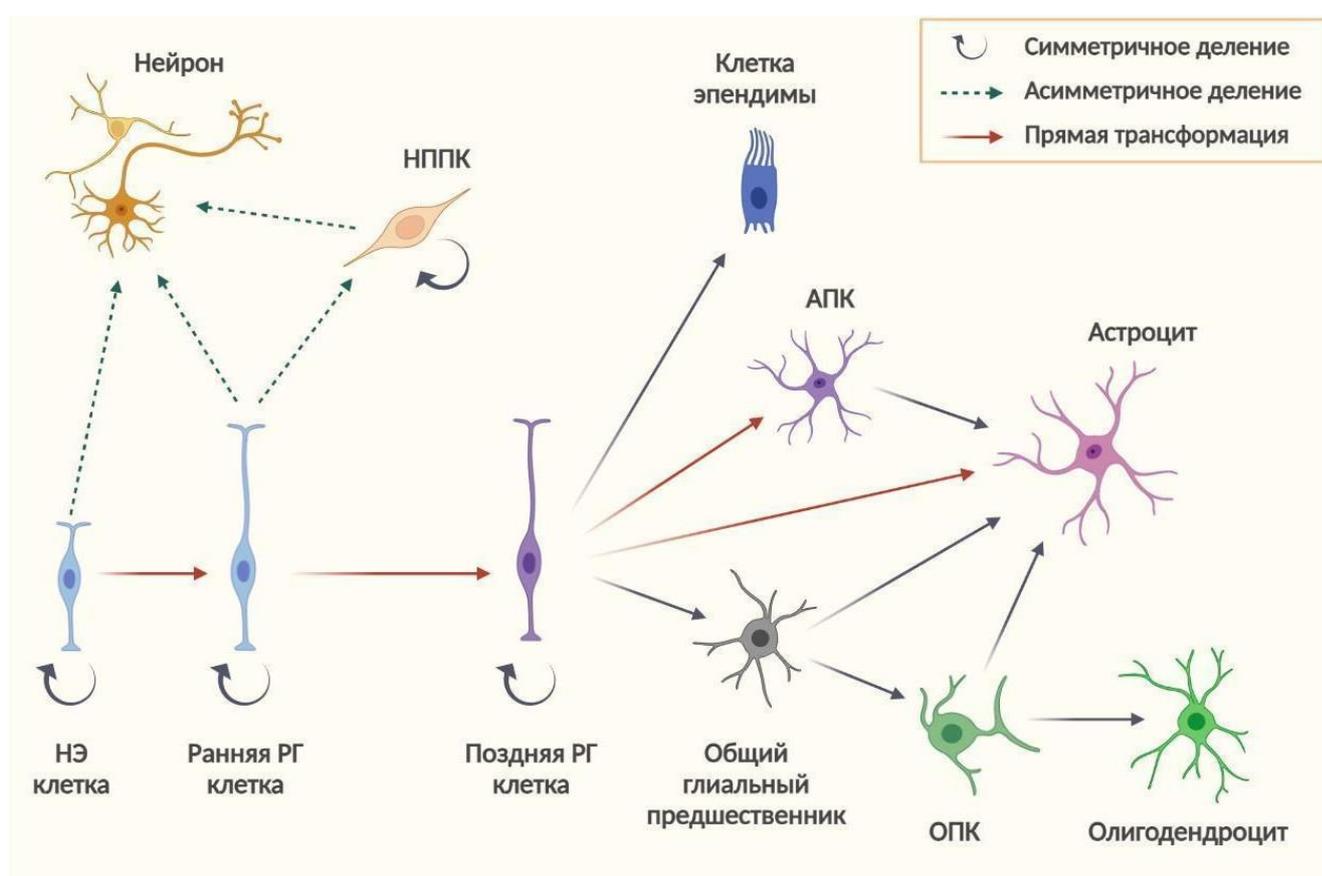


Рисунок 1. Схематическое изображение ветвей дифференцировки НСК в эмбриональном нейрогенезе. НЭ – нейроэпителиальная клетка, РГ – клетка радиальной глии, НППК – нейрональная промежуточная прогениторная клетка, АПК – астроцитарная прогениторная клетка, ОПК – олигодендроцитарная прогениторная клетка.

Однако на поведение РГ клеток и направление их дифференцировки существенное влияние могут оказывать внутренняя клеточная сигнализация и локальные сигналы окружающей среды (Gotz et al., 2002). Сигналы окружающей среды, в свою очередь, определяются временем развития и локализацией клетки в развивающейся нервной системе (Desai et al., 2000; Shen et al., 2006). Так, вдоль дорсовентральной оси переднего мозга выделяют несколько основных зон: перегородка, кора, а также латеральный, каудальный и медиальный ганглионарные бугорки (ЛГБ, КГБ и МГБ) (Bayraktar et al., 2014).

2.1.2. Эмбриональный глиогенез

Известно, что у грызунов основной глиогенез происходит на более поздних стадиях эмбрионального развития после основной волны дифференцировки нейронов, на стадии E16-E17 у мышей. Глиогенез у человека активно протекает после 20 недель беременности (Malatesta et al., 2000; Malatesta et al., 2003; Liu et al., 2022). Более того, истощение пула РГ клеток совпадает с увеличением числа астроцитов (Noctor et al., 2008). Таким образом, РГ клетки могут трансформироваться в астроцитарные промежуточные прогениторные клетки (АППК), либо в астроциты напрямую, что подтверждается взаимной экспрессией одних и тех же маркеров (Mission et al., 1991) (Рис. 1). Причем одна и та же РГ клетка, которая ранее делилась с образованием нейрона или НППК, впоследствии может дифференцироваться в астроглиальную клетку (Noctor et al., 2008). Граница между РГ клеткой, коммитированной в астроцитарную линию, и АППК довольно размыта. Часто их обозначают общим термином астроцитарных предшественников (АПК). Астроцитарные предшественники часто характеризуют экспрессией таких генов, как *Aldh1L1*, *Slc1a3* (GLAST), *Sox9*, *CD44*, *BLBP* (*Fabp7*) и др., хотя многие из них экспрессируются также и в дифференцированных астроцитах (Lattke, Guillemot, 2022).

Было показано, что астроциты и их предшественники являются крайне гетерогенными популяциями клеток, свойства и локализация которых, вероятно,

определяются временем генерации и позиционированием РГ клеток, из которых они произошли (Hochstim et al., 2008). В развивающемся мозге мыши недавно были идентифицированы подгруппы клеток РГ, коммитированные в астроглию: SPARC⁺ и SPARCL1⁺ (Liu et al., 2022). Предполагается, что SPARC⁺ это клетки, которые обеспечивают ранние волны астроглиогенеза в поздней эмбриональной вентрикулярной зоне. SPARCL1⁺ клетки, вероятно, обеспечивают более позднюю волну. Кроме того, они имеют выраженную экспрессию *EGFR* и *OLIG2*, что позволяет предположить, что эти клетки, вероятно, имеют потенции к дифференцировке в олигодендроциты (Fu et al., 2021; Liu et al., 2022). Более того, популяцию РГ клеток SPARCL1⁺ EGFR⁺ OLIG2⁺ выделили как основную группу клеток–предшественников астроцитов в развивающейся коре головного мозга человека (Fu et al., 2021).

Эмбриональный олигодендроцитогенез происходит в нескольких местах развивающегося мозга в три волны. Обычно олигодендроцитарные промежуточные прогениторные клетки не выделяют отдельно, а обозначают общим термином олигодендроцитарные прогениторные клетки (ОПК). Предполагается, что первые ОПК образуются из Nkx2.1-положительных РГ клеток, расположенных в МГБ, во время основной волны нейрогенеза – примерно на стадии E9-E10 развития мыши (Kessarlis et al., 2006). Впоследствии появление ОПК и олигодендроцитов происходит из Gsh2⁺ предшественников в ЛГБ и КГБ, а последняя волна генерации ОПК происходит от Emx1⁺ предшественников в дорсальной зародышевой зоне после рождения (Kessarlis et al., 2006). ОПК обычно характеризуется экспрессией таких генов как *NG2*, *PDGFRα*, *Olig1*, *Olig2* и *Sox10* (Britsch et al., 2001; Takebayashi et al., 2002; Rivers et al., 2008). ОПК пролиферируют, мигрируют по всей ЦНС, а затем, по мере дифференцировки и созревания, претерпевают ряд структурных и биохимических изменений (Spassky et al., 1998). В ходе этого процесса клетки теряют ОПК-специфические белки и начинают экспрессировать поверхностные антигены, такие как олигодендроцитарный антиген О4, олигодендроцитарная CNP (2',3'-

циклонуклеотид-3'-фосфодиэстераза) и МВР (основной белок миелина) (Dimou, Gotz, 2014).

2.1.3. Нейрогенез во взрослом мозге млекопитающих

Во взрослом мозге млекопитающих нейрогенез происходит в субвентрикулярной зоне бокового желудочка (СВЗ) и субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа (СГЗ) (Kempermann et al., 1997; Imayoshi et al., 2008). Было показано, что у некоторых видов, например, у грызунов, нейрогенез в данных областях активен на протяжении всей жизни (Altman, 1965; Altman, Das, 1969). Вопрос о существовании активных НСК и генерации новых нейронов в мозге взрослого человека остается открытым. На сегодняшний день имеется много различных противоречивых данных на этот счет (Boldrini et al., 2018; Sorrells et al., 2018; Moreno-Jimenez et al., 2019).

В СВЗ и СГЗ расположены НСК, представленные клетками, подобными клеткам радиальной глии. Как и РГ клетки развивающегося эмбрионального мозга, НСК в СВЗ и СГЗ характеризуются такими маркерами, как Pax6, Glast, Nestin, Vimentin, Hes5, Vlbp (Fabp7), Aldh1L1, Sox2 и функционально и морфологически похожи на астроциты, хотя ими не являются (Ferri et al., 2004; Urban, Guillemot; 2014). Эти клетки также способны и к симметричным, и к асимметричным делениям, но отличаются от РГ клеток склонностью именно к симметричным делениям и более низкой пролиферативной активностью (Simons, Clevers, 2011; Obernier et al., 2018). Как и РГ клетки, НСК в СВЗ и СГЗ также проявляют гетерогенность в отношении своего происхождения и типов клеток, которым они дают начало.

НСК в СВЗ называются клетками типа В и состоят из двух похожих друг на друга популяций: клеток В1 и В2. При этом клетки В2 являются потомками клеток В1 (Obernier et al., 2018). Клетки типа В редко делятся либо самообновляясь, либо давая начало промежуточным пролиферирующим предшественникам нейронов, именуемым ТАС (Transit-Amplifying Cells) или С-клетками (Doetsch et al., 1999)

(Рис. 2). Клетки типа С клетки подобны НППК в эмбриональном нейрогенезе и способны к нескольким симметричным делениям (Ponti et al., 2013). Это GFAP- и Vimentin-отрицательные клетки, которые характеризуются экспрессией генов таких транскрипционных факторов, как *Ascl1 (Mash1)*, *Pax6* и *Dlx2* (Doetsch et al., 1997; Ponti et al., 2013). Клетки типа С, в свою очередь, дают начало нейробластам (клеткам типа А) (Lois et al., 1996). Нейробласты являются ближайшими предшественниками нейронов, но все еще имеют способность к нескольким делениям (Ponti et al., 2013). Этот тип клеток остается Nestin-положительным и GFAP и Vimentin-отрицательным, но отличается от своих предшественников экспрессией полисиллированной молекулы клеточной нейрональной адгезии (PSA-NCAM), даблкортина (DCX) и TuJ1- (β -III-тубулина) (Doetsch et al., 1997; Francis et al., 1999). У большинства млекопитающих, в т.ч. мыши, нейробласты цепочкой мигрируют в область обонятельной луковицы, где затем дифференцируются в интернейроны, которые способствуют различению запаха и ассоциации «запах-вознаграждение» (Doetsch, Alvarez-Buylla, 1996; Grelat et al., 2018). При этом клетки В1 имеют региональные паттерны экспрессии транскрипционных факторов, аналогичные тем, которые наблюдаются при эмбриональном развитии, и в зависимости от расположения генерируют по меньшей мере десять различных подтипов интернейронов обонятельной луковицы (Delgado, Lim, 2015). Кроме того, клетки В1 в СВЗ также продуцируют олигодендроциты и их предшественников (Nait-Oumesmar et al., 1999).

РГ-подобные НСК в СВЗ называются клетками типа 1, в них детектируются такие маркеры, как *Pax6*, Nestin, *Vlbp*, *Sox2* и др. Эти клетки, как и клетки типа В в СВЗ, часто рассматривают как покоящиеся (Urban et al., 2016). Они претерпевают редкие симметричные или асимметричные деления и дают начало пролиферирующим промежуточным прогениторным клеткам (клеткам типа 2), аналогичным клеткам типа С в СВЗ (Filippov et al., 2003). Клетки типа 2 делятся симметрично, самообновляясь или генерируя нейробласты (клетки типа 3) (Goncalves et al., 2016) (Рис. 2). Нейробласты созревают и помимо DCX начинают экспрессировать маркер зрелых нейронов NeuN и кальций связывающий белок

кальбиндин. Они мигрируют в гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа. Когда молодые нейроны достигают конечной точки, начинается рост дендритов и аксона в направлении к молекулярному слою в направлении к полю СА3 (Sun et al., 2015). Было показано, что у взрослых грызунов НСК в СГЗ дают начало возбуждающим нейронам, которые могут быть вовлечены в формирование памяти и способности к обучению (Ming, Song, 2011).

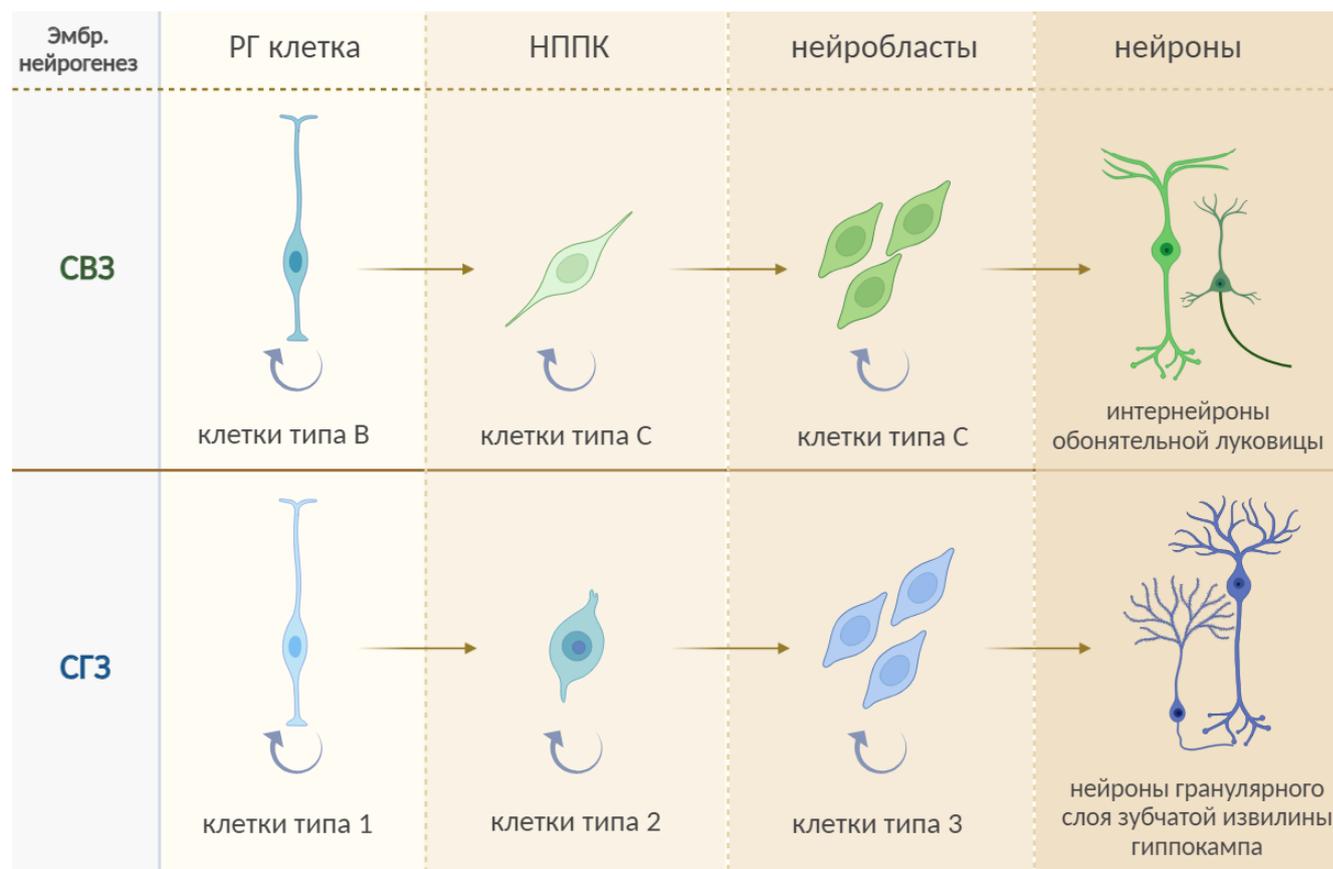


Рисунок 2. Схематическое представление нейрональных ветвей дифференцировки НСК в нейрогенных нишах взрослого мозга и их сопоставление с эмбриональным нейрогенезом. СВЗ – субвентрикулярная зона боковых желудочков, СГЗ – субгранулярная зона зубчатой извилины гиппокампа, РГ – клетка радиальной глии, НППК – нейрональная промежуточная прогениторная клетка.

2.1.4. Контроль активности нейральных стволовых клеток

Хотя НСК и способны к длительному (но не бесконечному) самообновлению и генерации более дифференцированного предшественника нейронов либо предшественника астроцитов и/или олигодендроцитов, большую часть времени

они находятся в покоящемся состоянии (Calzolari et al., 2015; Urban et al., 2019). Именно это состояние способствует сохранению дифференцировочного потенциала НСК и обеспечению резервного пула клеток для нейрогенеза в течение всей жизни животного (Ribeiro, Xapelli, 2021).

Активность НСК контролируется различными факторами, в том числе сигналами нейрогенной ниши. Нейрогенная ниша – специфическая микросреда, окружающая НСК, включающая в себя различные клеточные популяции, а также внеклеточный матрикс, сигнальные факторы короткого и дальнего действия (которые могут попадать в нишу из кровеносных сосудов) и межклеточные контакты (Alvarez-Buylla, Lim, 2004). Среда ниши регулирует состояние НСК, удерживая их в состоянии покоя или же передавая сигналы для их активации. Сигналы от нейрогенной ниши также оказывают влияние на клеточную дифференцировку, делая этот процесс специфичным для конкретного региона (Alvarez-Buylla, Lim, 2004; Ribeiro, Xapelli, 2021). Контроль активности НСК наиболее важен именно во взрослом мозге.

Одними из ключевых внутренних регуляторов состояния НСК являются различные факторы транскрипции (ТФ). Например, было показано, что экспрессия *NFIX* была повышена именно в покоящихся НСК, а его гиперэкспрессия в пролиферирующих НСК приводила к остановке клеточного цикла без индукции дифференцировки (Martynoga et al., 2013). NF κ B – это транскрипционный фактор, который контролирует экспрессию генов белков межклеточного матрикса, рецепторов к межклеточному матриксу, белков клеточной и межклеточной адгезии. Таким образом, переход НСК в состояние покоя включает в себя изменение их адгезии к межклеточному матриксу и соседним клеткам, как это было предположено ранее (Kazaniet al., 2010). В поддержании покоя также задействован ТФ REST. Он ингибирует биогенез рибосом, клеточное деление и экспрессию пронеуральных генов (таких как *Ascl1*, *NeuroD1*), а также генов внеклеточного матрикса (Gao et al., 2011; Mukherjee et al., 2016). Передача сигналов BMP также способствует покоящемуся состоянию НСК нейрогенных ниш

взрослого мозга, несмотря на то, что в эмбриональном нейрогенезе передача сигналов BMP критически важна для пролиферации (Urban, Guillemot, 2014). Показано, что нарушение передачи BMP приводит к чрезмерной пролиферации и истощению пула НСК гиппокампа (Mira et al., 2010). Так, BMP4 способствует экспрессии генов семейства ингибиторов дифференцировки, которые, в свою очередь, ингибируют активность транскрипционных факторов bHLH, в т.ч. *Ascl1* и *Olig2*. *Ascl1* является регулятором нейрогенеза (Castro et al., 2011). В покоящихся НСК он подавлен, но при переходе НСК в активное состояние он способен повторно экспрессироваться и способствовать их пролиферации (Andersen et al., 2014). В активных НСК *Ascl1* постепенно подвергается деградации, что в итоге переводит НСК обратно в состояние покоя (Urban et al., 2016). Одним из факторов, поддерживающих активную пролиферацию НСК является *Sox2*. Известно, что *Sox2* экспрессируется в пролиферирующих нейрональных предшественниках эмбрионального мозга и нейрогенных зонах взрослого мозга (Ellis et al., 2004). Этот фактор подавляет сигнальные пути, ведущие к покою, путем повышения экспрессии ядерного рецептора *Tlx* (Shimozaki et al., 2012). *CHD7* участвует в поддержании популяции покоящихся НСК путем ремоделирования хроматина в определенных генетических местоположениях, облегчая доступ либо к генам клеточного цикла в точке выхода из состояния покоя, либо к пронеуральным генам, таким как *Sox4* и *Sox11* (Feng et al., 2013). Покоящиеся НСК отличаются от активных не только по экспрессии генов, но и по метаболическому профилю. Например, в активных НСК по сравнению с покоящимися увеличены уровни малонил-КоА, которые синтезируются из ацетил-КоА ферментом ацетил-КоА карбоксилазой (Knobloch et al., 2017). Активное состояние связано с синтезом белка и иницированием дифференцировки, в то время как состояние покоя связано с высоким гликолитическим и липидным метаболизмом (Llorens-Bobadilla et al., 2015).

2.2. Сигнальные пути, задействованные в нейрогенезе

В настоящее время механизмы нейрогенеза млекопитающих и в особенности человека до сих пор остаются неясными. Остается много вопросов о последовательностях нейрональной дифференцировки и линиях клеток-предшественников, о происхождении и различиях типов НСК. Тем не менее на сегодняшний день известны некоторые факторы и сигнальные пути, вовлеченные в нейрогенез.

Notch-сигналинг является одним из механизмов поддержания самообновления НСК и их идентичности, а также контроля нейрональной дифференцировки. Предполагается, что основная функция пути Notch в НСК заключается в поддержании их пролиферативного и недифференцированного состояния (Kageyama et al., 2008b). Активация рецептора Notch на НСК происходит при его взаимодействии с лигандами, такими как Jagged1, Delta-like 1, 3, 4 (Dll1, Dll3, Dll4), расположенными на клеточных мембранах окружающих клеток. В процессе нейрогенеза продукты пронеуральных генов, таких как *Ascl1* (также известный как *Mash1*) и *Ngn2*, запускают экспрессию лигандов Dll1, Dll3 и/или Jagged1 на клеточной мембране нейральных прогениторных клеток и их более дифференцированных потомков. Лиганды взаимодействуют с трансмембранными Notch-рецепторами на НСК, активируя Notch-сигналинг (Lindsell et al., 1996; Kageyama et al., 2008b). В свою очередь, этот путь индуцирует в НСК экспрессию генов особых транскрипционных факторов – основных спирально-петлевых (bHLH) факторов – *Hes1* и *Hes5*. *Hes1* и *Hes5* подавляют экспрессию лигандов Notch и пронеуральных транскрипционных факторов, вызывая ингибирование нейрональной дифференцировки и поддержание статуса прогенитора клетки (Ohtsuka et al., 1999). Таким образом, клетка предотвращает трансформацию соседней клетки в клетку того же типа. Этот механизм называется «латеральным ингибированием» и участвует в поддержании разнообразия клеток (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Те клетки, которые имеют высокую экспрессию лигандов Notch и пронеуральных генов, будут подвергаться дифференцировке, а клетки,

экспрессирующие Notch-рецептор и имеющие активную передачу Notch-сигнализации, останутся НСК (Kageyama et al., 2008b). Кроме того, взаимодействие между лигандами на НППК и Notch-рецепторами на НСК функционирует как механизм обратной связи, поддерживающий состояние покоя НСК, тем самым предотвращая преждевременное истощение пула НСК (Imayoshi et al., 2010).

Известно, что *Jag1* (*Jagged1*) экспрессируется эпендимальными клетками и астроцитами СВЗ взрослого головного мозга, экспрессия *Dll1* заметна в клетках типа С, а рецепторы Notch экспрессируются клетками типа В (НСК) (Stump et al., 2002; Nyfeler et al., 2005; Basak et al., 2012). В СГЗ зубчатой извилины гиппокампа взрослого человека *Jag1* экспрессируется преимущественно астроцитами ниши, клетками типа 2 (НППК) и нейронами. В то же время активный Notch-сигналинг и экспрессия *Hes5* выражены в клетках типа 1 (НСК), но отсутствуют в клетках типа 2 (НППК) (Stump et al., 2002; Basak, Taylor, 2009). Уровни белков Hes в клетке колеблются с частотой 2-3 ч. Эти колебания, обусловленные их собственной отрицательной обратной связью и быстрой деградацией, обеспечивают временные колебания экспрессии пронейральных генов (*Ascl1* и *Ngn2*), которые подавляются белками Hes. Было показано, что периодическая экспрессия *Hes1* присутствует в дифференцирующихся стволовых и прогениторных клетках, а постоянная экспрессия характерна для самообновляющихся НСК (Imayoshi et al., 2010; Shimojo et al., 2011). Интересно, что эффект от *Ascl1* зависит от характера его экспрессии: колебательная экспрессия способствует пролиферации нейрональных предшественников, в то время как его стабильная экспрессия, наоборот, индуцирует дифференцировку (Imayoshi et al., 2013). Во взрослом головном мозге экспрессия *Ascl1* не детектируется в покоящихся НСК, но его динамическая экспрессия наблюдается в некоторых активированных НСК (Andersen et al., 2014).

WNT-β-катениновый путь (канонический путь WNT) участвует в регуляции пролиферации, дифференцировке и миграции клеток (Clevers, 2006). В частности, WNT-β-катениновый путь вовлечен в нейрогенез как эмбриональный, так и постнатальный, и взрослый (Wrobel et al., 2007; Varela-Nallar, Inestrosa, 2013).

β -катенин – активатор специальных транскрипционных факторов. В отсутствие WNT-сигнализации цитоплазматический β -катенин связан с комплексом, состоящим из белков аденоматозной полипозной палочки (APC), протеин-киназы GSK-3 и белка Axin, которые способствуют убиквитинированию и деградации β -катенина. В результате взаимодействия WNT-лиганда с рецепторными комплексами Frizzled-LRP5/6 на поверхности клетки происходит Dishevelled-опосредованное разрушение комплекса APC-GSK-3-Axin, накопление β -катенина в цитоплазме и его перенос в ядро, где он запускает экспрессию генов-мишеней WNT (MacDonald et al., 2009; Li et al., 2012). Канонический путь WNT может иметь разные эффекты в зависимости от клеточного контекста и времени развития: способствовать поддержанию пролиферации предшественников или, наоборот, дифференцировке в нейроны. Так, во время раннего нейрогенеза в клетках радиальной глии сигнальный путь WNT- β -катенина способствует их самообновлению, тем самым поддерживая популяцию РГ клеток (Wrobel et al., 2007). В СВЗ мозга взрослой мыши канонический WNT-сигналинг в НСК и НППК способствует их пролиферации, а обработка Dickkopf1, напротив, подавляет этот процесс (Adachi et al., 2007). Однако в более поздних НППК или РГ канонический WNT-сигналинг стимулирует прогрессию их дифференцировки в нейроны *in vitro* и *in vivo* (Hirabayashi et al., 2004; Munji et al., 2011). Этот эффект реализуется за счет того, что β -катенин способен активировать промоторы генов пронеуральных транскрипционных факторов нейрогенинов 1 и 2 (Ngn1 и Ngn2), NeuroD1 и Prox1, которые играют роль в нейрональной дифференцировке, а также в формировании синапсов и созревании нейронов (Hirabayashi et al., 2004; Kuwabara et al., 2009). Однако показано, что активация NeuroD1 β -катенином зависит от присутствия транскрипционного фактора Sox2, хотя сам по себе Sox2 способствует пролиферативной способности НСК и ингибирует нейрональную дифференцировку прогениторов ЦНС (Graham et al., 2003). Кроме того, есть предположение, что WNT- β -катенин-сигналинг контролирует пролиферацию и дифференцировку НСК не напрямую, а через активацию транскрипции Pax6 (Gan et al., 2014).

Сигнальный белок **sonic hedgehog (SHH)** играет роль в эмбриональном формировании центральной нервной системы, регулирует клеточный цикл нейральных стволовых и нейрональных прогениторных клеток (Dahmane et al., 1999; Wallace, 1999). В частности, сигналинг SHH критически важен для кортикогенеза, поскольку он участвует в регуляции пролиферации кортикальных НППК (Machold et al., 2003). Сигнализация SHH также вовлечена в пролиферацию и поддержание НСК взрослых СГЗ и СВЗ (Machold et al., 2003). Было показано, что в гиппокампе новорожденных передача сигналов SHH зависит от Sox2 (Favaro et al., 2009). SHH действует через трансмембранные рецепторы Patched (Ptch). В отсутствие SHH Ptch ингибирует трансмембранный G-связанный рецептор Smoothened (Smo). При связывании SHH с Ptch происходит снятие ингибирования Smo, который, в свою очередь, активирует транскрипционные факторы класса цинковых пальцев Gli1, 2 и 3, которые и интерпретируют сигналы SHH в зависимости от контекста, действуя как активаторы или репрессоры транскрипции различных генов (Ruiz i Altaba, 1998). Было показано, что экзогенный SHH *in vitro* или его сверхэкспрессия в СГЗ *in vivo* способствует пролиферации прогениторных клеток (Lai et al., 2003). Подавление SHH-сигнализации в клетках СГЗ 2-го типа приводит к снижению их пролиферации. Потеря SHH-сигнализации вследствие удаления рецептора Smo в В- и С-клетках СВЗ приводит к их преждевременной дифференцировке (Balordi, Fishell, 2007).

Костные морфогенетические белки (BMPs) – это факторы роста, входящие в подгруппу суперсемейства сигнальных лигандов трансформирующего фактора роста β (TGF β). Существует большое количество BMP, действующих через связывание с двумя типами рецепторов BMP с киназной активностью: BMPR I типа, представленные активин-подобными киназами 2, 3 и 6 (ALK2/3/6), и BMPR II типа (Massague, 1998; Hegarty et al., 2013).

В канонической BMP-сигнализации участвуют белки SMAD: рецептор-регулируемые SMAD (SMAD 1, 5, 8), общие медиаторные SMAD (SMAD 4) и ингибиторные SMAD (SMAD 6 и 7). Активация SMAD происходит после

связывания BMP со своими рецепторами: BMP-лиганды, связываясь с BMPR типа II, активируют их киназные домены, которые фосфорилируют и тем самым активируют BMPR типа I. В свою очередь, BMPRI (ALK2/3/6) фосфорилируют SMAD-белки (SMAD1/5/8) (Heldin et al., 1997; Zhang et al., 1997). BMP-сигналинг участвует в регуляции различных процессов нейроразвития (пролиферация, дифференцировка, апоптоз) (Hegarty et al., 2013). Репрессия BMP-SMAD-сигнализации необходима для первичной индукции нейронов в наивной эктодерме во время эмбриогенеза (Hegarty et al., 2013). Это достигается путем снижения регуляции SMAD с помощью фактора роста фибробластов (FGF) и инсулиноподобного фактора роста (IGF) и, соответственно, ингибирования экспрессии BMP4 и BMP7 и самой BMP-сигнализации (Pera et al., 2003; Liu, Niswander, 2005). После закрытия нервной трубки BMP4 или BMP7-активированный BMP-SMAD-сигналинг необходим для индукции нервного гребня (Liem et al., 1995). Noggin является основным ингибитором BMP и регулятором BMP-сигнализации в нейрогенезе (Smith, Harland, 1992; Pera et al., 2004; Bonaguidi et al., 2008). Сигнализация BMP-SMAD1/5/8 играет роль в дифференцировке, созревании и спецификации нейронов в эмбриональной центральной нервной системе (Hegarty et al., 2013). BMP также участвуют в некоторых нейральных процессах во взрослом мозге, но их действие может быть различным в разных условиях. Сигнализация BMP-SMAD поддерживает покоящееся состояние НСК зубчатой извилины гиппокампа, обратимо снижая пролиферацию и сохраняя их недифференцированное состояние (Mira et al., 2010). С другой стороны, BMP участвуют в дифференцировке нейронов. Такие противоречивые эффекты могут объясняться различной экспрессией BMPR и их действием: НСК экспрессируют BMPRIa, который поддерживает их недифференцированное состояние, а нейробласты и нейроны экспрессируют BMPRIb, который способствует остановке цикла и дифференцировке (Mira et al., 2010). Кроме того, вероятно, BMP могут оказывать разное действие в зависимости от концентрации. Также оказалось, что BMP-сигнализация активна в НСК и в клетках типа C во время нейрогенеза в СВЗ взрослого головного мозга, однако данные противоречивы. Было показано, что

усиление сигнализации BMP в СВЗ взрослой особи приводило к ингибированию нейрогенеза *in vitro* и *in vivo*, а ингибирование BMP с помощью Noggin способствовало нейрогенезу (Lim et al., 2000). В то же время ингибирование BMP путем делеции SMAD4 или добавления Noggin приводило, наоборот, к подавлению нейрогенеза и активации олигодендрогенеза (Colak et al., 2008).

Другой член суперсемейства TGF β – **Nodal**, по-видимому, участвует в контроле спецификации нейрональной судьбы в эмбриональном развитии. Антагонисты Nodal – Lefty1 и Cerberus-1, необходимы для нейрональной паттернизации передней части нервной трубки (Perea-Gomez et al., 2002). Отсутствие Nodal-сигнализации вызывает преждевременную нейрональную дифференцировку клеток эпибласта мыши (Camus et al., 2006). Nodal связывается с обладающими киназной активностью рецепторами TGF β R типа I (ALK4/7) и II (активиновые рецепторы ActRIIa и ActRIIb), которые активируют сигнальный путь SMAD 2/3 (Schier, 2003). Путь TGF β /Activin/Nodal необходим для самообновления ЭСК и поддержания их плюрипотентности (James et al., 2005). Поэтому данный путь потенциально ингибирует нейроэктодермальную дифференцировку ЭСК (Vallier et al., 2004).

Факторы роста фибробластов (FGF) – это семейство сигнальных факторов роста, митогенов, которые, в частности, участвуют в эмбриональном развитии нервной системы (Vaccarino et al., 1999). FGF необходимы для пролиферации НСК и для нейрогенеза. FGF2 экспрессируется на всех стадиях развития мозга (Kalcheim, Neufeld, 1990; Gomez-Pinilla et al., 1994; Raballo et al., 2000). FGF2 индуцирует пролиферацию нейроэпителиальных клеток и нейральных предшественников, выделенных из эмбрионального спинного мозга, теленцефалона и мезенцефалона мыши (Murphy et al., 1990; Raballo et al., 2000). А введение экзогенного FGF2 в желудочки взрослого головного мозга мыши приводило к усилению пролиферации НСК и нейрогенеза в СВЗ (Rai et al., 2007). Кроме того, FGF2 способен стимулировать выживание НСК в присутствии инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) (Drago et al., 1991). FGF2 также имеет

дополнительные роли в дифференцировке и созревании нейронов: в ответ на введение FGF2 молодые нейроны демонстрировали усиленный рост дендритов (Rai et al., 2007). Было показано, что FGF2 участвует в нейрональной индукции плюрипотентных стволовых клеток *in vitro* (Kunath et al., 2007; Stavridis et al., 2007). Несколько исследований на изолированных эмбриональных и взрослых НСК показали, что FGF2 и эпидермальный фактор роста (EGF) способствуют их пролиферации (Reynolds et al., 1992; Vescovi et al., 1993; Gritti et al., 1996; Reynolds, Weiss, 1996). Оказалось, что чувствительность к FGF появляется уже на стадии нервной пластинки, а к EGF – на более поздней стадии. Оба фактора могут независимо вызывать раннюю пролиферацию НСК (Tropepe et al., 1999).

2.3. Плюрипотентные стволовые клетки как источник для получения нейральных культур in vitro

Наиболее подходящим источником для получения НСК и/или нейронов *in vitro* является культура плюрипотентных стволовых клеток (ПСК). ПСК характеризуются длительной способностью к самообновлению и потенциалом к дифференцировке в любой тип клеток трех зародышевых листков.

Существует два основных типа ПСК: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Эти два типа ПСК во многом схожи между собой: профили экспрессии генов, морфология, активность теломеразы и т.д. (Okita et al, 2007). Источником ЭСК являются клетки внутренней клеточной массы эмбриона на стадии бластоцисты (Evans, Kaufman, 1981). Поскольку получение ЭСК связано с манипуляциями с эмбрионами, получение и использование ЭСК человека затруднено по этическим соображениям. ИПСК же могут быть получены путем генетического перепрограммирования соматических клеток, поэтому они являются альтернативой ЭСК. Первые ИПСК мыши и человека были получены из фибробластов в лаборатории Яманаки с помощью ретровирусной трансфекции генов плюрипотентности (*OCT3/4*, *SOX2*, *C-MYC* и *KLf4*) (Takahashi, Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). В это же время группа ученых, возглавляемая Дж. Томсоном, получила ИПСК из фибробластов

человека, используя другой набор генов (*OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* и *LIN28*) и лентивирусную доставку (Yu et al., 2007).

В дальнейшем технологии получения ИПСК были неоднократно оптимизированы, что позволило получать их не только из фибробластов, но и из других типов клеток: кератиноцитов человека, клеток периферической крови человека, адипоцитов, гепатоцитов, клеток желудка и др. Кроме того, были предложены различные методы индукции плюрипотентности клеток без использования вирусных векторов, что сделало такие ИПСК пригодными для клеточной терапии (Karagiannis et al., 2019).

ИПСК во многом являются аналогом ЭСК. Они имеют схожую экспрессию генов стволовости, склонны к образованию тератом и эмбрионных теллец, а при инъекции в бластоцисту образуют химер. Однако профили метилирования и экспрессии генов ЭСК и ИПСК несколько различны, они также могут отличаться между ИПСК разных линий (Doi et al., 2009; Nazor et al., 2012; Nishizawa et al., 2016). Кроме того, каждая линия может иметь индивидуальные одиночные нуклеотидные полиморфизмы, которые могут влиять на экспрессию генов и поведение ИПСК (Kajiwara et al., 2012).

2.4. Методы дифференцировки нейронов in vitro из плюрипотентных стволовых клеток

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Galiakberova A. A., Dashinimaev E. B. Neural Stem Cells and Methods for Their Generation From Induced Pluripotent Stem Cells in vitro // Front Cell Dev Biol. – 2020. – Vol. 8. – P. 815.

Существует множество различных протоколов дифференцировки НСК из ПСК. В зависимости от условий они дают начало НСК с разнообразным спектром дифференцировки в различные типы нейронов и глии (Watanabe et al., 2007; Chambers et al., 2009; Kim et al., 2011; Fedorova et al., 2019). Например, в результате использования одних протоколов полученные НСК дифференцируются в нейроны переднего мозга (теленцефалические предшественники) (Watanabe et al., 2007, Shi

et al., 2012), в других – в предшественников заднего или среднего мозга (Koch et al., 2009; Patani et al., 2009).

Различные подходы включают в себя 2D или 3D культивирование, культивирование на матриксе или в ко-культуре с использованием малых молекул и факторов роста или без них (Рис. 3).

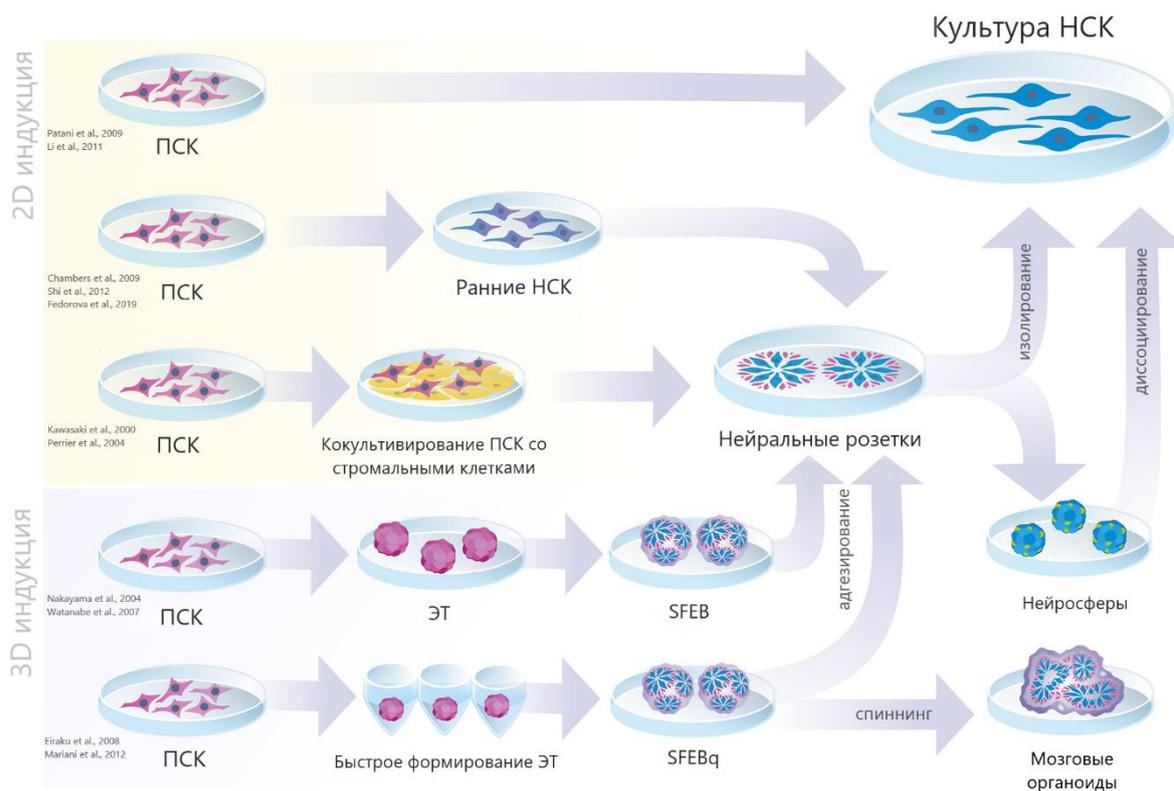


Рисунок 3. Упрощенное представление общих принципов нейроиндукции (Galiakberova, Dashinimaev, 2020, с изменениями). Нейральная индукция ПСК может проводиться в 2D условиях (монослой и ко-культура) или в 3D условиях (эмбриоидные тельца). В то же время, дальнейшая генерация и/или культивирование НСК могут быть достигнуты в 2D монокультуре и культуре нейральных розеток или в 3D культурах (SFEB и SFEBq, органоиды мозга, нейросферы). ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; НСК – нейральные стволовые клетки; ЭТ – эмбриоидное тельце; SFEB(q) – (быстрая) бессывороточная культура эмбриоидных телец.

Так, 2D ко-культивирование ЭСК со стромальными клетками в бессывороточной среде приводило к получению нейроэпителиальных (нейральных) розеток, демонстрирующие наличие маркеров НСК (PAX6, SOX1,

NESTIN и NCAM) (Kawasaki et al., 2000; Perrier et al., 2004). Fedorova et al. получали нейроэпителиальные розетки при 2D-культивировании ПСК в низкой плотности на бессывороточной среде без воздействия малыми молекулами (Fedorova et al., 2019). 3D культивирование ПСК в виде эмбриоидных телец в бессывороточной среде с добавлением FGF2 либо без него также можно использовать в качестве метода получения НСК и нейронов из ПСК. Такой метод получил названия SFEB (serum-free culture of embryoid bodies) (Nakayama et al., 2004; Watanabe et al., 2007; Koch et al., 2009). Модификация метода SFEB (SFEBq) включает в себя быстрое (quick) контролируемое формирование эмбриоидных телец в лунках с коническим дном (Eiraku et al., 2008; Mariani et al., 2012).

Однако SFEB и SFEBq в сравнении с другими подходами оказались не очень эффективными методами получения нейральных культур или органоидов. Исследование нейральных культур, полученных методом SFEBq из человеческих ИПСК, показало наличие в них значительного числа недифференцированных клеток, и подсадка таких нейральных культур животному приводила к развитию тератом (Koynagi-Aoi et al., 2013).

В целом в настоящее время можно утверждать, что в качестве основного метода получения НСК из ПСК используется так называемый метод двойного ингибирования SMAD (DUAL SMADi) с использованием малых молекул-ингибиторов SMAD-сигнализации, который впервые был разработан Chambers и др. в 2009 году (Chambers et al., 2009).

2.4.1. Метод с DUAL SMAD ингибированием

Метод основан на ингибировании малыми молекулами двух путей активации SMAD: Lefty/Activin/TGF β - и BMP-сигнальных путей (Рис. 4 А).

А



Б

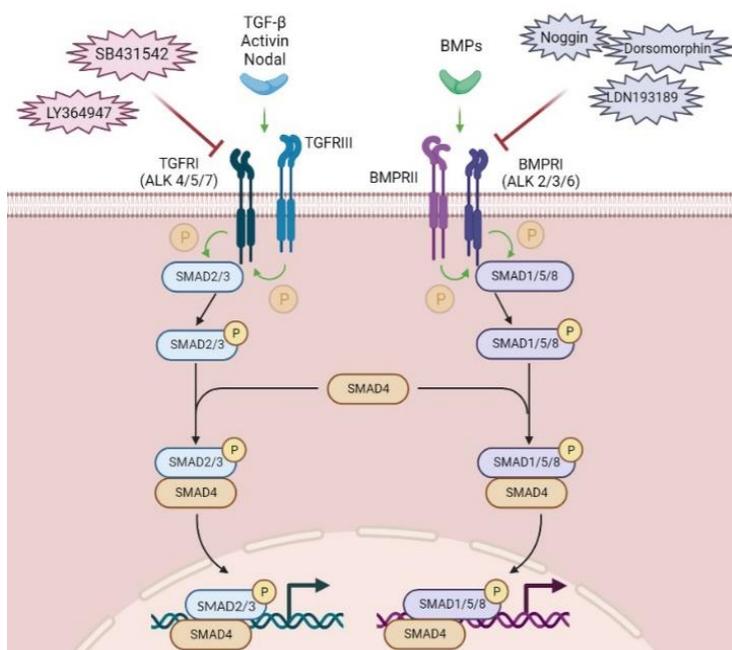


Рисунок 4. Принцип работы DUAL SMAD ингибирования.

А – дифференцировка ПСК при ингибировании двух путей активации SMAD-сигналинга (Imaizumi, Okano, 2021, с изменениями).

Б – Механизм ингибирования малыми молекулами двух путей активации SMAD-сигналинга на уровне рецепторов.

Lefty/Activin/TGF β -путь приводит к активации SMAD 2/3 сигналинга, который направляет дифференцировку ПСК в мезодерму (Jones et al., 1995). Блокировка рецепторов для Lefty/Activin/TGF β с помощью малых молекул SB431542, LY364947 или REPSONX ингибирует SMAD-2/3-сигналинг, что способствует дифференцировке ПСК в эктодерму (Smith et al., 2008). Наиболее часто используется именно SB431542. Эта малая молекула ингибирует Lefty/Activin/TGF β сигналинг путем блокировки фосфорилирования ALK4/5/7-рецепторов (рецепторов TGF β первого типа). В результате ALK4/5/7 киназы не способны фосфорилировать и активировать свой субстрат – SMAD 2 и 3 (Inman et al., 2002) (Рис. 4 Б).

SB431542 в одиночку способен направить ПСК в нейральную дифференцировку (Smith et al., 2008), однако эффективность при этом будет не

очень высокая. Поэтому в дополнение к ингибированию этой ветви SMAD-сигналинга с помощью SB431542 добавляют ингибиторы BMP-сигнального пути (Chambers et al., 2009).

BMP-сигнальный путь работает через SMAD-1/5/8-сигналинг и блокирует последующую дифференцировку эктодермы в нейроэктодерму (Wilson, Hemmati-Brivanlou, 1995). Поэтому добавление Noggin либо малых молекул LDN193189 или Dorsomorphin приводит к подавлению BMP-пути SMAD-сигналинга на уровне рецепторов BMPR I типа (activin receptor-like kinase ALK2/3/6) и, таким образом, способствует дифференцировке клетки в нейроэктодерму (Chambers et al., 2009; Kim et al., 2010; Zeltner et al., 2016) (Рис. 4 Б).

Интересно, что по некоторым данным Dorsomorphin работает лучше, чем Noggin, и увеличивает выживаемость колоний ПСК (Kim et al., 2010; Morizane et al., 2011). Dorsomorphin представляет собой небольшую молекулу, которая легче проникает в клетки и, в отличие от Noggin, избирательно ингибирует SMAD1/5/8 через селективную блокировку ALK2/3/6, не влияя при этом на MAPK p38 (Yu et al., 2008a; Yu et al., 2008b). Однако Dorsomorphin все же обладает некоторыми нецелевыми эффектами, например, он ингибирует АМФ-активируемую протеинкиназу (Zhou et al., 2001). Малая молекула LDN193189 является производным Dorsomorphin, но обладает лучшей активностью (Cuny et al., 2008).

В оригинальном протоколе Chambers и др. культивировали ПСК на покрытых матригелем чашках Петри в бессывороточной культуральной среде с добавлением SB431542 и Noggin. После нескольких дней воздействия Noggin и SB431542, ЭСК дифференцировались в SOX1, PAX6, ZIC1-позитивную раннюю нейроэпителиальную популяцию, способную к организации нейральных розеток (Chambers et al., 2009). Этот протокол показал 80% эффективность дифференцировки ЭСК и ИПСК в PAX6-положительные НСК. В дальнейшем эти НСК в определенных условиях были способны дифференцироваться в дофаминергические нейроны, а также в мотонейроны.

Данный протокол приобрел множество модификаций, оптимизированных под те или иные задачи, а также под конкретные условия культивирования в конкретных лабораториях. Например, Morizane et al. использовали DUAL SMADi на ЭСК и ИПСК, культивируемых на стромальных фидерных клетках РА6 или в виде культуры эмбрионидных телец в бессывороточной среде (Morizane et al., 2011). Shi et al. сообщили, что добавление ретиноидов к оригинальному протоколу с DUAL SMADi значительно повысило эффективность (> 95%) дифференцировки ЭСК и ИПСК в Pax6-позитивные кортикальные НСК и прогениторные клетки (Shi et al., 2012). В некоторых исследованиях одновременно с малыми молекулами для DUAL SMADi добавляли различные факторы и вещества для паттернирования нейральных культур, такие как SHH, CHIR99021, FGF8 и др. (Liu et al., 2013; Nilsson et al., 2021). Кроме того, были разработаны специальные коммерческие наборы для дифференцировки ПСК в НСК, которые активно используются учеными по всему миру, например, PSC Neural Induction Medium от компании Gibco (#A1647801) или компании Merck (#SCM110).

Последующие манипуляции с культурами, полученными с помощью метода с DUAL SMADi, могут быть различными. В целом имеются данные, что при использовании метода с DUAL SMADi, полученные НСК могут стабильно культивироваться до 30-го пассажа (Chambers et al., 2009; Li et al., 2011; Reinhardt et al., 2013). Для получения более чистой линии НСК и удаления оставшихся недифференцированных ИПСК в некоторых работах нейральные розетки изолировали из общей культуры и затем культивировали отдельно в 2D культуре или в 3D нейросферах (Рис. 3). DUAL SMADi также можно применять и к эмбрионидным тельцам с последующим их адгезированием на матриксе (Pauly et al., 2018; Munoz et al., 2020). К полученным культурам НСК затем можно добавлять различные вещества и факторы для их направления в более специализированные предшественники. Например, добавление пурморфамин (агониста SHH-сигналинга) или самого SHH приводит к образованию клеток медиального ганглиозного возвышения – предшественников тормозных ГАМК-нейронов (Liu et

al., 2013; Vigont et al., 2021). Воздействие определенными дозами FGF8 на НСК, полученных из человеческих ПСК, с последующим ингибированием Notch с помощью ингибитора гамма-секретазы (DAPT) позволяло получать нейроны, экспрессирующие гипоталамический гонадотропин-рилизинг-гормон (Poliandri et al., 2017; Lund et al., 2020; Yellapragada et al., 2022).

Стоит отметить, что для получения культуры зрелых нейронов протоколы с использованием малых молекул, в частности, протокол с DUAL SMAD_i, занимают довольно длительное время (от 21-30 дней и более).

2.4.2. Методы дифференцировки с помощью гиперэкспрессии транскрипционных факторов

В настоящее время все большую популярность набирают методы направленной дифференцировки ПСК в так называемые индуцированные нейроны при помощи принудительной активации или экзогенной экспрессии в клетках транскрипционных факторов (Pang et al., 2011; Zhang et al., 2013; Busskamp et al., 2014; Sagal et al., 2014; Ng et al., 2021). Помимо дифференцировки ПСК в желаемые типы клеток, гиперэкспрессия определенных ТФ используется для трансдифференцировки клеток между типами (Davis et al., 1987) и репрограммированию соматических клеток в ПСК (Takahashi, Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007).

В 2011 году человеческие ЭСК были дифференцированы в нейроны при помощи гиперэкспрессии коктейля ТФ: *BRN2*, *ASCL1* и *MYT1L* (Pang et al., 2011). Позже стали подбирать ТФ, экспрессия в ПСК которых способна в одиночку запустить направленную нейральную дифференцировку. Было показано, что гиперэкспрессия гена *ASCL1*, достаточна для получения функциональных нейронов из фибробластов мыши и человека, а также ЭСК, что указывает на то, что *ASCL1* является ключевым фактором перепрограммирования различных клеток в нейроны (Chanda et al., 2014).

Еще одним интересным транскрипционным фактором является АТОН1 (также известный как MATH1). АТОН1 принадлежит к пронеуральным факторам транскрипции семейства bHLH (Klisch et al., 2011). Исходно данный фактор был описан как ТФ, необходимый для развития и выживания волосковых клеток – рецепторных клеток, расположенных во внутреннем ухе (Bermingham et al., 1999). Но выяснилось, что АТОН1 является одним из ключевых регуляторов нейрогенеза, который необходим для дифференцировки не только волосковых клеток внутреннего уха, но и различных других типов нейронов, таких как гранулярные нейроны мозжечка, нейроны ствола мозга и многочисленные компоненты проприоцептивной и интероцептивной систем, а также некоторые не-нейрональные типы клеток (Ben-Arie et al., 2000). Было показано, что экзогенная гиперэкспрессия *АТОН1* может запрограммировать человеческие ИПСК в индуцированные нейроны, которые остаются функциональными при длительном культивировании (Sagal et al., 2014; Ng et al., 2021).

Самым популярным транскрипционным фактором, экзогенная гиперэкспрессия которого используется для направленной дифференцировки ПСК в нейроны, является нейрогенин 2 (NGN2) (Thoma et al., 2012; Zhang et al., 2013; Lin et al., 2021; Schornig et al., 2021). NGN2 – один из членов семейства нейрогенинов, которое представляет собой класс факторов транскрипции bHLH, способных связываться с ДНК для регуляции транскрипции генов. Семейство включает в себя три фактора: NGN1, NGN2 и NGN3 (Bertrand et al., 2002).

Было показано, что нейрогенины способствуют дифференцировке нейронов путем ингибирования глиального направления дифференцировки, индукции каскада паннейронных факторов в НСК, а также способствуя их выходу из клеточного цикла (Farah et al., 2000; Sun et al., 2001). В нейрогенезе постоянная экспрессия *NGN2* способствует дифференцировке нейронов, тогда как временная осцилляторная экспрессия поддерживает НСК в недифференцированном состоянии (Shimojo et al., 2011). Более того, нейрональная дифференцировка одной клетки ингибирует дифференцировку соседних клеток в клетки того же типа

(латеральное ингибирование), что таким образом поддерживает пул НСК или предшественников (Shimojo et al., 2011). Незадолго до начала дифференцировки в предшественниках нейронов повторно активируется экспрессия Pax6. Данный фактор активирует NGN2, который и запускает дальнейшую дифференцировку (Scardigli et al., 2001; Scardigli et al., 2003). При этом же сам NGN2 подавляет экспрессию Pax6 по механизму отрицательной обратной связи, поскольку сам по себе Pax6 удерживает нейральные предшественники в пролиферирующем состоянии и ингибирует их дифференцировку (Scardigli et al., 2001; Bel-Vialar et al., 2007). Известно, что экспрессия *NGN2* подавляется на заключительных стадиях дифференцировки, что затем способствует спецификации подтипа нейрона (Hulme et al., 2022).

NGN2 регулирует дифференцировку различных типов нейронов: по энергичности (глутаматергических, дофаминергических) и функциональным свойствам (сенсорных и моторных) (Scardigli et al., 2001; Zirlinger et al., 2002; Scardigli et al., 2003; Kele et al., 2006), но при этом ингибирует дифференцировку в ГАМКергические нейроны, а также дифференцировку в глиальном направлении (Jo et al., 2007; Sun et al., 2019; Jiang et al., 2020). Такое обилие эффектов *NGN2* объясняется разной ролью данного ТФ в зависимости от клеточного контекста, а также периода, длительности и силы его экспрессии (Hindley et al., 2012; Hulme et al., 2022). Для дифференцировки дофаминергических нейронов *NGN2* не критичен, однако наибольшую роль он играет для дифференцировки в глутаматергические, а также моторные нейроны. Во время развития зубчатой извилины гиппокампа клетки-предшественники во всех пролиферативных слоях экспрессируют *NGN2* (Galichet et al., 2008). *NGN2* экспрессируется в эмбриональных НППК в районе зубчатой извилины гиппокампа и играет существенную роль в развитии этой структуры. В СВЗ взрослого мозга *NGN2* экспрессируется подмножеством клеток типа С, которые в дальнейшем будут дифференцироваться в глутаматергические интернейроны (Brill et al., 2009).

Гиперэкспрессия экзогенного *NGN2* в фибробластах индуцировала их прямую дифференцировку в нейроны (Vierbuchen et al., 2010; Zhao et al., 2015). Прямое репрограммирование соматических клеток в нейроны является крайне привлекательным направлением, поскольку соматические клетки человека получить намного проще. Однако прямое репрограммирование в нейроны посредством гиперэкспрессии в соматических клетках proneurальных транскрипционных факторов или использования малых молекул обладает низкой эффективностью. Поэтому в параллель к попыткам дифференцировки фибробластов в нейроны, аналогичный протокол гиперэкспрессии экзогенного *NGN2* был применён для ЭСК (Thoma et al., 2012) и ИПСК (Zhang et al., 2013).

При этом, используя экзогенную гиперэкспрессию только *NGN2* в ПСК без дополнительных генов или направляющих факторов роста, получается смешанная культура нейронов, в которой преобладают кортикальные возбуждающие глутаматергические нейроны, характеризующиеся такими маркерами, как DCX, MATN3, NEUN, OLIG2, SOX1, TUBBIII, MAP2AB и VGlut1 / 2 (Thoma et al., 2012). Кроме того, были обнаружены и маркеры сенсорных нейронов коры головного мозга (Schornig et al., 2021). Интересно, что маркеры ГАМКергических нейронов в таких культурах обнаружено не было, что согласуется с тем, что *in vivo* экспрессия *NGN2* во время нейрогенеза негативно регулирует дифференцировку тормозных ГАМКергических нейронов (Schuermans et al., 2004). *NGN2*, а также его нижестоящие эффекторы репрессируют *Ascl1* и другие гены, подавляя *Ascl1*-зависимые и *Ascl1*-независимые регуляторные пути, необходимые для генерации ГАМКергических нейронов (Schuermans et al., 2004; Roybon et al., 2010). В своем эксперименте путем анализа данных транскриптомов Lin et al. показали, что их *NGN2*-индуцированные нейроны не имеют четких аналогов популяции нейронов *in vivo*. Все кластеры полученных ими индуцированных нейронов имеют смешанные сигнатуры различных типов нейронов и центральной, и периферической нервных систем (Lin et al., 2021). Используя же дополнительные трансгены и/или определенные условия среды, гиперэкспрессия *NGN2*

использовалась для дифференцировки нейральных культур, обогащенных и другими типами нейронов, например, кортикальных серотонинергических, дофаминергических (по эргичности), а также периферических моторных, сенсорных (по функциям) (Hulme et al., 2022).

Механизм, по которому NGN2 запускает прямое репрограммирование фибробластов или ПСК в нейроны, исследован не до конца. Тем не менее известно, что экспрессия *NGN2* впоследствии стимулирует гены нейрональных ТФ (*ISL1*, *PAX6*, *POU3F2*, *POU4F1* и др.). При этом происходит подавление активности ингибиторов нейрогенеза, таких как *HES1* и *REST*. Таким образом NGN2 запускает согласованный процесс развития клетки в направлении нейронального дифферона (Busskamp et al., 2014). Путем сравнения траекторий псевдовремени, полученных на основе данных транскриптомов единичных клеток (scRNA-seq) в культурах NGN2-индуцированных нейронов и нейральных культур из органоидов мозга, было предположено, что такая направленная дифференцировка обходит ранние переходные состояния, стадию индукции нейроэктодермы и нейроэпителлия, которые обычно наблюдаются *in vivo* для достижения терминально дифференцированных нейронов (Lin et al., 2021).

Гиперэкспрессию экзогенных ТФ, необходимых для запуска нейральной дифференцировки, можно осуществлять разными способами. Можно разделить способы доставки ТФ на методы с интеграцией гена ТФ в геном трансфицируемых клеток и методы без интеграции. К первой группе относятся методы с использованием транспозонных систем, а также методы с использованием лентивирусной доставки. Поскольку для индукции дифференцировки ИПСК постоянная экспрессия трансгена не нужна, были разработаны различные системы, в которых транскрипция трансгена происходит только в определенных условиях. Наиболее известной и популярной системой регуляции экспрессии трансгена является тетрациклин активируемая система TetON (Urlinger et al., 2000). Система состоит из двух векторов. В одном векторе закодирован ген тетрациклин-зависимого белка-трансактиватора rtTA (reverse tetracycline-controlled

transactivator) (Gossen et al., 1995) под конститутивным промотором, что приводит к постоянной экспрессии *rtTA*. Во втором векторе закодирован ген интереса (в данном случае *NGN2*) под промотором TetON, который активируется только при взаимодействии с ним *rtTA*, связанного с антибиотиком тетрациклинового ряда. В отсутствие антибиотика *rtTA* не способен активировать TetON-промотор, следовательно, ген интереса экспрессироваться не будет. При добавлении антибиотика *rtTA* активирует TetON-промотор, что приводит к экспрессии данного гена интереса.

Такие системы удобны тем, что для запуска экспрессии *NGN2* (гена интереса) в трансгенной линии клеток достаточно лишь добавить в культуральную среду для клеток необходимый антибиотик. После отмены антибиотика экспрессия трансгена прекращается. В качестве антибиотика обычно используется доксициклин, поскольку он является наиболее устойчивым аналогом тетрациклинов.

Доставка и интеграция векторов системы TetON в геном клеток может осуществляться разными способами. Так, сообщалось об успешном получении моторных нейронов путем гиперэкспрессии *NGN2*, *ISL1* и *LHX3* посредством TetON системы, доставленной с помощью транспозонной системы PiggyBac (Garone et al., 2019). Еще одним и наиболее популярным способом доставки TetON системы для гиперэкспрессии экзогенных ТФ (в т.ч. *NGN2*) является лентивирусная трансдукция (Zhang et al., 2013; Ng et al., 2021; Schornig et al., 2021). Лентивирусные вектора способны встраиваться в геном хозяина, что делает возможным постоянную экспрессию трансгена (в зависимости от промотора). Поскольку лентивирусы проникают в ядро клетки-хозяина путем активного транспорта и при этом не требуют клеточного деления, лентивирусные вектора активно используются для трансдукции как делящихся, так и покоящихся клеток (Lois et al., 2002; Zhang et al., 2016). Гиперэкспрессия *NGN2* с помощью системы TetON и лентивирусной доставки приводила к эффективной дифференцировке ИПСК с функциональные нейроны всего за 7-14 дней (Zhang et al., 2013; Frega et al., 2017).

К методам доставки генов ТФ без интеграции в геном можно отнести различные виды трансфекций, в т.ч. электропорацию, липофекцию, а также трансдукцию на основе не интегрирующих вирусных векторов, таких как аденоассоциированные вирусные вектора (AAV). Сообщалось, что липофекция (трансфекция основанная на липидах) мРНК генов *ATOH1* и *NGN2* в ИСПК приводила к получению дофаминергических нейронов (Xue et al., 2019). Tolomeo et al. сообщили, что в результате липофекции ИПСК модифицированной мРНК *NGN2* получались гетерогенные культуры, содержащие как НСК, так и нейроны (Tolomeo et al., 2021). Авторы отметили, что получение НСК, по-видимому, характерно только для данного метода доставки *NGN2*, поскольку при применении протокола с лентивирусной доставкой такого не наблюдалось (Tolomeo et al., 2021).

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Составные среды, использованные в работе

Среда для пролиферации нейтральных стволовых клеток человека (NPM): DMEM + DMEM / F12 (1:1) (ПанЭко, Россия), B27 supplement (1x) (Carpicorn, Германия), 1 mM Glutargo (Corning, США) 1 mM пируват натрия (Gibco, США), 25 нг/мл EGF, 25 нг/мл bFGF, пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (Gibco, США).

Среда для терминальной дифференцировки в нейроны (N2B27): DMEM / F12 + Neurobasal Medium (1:1), N2-supplement (Carpicorn, Германия), B27-supplement (Carpicorn, Германия), 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Glutargo (Corning, США), 1 mM пируват натрия (Gibco, США), пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (Gibco, США), с добавлением 10 нг/мл BDNF или без него.

Приготовление раствора для покрытия матригелем: Matrigel смешивали с MEM/F12 (Corning, США) в соотношении 50 : 1 (все манипуляции производили на льду, пока все растворы холодные, т.к. матригель полимеризуется при комнатной температуре), далее концентрированный раствор разливали по аликвотам и замораживали при -20°C . Размороженную аликвоту хранили при 4°C , допускается многократное применение раствора.

Приготовление культурального пластика, покрытого матригелем: Раствор матригеля наносили на поверхность культуральной посуды исходя из соотношения 0,1 мл на 1 см^2 , инкубировали в течение 30-60 минут при 37°C , после чего матригель удаляли.

Все манипуляции с живыми клеточными культурами производились в стерильных условиях внутри ламинарных шкафов 2-го уровня биобезопасности, соблюдая принятые правила асептики при работе с культурами клеток человека и животных.

3.2. Культивирование ИПСК

В данной работе использовались следующие линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека:

- 1) ИПСК-KYOU, изначально полученная в лаборатории Шинья Яманака (Университет Киото, Япония) путем ретровирусного перепрограммирования фибробластов кожи взрослой женщины. Клеточная линия ИПСК-KYOU была приобретена в банке клеток ATCC (KYOU-DXR0109B, ACS-1023™, ATCC®, США)
- 2) ИПСК-KYOU-GCaMP6s, полученная нами ранее из клеток линии ИПСК-KYOU с помощью транспозонной системы Sleeping Beauty.
- 3) ИПСК-AFS17, полученная путем лентивирусного перепрограммирования стволовых клеток амниотической жидкости по методике Дашинимаева и др. (Dashinimaev et al., 2017).
- 4) ИПСК-DP, полученная путем лентивирусного перепрограммирования клеток дермальной папиллы (Muchkaeva et al., 2014).
- 5) ИПСК-DYP0730, полученная путем эписомального перепрограммирования дермальных фибробластов (ATCC CCL-54 Detroit 532) донора-пациента с синдромом Дауна. Линия клеток ИПСК-DYP0730 была приобретена в банке клеток ATCC (ACS-1003™, ATCC®, США).

ИПСК культивировались в чашках Петри, покрытых матригелем в среде mTeSR1 или mTeSR Plus (Stem Cell Technologies, Канада) при 37°C в CO₂-инкубаторе с 5% CO₂ и при влажности 100%. При достижении 70-80% конфлюэнтности клетки пассировали. Для этого ИПСК снимали аккутазой (Corning, США), разбавляли в растворе Дульбекко (DPBS) без кальция и магния (ПанЭко, Россия) и центрифугировали при 400 g в течение 5 минут в центрифуге Eppendorf Centrifuge 5702. Супернатант удаляли, а клеточный осадок

ресуспендировали в среде mTeSR1 или mTeSR Plus, содержащей 5 мкМ ROCKi (Y27632, Sigma-Aldrich, США).

Подсчет клеток производили счетчике Bio-Rad TC2 с использованием оригинальных слайдов.

Для криоконсервирования клеток использовали среду Vambunker™ (Nippon Genetics, Япония).

3.3. Получение ИПСК-KYOU, экспрессирующих TetON-NGN2. Приготовление лентивирусов и лентивирусная трансдукция

Для получения ИПСК-KYOU, экспрессирующих систему TetON и ген *NGN2*, мы использовали плазмиды rtTA-N144 и TRET-hNgn2-UBC-PuRo, полученные из депозитария Addgene. Плазида rtTA-N144 была любезно предоставлена Эндрю Ю. (плазида Addgene # 66810; <http://n2t.net/addgene:66810>; RRID:Addgene_66810). Плазида pLV_TRET_hNgn2_UBC_Puro была любезно предоставлена Роном Вайсом (плазида Addgene # 61474; <http://n2t.net/addgene:61474>; RRID:Addgene_61474).

Приготовление лентивирусного супернатанта. Лентивирусы были получены в клетках HEK293T (10^6 клеток в d=6 см чашке Петри) путем ко-трансфекции тремя хелперными плазмидами (pLP1, pLP2, pVSVG) в концентрациях: 4 мкг ДНК лентивирусного вектора, 4 мкг pLP1, 2 мкг pLP2, 1 мкг pVSVG и упакованы с помощью реагента Lipofectamine2000 (Invitrogen, США), согласно протоколу, предложенному производителем в бессывороточной среде OPTI-MEM. Клетки HEK293T трансфицировали в течение 4 часов, затем среду аспирировали и добавляли 4 мл полной ростовой среды (DMEM (ПанЭко, Россия), 10% фетальная бычья сыворотка (Capricorn Scientific, Германия), 1 mM Glutargo (Corning, США), 1 mM пируват натрия (Gibco, США), пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (Gibco, США)). Среду с лентивирусными комплексами

собирали через 48 ч после трансфекции, центрифугировали (100 g) в течение 5 минут при комнатной температуре и стерилизовали через фильтр 0,45 мкм.

Лентивирусная трансдукция ИПСК. Собранный супернатант, содержащий упакованные лентивирусы, наливали на ИПСК-KYOU или ИПСК-KYOU-GCaMP6s, смешивая в соотношении 2 мл супернатанта + 2 мл ростовой среды. Полибрен был добавлен в конечной концентрации 5 мкг/мл. На следующий день среду меняли на полную ростовую среду mTeSR1 или mTeSR Plus, содержащую ROCKi (5 мкМ). После трансдукции и до начала дифференцировки ИПСК-TetON-NGN2 культивировали на ростовой среде, дополненной селективными антибиотиками: пурамицином (0,5 мкг/мл; Sigma, США) и гигромицином В (50 мкг/мл; Serva, Германия).

Клонирование трансгенных ИПСК. ИПСК-TetON-NGN2 были клонированы методом предельного разведения для отбора наиболее подходящих клонов. Для этого культуру ИПСК-TetON-NGN2 снимали раствором аккутазы и рассаживали в концентрации 1-2 клетки/см² на d=10 см чашку Петри, покрытую матригелем в среду mTeSR1 с ROCKi (5 мкМ). Через 10-14 дней, когда единичные клетки образовали колонии, колонии снимали с чашки Петри с помощью диспазы (Invitrogen, США) и DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) в пропорции 1:1 при 37°C в течение 15 минут. Выбранные клоны собирали механическим способом при помощи стерильного наконечника на 10 мкл под визуальным контролем на микроскопе EVOS XL Cell Imaging System (Life Technologies), перемещали в эппендорфы со ростовой средой и очень тщательно ресуспендировали. Суспензию клеток из каждого клона делили на две части. Каждый клон высевали в две лунки двух 12-х луночных планшетов, покрытых матригелем, в ростовую среду mTeSR1, содержащей 5 мкМ ROCKi: планшет №1 – для ведения клеток, планшет №2 – для дифференцировки. Далее в планшете №2 запускали нейральную дифференцировку для каждого клона путем добавления доксицилина 1 мкг/мл (Sigma, США) в течение 5 дней. Через 3-5 дней в планшете №2 с помощью фазово-контрастной микроскопии были выбраны и отмечены номера клонов, в которых произошла

наиболее эффективная дифференцировка. Наиболее подходящие клоны ИПСК затем были размножены с планшета №1 для дальнейших экспериментов.

Для ИПСК-KYOU-GCaMP6s клоны были дополнительно проверены на экспрессию GCaMP6s по флуоресценции в зеленом спектре.

3.4. Нейральная дифференцировка ИПСК методом с DUAL SMAD ингибированием

За день до начала нейральной дифференцировки ИПСК были посажены в d=60 мм чашки Петри в среде mTeSR1 или mTeSR Plus. По достижении культуры конfluence около 30% среда была заменена на нейральную индукционную среду (PSC Neural Induction Medium, Thermo Fisher Scientific). Клетки культивировались в этой среде, дополненной 5 мкМ ROCKi, в течение 3-х пассажей в чашках Петри, покрытых матригелем. Затем полученные нейральные стволовые клетки (НСК) переводили на среду для пролиферации НСК (NPM) с добавлением ROCKi (5 мкМ) и культивировали их как минимум в течение 3 пассажей.

Для терминальной дифференцировки нейронов из НСК клетки пересаживали на покрытые матригелем чашки или лунки планшета в количестве 20×10^3 клеток/см². Клетки культивировали без пересева в дифференцировочной среде N2B27 с добавлением ROCKi (5 мкМ) на протяжении 14-ти и 21-го дня.

3.5. NGN2-индуцированная нейральная дифференцировка ИПСК

В день 0 ИПСК, экспрессирующие TetON-NGN2 (или GCaMP6s и TetON-NGN2), были посажены на покрытые матригелем d=35 мм чашки Петри в концентрации 3×10^4 клеток/см² в среде mTeSR1, дополненной ROCKi (5 мкМ) и мышинным ламинином (0,5 мкг/мл) (Corning, США). Доксициклин (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл добавляли с 0 по 5 день для индукции экспрессии трансгена NGN2. Среда меняли ежедневно в течение 6 дней. Для того чтобы остановить пролиферацию недифференцированных ИПСК, в культуральную среду на 2-й и 3-

й дни добавляли цитозин-арабинозид (Ara-C) (Sigma, США) в концентрации 0,1 мкг/мл.

Небольшие участки новых культуральных чашек (диаметром ~10-15 мм или 14 мм на 35-мм чашках со стеклянным дном) были предварительно покрыты поли-D-лизином (Gibco, США), разведенным в DPBS 1:1, в течение 1 ч при 37°C. Участки трижды промывали стерильным DPBS, высушивали, не закрывая, в течение 2-3 часов в ламинарном потоке, а затем покрывали раствором матригеля и инкубировали в течение 30-60 минут при 37°C.

На 4-й день дифференцирующиеся культуры пересевали на новый субстрат. Для этого клетки обрабатывали раствором аккутазы, промывали в DPBS и высевали в виде диссоциированных клеток в капли на предварительно подготовленные участки новых чашек Петри (клетки с одной d=35 мм чашки Петри высевали в две капли (~200 мкл) в смешанную среду N2B27 и mTeSR1 (1:1), дополненную человеческим BDNF (10 нг/мл; Petrotech, Великобритания), NGF (20 нг/мл; Petrotech, Великобритания), ROCKi (5 мкМ), мышинным ламинином (0,5 мкг/мл) и доксициклином (1 мкг/мл). На 5 день среда была заменена на среду N2B27, дополненную человеческим BDNF (10 нг/мл), NGF (20 нг/мл), ROCKi (5 мкМ), мышинным ламинином (0,5 мкг/мл) и доксициклином (1 мкг/мл). После 7-го дня половину культуральной среды меняли дважды в неделю. Далее нейральные культуры культивировали без пересева в течение еще 7-14 дней.

3.6. Выделение РНК

Выделение РНК. Клетки снимали с аккутазой, промывали в DPBS и центрифугировали. Для выделения тотальной РНК из исследуемых клеток (2×10^6 клеток) использовали готовый набор «ExtractRNA kit» (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

Определение концентрации РНК. Концентрацию РНК в полученном растворе измеряли с помощью спектрофотометрического анализа с использованием

спектрофотометра Implen NanoPhotometer P-Class P360. Определяли оптическую плотность раствора РНК при облучении ультрафиолетом с длиной волны 260 нанометров. Контроль за чистотой образца осуществляли с помощью измерения оптической плотности исследуемого раствора при облучении ультрафиолетом с длинами волн 230 и 280 нанометров.

3.7. Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени

Обратная транскрипция. Для синтеза кДНК использовали 1 мкг общей РНК. Обратную транскрипцию проводили с использованием готового набора «Обратная транскриптаза MMLV» фирмы «Евроген». В качестве праймеров использовались olig(dT) и Random праймеры. Для того чтобы удалить примеси геномной ДНК, перед реакцией обратной транскрипции проводили предварительную обработку РНК ДНКазой с использованием набора DNaseI, RNase-free (Thermo scientific, США).

Для одной реакции использовали около 1,5 мкг РНК, к раствору которой добавляли по 1 мкл 10x буфера, 1 мкл ДНКазы, а затем полученный объем доводили водой mQ до 10 мкл. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. После этого в реакцию добавляли 50 мМ ЭДТА в объеме 1 мкл и инкубировали при температуре 60 °С еще 10 минут для инактивации фермента.

Для проведения реакции обратной транскрипции готовили две смеси: MIX1 и MIX2. MIX1 готовили в соответствии с Табл. 1.

Таблица 1. Раствор MIX1:

Реактив	Объем для одной пробы
5x буфер для синтеза первой цепи	5 мкл
Смесь dNTP	2,5 мкл
DTT	2,5 мкл
MMLV-ревертаза	1 мкл

MIX2 состоит из раствора РНК, полученного после обработки ДНКазой, к которому добавили по 1,5 мкл праймеров oligo(dT) и Random с концентрацией 20 мМ. После добавления праймера к РНК, смесь инкубировали 2 минуты при 70°C для расправления вторичной структуры РНК и сразу помещали в лед. После этого к охлажденной смеси MIX2 приливали MIX1 в объеме 11 мкл. Полученный раствор инкубировали при 37°C в течение 1 часа, а затем в течение 10 минут при 65°C для остановки синтеза комплементарной ДНК (кДНК).

ПЦР в реальном времени. Для проведения ПЦР в реальном времени использовали 5x реакционную смесь «qPCRMix-HS SYBR» фирмы «Евроген». ПЦР-анализу подвергалась кДНК, полученная в ходе обратной транскрипции. Реакционная смесь составлялась по следующему протоколу: стерильная вода 2 мкл, 5x смесь для ПЦР в реальном времени HS-SYBR 2 мкл, раствор кДНК 5 мкл (около 15 нанограмм РНК для неразбавленного раствора), праймеры (прямой и обратный) по 0,5 мкл (концентрация праймеров составляла 10 мкМ) — таким образом общий объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Амплификация проводилась согласно следующей программе:

1. 95°C - 10:00
2. Далее 40 циклов:
 1. 95°C - 0:15
 2. 60°C - 1:00

После прохождения сорока циклов строили кривую. В данной работе использовали амплификатор «CFX96 PCR System» фирмы «Bio-Rad». Данные о использованных праймерах представлены в Таблице 2. Праймеры подбирались по материалам следующих банков праймеров: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html> и <http://medgen.ugent.be/rtprimerdb>, а также с помощью программы Primer Blast.

Определение относительного уровня экспрессии гена. Для определения относительных уровней экспрессии исследуемых генов использовался $-\Delta\Delta C_t$ метод. Для нормировки результатов использовались два нормировочных гена:

EMC7 и *PSMB4*, стабильность экспрессии которых в исследуемых клеточных образцах была подтверждена с помощью алгоритма geNorm. Праймеры, использованные в данной работе, перечислены в таблице 2:

Таблица 2. Последовательности праймеров («Евроген»).

	Ген	Последовательность 5'→3'
1.	<i>ASCL1</i>	ATCCTAACCAGTTCGGGGAT TGGTGGCCTCTTGATCTCAC
2.	<i>MAP</i>	CTCAGCACCGCTAACAGAGG CATTGGCGCTTCGGACAAG
3.	<i>TUBB3</i>	CCGAAGCCAGCAGTGTCTAA AAGACAGAGACAGGAGCAGC
4.	<i>GFAP</i>	AGGTCCATGTGGAGCTTGAC GCCATTGCCTCATACTGCGT
5.	<i>NEUROD1</i>	ACAGATTTGCAATGGCTGGC CAGGTGAAATCCCACAGCC
6.	<i>PAX6</i>	AGTGCCCGTCCATCTTTGC CGCTTGGTATGTTATCGTTGGT
7.	<i>S100B</i>	GAAGGGAGGGAGACAAGCAC TCGTGGCAGGCAGTAGTAAC
8.	<i>SOX1</i>	AAATACTGGAGACGAACGCC AACCCAAGTCTGGTGTGAGC
9.	<i>TH</i>	GCCCTACCAAGACCAGACGTA CGTGAGGCATAGCTCCTGA
10.	<i>BRN2</i>	GGGGGAAAACCCTAGACCTT GTCCACCTAGTTCCACTGATGT
11.	<i>NGN2</i>	GAGTTTGCAGAGCGGACTGA GGCATTGTGACGAATCTGGG
12.	<i>OCT4</i>	ACCCACACTGCAGCAGATCA CACACTCGGACCACATCCTTCT
13.	<i>SOX2</i>	TGCGAGCGCTGCACAT GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA
14.	<i>MAPT</i>	TTTGGTGGTGGTTAGAGATATGC CCGAGGTGCGTGAAGAAATG

15.	<i>NES</i>	CAACAGCGACGGAGGTCTC GCCTCTACGCTCTCTTCTTTGA
16.	<i>ZIC3A</i>	ATGAGTAAGGCCAGTTGAGCA AAACCTAGAGCATTGCCCTT
17.	<i>ZIC3B</i>	GCATGTGCATACCTCGGACA ACCAAGCAGGACAACACTTCA
18.	<i>PTN</i>	GGGAAGCAGAGCATGTCCTA ACAAATGCTTCTGCCAAAGTGA
19.	<i>CD44</i>	TCAGAGCACACCCTTCCTCT CCAATAAGTGCTTTCAACTCAGCA
20.	<i>ACTG2</i>	GCCAGATGGGCAGGTTATCA CAGCGGACTCCATGCCAATA
21.	<i>PTPRZ</i>	ATACTGCCCTAGTGTCTCCATG AGAAAAGTGGTAGAGTAAGACCAGC
22.	<i>SOX3</i>	TGGAGAAGTCAACGCCTAC CTCCCCACTACCCAAACGAA
23.	<i>PLP1</i>	AGGCTGCATAGAAGGAGGAGA TGCATGTGAGGTTTTTCAGGGA
24.	<i>VCAM</i>	TTTGACAGGCTGGAGATAGACT TCAATGTGTAATTTAGCTCGGCA
25.	<i>DCX</i>	TGCCATGTGTGTAAGGTGCT GCTCTTTGGCTGCCTGGTAT
26.	<i>NSE</i>	CCGGGAAGTCAAGCCTGATC CTCTGCACCTAGTCGCATGG
27.	<i>PSMB4</i>	CATTCCGTCCACTCCCGATT CGAACTTAACGCCGAGGACT
28.	<i>EMC7</i>	AAAGGAGGTAGTCAGGCCGT GTTGCTTCACACGGTTTTCCA

3.8. Секвенирование РНК

Анализ транскриптомных данных нейральных культур. Библиотеки кДНК были получены из 1 мкг РНК с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep (New England Biolabs, США) и штрих-кодированы индексными

праймерами для пулового секвенирования. Секвенирование проводилось для получения медианы 20,9 млн. прочтений (диапазон 11-34 млн. прочтений) по 2×150 пар оснований на библиотеку. Для оценки количества генов использовали инструмент "salmon" (версия 1.2.1). Анализ дифференциально экспрессированных генов проводили с помощью пакета R "DESeq2" (версия 1.30.1).

Анализ транскриптомных данных нейральных культур N-KYOU p5 и iN-NGN2. В ходе подготовки данных были удалены гены с недостаточным количеством ридов (не экспрессирующиеся в анализируемых клетках) с использованием функции `filterByExpr` из пакета R `edgeR`. Далее выполнена квантильная нормализация с использованием соответствующего метода, реализованного на платформе Genome Enhancer (<https://ge.genexplain.com>).

Анализ главных компонент и метод многомерного шкалирования были выполнены с использованием функций R `prcomp` и `cmdscale` соответственно.

Для кластеризации образцов и генов были использованы величины коэффициента корреляции Пирсона в качестве меры сходства и метод Варда. Для построения тепловой карты кластеризации использовалась функция `heatmap.2` из пакета `gplots`.

Дифференциально-экспрессирующиеся гены были идентифицированы с помощью подхода, реализованного в функциях пакета `edgeR`. При этом образцы iN-NGN2 сравнивались с образцами N-KYOU. Для оценки гипер- и гипо-экспрессированных генов были отобраны гены, транскрипция которых изменялась в два раза ($|\logFC| > 1$) со скорректированным значением $p < 0,0505$ (значение p , скорректированное по методу Беньямини-Хохберга).

Анализ обогащения сигнальных и метаболических путей (Khatri et al., 2012) был выполнен при помощи веб-сервиса `g:Profiler` (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) с использованием информации по путям из базы данных KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), а также информации по биологическим процессам Gene Ontology (<http://geneontology.org>). Анализировались только пути и

процессы с скорректированным значением $p < 0,05$. В качестве поправки на множественные сравнения был использован метод g:SCS, предложенный по умолчанию. При анализе процессов Gene Ontology не использовались недостоверные данные по связям между генами и процессами, полученные методом электронной аннотации. Для визуализации идентифицированных путей и процессов использовался метод treemap, реализованный в пакете R treemap. Сигнальные и метаболические пути были сгруппированы в соответствии с классификацией путей, представленной в KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Процессы Gene Ontology были разбиты на кластеры с использованием информации по их положению в ациклическом направленном графе и, следовательно, семантическому сходству терминов. Для оценки сходства терминов был использован метод Вана, реализованный в функции calculateSimMatrix из пакета rrvgo. Кластеризация процессов была выполнена при помощи метода средней связи (функция hclust), а кластеры идентифицированы с использованием функции cutreeDynamic из пакета dynamicTreeCut.

3.9. Секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq)

Создание библиотек. Культуры нейронов для анализа снимали с использованием аккутазы и суспендировали в DPBS. Затем производили подсчет клеток на счетчике. Для подготовки библиотек использовали 12 800 клеток в 12,8 мкл DPBS. Библиотеки подготавливались с помощью набора «10x Genomics Chromium Single Cell 3' Reagent Kit» («Chromium Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3») в соответствии с инструкциями производителя. Всего было получено 425 млн. чтений (23 254 прочтений на клетку).

Обработка исходных данных. Фильтрация прочтений по качеству основывалась на следующих условиях: ген экспрессируется как минимум в 3 клетках, клетка содержит не менее 300 различных генов ($\text{min.cells} = 3$, $\text{min.features} = 300$). Затем были отобраны клетки, содержащие менее 15 000 UMI и менее 10% митохондриальной РНК ($\text{nCount_RNA} < 15000$ & $\text{percent.mt} < 10$). Пакет программ

Seurat (версия 3.1.1) в программе R (версия 3.6.3, R-Foundation, Вена, Австрия) был использован для создания матрицы ген-штрих-код, содержащей штрих-кодированные клетки и количество экспрессии генов. Функция преобразования SCT из этого пакета использовалась для нормализации данных о количестве молекул к размеру библиотеки в каждой клетке.

Кластеризация, визуализация и аннотирование. Анализ кластеризации и субкластеризации клеток проводился с помощью функции FindClusters пакета программ Seurat (разрешение = 0,1). Для аппроксимации и проецирования кластерного многообразия применялся UMAP – алгоритм снижения размерности. Кластеры клеток были аннотированы на основе наиболее ранжированных генов DP из scRNA-seq и RNA-seq и канонических нейрональных маркеров из литературы.

Анализ показателей клеточного цикла. Анализ клеточного цикла анализировали с помощью функции CellCycleScoring пакета программ Seurat, которая хранит оценки S и G₂/M в метаданных объекта вместе с предсказанной классификацией каждой клетки в фазах G₂/M, S или G₁. Оценки основаны на экспрессии маркеров фаз G₂/M и S.

Анализ псевдовременной траектории. Дифференцировку НСК анализировали с помощью пакета программ Monocle 3 (версия 0.2.3.0; <https://coletrapnelllab.github.io/monocle3/>). Клетки были организованы в прерывистые траектории вдоль общей траектории, соответствующей клеточной дифференцировке. Идентифицированные на этих траекториях гены различались по экспрессии. Для определения прогресса клетки использовался список дифференциально экспрессированных генов, которые являлись общими для пассажей 5 и 25 и связанные с процессами клеточной пролиферации, выживания клеток, клеточного роста, клеточной дифференцировки и клеточной миграции. Кластер 8 был выбран в качестве нулевой точки для структуры дерева Monocle.

3.10. Иммуноцитохимическое окрашивание и количественный анализ флуоресцентных фотографий

Для проведения иммуноцитохимического окрашивания нейральные культуры дифференцировали в чашках Петри со стеклянным дном либо в лунках 24-луночных планшетов.

Нейральные культуры фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем культуры промывали в DPBS (по 5 мин при комнатной температуре) и инкубировали с первичными антителами в 200 мкл блокирующего раствора (PBS, 10% FBS, 0,1% Triton-X-100) во влажной камере в течение ночи (16-18 часов) при 4°C. После инкубации, культуры дважды промывали в DPBS и инкубировали с соответствующими вторичными антителами (Alexa Fluor 488, либо Alexa Fluor 546, либо Alexa Fluor 660) разведенными в блокирующем растворе в соотношении 1: 1000 в течение 1 часа во влажной камере при температуре 37 °C. После инкубации культуры снова дважды промывались в DPBS. Затем ядра клеток контрастировали при помощи красителя DAPI (1 мг/мл в DPBS). Флуоресцентную микросъемку проводили с использованием флуоресцентного микроскопа (EVOS FL AUTO, Life Technologies), обработка изображений производилась в программе ImageJ. Первичные антитела приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Антитела, использованные для иммуноцитохимического окрашивания

№	Антиген	Производитель	Кат.номер	Животное	Разведение
1.	Nestin	Millipore	Mab5326	Мышь	1:200
2.	NSE	Dako	M0873	Мышь	1:200
3.	S100b	Abcam	Ab7852	Мышь	1:200
4.	bIII tub	Millipore	Mab1637	Мышь	1:200
5.	GFAP	Millipore	04-1031	Кролик	1:200
6.	hNCAM	Abcam	Ab75813	Кролик	1:200

7.	NeuN	Abcam	Ab104225	Кролик	1:200
8.	PAX6	Cloud-Clone Corp.,	#PAH446R01	Кролик	1:200
9.	SYN	Abcam	Ab8	Кролик	1:200
10.	SYP	Abcam	Ab32127	Кролик	1:200

Все процедуры количественной оценки были выполнены в программе Fiji. Процесс анализа изображений был реализован в макроязыке ImageJ (версия Fiji-ImageJ 1.53t) (Schindelin et al., 2012). Мы использовали систему интегральной оценки для каждого канала флуоресценции, разработанную Шиловым Б. В. и Задорожным А. Д. (кафедра биоинформатики, РНИМУ им. Пирогова). Система включала количественную оценку яркости пикселей на основе гистограммы изображения. Для увеличения вклада яркости, ее значение возводилось в квадрат для каждого пикселя изображения:

$$\text{Индекс канала} = \sum \text{количество пикселей} \times \text{яркость}^2.$$

В парах каналов (красный-синий и зеленый-синий) исследовалось отношение индекса канала окрашенных антителом структур (красный или зеленый) к индексу канала окрашенных DAPI ядер (синий). Это отношение представляет собой уровень флуоресценции антитела. Процесс был автоматизирован с помощью скрипта, написанного на макроязыке ImageJ. С его помощью было проанализировано 362 пары изображений нейральных культур. Каждое окрашенное изображение сравнивали с отрицательным контролем, окрашенным только вторичными антителами. Результаты анализа изображений включают расчетное соотношение для каждой пары изображений. Для статистического анализа и визуализации использовался R версии 4.2.2 с пакетами tidyverse (Wickham et al., 2019) и arsenal. Анализ проводился в двух биологических повторах (каждый имел два технических повтора), разделенных во времени.

3.11. Микросъемка в фазовом контрасте

Микросъемка производилась на флуоресцентном микроскопе (EVOS FL AUTO, Life Technologies). Клетки при этом находились в полной ростовой среде.

3.12. Кальциевый имиджинг

Измерения $[Ca^{2+}]_i$ проводили с помощью генетически кодируемого Ca^{2+} -индикатора GCaMP6s. Для измерения $[Na^+]_i$ использовали флуоресцентный индикатор SBFI (ThermoFisher, США), который вводили в клетки в виде ацетоксиметилового эфира (8 мкМ) на 50-60 мин при 37°C. Стоковые растворы эфиров АМ в ДМСО предварительно смешивали с неионным детергентом Pluronic F-127 (0,02%; Molecular Probes, Орегон) для облегчения проникновения эфиров в клетки и затем добавляли в инкубационную среду в указанной выше концентрации.

Измерения проводили при 26-29°C в буфере, содержащем (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 5 D-глюкозы. pH 7,4 устанавливали с помощью 1M NaOH. Номинально бескальциевые растворы содержали 2 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ EGTA и не содержали CaCl₂. Для изучения влияния глутамата (Glu), ингибиторов рецепторов и других агентов предыдущие растворы в каждой чашке с клетками заменяли новыми (4 x 1 мл) в течение 40 с. Буферы готовили непосредственно перед использованием.

Измерения изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ проводили с помощью системы анализа изображений на основе микроскопа Nikon Ti2 (Япония), светодиодной системы освещения (PE-340-fura, CoolLED, США), с использованием трехполосного зеркала с делителем луча DM468/526/596, набора возбуждающих фильтров 442 ± 21 нм для GCaMP6s и 387 ± 6 нм SBFI. Флуоресценция GCaMP6s и SBFI регистрировалось при 544 ± 12 нм. Светофильтры и кубик были изготовлены Semrock (Thorlabs, США). Время экспозиции составляло 200-500 мс, при этом интенсивность излучения светодиода находилась в диапазоне 5-20% от максимального значения.

Все реагенты, за исключением индикаторов кальция и натрия и Pluronic, были приобретены у компании Sigma (США).

Регистрация, хранение и обработка полученной информации осуществлялась с помощью программного обеспечения NIS, поставляемого с описанной системой анализа изображений. Построение графиков изменений и статистический анализ проводили с помощью программы Prism 8.1. Различия с $p < 0,05$ в парных t-тестах считались значимыми.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Galiakberova A. A., Brovkina O. I., Kondratyev N. V., Artyuhov A. S., Momotyuk E. D., Kulmukhametova O. N., Lagunin A. A., Shilov B. V., Zadorozhny A. D., Zakharov I. S., Okorokova L. S., Golimbet V. E., Dashinimaev E. B. Different iPSC-derived neural stem cells shows various spectrums of spontaneous differentiation during long term cultivation // *Frontiers in molecular neuroscience*. — 2023. — Vol. 16.

Galiakberova A.A., Surin A.M., Bakaeva Z.V., Sharipov R.R., Zhang D., Dorovskoy D.A., Shakirova K.M., Fisenko A.P., Dashinimaev E.B. iPSC-Derived Human Neurons with GCaMP6s Expression Allow In Vitro Study of Neurophysiological Responses to Neurochemicals // *Neurochem Res*. — 2022. — Vol. 47, no 4. P. — 952-966.

Степанов, А. И., Путляева, Л. В., Дидыч, Д. А., Галиакберова, А. А., Гурская, Н. Г., Лукьянов, К. А. Экспрессия фактора АТОН1 индуцирует быструю дифференцировку ИПСК в нейронном направлении // *Вестник РГМУ*. 2023. №5. С. 4–9.

4.1. Дифференцировка ИПСК в нейроны с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием

Получение нейральных культур из ИПСК с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием (DUAL SMADi) включает в себя три этапа:

- 1) Индукция нейроэктодермальной дифференцировки ИПСК с помощью воздействия малых молекул, ингибирующих два пути активации SMAD-сигналинга. По окончании первой стадии получается культура пролиферирующих НСК. Этап занимает около 10-14 дней
- 2) Полученные НСК культивируют в течение нескольких пассажей на среде NPM (среда для пролиферации нейральных стволовых клеток), содержащей факторы роста FGF2 и EGF (которые поддерживают самообновление НСК и их недифференцированное состояние), но не содержащей малых молекул-ингибиторов SMAD. Этап занимает от 14 дней и более.
- 3) Терминальная дифференцировка НСК в нейральные культуры путем элиминации из среды факторов роста FGF2 и EGF. На этом этапе возможно добавление различных факторов, способствующих дифференцировке НСК в тот или иной тип клеток. Если же направляющие факторы не добавлены, то такая дифференцировка считается спонтанной. Этап занимает от 14 дней и более.

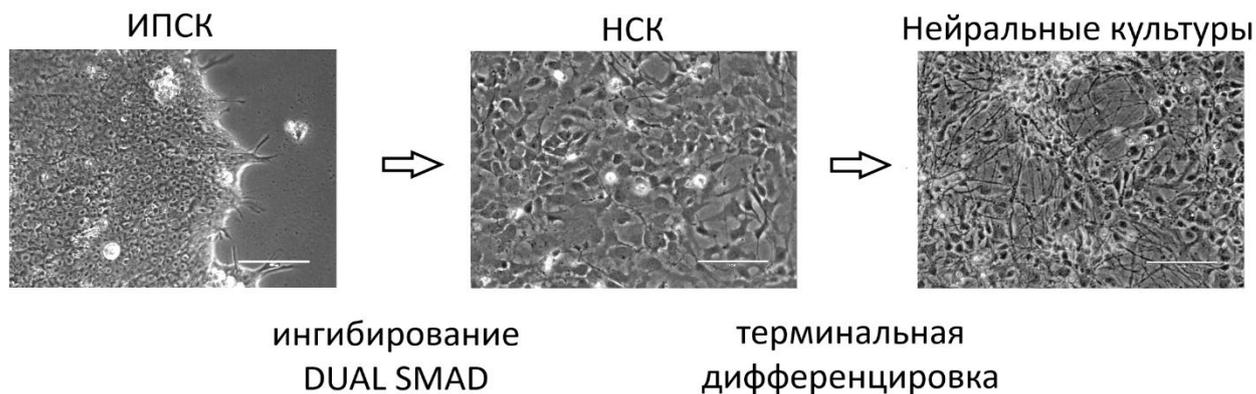


Рисунок 5. Этапы получения нейральных культур из ИПСК с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием.

4.1.1. Общий дизайн эксперимента

Мы получили культуры НСК из 5 линий ИПСК (KYOU, KYOU-GCaMP6s, AFS17, DP и DYP0730) с помощью метода с DUAL SMADi. Следует отметить, что линия ИПСК-DYP0730 получена из клеток пациента с синдромом Дауна и имеет лишнюю 21 хромосому. Мы предполагали, что культуры нейронов, полученные из ИПСК-DYP0730, должны будут отличаться от культур, дифференцированных из других линий (Mollo et al., 2021; Giffin-Rao et al., 2022), и поэтому ввели данную линию клеток в анализ в качестве контроля сдвига спектра дифференцировки.

Пассажем 0 мы считали момент, когда клетки развивали морфологию, соответствующую НСК, и были переведены на среду NPM в адгезивном состоянии. С этого момента мы культивировали НСК в течение 5 пассажей. На 5-м пассаже НСК были направлены в спонтанную нейральную дифференцировку. Полученные таким образом нейральные культуры (N) поддерживали в среде N2B27 с добавлением 5 мкМ ROCKi. На 14-й день дифференцировки из части клеток всех культур, кроме N-KYOU-GCaMP6s, выделяли общую РНК для количественной ПЦР с обратной транскрипцией, а на 21-й день дифференцировки проводили иммуноцитохимическое окрашивание нейральных культур. Нейральные культуры N-KYOU-GCaMP6s на 21-й день дифференцировки были исследованы на наличие

специфической кальциевой активности с помощью кальциевого имиджинга по флуоресцентному сигналу от кальциевого индикатора GCaMP6s.

Для исследования дифференцировки НСК при долгосрочном культивировании пассирование линий НСК-KYOU и НСК-AFS17 было продолжено до 30 пассажа (Рис. 6). На 5-м, 10-м, 15-м, 20-м, 25-м (для KYOU и AFS17) и 30-м (только для KYOU) пассажах часть культур НСК были отправлены в спонтанную нейральную дифференцировку. Через 14 дней спонтанной дифференцировки из клеток выделяли общую РНК для проведения количественного ОТ-ПЦР и транскриптомного анализа (bulk RNA-seq).

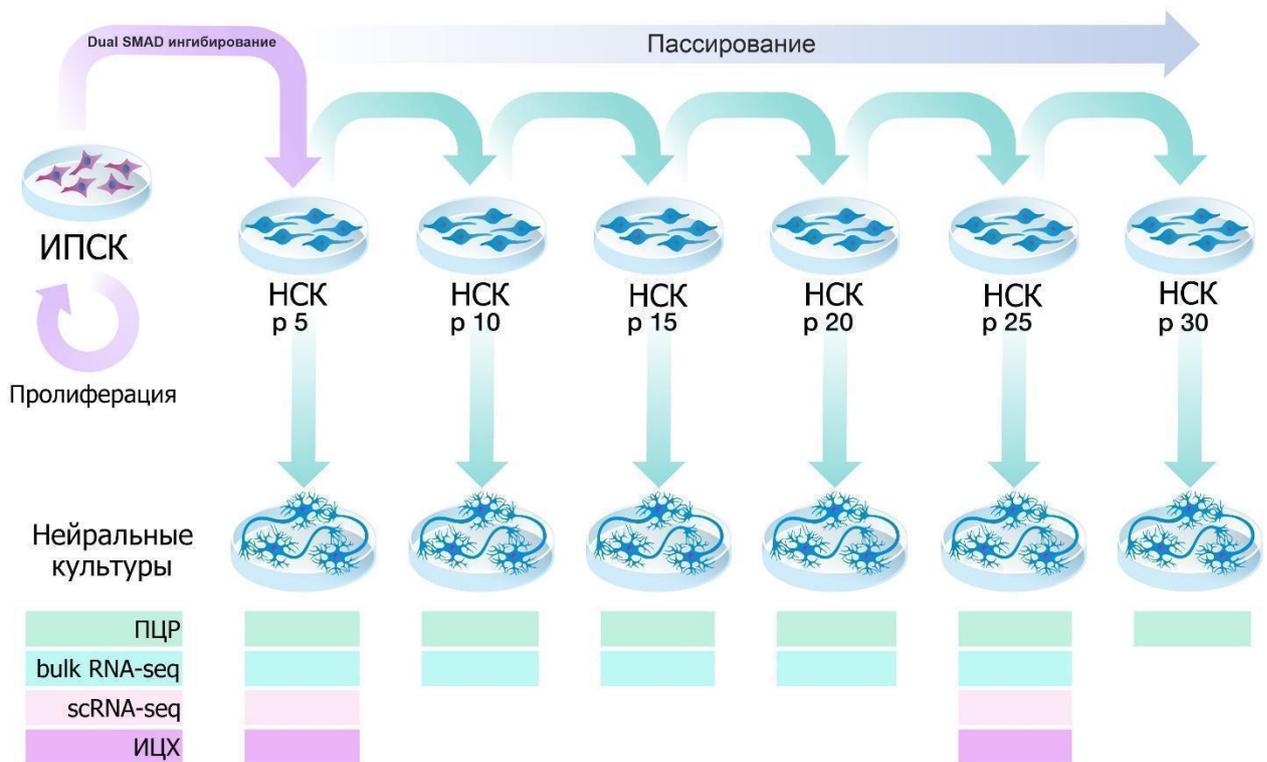


Рисунок 6. Дизайн эксперимента с долгосрочным культивированием НСК. ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; НСК – нервные стволовые клетки; p – пассаж; bulk RNA-seq – анализ общих транскриптомов; scRNA-seq – секвенирование РНК единичных клеток; ИЦХ – иммуноцитохимия.

В качестве основных точек сравнения были взяты 5-й и 25-й пассажи: нейральные культуры, дифференцированные из НСК-KYOU и НСК-AFS17 на 5 и 25-м пассажах (N-KYOU p5/25, N-AFS17 p5/25), были проанализированы на

экспрессию основных маркеров методами иммуноцитохимии, а N-KYOU p5/25 были дополнительно исследованы на клеточное разнообразие с помощью анализа данных секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq).

4.1.2. Морфология спонтанно дифференцированных из НСК нейральных культур

Во время культивирования НСК большинство клеток в культурах имели стандартную для таких НСК морфологию – округлую форму с короткими отростками и высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. После начала спонтанной дифференцировки мы наблюдали типичное изменение морфологии культуры: появление клеток с небольшой сомой и тонкими длинными нейритами, образующими сети (Рис. 7), что мы интерпретировали как инициацию дифференцировки в нейроны.

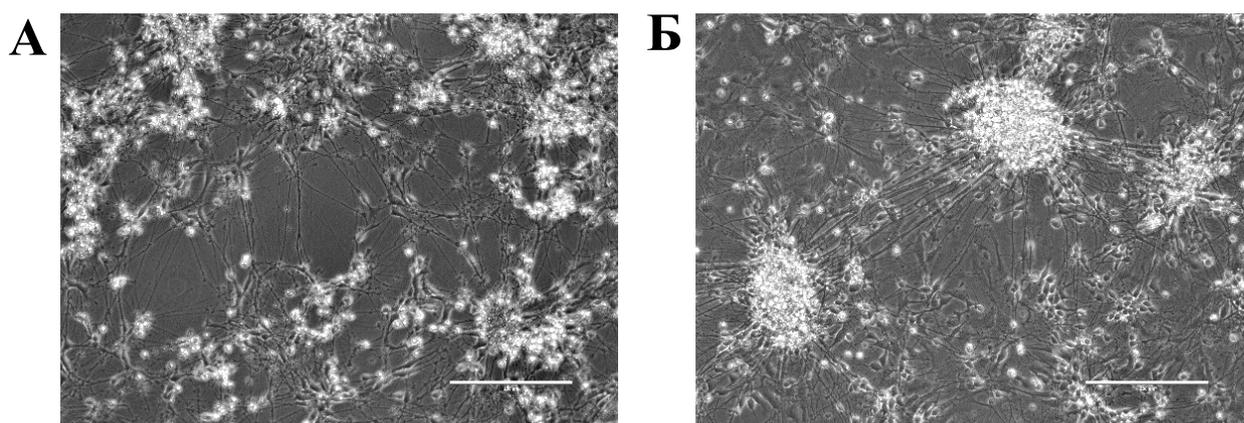


Рисунок 7. Нейральные культуры N-KYOU p20 (А) и N-AFS17 p20 (Б) на 14-й день спонтанной дифференцировки. Фазовый контраст, увеличение 20х, шкала 200 мкм

Однако важно отметить, что и НСК, и нейральные культуры, полученные путем спонтанной дифференцировки, имели очень неоднородный по морфологии клеточный состав. Например, в культурах НСК мы часто наблюдали розеткоподобные структуры, состоящие из мелких клеток с выраженной полярностью (Рис. 8 А; синие стрелки), а также регулярно встречали крупные уплощенные клетки с обширной цитоплазмой (Рис. 8 В; красные стрелки). В нейральных культурах (N) хотя мы определили большинство клеток как нейроноподобные (Рис. 8 Д, Е; зеленые стрелки), некоторые клетки явно сохраняли

морфологию, подобную НСК (Рис. 8 Д, Е; желтые стрелки), и, похоже, продолжали пролиферировать.

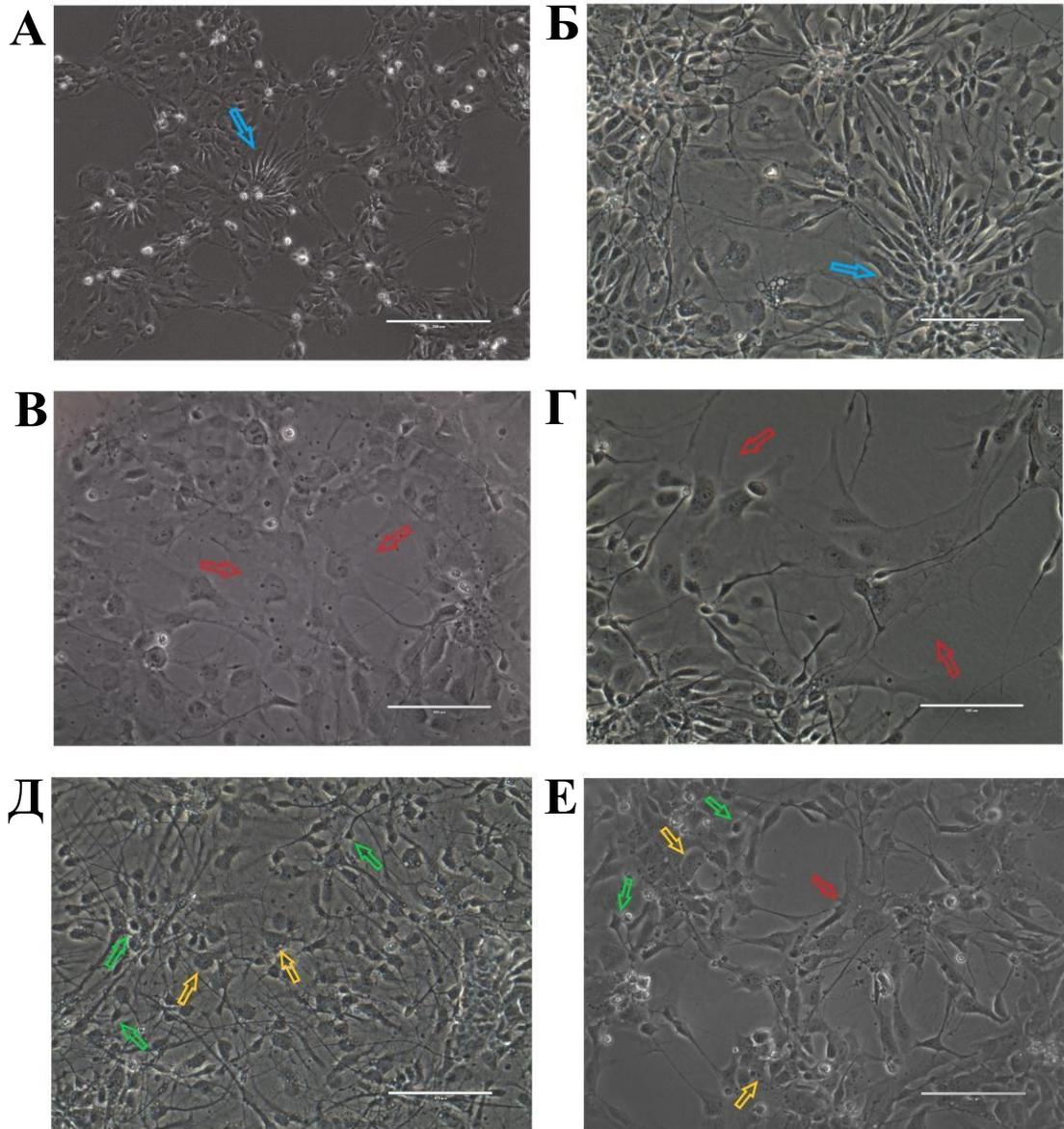


Рисунок 8. Гетерогенность полученных НСК и нейральных культур (N) на примере линии KYOU.

А, В, – культуры НСК-KYOU;

Б, Г, Д, Е – культуры N-KYOU на 14й день дифференцировки;

Синие стрелки указывают на нейральные розетки, красные стрелки указывают на крупные уплощенные клетки не-нейрональной морфологии, желтые стрелки указывают на НСК-подобные клетки, зеленые стрелки указывают на нейроно-подобные клетки.

Фазовый контраст, А – шкала 200 мкм, Б-Е – шкала 100 мкм.

Кроме того, как и в культурах НСК, в нейральных культурах мы наблюдали уплощенные клетки неправильной формы с большим ядром, без нейритов и с включениями вакуолей в цитоплазме (Рис. 8 Д, Е; красные стрелки), а также розеткоподобные структуры (Рис. 8 Б, синие стрелки).

4.1.3. Кальциевая активность нейральных культур, спонтанно дифференцированных из НСК-KYOU-GCaMP6s

Мы провели серию экспериментов по регистрации внутриклеточного кальциевого сигнала в 21-дневных культурах N-KYOU-GCaMP6s при воздействии различных веществ – стимуляторов и ингибиторов нейрофизиологической активности (пикротоксина, глутамата и кинуреновой кислоты). Изменение уровня кальция регистрировали с помощью GCaMP6s – генетически кодируемого кальциевого индикатора, синтезированного на основе зеленого флуоресцентного белка GFP и кальмодулина. При связывании GCaMP6s с ионами кальция происходит усиление его флуоресценции (Chen et al., 2013). Интенсивность флуоресценции отражает концентрацию ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в цитозоли клетки, однако верхний предел флуоресценции ограничивается количеством белка GCaMP6s в клетке.

Пикротоксин – неконкурентный антагонист ГАМК-рецепторов (Akaike et al., 1985), с его помощью мы снимали фоновое ГАМК-опосредованное ингибирование активности нейронов. Глутамат (глутаминовая кислота) – важнейший возбуждающий нейромедиатор, который при взаимодействии с ионотропными глутаматными NMDA-, AMPA- и каинатными рецепторами приводит к поступлению ионов кальция и натрия в цитозоль и возбуждению нейронов. Кинуреновая кислота – антагонист ионотропных рецепторов к глутамату: NMDA-, AMPA-, каинатных рецепторов (Elmslie, Yoshikam, 1985).

До добавления веществ в культивируемых клетках наблюдались слабые спонтанные кальциевые осцилляции, которые на графике выражаются в редких пиках возрастания флуоресценции GCaMP6s. При добавлении пикротоксина (pic)

в среднем мы не наблюдали заметного изменения частоты или интенсивности пиков флуоресценции. При добавлении глутамата (Glu) в концентрации 10 мкМ почти во всех выбранных клетках происходило резкое увеличение флуоресценции с последующим медленным снижением. Добавление кинуреновой кислоты (KYN) в некоторых клетках вызывало хаотичные осцилляции $[Ca^{2+}]_i$ с последующим ее снижением (Рис. 9).

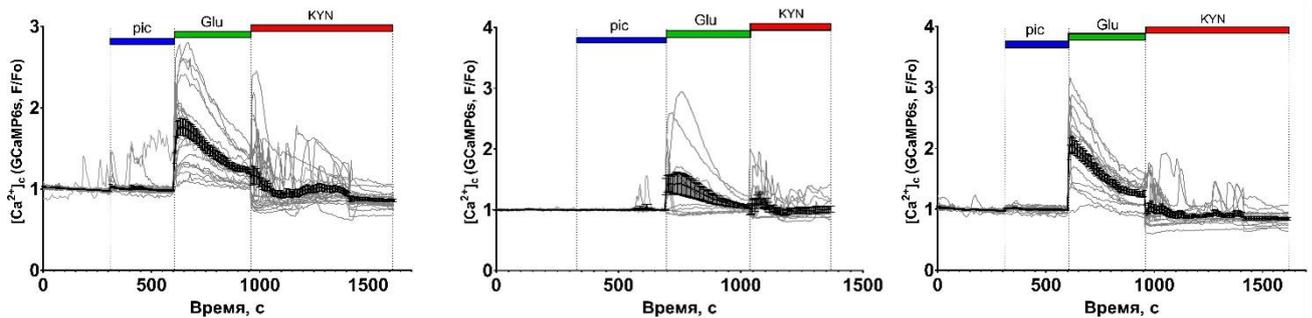


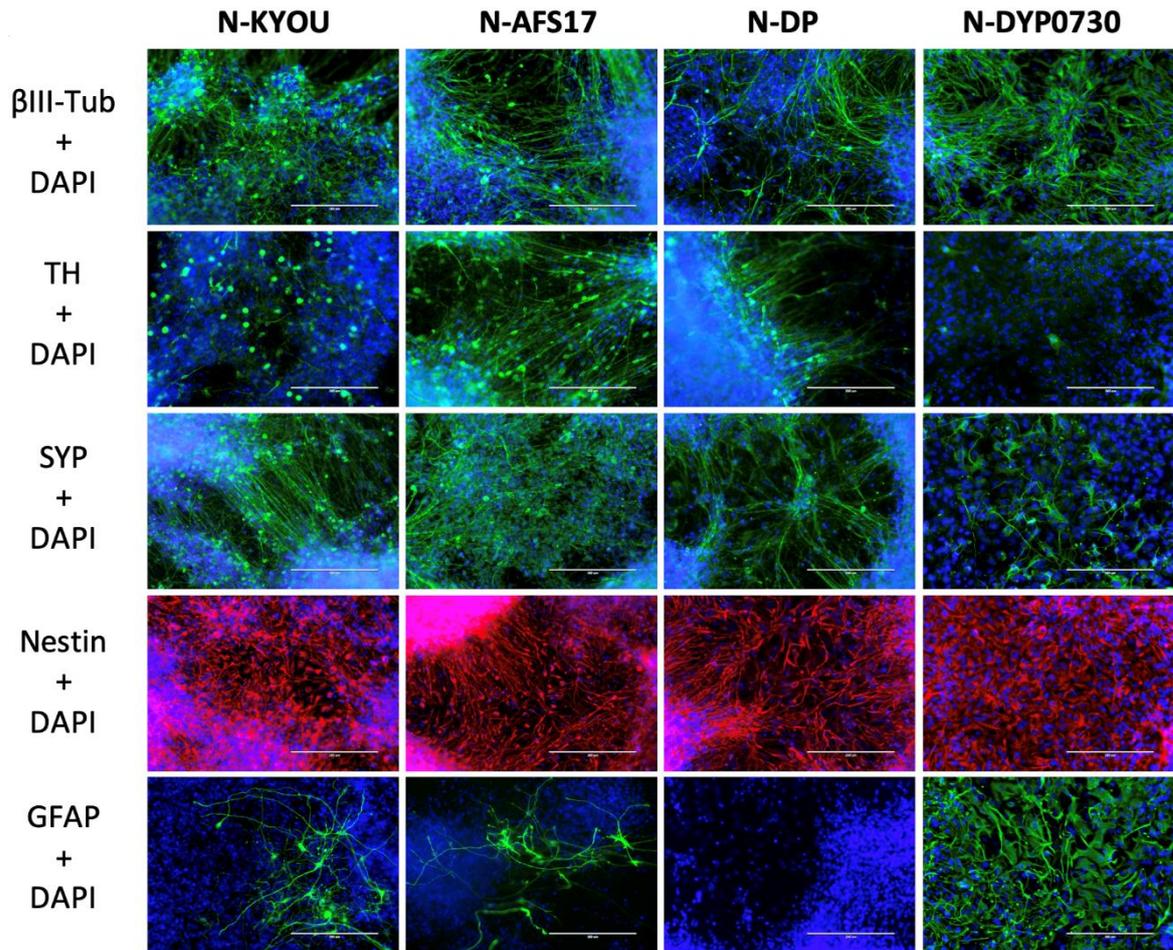
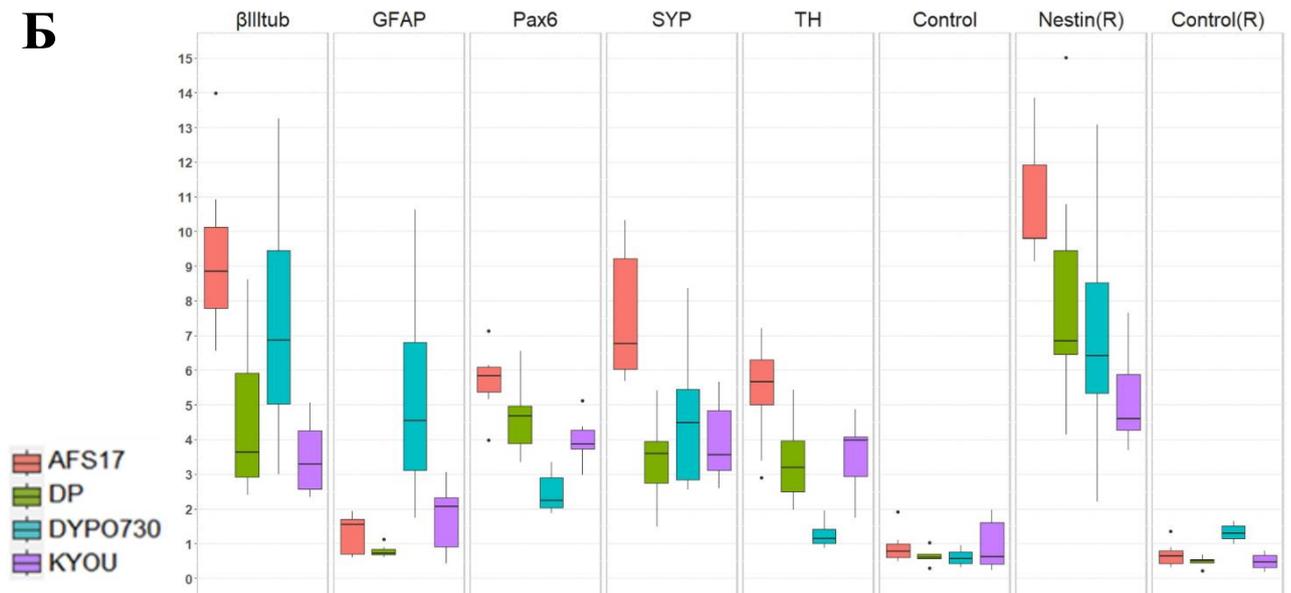
Рисунок 9. Результаты трех независимых экспериментов по изменению $[Ca^{2+}]_i$ в нейральных культурах N-KYOU-GCaMP6s при добавлении различных веществ: Pic – пикротоксин (10 мкМ), Glu – глутамат (10 мкМ), KYN – кинуреновая кислота (1 мМ). Графики представляют собой зависимость интенсивности флуоресцентного сигнала GCaMP6s от времени. Изменение флуоресцентного сигнала клетки отражает изменения $[Ca^{2+}]_i$ в ней. Каждая кривая представляет собой одну клетку, изменяющую интенсивность флуоресценции в течение времени. Интенсивность сигнала для каждой клетки нормирована на ее флуоресценцию в начале эксперимента и принята за 1.

Некоторые клетки не ответили повышением $[Ca^{2+}]_i$ на глутамат, что говорит о присутствии в культуре клеток, не обладающих глутаматными рецепторами, либо неспособными к кальциевому ответу на глутамат в данных условиях. Часть клеток проявила кальциевую активность при добавлении кинуреновой кислоты, несмотря на то, что она блокирует ионотропные рецепторы. Вероятно, в таких клетках увеличение концентрации кальция в цитозоли вызвано его притоком из внутриклеточного депо (эндоплазматического ретикулаума). Эти результаты говорят о гетерогенности клеточной культуры.

В целом на основе полученных данных мы можем утверждать, что метод с DUAL SMADi позволяет получить нейральные культуры, в которых часть клеток демонстрируют кальциевую активность в ответ на добавление глутамата.

4.1.4. Сравнение нейральных культур, спонтанно дифференцированных из разных линий НСК

Нейральные культуры (N-культуры), полученные из разных линий НСК, значительно отличались друг от друга. Во всех нейральных культурах (N-KYOU, N-AFS17, N-DP и N-DYP0730), дифференцированных из соответствующих линий НСК на 5-м пассаже, методом иммуноцитохимического окрашивания были обнаружены маркеры нейрональных предшественников – Nestin, Pax6 (не показан на фотографиях), а также маркеры нейронов – β -III-тубулин, синаптофизин (SYN) и тирозингидроксилаза (TH) (Рис. 10 А, Б). Однако меньше всего TH-позитивных клеток было обнаружено в N-DYP0730 (Рис. 10 А, Б). Маркер глиальных клеток, GFAP, наблюдался во всех нейральных культурах, кроме N-DP. При этом культуры различались по количеству GFAP-положительных клеток (Рис. 10 Б). В N-KYOU и N-AFS17 наблюдались 1-3 группы GFAP⁺ клеток, тогда как культура N-DYP0730 была значительно обогащена GFAP⁺ клетками по сравнению с другими культурами (Рис. 10 А). Стоит отметить, что β -III-тубулин⁺ клетки в культуре N-DYP0730 оказались довольно неоднородными по морфологии: были и нейроноподобные, и НСК-подобные клетки, и даже клетки, морфология которых очень напоминала GFAP⁺ клетки той же культуры (Рис. 10 А). Более того, некоторые Nestin⁺ клетки имели схожую морфологию с GFAP⁺ клетками (Рис. 10 А). Эти наблюдения согласуются с тем, что НСК, полученные из ИПСК с трисомией 21 хромосомы, имеют повышенную склонность к дифференцировке в астроглиальные клетки (Mollo et al., 2021).

A**Б**

Группы	Размеры групп	p-value
AFS17 p5 vs KYOU p5	52/52	0.003 (< 0.05)
DP p5 vs DYP0730 p5	51/57	0.351
DP p5 vs AFS17 p5	51/52	0.039 (< 0.05)
DP p5 vs KYOU p5	51/52	0.585
DYP0730 p5 vs AFS17 p5	57/52	0.289
DYP0730 p5 vs KYOU p5	57/52	0.112

Рисунок 10. Результаты иммуноцитохимического окрашивания нейральных культур N-KYOU, N-AFS17, N-DP и N-DYP0730 на 21-й день спонтанной дифференцировки, полученные из соответствующих линий НСК на 5-м пассаже.

А – Флуоресцентная микроскопия, шкала 200 мкм. Ядра окрашены DAPI (синий).

Б – Количественный анализ данных иммуноцитохимического окрашивания нейральных культур. Размеры групп – количество проанализированных снимков, включает все 6 антигенов. p-value – достоверность различий между группами, результат теста Манна-Уитни с поправкой на частоту ложных обнаружений при множественной проверке гипотез.

β III-Tub – β -III-тубулин, TH – тирозингидроксилаза, SYP – синаптофизин, control – контроль без первичных антител по зеленому сигналу, control (R) – контроль по красному сигналу.

Анализ уровней экспрессии маркерных генов методом количественной ОТ-ПЦР также показал значительные различия между нейральными культурами четырех линий (N-KYOU, N-AFS17, N-DP и N-DYP0730) (Рис. 11). В целом, мы обнаружили корреляцию между данными, полученными с помощью иммуноцитохимического окрашивания и измеренными уровнями экспрессии генов. Например, нейральные культуры с хромосомной аномалией T21 (N-DYP0730) экспрессировали гены-маркеры глиальных клеток (*GFAP*, *CD44*, *S100B*) значительно сильнее, а гены-маркеры нейронов (*MAP2*, *NEUROD1*, *TUBB3*) значительно слабее, чем три другие культуры. Экспрессия различных маркерных генов (например, *ASCL1*, *MAP2*, *NGN2*, *OCT4*, *PTN*, *SOX3*) также значительно отличалась между тремя культурами с нормальным кариотипом (N-KYOU, N-AFS17, N-DP), что, по-видимому, указывает на различный клеточный состав, образовавшийся в результате спонтанной дифференцировки.

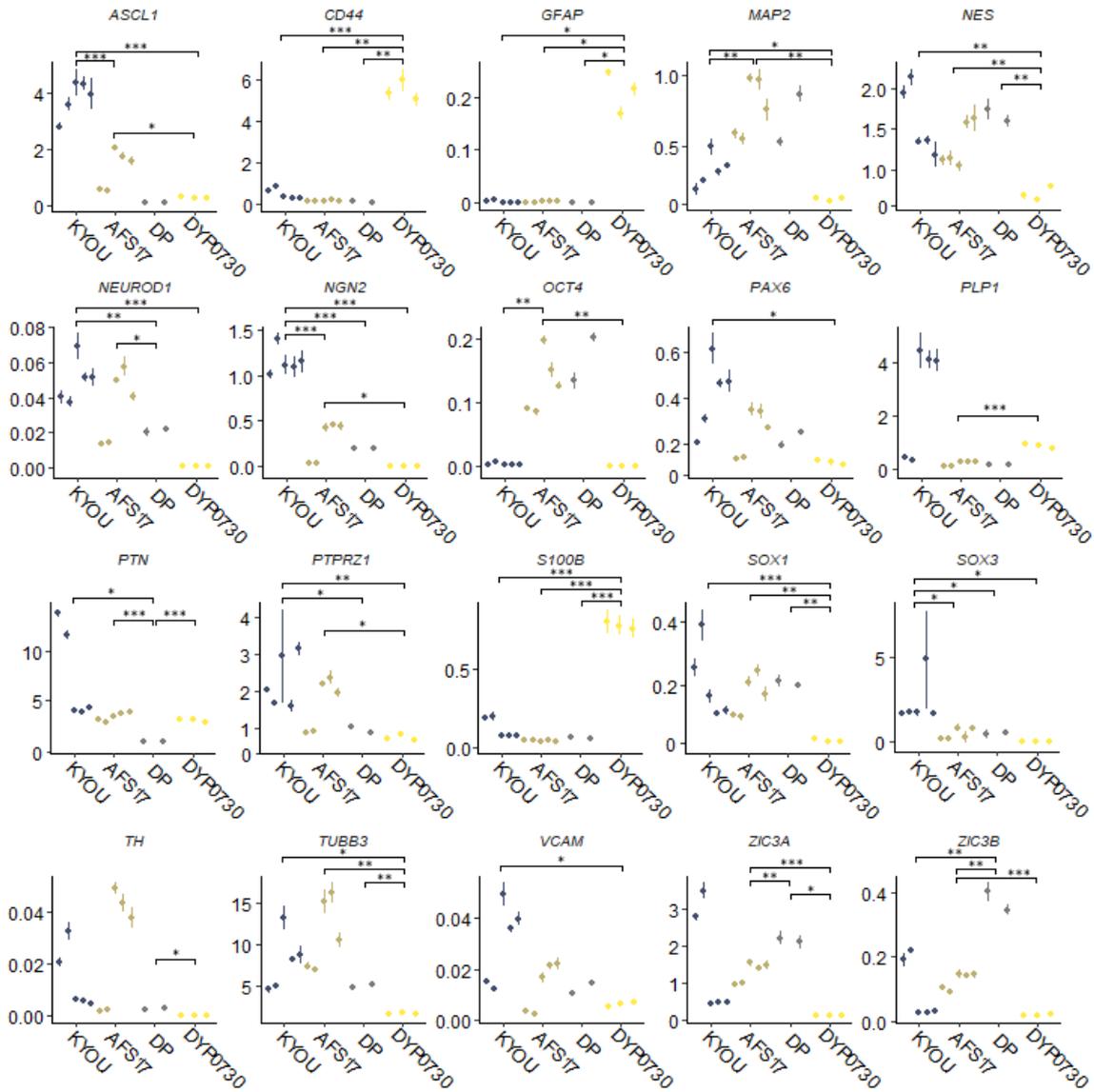


Рисунок 11. Уровни относительной экспрессии маркерных генов, определенные методом количественной ОТ-ПЦР, в 14-дневных нейральных культурах N-KYOU, N-AFS17, N-DP и N-DYP0730, полученных из соответствующих линий НСК на 5 пассаже.

По оси Y показан уровень экспрессии, рассчитанный методом $-\Delta\Delta C_t$, нормализованный к экспрессии генов домашнего хозяйства (*EMC7* и *PSMB4*). Каждая точка представляет собой биологическую реплику. Столбики ошибок указывают на стандартное отклонение технических реплик. Звездочки указывают на статистическую значимость различий между указанными группами образцов, рассчитанную с помощью теста Уэлча (* – p-value < 0,054; ** – p-value < 0,01; *** – p-value < 0,001).

4.1.5. Анализ изменения нейтральных культур KYOU и AFS17 при длительном культивировании НСК

Далее мы исследовали, как продолжительность культивирования НСК влияет на их дифференцировочный потенциал и спектр клеточных типов в нейтральных культурах. Для этого мы культивировали НСК-KYOU и НСК-AFS17 до 30-го пассажа. Каждые 5 пассажей часть НСК направляли в спонтанную дифференцировку.

В процессе культивирования НСК-KYOU и НСК-AFS17 с 5-го по 30-й пассажи в течение 168 дней мы не наблюдали значительных изменений ни в скорости пролиферации культуры (Рис. 12), ни в морфологии культивируемых клеток.

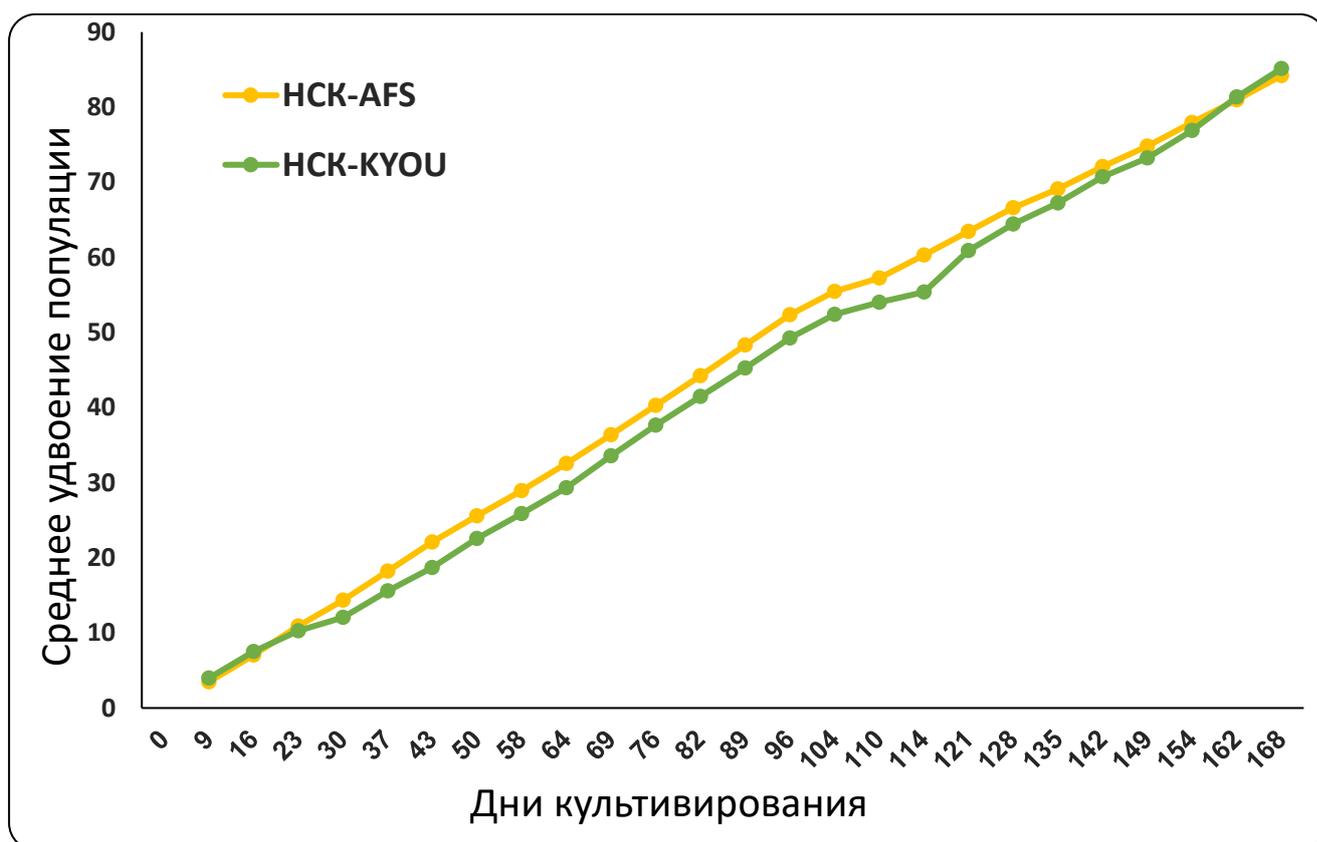


Рисунок 12. Темпы пролиферации культур НСК (полученных из ИПСК-KYOU и ИПСК-AFS17) в течение культивирования с 5-го по 30-й пассажи.

Иммуноцитохимическое окрашивание показало, что 21-дневные нейральные культуры N-KYOU и N-AFS17, полученные из НСК на 5 и 25 пассажах (N-культуры p5 / p25), были положительными на маркеры НСК (Nestin и Pax6) и нейронов (β -III-тубулин, синаптофизин (SYN) и тирозингидроксилазу (TH)) в обоих случаях у обеих линий (Рис. 13 А, Б). Однако анализ результатов окрашивания показал снижение уровней маркеров НСК Nestin и Pax6 в N-культурах p25 по сравнению с N-культурами p5 в обеих линиях (KYOU и AFS17) (Рис. 13 Б). β -III-тубулин, хотя и детектировался на достаточно высоком уровне, имел различную динамику в двух линиях: в N-AFS17 p25 общий флуоресцентный сигнал снижался, а в N-KYOU p25, наоборот, возрастал, по сравнению с p5 (Рис. 13 Б). Изменение количества клеток, положительных на глиальный маркер GFAP, также имело интересную динамику. В N-KYOU p5 присутствовало небольшое количество GFAP⁺-клеток, а в N-KYOU p25 они практически не обнаруживались (Рис. 13 А, Б). В N-AFS17 p5 также наблюдалось небольшое количество GFAP⁺-клеток, но в N-AFS17 p25 их количество значительно увеличилось (Рис. 13 А, Б).

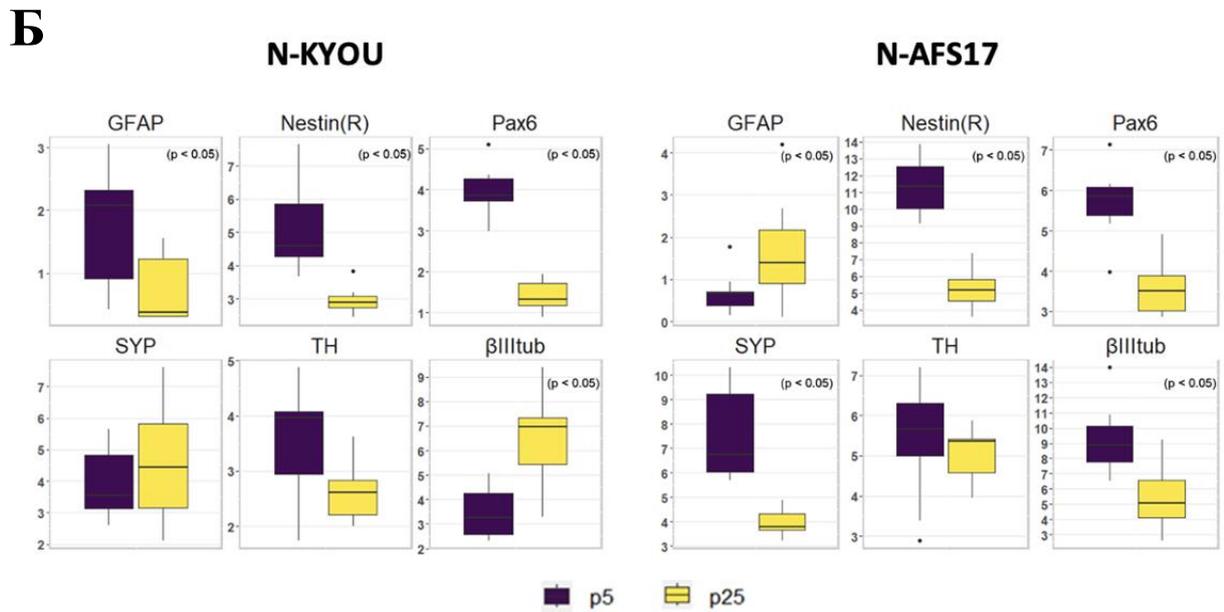
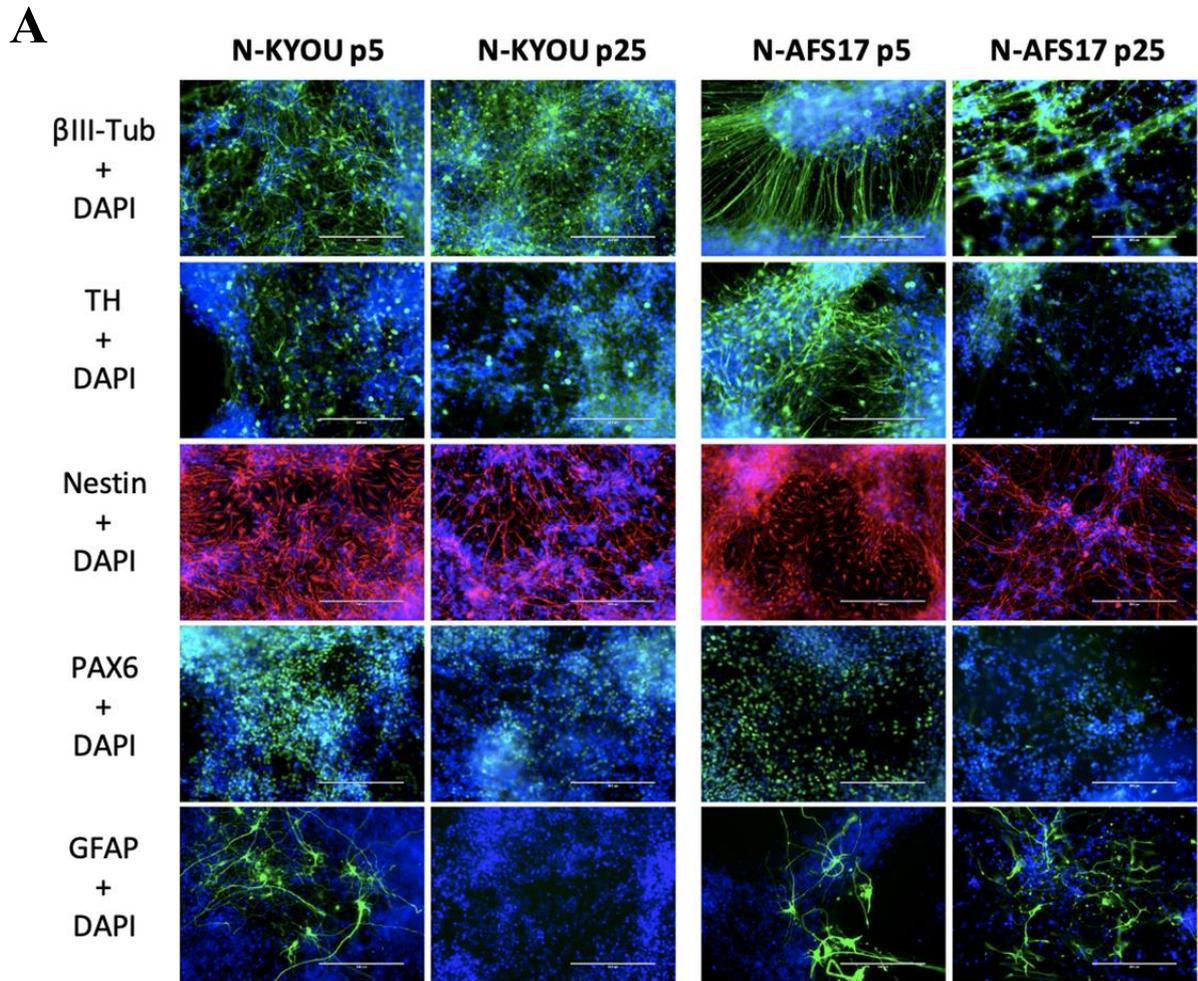


Рисунок 13. Результаты иммуноцитохимического окрашивания нейральных культур N-KYOU и N-AFS17 p5 и p25 на 21-й день спонтанной дифференцировки.

A – Флуоресцентная микроскопия, шкала 200 мкм. Ядра окрашены DAPI (синий)

B – Количественный анализ данных иммуноцитохимического окрашивания нейральных культур.

Размеры групп (включает все 6 антигенов): N-KYOU p5 n = 52, N-KYOU p25 n = 53, N-AFS17 p5 n = 52, N-AFS17 p25 n = 52;

p-value – достоверность различий между группами, результат теста Манна-Уитни с поправкой на частоту ложных обнаружений при множественной проверке гипотез. Группы: N-KYOU p5 vs. N-KYOU p25 p-value = 0.07; N-AFS17 p5 vs. N-AFS17 p25 p-value = 0.006

β III-Tub – β -III-тубулин, TH – тирозингидроксилаза, SYP – синаптофизин, R – обозначение красного сигнала окраски.

Результаты анализа уровней относительной экспрессии маркерных генов с помощью количественной ОТ-ПЦР в нейральных культурах N-KYOU и N-AFS17, полученных на разных пассажах, подтвердили значительные различия как между обеими культурами как на одном пассаже, так и между разными пассажами в одной культуре (Рис. 14). Уровни экспрессии генов глиальной дифференцировки (*CD44*, *GFAP*, *S100b*) снижались с увеличением пассажа НСК в культуре N-KYOU, в то время как в культуре N-AFS17 наблюдалось их увеличение, что коррелирует с результатом иммуноцитохимического окрашивания.

Мы также наблюдали, что с увеличением пассажа НСК экспрессия ряда генов имела тенденцию к снижению в обеих культурах (*TH*, *PTN*, *ZIC3A*, *ZIC3B*), в то время как экспрессия таких генов, как *ASCL1*, *NEUROD1*, *PLP1*, *SOX3*, *VCAM* (для N-AFS17) и *MAP2*, *NES*, *PAX6* (для N-KYOU) возрастала (Рис. 14).

Таким образом, мы успешно получили нейральные культуры, спонтанно дифференцированные из НСК на различных пассажах при длительном культивировании. Мы наблюдали сложный морфологически неоднородный состав этих клеточных культур, состоящий из множества явно различных популяций, анализ которых был весьма затруднен из-за ограничений методов флуоресцентной микроскопии и количественной ОТ-ПЦР. Поэтому следующим шагом был анализ данных транскриптомов полученных нейральных культур.

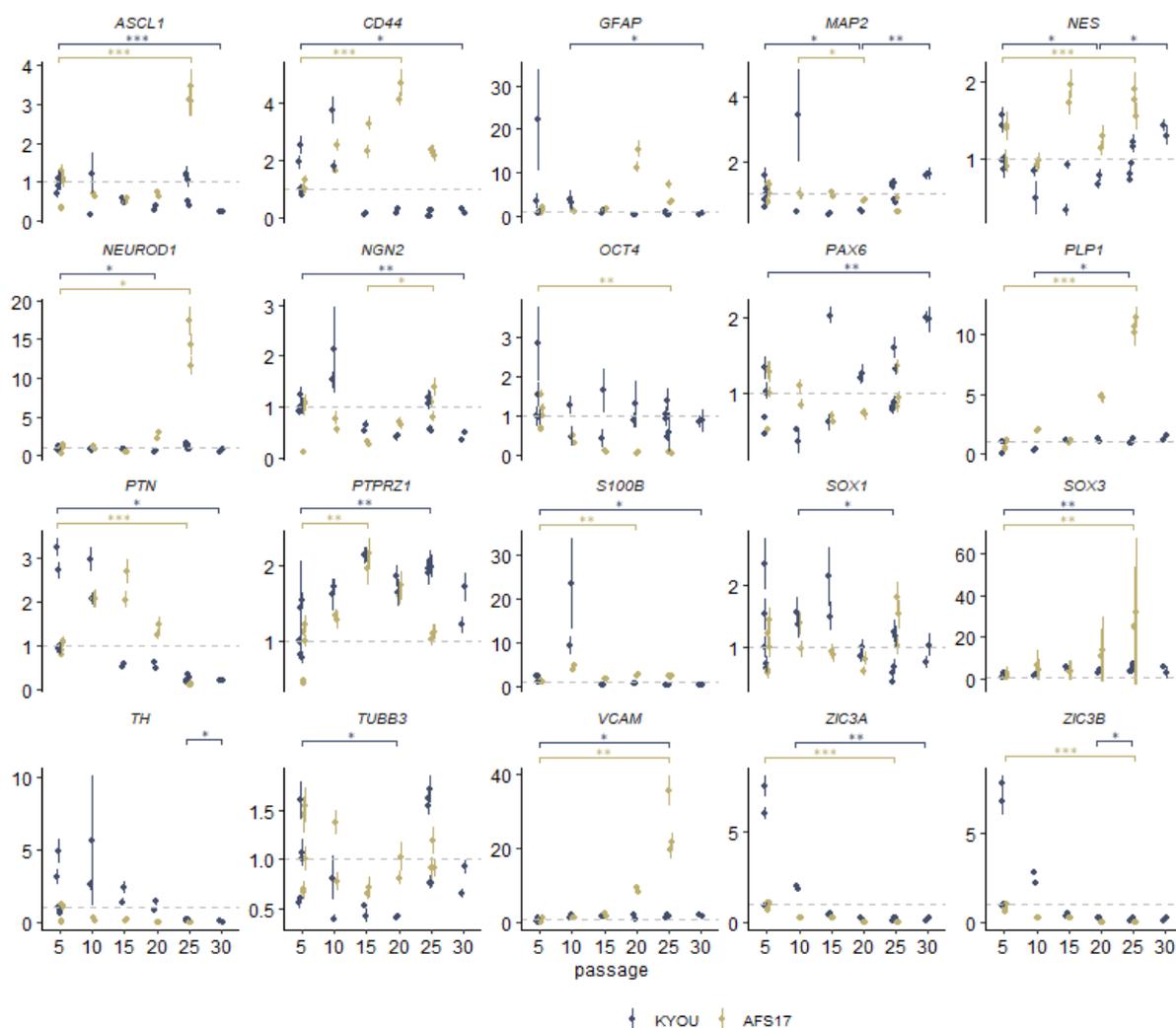


Рисунок 14. Уровни относительной экспрессии маркерных генов в 14-дневных нейральных культурах (N-KYOU и N-AFS17), полученных из соответствующих линий НСК на 5, 10, 15, 20, 25 пассажах, и на 30 пассаже (только для N-KYOU), определенные методом количественной ОТ-ПЦР.

По оси Y показан уровень экспрессии, рассчитанный методом $-\Delta\Delta C_t$, нормализованный к экспрессии генов домашнего хозяйства (*EMC7* и *PSMB4*). Каждая точка представляет собой биологическую реплику, собранную отдельно в разные временные точки. Столбики ошибок указывают на стандартное отклонение технических реплик. Звездочки указывают на статистическую значимость различий между указанными группами образцов, рассчитанную с помощью теста Уэлча (* – p-value <0,05; ** – p-value <0,01; *** – p-value <0,001).

4.1.6. Результаты анализа секвенирования тотальной РНК нейтральных культур KYOU и AFS17 при длительном культивировании НСК

Мы собрали образцы тотальной РНК из нейтральных культур, полученных в результате спонтанной 14-дневной дифференцировки НСК-KYOU и НСК-AFS17 на разных пассажах: 15 образцов с 5-го по 30-й для НСК-KYOU и 8 образцов с 5-го по 20-й для НСК-AFS17 (с шагом в 5 пассажей).

Анализ транскриптомных данных методом главных компонент (РСА) показал, что длительность культивирования НСК (количество пассажей) вносит основной вклад в различия дифференцированных из этих НСК нейтральных культур (Рис. 15 А, Б). И это справедливо для обеих линий: и KYOU, и AFS17. При этом нейтральные культуры разных линий отличаются: на графике РСА видно, что N-AFS17 разных пассажей группируются отдельно от таковых N-KYOU по оси первого главного компонента (оси X) (Рис. 15 А). Вероятно, что основным источником вариаций в экспрессии генов является разница в исходных линиях ИПСК, из которых были получены НСК. Тем не менее разные пассажи для обеих линий хорошо группируются вдоль оси второго главного компонента (ось Y) (Рис. 15 А), что может означать наличие общих тенденций в изменении культур при увеличении продолжительности культивирования НСК.

Мы также обнаружили, что транскрипция многих специфических генов, используемых в качестве маркеров для различных клеточных популяций, зависит от количества пассажей (Рис. 15 В). Например, как правило, экспрессия генов, связанных со зрелыми нейронами, их конкретными типами и зрелыми глиальными подтипами, такими как астроциты и олигодендроциты, имела тенденцию к снижению с увеличением количества пассажей НСК. В то же время мы наблюдали увеличение экспрессии генов, характерных для нейроэпителиальных и не-нейрональных типов клеток.

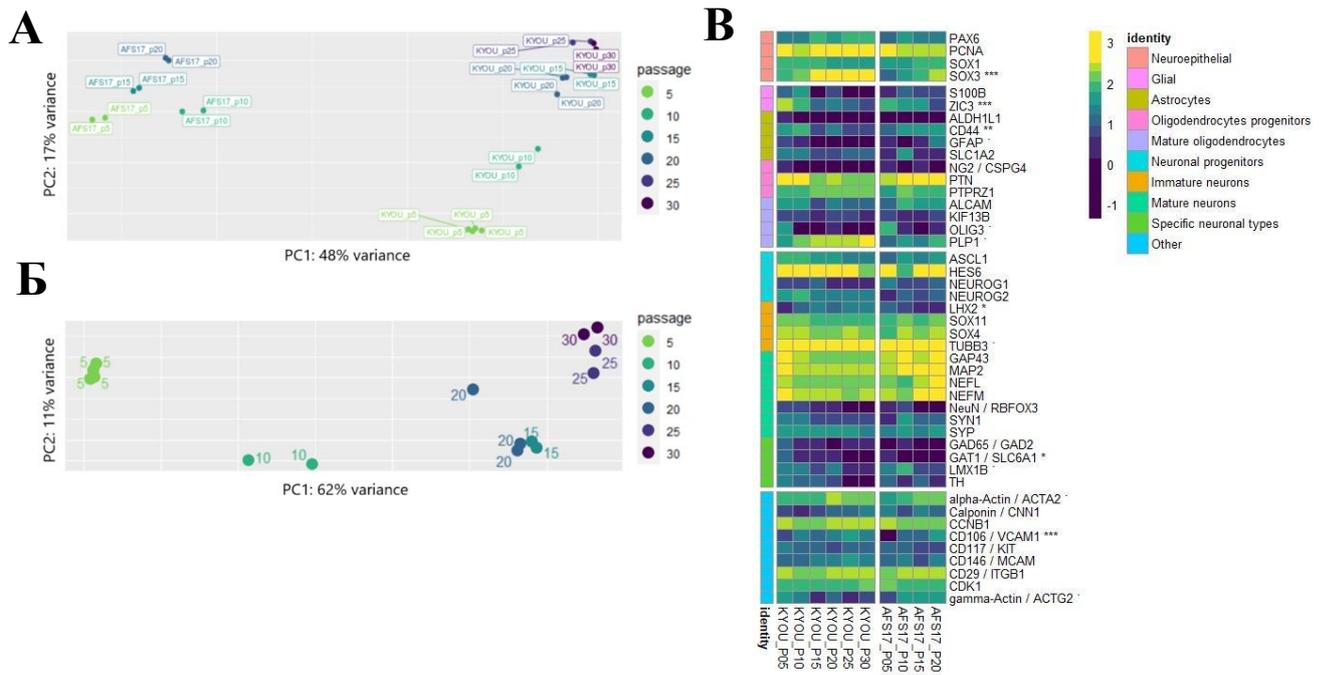


Рисунок 15. Результаты анализа данных секвенирования тотальной РНК нейральных культур.

А – Анализ главных компонент, примененный к стабилизированным по дисперсии преобразованным данным экспрессии для культур N-KYOU и N-ASF17. Оси X (PC1) и Y (PC2) – главные компоненты 1 и 2 соответственно, объясняющие 48 и 17 % дисперсии (variance).

Б – Анализ главных компонент, примененный к стабилизированным по дисперсии преобразованным данным экспрессии для культур N-KYOU. Оси X (PC1) и Y (PC2) – главные компоненты 1 и 2 соответственно, объясняющие 62 и 11% дисперсии (variance).

В – Тепловая карта изменения экспрессии некоторых клеточных маркеров в зависимости от пассажа НСК для культур N-KYOU и N-ASF17. Показаны только те гены, которые достигли условной статистической значимости в анализе дифференциальной экспрессии (* – $p < 0,001$; ** – $p < 1e-04$; *** – $p < 1e-05$). Цветом обозначено количество транскриптов на миллион (TPM) от самого высокого (желтый) до самого низкого (синий) для каждого гена на всех пассажах. Цветная полоса слева указывает на функциональную аннотацию для конкретного маркера. Группа «Специфические типы нейронов» включает маркеры полностью дифференцированных нейронов: GAD65 и SLC6A1 для ГАМКергических, LMX1B и TH для дофаминергических. Группа «Другие» включает маркеры пролиферирующих, стромальных, эндотелиальных или сосудистых клеток.

Интересно, что многие из общих для обеих нейральных культур дифференциально экспрессированных генов, которые имели тенденцию к

снижению с увеличением длительности культивирования НСК, в анализе генных онтологий (GO) были обогащены сигнальными путями WNT и BMP.

4.1.7. Результаты анализа секвенирования РНК единичных клеток нейральных культур KYOU при длительном культивировании НСК

Чтобы доказать, что длительное культивирование НСК приводит не просто к изменению общего транскриптомного профиля в дифференцированных из них нейральных культурах, а к изменению состава самих клеточных популяций, а также чтобы подтвердить гетерогенность нейральных культур, полученных из ИПСК с помощью метода с DUAL SMADi, мы провели анализ секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq) для 14-дневных нейральных культур, полученных из НСК-KYOU на 5-м и 25-м пассажах. Для создания библиотек кДНК единичных клеток мы использовали клетки из двух образцов: N-KYOU p5 и N-KYOU p25, используя два независимых биологических повтора для каждого образца. После фильтрации качества в анализ данных были включены 8105 клеток из N-KYOU p5 и 6341 клетка из N-KYOU p25.

Первичный анализ показал, что обе клеточные культуры были гетерогенными. Согласно автоматизированному аннотатору SingleR, было идентифицировано 22 отдельных кластера (популяции клеток) с характерными генами. Большинство из них мы определили как нейральные прогениторные/стволовые клетки (НСК), остальные кластеры были определены как астроциты, предшественники астроцитов (АПК), зрелые нейроны, нейроны и предшественники нейронов (Рис. 16 А). При сравнении распределения кластеров между нейральными культурами двух пассажей мы наблюдали резкое снижение представленности кластеров 0 и 2 в N-KYOU p25 по сравнению с N-KYOU p5 (Рис. 16 А, черные стрелки). Мы идентифицировали эти кластеры как астроциты и АПК, поскольку клетки из этих кластеров экспрессируют глиальные маркеры. Наиболее характерными маркерами для кластера 0 были *SCL6A1* (ген ГАМК-транспортера GAT1 и маркер тормозных нейронов, астроцитов и олигодендроцитов), а также *SPARCL1* (ген внеклеточного матричного Ca²⁺-связывающего белка, экспрессируемого астроцитами) (Minelli et

al., 1995; Kucukdereli et al., 2011). Маркерами кластера 2 были гены *S100B* (ген кальций-связывающего белка S100B, маркер олигодендроцитов и астроцитов), *CLU* (ген кластерина, маркер глии Мюллера и, в меньшей степени, астроцитов) и ген транскрипционного фактора *ZIC3*. Кроме того, кластер 2 характеризовался выраженной экспрессией гена рецептора гиалуроновой кислоты *CD44* и гена плейотрофина (*PTN*), которые также являются неявными маркерами астроцитов (Приложение, Рис. 30) (Yeh et al., 1998; Liu et al., 2004; Cai et al., 2012; Dzwonek et al., 2015; Linnerbauer et al., 2022). Интересно, что соседний малый глиальный кластер 20, который является единственным *TAGLN*⁺ кластером (ген трансгелина, маркера гладкомышечных клеток), оставался почти неизменным с пассажами, но становился более активно пролиферирующим по мере увеличения доли клеток в фазах S и G₂ в N-KYOU p25. Аналогичная ситуация отражена в экспрессии многих генов, характерных для этого кластера.

Представленность кластеров, которые мы определили как нейроны на разных стадиях созревания (кластеры 5, 16, 1, 17, 14), была несколько увеличена в N-KYOU p25 по сравнению с N-KYOU p5. Также было отмечено значительное увеличение представленности кластеров 6 и 8 в N-KYOU p25 по сравнению с p5.

Анализ маркеров клеточного цикла в кластерах показал, что популяции клеток были четко разделены по фазам клеточного цикла (Приложение, Рис. 31). В N-KYOU p5 мы обнаружили 13 кластеров, в которых более 80% клеток находились в ранней фазе G₁. В N-KYOU p25 число таких кластеров сократилось до 11. Поскольку фаза G₁ является стартовой для фазы G₀, стадии покоя, мы рассматривали клетки, находящиеся в G₁, как терминально дифференцирующиеся. Соответственно, клетки, определяемые в фазах G₂/M и S, мы рассматривали как активно делящиеся прогениторные и/или стволовые клетки. Это позволило нам определить группу клеточных кластеров, расположенных в нижней части UMAP (кластеры 10, 12, 13, 15, 18, 19), как циклирующие нейральные стволовые или прогениторные клетки (цНСК).

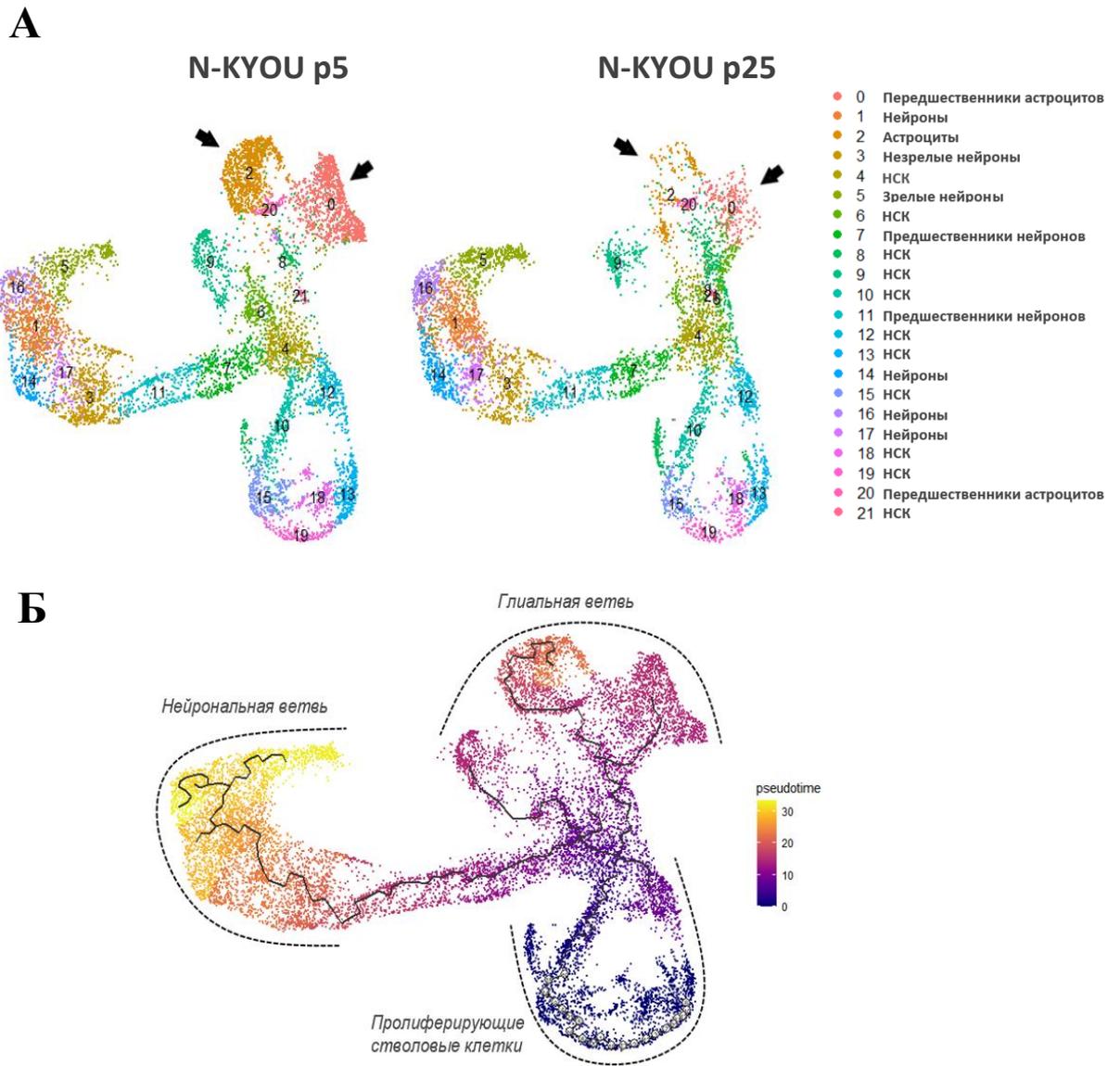


Рисунок 16. Результаты анализа данных scRNA-seq из нейральных культур N-KYOU p5 и p25. А – 22 кластера, выявленные в результате сокращения размерности алгоритма UMAP для данных scRNA-seq в N-KYOU p5 и p25. Черные стрелки указывают на два кластера, которые наиболее существенно отличаются в N-KYOU p25 по сравнению с p5.

Б – Направления (ветви) дифференцировки НСК, распространяющиеся от области пролиферативно активных НСК к глиальной или нейрональной ветвям, выявленные анализом траекторий Monocle.

Согласно анализу траектории Monocle, в полученных нами нейральных культурах существует несколько направлений дифференцировки стволовых клеток, точка бифуркации которых находится в кластере 4, который находится на пересечении кластеров пролиферирующих цНСК (нижняя ветвь) далее делится на

две глобальные группы кластеров, «левую» группу (3, 17, 14, 1, 16, 5) и «верхнюю» группу (9, 20, 0, 2) (Рис. 16 Б). «Левая» группа кластеров характеризуется экспрессией нейрон-специфических генов: *STMN2*, *DCX*, *GAP43*, *TUBB3*, *SYP*, *BASP1*, *RTN1*, *NCAM1*, *SOX3*, *SOX11*, что подтверждает нашу гипотезу о том, что эта ветвь дифференцировки ведет к зрелым нейронам (кластер 5) (Приложение, Рис. 32 А). Кластеры 7 и 11, которые находятся на пути к «левым» кластерам, также содержат маркеры нейрональных предшественников (*ASCL1*, *SOX3*, *PAX6*, *NEST*, *POU3F2*, *SOX1*, *NEUROG2*) наряду с маркерами нейронов и поэтому идентифицируются как ранние предшественники нейронов (Приложение рис. 32 Б). По экспрессии генов, специфичных для астроглии и ее предшественников (*S100B*, *CD44*, *ITGA6*, *CLU*), мы определили «верхнюю» группу кластеров как глиальную ветвь дифференцировки (Приложение, Рис. 33).

Интересно, что дифференциально экспрессированные гены, связанные с сигнальными путями WNT и BMP, которые были обнаружены при анализе транскриптомов N-KYOU и N-AFS17 на ранних и поздних пассажах НСК, согласно нашим данным scRNA-seq N-KYOU имеют специфическую для типа клеток локализацию на пространстве UMAP. Как и ожидалось, гены, экспрессия которых снизилась с увеличением пассажа, локализованы в глиальных кластерах 0 (*GDF7*, *RSPO3*, *TPBG*, *WNT1*) и 2 (*BMP5*, *MSX2*, *RNF43*), а также в кластерах цНСК (*MSX2*, *RNF43*, *RSPO3*, *TPBG*). Единственный ген, экспрессия которого повысилась, *SHISA3*, также локализован в кластере цНСК (Приложение, Рис. 34).

Как следует из нашего анализа псевдовремени (Рис. 16 Б), клетки из кластера 20 являются предшественниками клеток кластера 2, поэтому изменения генетических программ в этом кластере, вероятно, ответственны за наблюдаемое истощение кластера 2 в N-KYOU p25. Аналогичная картина наблюдалась и для кластера 8, который находится выше по течению кластеров 0 и 20. При увеличении пассажей с 5 до 25 его представленность увеличилась в 3 раза (с 2,5% до 7,5%), причем большинство клеток кластера 8 находились в фазах G₂M и S. Это указывает на то, что он состоит, по-видимому, из постоянно делящейся популяции НСК,

которая совершает дифференцировку в глиальном направлении, но теряет способность к полной дифференцировке по мере прохождения 25 пассажей (более 130 дней культивирования и более 70 усредненных циклов пролиферации).

Полученные результаты позволяют нам утверждать, что нейральные культуры, спонтанно дифференцированные из НСК, представляют собой гетерогенные культуры, состоящие из различных клеточных популяций, соотношение которых изменяется с увеличением длительности культивирования НСК.

4.2. Дифференцировка ИПСК в нейроны с индукцией экзогенной гиперэкспрессии NGN2 на основе известного протокола с лентивирусной доставкой и селекцией

Для исследования подходов дифференцировки ИПСК в нейроны с помощью индукции в них гиперэкспрессии экзогенного пронейрального транскрипционного фактора *NGN2* нами был выбран наиболее известный протокол с лентивирусной доставкой трансгенов и системы трансактивации TetON под доксициклин-активируемым промотором. Данный метод дифференцировки происходит в три основных этапа:

- 1) Создание трансгенной линии ИПСК, имеющей трансген *NGN2* под доксициклин-активируемым промотором и стабильно экспрессирующей ген трансактиватора *rtTA*, ее селекция и клонирование. Этап занимает от 14 дней.
- 2) Инициация нейральной дифференцировки индукцией экзогенной гиперэкспрессии *NGN2* в ИПСК путем добавления в культуральную среду доксициклина. Этап занимает 4-5 дней.
- 3) Созревание *NGN2*-индуцированных нейральных культур (iN-*NGN2*) на среде N2B27 с добавлением 5 мкМ ROCKi и 10 нг/мл BDNF. Этап занимает от 5-7 дней и более.

4.2.1. Общий дизайн эксперимента

На первом этапе мы вывели линию ИПСК-KYOU с трансгенами *NGN2* и системы трансактивации TetON (ИПСК-KYOU-TetON-*NGN2*).

На втором этапе мы оптимизировали оригинальный протокол дифференцировки Zhang et al., 2013 добавлением дополнительного шага – пересадки дифференцирующихся клеток на новый субстрат с увеличением плотности культуры.

Из дифференцированных в течение 14 дней нейральных культур на среде N2B27 затем была выделена общая РНК для транскриптомного анализа (bulk RNA-seq).

Для проверки специфической кальциевой активности на основе уже ранее полученной линии ИПСК-KYOU-GCaMP6s, экспрессирующей флуоресцентный кальциевый индикатор GCaMP6s, на третьем этапе мы вывели трансгенную линию ИПСК-KYOU-GCaMP6s-TetON-NGN2. Полученная линия была дифференцирована в iN-GCaMP6s-NGN2 по подобранному ранее протоколу. Нейральные культуры затем были исследованы на экспрессию различных маркеров методами количественной ОТ-ПЦР и иммуноцитохимии, а также на наличие кальциевой активности с помощью кальциевого имиджинга.

4.2.2. Получение трансгенных линий ИПСК-KYOU-TetON-NGN2 и оптимизация протокола нейральной дифференцировки

Ранее нами была выведена трансгенная линия ИПСК-KYOU, стабильно экспрессирующая флуоресцентный кальциевый индикатор GCaMP6s (ИПСК-KYOU-GCaMP6s).

Линии ИПСК-KYOU и ИПСК-KYOU-GCaMP6s были трансдуцированы с помощью лентивирусной доставки пронеурального гена *NGN2* под доксициклин-активируемым промотором TetON и гена трансактиватора rtTA. Полученные новые линии ИПСК-KYOU-TetON-NGN2 и ИПСК-KYOU-GCaMP6s-TetON-NGN2 (для простоты далее в названиях будет опускаться слово TetON) были клонированы методом предельного разведения с последующим отбором клонов, которые эффективно дифференцировались в ответ на добавление доксициклина. Кроме того, для дополнительного отбора и во избежание случайного замалчивания трансгенов линии поддерживались на селективных антибиотиках (пурамицин (1 мкг/мл) и гигромицин Б (50 мкг/мл)).

Добавление доксициклина приводило к немедленному началу дифференцировки ИПСК (Рис. 17). Уже на 2-й день инкубации клеток с доксициклином мы могли наблюдать процесс трансформации ИПСК в отростчатые

нейроноподобные клетки. Добавление AraC (Арабино-фуранозил-цитозин-трифосфат, ингибирует синтез ДНК) на 2-й и 3-й дни дифференцировки позволяло нам эффективно избавиться от оставшихся пролиферирующих ИПСК (Рис. 17 А, Б, В).

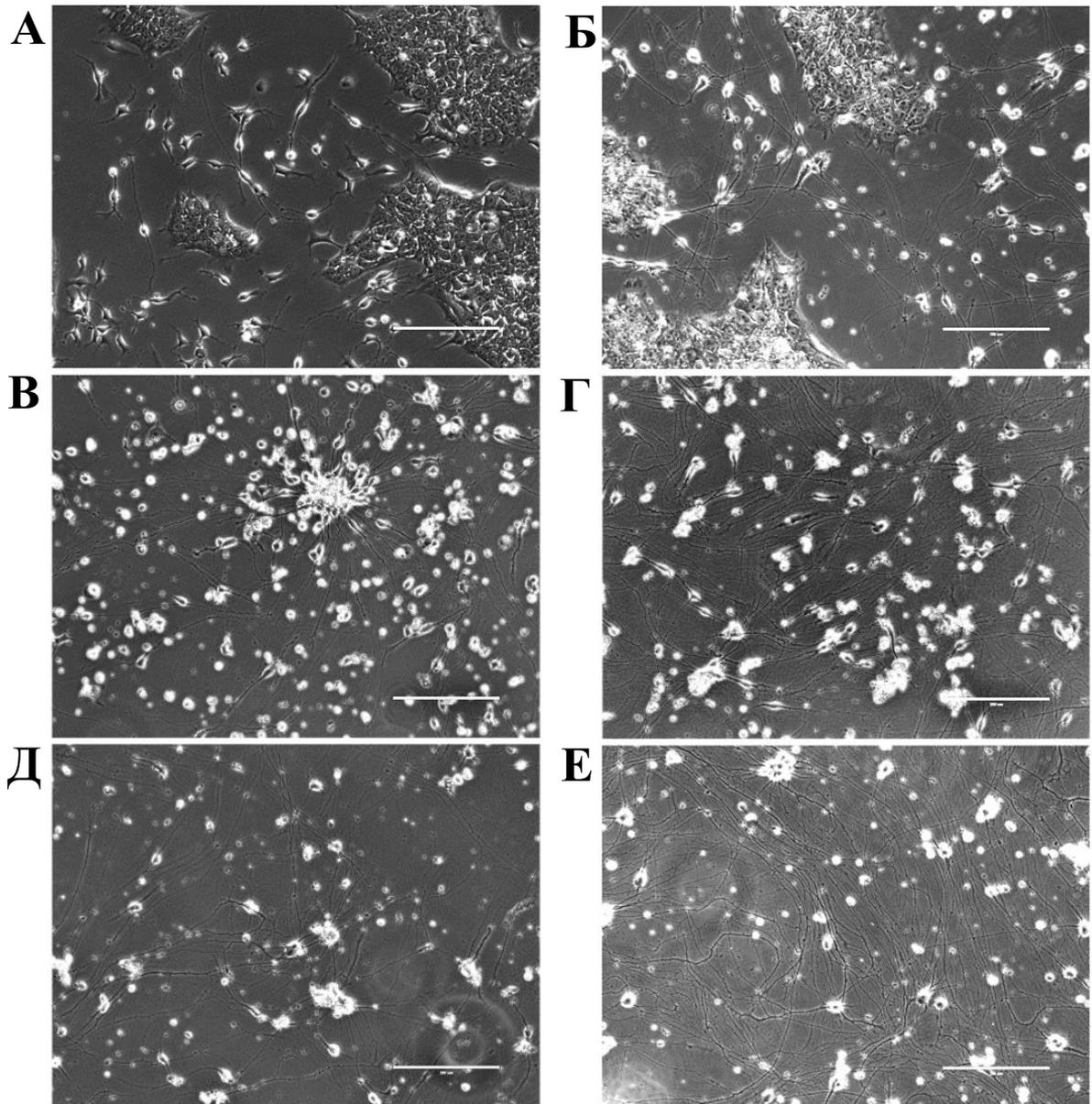


Рисунок 17. Прогресс дифференцировки ИПСК в нейроны под влиянием доксициклин-зависимой экспрессии *NGN2*: (А) – 2 дд; (Б) – 3 дд; (В) - 5 дд; (Г) – 8 дд; (Д) – 14 дд; (Е) – 21 дд. дд – день дифференцировки. Фазовый контраст, шкала 200 мкм.

Поскольку дифференцирующиеся из ИПСК нейральные культуры оказывались довольно разреженными из-за гибели части клеток, мы пришли к необходимости пересадки и концентрирования дифференцирующихся культур.

Оптимальным периодом для пересадки оказался 4-й день дифференцировки. Пересадка клеток с сокращением площади культурального сосуда в 2-3 раза обеспечивала достаточную плотность нейральных культур для их долгосрочного выживания.

Кроме того, отростки нейронов плохо адгезируются на матрикеле и легко отделяются от субстрата при смене культуральной среды, поэтому было необходимо подобрать субстрат, который бы обеспечивал более плотную адгезию клеток. В качестве субстратов для пересадки дифференцирующихся культур, мы протестировали растворы поли-L-лизина и поли-D-лизина как в чистом виде, так и в комбинации с матрикелем. Последовательное покрытие новых культуральных сосудов сперва раствором поли-D-лизина, а затем раствором матригеля оказалось наиболее оптимальным. На таком двойном субстрате нейроны имели лучшую адгезию, в отличие от субстрата из одного только матригеля (Рис. 18). Если на матрикеле отростки между группами клеток оставались натянутыми (плохо адгезировались), то на двойном субстрате из поли-D-лизина и матригеля, отростки плотно к нему прилегали. В таких условиях нейроны оставались жизнеспособными в течение 2 месяцев без каких-либо явных изменений в морфологии.

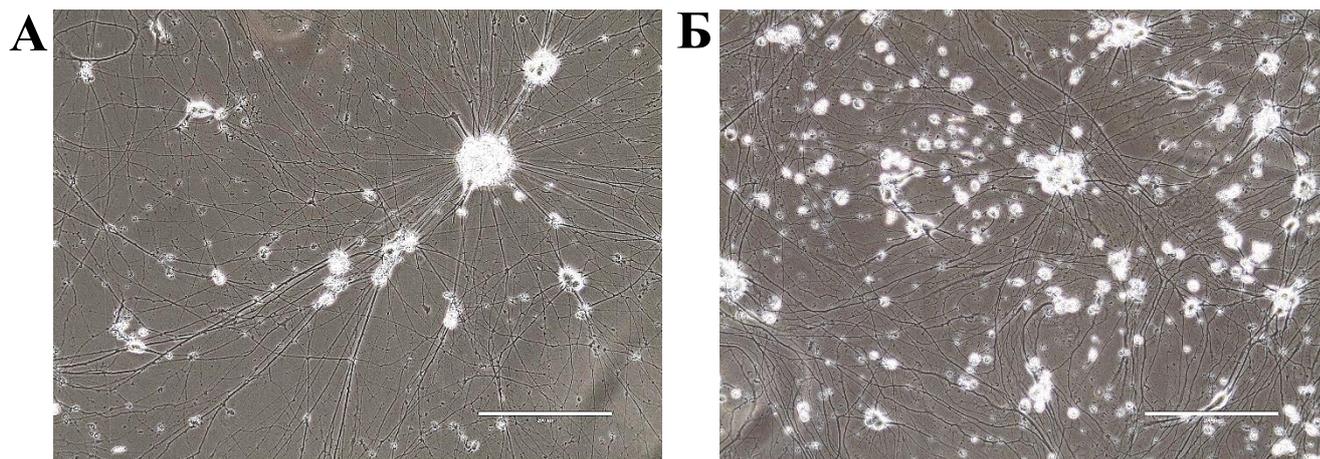


Рисунок 18. Сравнение морфологии iN-NGN2 на 21й день дифференцировки на разных субстратах. Фазовый контраст, шкала 200 мкм. А – матрикель; Б – поли-D-лизин + матрикель.

В полученных с помощью оптимизированного нами протокола нейральных культурах iN-NGN2 мы наблюдали биполярную и мультиполярную морфологию нейронов с ветвящимися дендритами и очень длинными аксонами. Все нейриты

плотно адгезировались к субстрату и образовывали своеобразные узоры. Сомы некоторых нейронов были увеличены и/или сгруппированы (Рис. 17 Е, Рис. 18 Б).

4.2.3. Анализ *NGN2*-индуцированных нейральных культур методом иммуноцитохимического окрашивания и количественной ПЦР

Анализ экспрессии генов методом количественной ОТ-ПЦР показал значительное повышение уровней экспрессии нейрональных маркеров (*TUBB3*, *TH*, *MAP2*, *MAPT* и *NSE*), а также маркеров нейрональных предшественников (*DCX*, *ASCL1*, *BRN2* и *NEUROD1*) в полученных нейральных культурах по сравнению с исходной культурой ИПСК (Рис. 19). При этом наблюдалось достоверное падение маркеров плюрипотентности *SOX2* и *OCT4*.

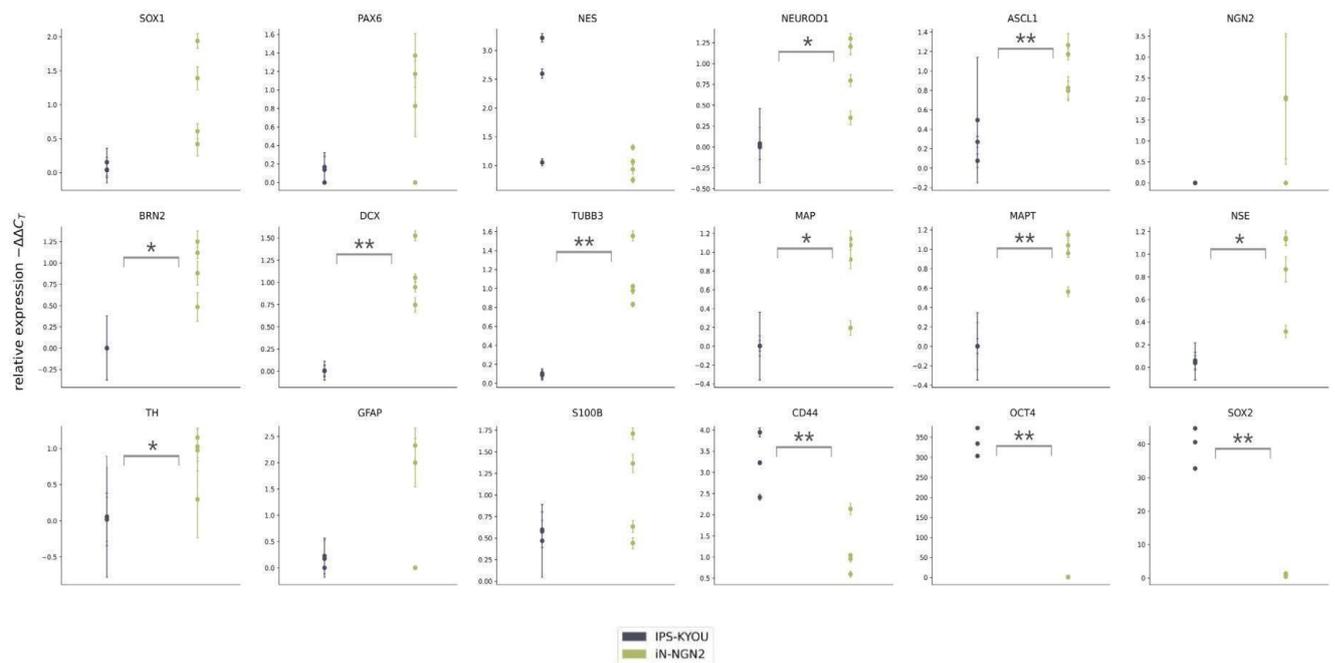


Рисунок 19. Уровни относительной экспрессии маркерных генов, определенные методом количественной ОТ-ПЦР в 17-дневных нейральных культурах iN-NGN2. По оси Y показан уровень экспрессии, рассчитанный методом $-\Delta\Delta C_t$, нормализованный к экспрессии генов домашнего хозяйства (*EMC7* и *PSMB4*). Каждая точка представляет собой биологическую реплику. Столбики ошибок указывают на стандартное отклонение технических реплик. Звездочки указывают на статистическую значимость различий, рассчитанную с помощью теста Уэлча (* – p-value < 0,05, ** – p-value < 0,01).

На 21-й день дифференцировки полученные культуры положительно окрашивались на маркеры нейронов β III-тубулин, синаптофизин (SYP), синапсин (SYN) (не показан), NeuN, hNCAM и NSE, а также на маркер клеток-предшественников нейронов – Nestin (Рис. 20). Глиальный маркер GFAP не был обнаружен. На изображениях, полученных при окрашивании антителом против синаптофизина, четко визуализировались обильно ветвящиеся дендриты, которые не были видны при использовании фазово-контрастной микроскопии (Рис. 20 Б). А изображение, полученное на малом увеличении при окрашивании антителом против β III-тубулина, демонстрирует узоры, образованные отростками нейронов (Рис. 20 В).

Таким образом мы можем утверждать, что используемый нами протокол NGN2-индуцированной дифференцировки ИПСК позволяет получить относительно гомогенную культуру нейронов человека, не содержащую глиальные клетки.

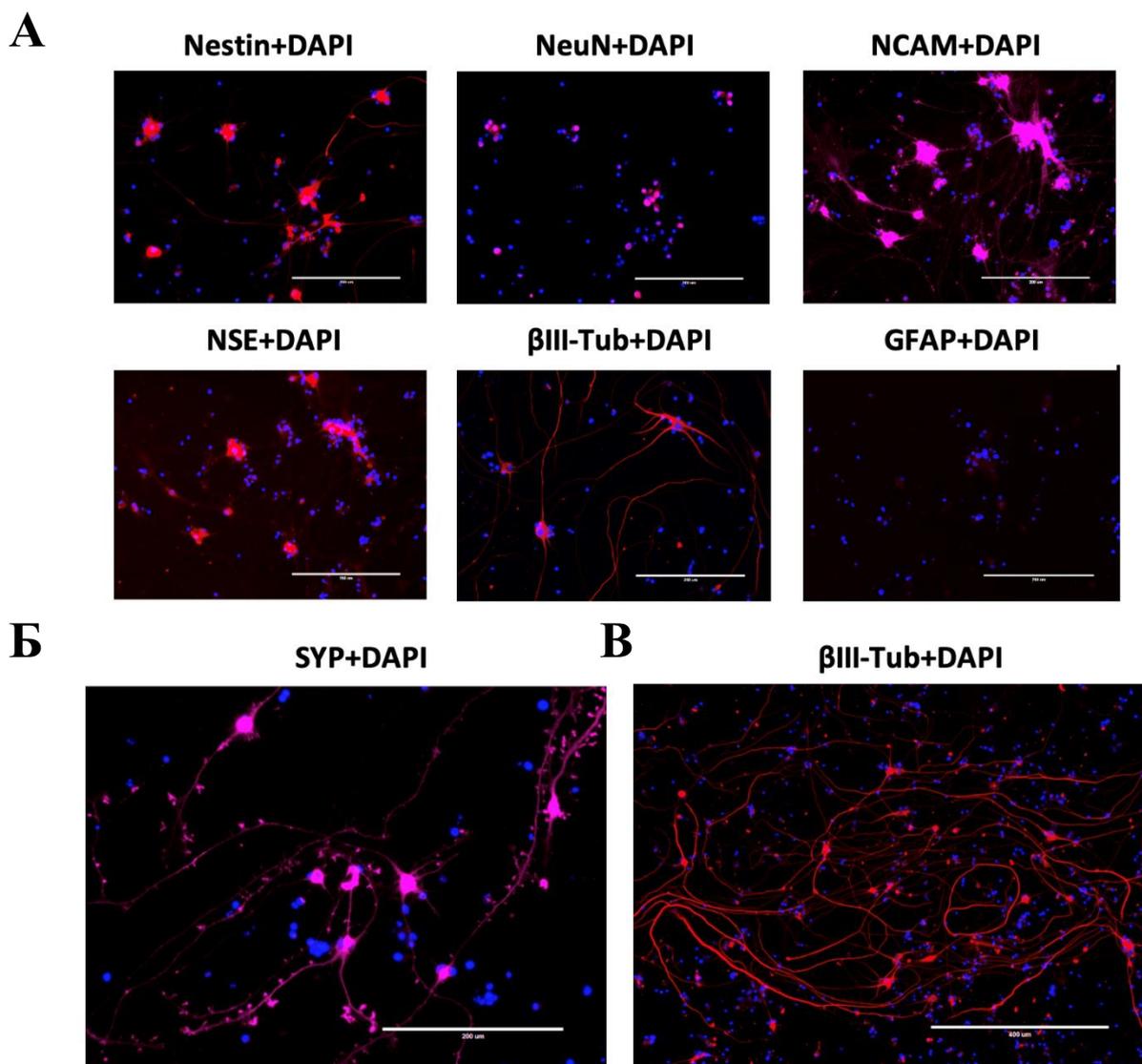


Рисунок 20. Результаты иммуноцитохимического окрашивания iN-NGN2 на 21-й день дифференцировки. Флуоресцентная микроскопия, ядра докрашены DAPI (синий). А, Б – шкала 200 мкм, В – шкала 400 мкм.

4.2.4. Кальциевая активность NGN2-индуцированных нейральных культур

Для подтверждения наличия функциональных нейронов в NGN2-индуцированных нейральных культурах, полученных оптимизированным протоколом, мы провели эксперимент по исследованию нейрофизиологической кальциевой активности на культуре iN-GCaMP6s-NGN2, экспрессирующей генетически кодируемый кальциевый индикатор GCaMP6s (Chen et al., 2013).

Добавление глутамата (Glu) в концентрации 100 мкМ (в присутствии глицина и отсутствии Mg^{2+}) приводило к увеличению концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$)

в клетках культуры iN-GCaMP6s-NGN2 на 23-й день дифференцировки (Рис. 21). Присутствие ионотропных глутаматных рецепторов было подтверждено снижением $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на Glu в присутствии ингибиторов глутаматных рецепторов: CNQX (ингибитора AMPA- и каинатных рецепторов) и МК-801 (ингибитора NMDA-рецепторов) (Attwell et al., 1999; Madsen et al., 2001). $[Ca^{2+}]_i$ определяли по интенсивности флуоресцентных сигналов кальциевого индикатора GCaMP6s, которые были нормированы относительно исходного значения флуоресценции в покоящихся клетках (F/F_0). Поскольку профили ответов $[Ca^{2+}]_i$ на Glu различались между клетками (Рис. 21 А, В), для количественного сопоставления кальциевых ответов клеток на действие одного Glu и Glu в присутствии ингибиторов МК-801 и CNQX использовали площади под кривыми изменений $[Ca^{2+}]_i$ (Рис. 21 Б, Г) (Area Under Curves, AUC, отн. ед.). Для калибровки максимального сигнала GCaMP6s в конце каждого эксперимента добавляли кальциевый ионофор иономицин (2 мкМ в присутствии 5 мМ $CaCl_2$).

Измерение сигналов GCaMP6s (Рис. 21 А, Б) показало, что Glu-индуцированный подъем $[Ca^{2+}]_i$ в присутствии CNQX (9 мкМ) оказался ниже на $8,7 \pm 7,0\%$ ($n=27$, $p=0,0015$, парный t-тест) по сравнению с подъемом $[Ca^{2+}]_i$ при добавлении только Glu. Эти данные указывают на наличие AMPA и/или каинатных рецепторов в исследуемой культуре.

Далее мы проверили наличие в клетках метаботропных глутаматных рецепторов, связанных с высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных компартментов (mGluRs типа 1). Для этого мы добавляли Glu к клеткам в номинально бескальциевом буфере, в котором концентрация Ca^{2+} была снижена добавлением хелатора EGTA (100 мкМ), а наличие Mg^{2+} блокировало работу NMDA-рецепторов. В таких условиях Glu не индуцировал повышение $[Ca^{2+}]_i$ в клетках. Последующая замена буфера на Ca^{2+} -содержащий (без Mg^{2+}) и добавление Glu привели к отчетливому увеличению $[Ca^{2+}]_i$ (Рис. 21 В). Это говорит о том, что увеличение $[Ca^{2+}]_i$ не связано с его высвобождением из внутриклеточных депо, а реализуется только за счет притока ионов Ca^{2+} из буфера (извне клетки).

Добавление ингибитора NMDA-рецепторов МК-801 (9 мкМ) вызывало ингибирование Glu-индуцированного увеличения $[Ca^{2+}]_i$ ($49,1 \pm 4,6\%$, $n=21$, $p < 0,0001$, парный t-тест) (Рис. 21 В, Г). Из этого следует, что нейроны в наших культурах имеют функциональные ионотропные рецепторы к глутамату NMDA-типа. Почти двукратное снижение сигналов от GCaMP6s согласуется с тем, что NMDA рецепторы обеспечивают основной приток Ca^{2+} во время действия Glu в культивируемых нейронах ЦНС (Brittain et al., 2012).

Для дальнейшей проверки того, что клетки экспрессируют функционально активные глутаматные рецепторы, способные пропускать внутрь клетки не только Ca^{2+} , но и Na^+ , мы провели одновременные измерения $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ путем регистрации флуоресцентных сигналов от GCaMP6s и синтетического Na^+ индикатора SBFI. Добавление Glu приводило к быстрому увеличению как $[Ca^{2+}]_i$ (флуоресценции GCaMP6s), так и $[Na^+]_i$ (флуоресценции SBFI) (Рис. 22 А, Б). Затем наблюдалось снижение $[Ca^{2+}]_i$ до уровня, определяемого балансом между притоком Ca^{2+} и его удалением из клетки, а также его поглощением эндоплазматическим ретикуломом (Verkhratsky, 2004) и митохондриями (Szabadkai, Duchen, 2008) (Рис. 22 А). Концентрация Na^+ , напротив, продолжала расти, хотя и с меньшей скоростью, до тех пор, пока Glu не был удален из буфера (Рис. 22 Б). Удаление Glu быстро восстанавливало $[Ca^{2+}]_i$ до базального уровня, тогда как $[Na^+]_i$ снижался заметно медленнее (Рис. 22 А, Б). Подобные различия в динамике постглутаматных изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ наблюдались в первичных культурах нейронов, выделенных из мозга крысы (Sharipov et al., 2018). Вероятно, они обусловлены гораздо большим потреблением АТФ Na^+/K^+ -АТФазой по сравнению с Ca^{2+} -АТФазами плазматической мембраны и эндоплазматического ретикула на фоне значительного снижения внутриклеточного АТФ (Surin et al., 2014; Sharipov et al., 2018).

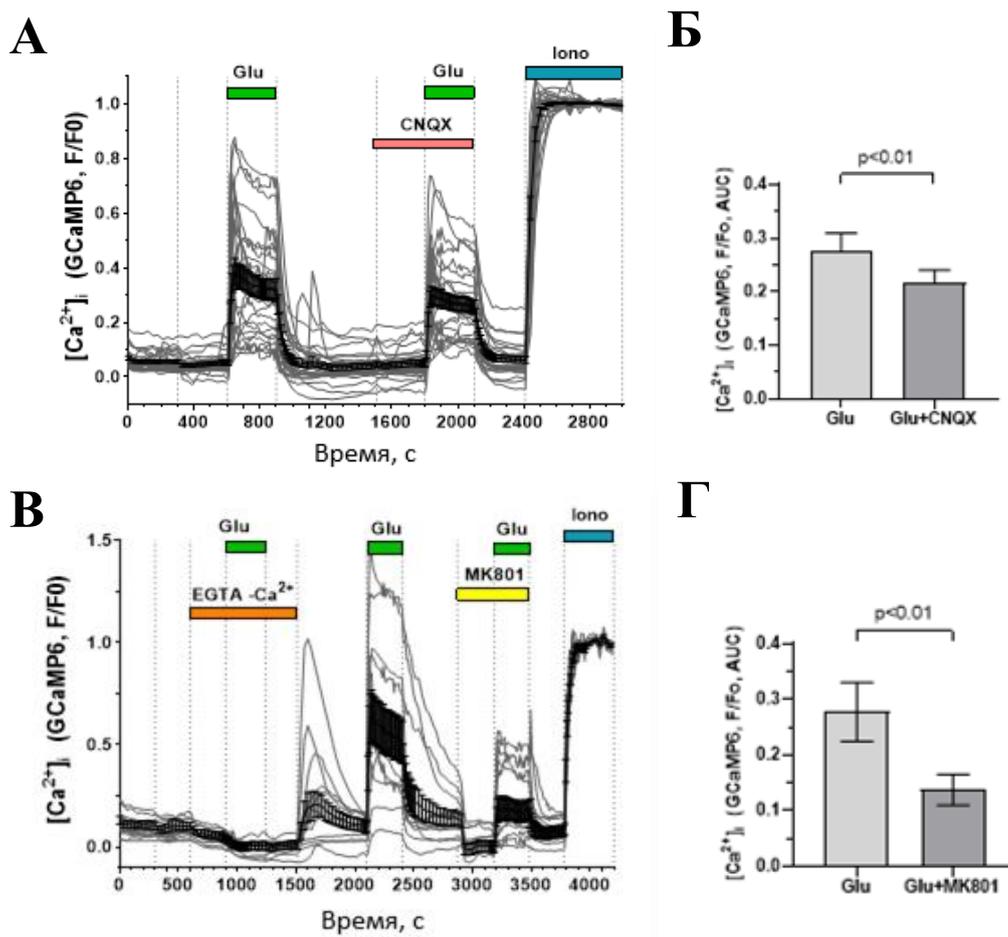


Рисунок 21. Результаты кальциевого имиджинга в нейральных культурах iN-GCaMP6s-NGN2. Glu – глутамат (100 мкМ), CNQX – ингибитор AMPA и/или каинатных рецепторов (9 мкМ), MK801 – ингибитор NMDA-рецепторов (9 мкМ), Iono – иономицин (2 мкМ), EGTA- Ca²⁺ – буфер без кальция с хелатором, p – p-value – результат парного t-теста.

А, В – графики зависимости интенсивности флуоресцентного сигнала GCaMP6s, нормализованного на флуоресценцию клетки в покое (F/F₀), от времени. Изменение флуоресцентного сигнала клетки отражает изменения [Ca²⁺]_i в ней. Каждая кривая представляет собой одну клетку, изменяющую интенсивность флуоресценции в течение времени. Б, Г – количественная оценка изменения кальциевого ответа, рассчитанная на основе площади под кривыми изменений флуоресцентного сигнала ([Ca²⁺]_i) (AUC, отн. ед.) графиков А и В.

Добавление Glu в присутствии коктейля ингибиторов ионотропных глутаматных рецепторов МК-801 и CNQX вызывало снижение как [Ca²⁺]_i на 74,2±3,7% (Рис. 22 А, В), так и [Na⁺]_i на 33,9±0,7% (n=47, p<0,0001, парный t-тест) (Рис. 22 Б, Г). Подобное различие в эффекте ингибиторов ионотропных глутаматных рецепторов на подъем [Ca²⁺]_i и [Na⁺]_i наблюдалось и в

культивируемых нейронах гиппокампа крысы при активации NMDA-рецепторов (Brittain et al., 2012).

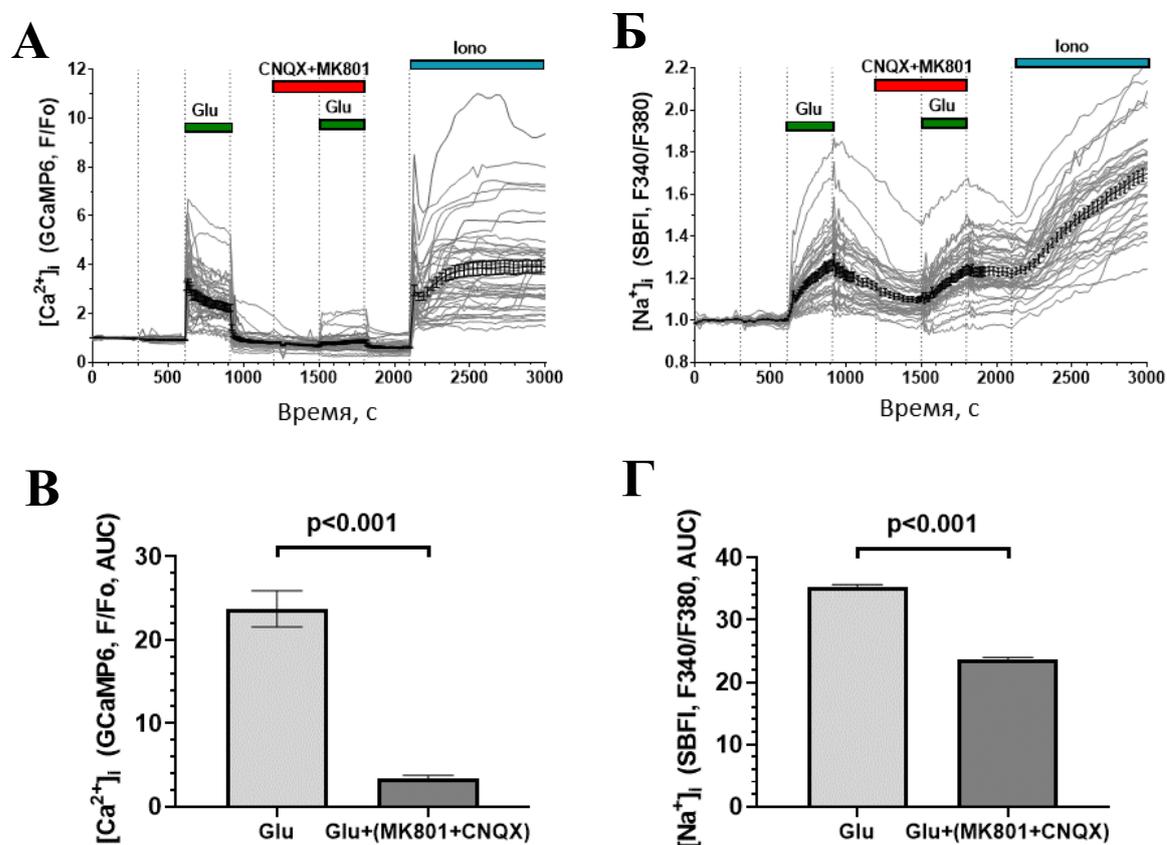


Рисунок 22. Результаты одновременного измерения $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ в нейральных культурах iN-GCaMP6s-NGN2. Glu – глутамат (100 μ M), CNQX – ингибитор AMPA и/или каинатных рецепторов (9 мкM), MK801 – ингибитор NMDA-рецепторов (9 мкM), Iono – иономицин (2 мкM), SFBI – флуоресцентный натриевый индикатор, p – p-value – результат парного t-теста. А – графики зависимости интенсивности флуоресцентного сигнала GCaMP6s, нормализованного на флуоресценцию клетки в покое (F/F₀), от времени. Изменение флуоресцентного сигнала GCaMP6s отражает изменения $[Ca^{2+}]_i$. Б – графики зависимости интенсивности флуоресцентного сигнала SBFI от времени. Изменение флуоресцентного сигнала SBFI отражает изменения $[Na^+]_i$. Изменения $[Na^+]_i$ представлены как отношение сигналов SBFI при возбуждении флуоресценции на 340 и 380 нм (F340/F380). В, Г – количественные оценки изменений кальциевого (В) и натриевого (Г) ответов, рассчитанные на основе площади под кривыми изменений флуоресцентных сигналов (AUC, отн. ед.) GCaMP6s и SBFI с графиков А и Б соответственно.

Чтобы подтвердить наличие в исследуемой культуре потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов (Lacínova, 2005), мы вызывали деполяризацию мембран клеток путем снижения трансмембранного градиента концентрации ионов калия. При добавлении в буфер 50 мМ KCl мы наблюдали быстрый кратковременный подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках ($n=83$) (Рис. 23).

Добавление АТФ (100 мкМ) – агониста P2Y- и P2X- рецепторов, привело к повышению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ только в ~20% клеток (Рис. 23). Это говорит о том, что только часть клеток в полученной нами нейральной культуре имеет функциональные пуринергические рецепторы P2-типа.

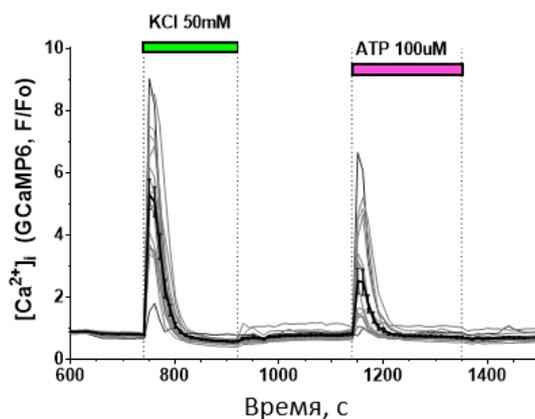


Рисунок 23. Результаты кальциевого имиджинга в нейральных культурах iN-GCaMP6s-NGN2 при добавлении 50мМ KCl и 100 мкМ АТФ (АТР).

Графики представляют собой зависимости интенсивности флуоресцентного сигнала GCaMP6s, нормализованного на флуоресценцию клетки в покое (F/F_0), от времени. Изменение флуоресцентного сигнала клетки отражает изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ней. Каждая кривая представляет собой одну клетку, изменяющую интенсивность флуоресценции в течение времени.

Таким образом, модифицированный нами протокол NGN2-индуцированной дифференцировки ИПСК позволяет получить функционально активные культуры человеческих нейронов, которые на добавление глутамата реагируют повышением концентраций Ca^{2+} и Na^+ внутри клетки. При этом, отсутствие повышения уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в бескальциевом буфере в ответ на глутамат (Рис. 21 В) и подавление повышения уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на ~74% при добавлении смеси МК-801 и CNQX (Рис. 22

А) указывает на доминирующую роль ионотропных глутаматных рецепторов в передаче сигналов Ca^{2+} в NGN2-индуцированных нейральных культурах. Поступление Ca^{2+} из буфера обеспечивается рецепторами NMDA-типа и в меньшей степени рецепторами AMPA/каинатного типа.

4.3. Сравнение нейральных культур, полученных из ИПСК-KYOU методом с DUAL SMAD ингибированием и методом с индукцией экзогенной гиперэкспрессии NGN2

В данном эксперименте мы провели сравнение нейральных культур, полученных из одной и той же линии ИПСК-KYOU, но разными методами: iN-NGN2, полученные из ИПСК-KYOU индукцией экзогенной гиперэкспрессии NGN2, и нейральные культуры N-KYOU p5, спонтанно дифференцированные из НСК-KYOU (которые были получены из ИПСК-KYOU методом с DUAL SMAD ингибированием) на 5 пассаже.

Для этих целей были проведены анализы данных секвенирования общей мРНК, а также данных количественной ПЦР с обратной транскрипцией.

Результаты анализа уровней относительной экспрессии маркерных генов методом количественной ОТ-ПЦР в нейральных культурах N-KYOU p5 и iN-NGN2, а также линии ИПСК-KYOU, которая является общим источником обеих нейральных культур, показали повышенную экспрессию маркеров НСК (*SOX1*, *PAX6*, *NES*) и нейрональных предшественников (*NEUROD1*, *ASCL1*, *NGN2*) N-KYOU p5 по сравнению с ИПСК и iN-NGN2 (Рис. 24). Кроме того, в N-KYOU p5 повышена экспрессия глиальных маркеров, таких как *S100b*, *CD44*, *VCAM1*, *PLP1*, *PTN* и *PTPRZ*. Нейрональные же маркеры (*TUBB3*, *MAP*, *MAPT*, *NSE*), а также маркер нейробластов и ранних нейронов *DCX*, напротив, имели более высокий уровень экспрессии в iN-NGN2 по сравнению с N-KYOU p5 (Рис. 24). Эти данные указывают на то, что в N-KYOU p5 другие не-нейрональные типы клеток (НСК и глиальные клетки) преобладают над нейронами.

В транскриптомный анализ вошли 4 образца (биологических повтора) 14-ти дневных нейральных культур iN-NGN2, и 6 образцов нейральных культур N-KYOU p5 на 14й день дифференцировки.

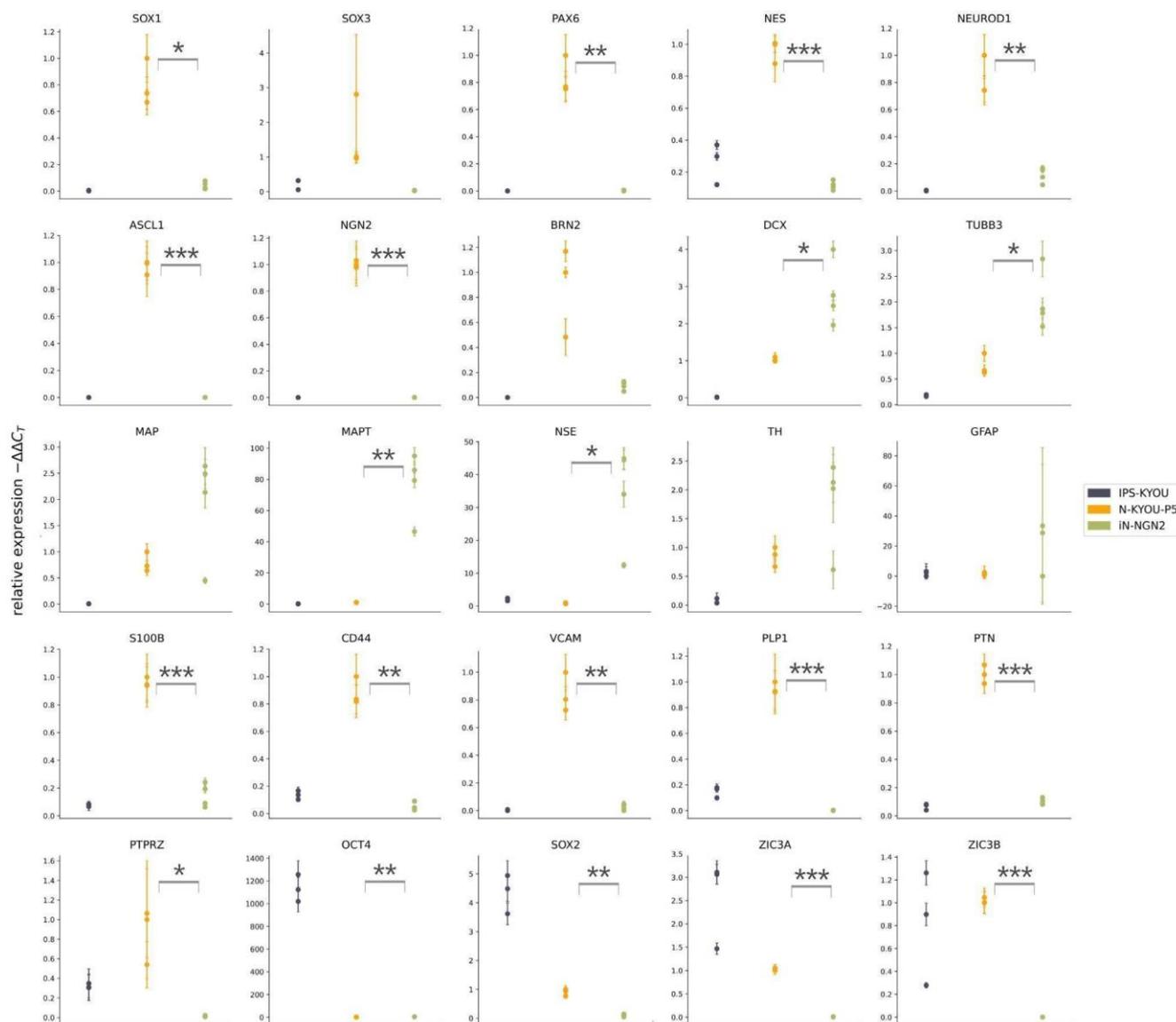


Рисунок 24. Уровни относительной экспрессии маркерных генов, определенные методом количественной ОТ-ПЦР, в образцах линии ИПСК-KYOU, 14-дневных нейральных культурах N-KYOU p5 и 17-дневных нейральных культурах iN-NGN2. Обе нейральные культуры были получены из ИПСК-KYOU, но разными подходами.

По оси Y показан уровень экспрессии, рассчитанный методом $-\Delta\Delta C_t$, нормализованный к экспрессии генов домашнего хозяйства (*EMC7* и *PSMB4*). Каждая точка представляет собой биологическую реплику. Столбики ошибок указывают на стандартное отклонение технических реплик. Статистическая значимость, рассчитанная с помощью теста Уэлча, указана только для сравнения N-KYOU p5 и iN-NGN2 и обозначена звездочками (* – p-value < 0,05, ** – p-value < 0,01, *** – p-value < 0,001).

Оценка сходства и различия общих транскриптомных профилей N-KYOU p5 и iN-NGN2 производилась с использованием методов снижения размерности пространства: кластерный анализ с тепловой картой, анализ главных компонент

(PCA) и многомерное шкалирование (MDS). Результаты представлены по генам, которые различались в сравниваемых группах в два раза ($|\log FC| > 1$). Результаты по всем выявленным генам, которые имели достаточную экспрессию в исследуемых культурах, представлены в приложении (Приложение, Рис. 35).

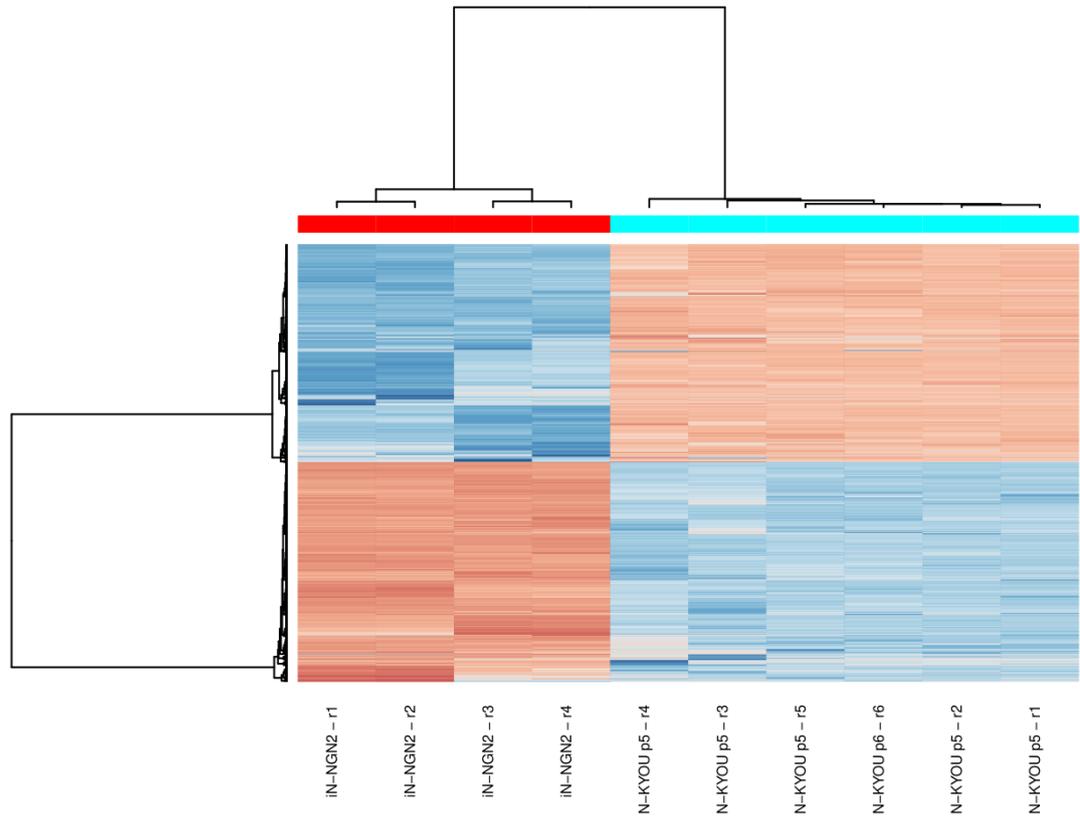
Тепловая карта дифференциальной экспрессии с результатами кластеризации генов демонстрирует различия в транскриптомных профилях между N-KYOU p5 и iN-NGN2 (Рис. 25 А, Приложение, Рис. 35).

На графике PCA образцы N-KYOU p5 и iN-NGN2 группируются по разным концам оси первого главного компонента (ось X), которая отражает 88% общей дисперсии (изменчивости). Хотя образцы iN-NGN2 поделились на два кластера и располагаются по разным концам оси второго главного компонента (ось Y), данный компонент отражает лишь 4% общей дисперсии (Рис. 25 Б). На графике MDS группы образцов N-KYOU p5 и iN-NGN2 также располагаются на разных концах оси X (Рис. 25 В). Разброс в расположении биологических повторов внутри обеих групп вдоль осей Y на PCA и MDS может говорить о естественных различиях нейтральных культур, полученных одним и тем же методом. Также видно, что биологические повторы iN-NGN2 разделились на 2 кластера (Рис. 25 А, Б). На это может влиять огромное количество разных факторов, в том числе вариаций в исходных клетках, из которых нейтральные культуры были дифференцированы.

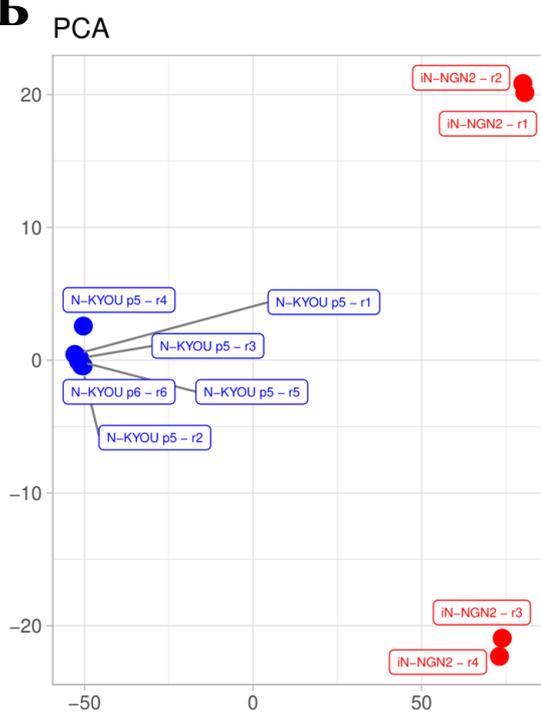
При сравнении нейтральных культур N-KYOU p5 и iN-NGN2 всего было идентифицировано 5253 гена ($|\log FC| > 1$ и скорр. знач. $p < 0,05$), из которых по данным Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) 4974 гена (95%) являются белок-кодирующими. При сравнении же двух кластеров iN-NGN2 между собой было идентифицировано лишь 910 генов. Поэтому различия внутри группы iN-NGN2 на фоне сравнения N-KYOU p5 и iN-NGN2 не столь существенны и, вероятно, не будут влиять на конечный результат.

Таким образом, на основе полученных графиков можно утверждать, что нейтральные культуры N-KYOU p5 и iN-NGN2 значительно отличаются друг от друга.

A



Б



В

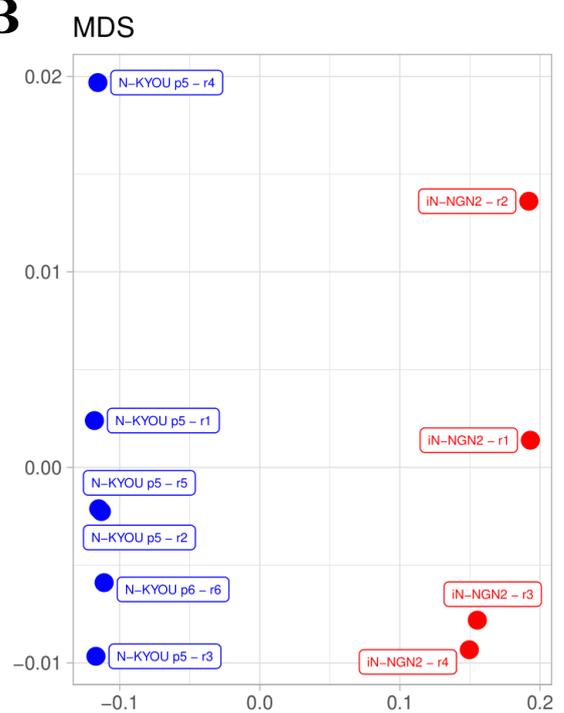


Рисунок 25. Результаты применения методов снижения размерности пространства для данных общих транскриптомов нейральных культур N-KYOU p5 и iN-NGN2 при $|\log_{FC}| > 1$ и скорр. значения $p < 0,05$.

A — кластерный анализ, визуализированный в виде тепловой карты дифференциально экспрессированных генов.

Б – анализ главных компонент (PCA), примененный к стабилизированным по дисперсии преобразованным данным экспрессии. Оси X и Y – главные компоненты 1 и 2 соответственно, объясняющие 88 и 4 % дисперсии (variance).

В – метод многомерного шкалирования (MDS). В качестве меры сходства использованы величины коэффициента корреляции Пирсона. Ось X описывает максимум различий между объектами.

Для оценки дифференциальной экспрессии (ДЭ) генов нейральные культуры iN-NGN2 сравнивались по отношению к нейральным культурам N-KYOU p5. На рисунках 26 и 27 представлены тепловые карты абсолютной и относительной экспрессии выбранных генов-маркеров разных типов нейронов (Рис. 26), а также различных нейральных предшественников и других клеточных типов (Рис. 27). Относительная экспрессия генов представлена в шкале Z-score. Z-score гена рассчитывается путем сравнения уровня его экспрессии в данном образце со средним уровнем экспрессии этого гена во всех образцах. Соответственно, при нулевом значении экспрессия гена в среднем не отличается от остальных, положительное значение говорит о гиперэкспрессии гена относительно остальных образцов, а отрицательное – о гипоекспрессии.

На рисунке 26 А видно, что обе культуры имеют высокий уровень абсолютной экспрессии маркеров незрелых нейронов (*TUBB3*, *DCX*, *NCAM1*, *STMN1*), а также некоторых маркеров зрелых нейронов (*MAP2*, *MAP1B*, *MAP1A*, *MAP1S*). Однако iN-NGN2 отличается от N-KYOU p5 более высокой экспрессией большей части выбранных генов-маркеров зрелых нейронов, таких как *SYP*, *SYN*, *ENO2(NSE)*, *NEFL* и др. (Рис. 26 А). Более того, относительный уровень экспрессии маркеров и зрелых, и незрелых нейронов в iN-NGN2 намного выше, чем в N-KYOU p5 (Рис. 26 Б).

Также нейральные культуры iN-NGN2 отличаются повышенной экспрессией генов-маркеров холинергических и глутаматергических нейронов, но не ГАМКергических. Кроме того, отмечена экспрессия маркеров периферических сенсорных нейронов (неуточненной ергичности) (Рис. 26).

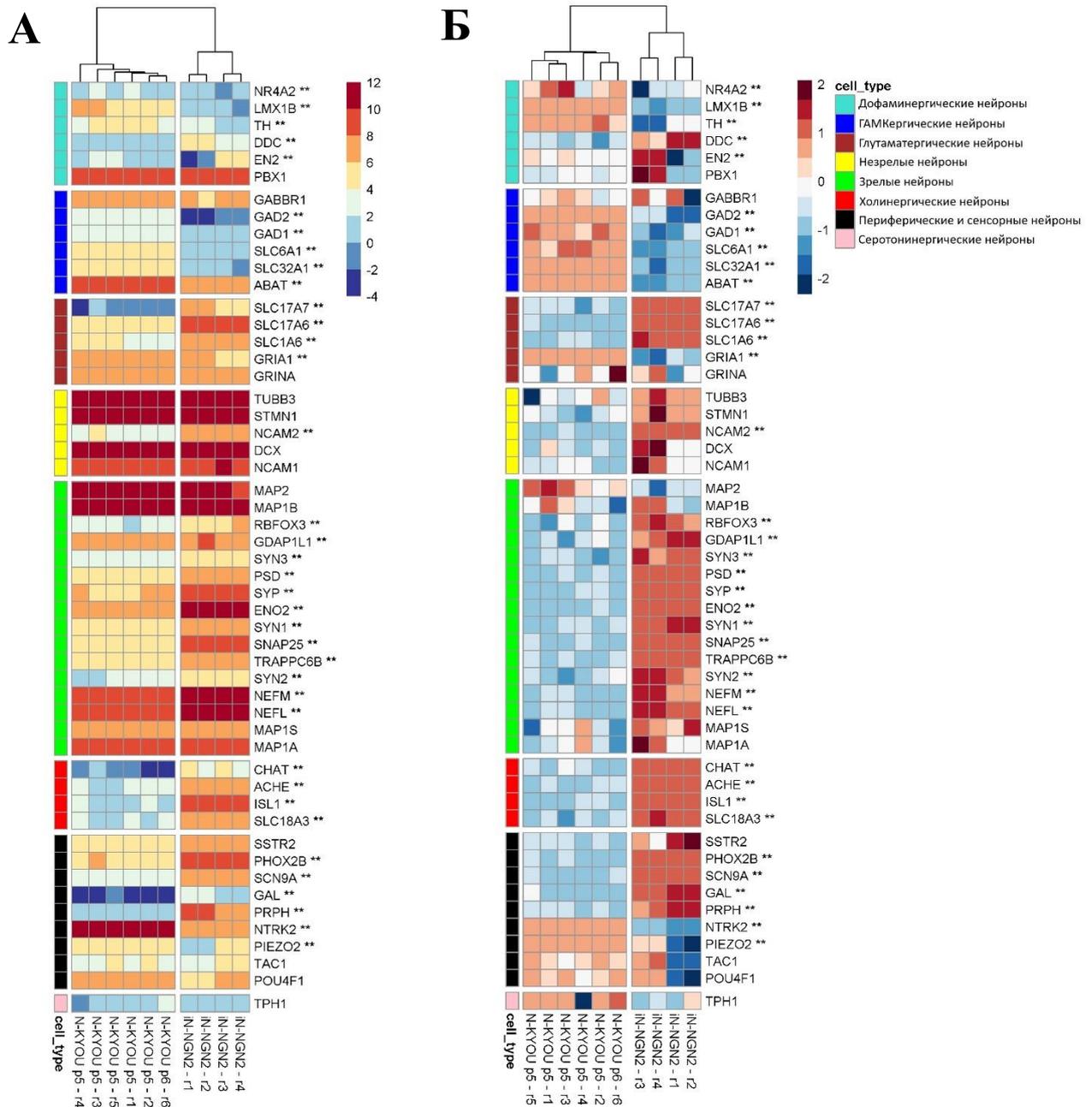


Рисунок 26. Тепловые карты изменения экспрессии генов-маркеров разных типов нейронов. Двумя звездочками (**) обозначены гены с $|\logFC| > 1$ и скорректированным значением $p < 0,05$. Легенда (клеточные типы) является общей для обеих тепловых карт и представлена на рисунке Б.

А – Карта с абсолютными значениями уровней транскрипции генов

Б – Карта с относительными значениями уровней транскрипции генов по шкале z-score

В то же время в нейральных культурах N-KYOU p5 представлена повышенная экспрессия маркеров ГАМКергических, серотонинергических и дофаминергических нейронов (Рис. 26 А, Б) относительно iN-NGN2, хотя маркеры глутаматергических нейронов тоже присутствуют (Рис. 26 Б).

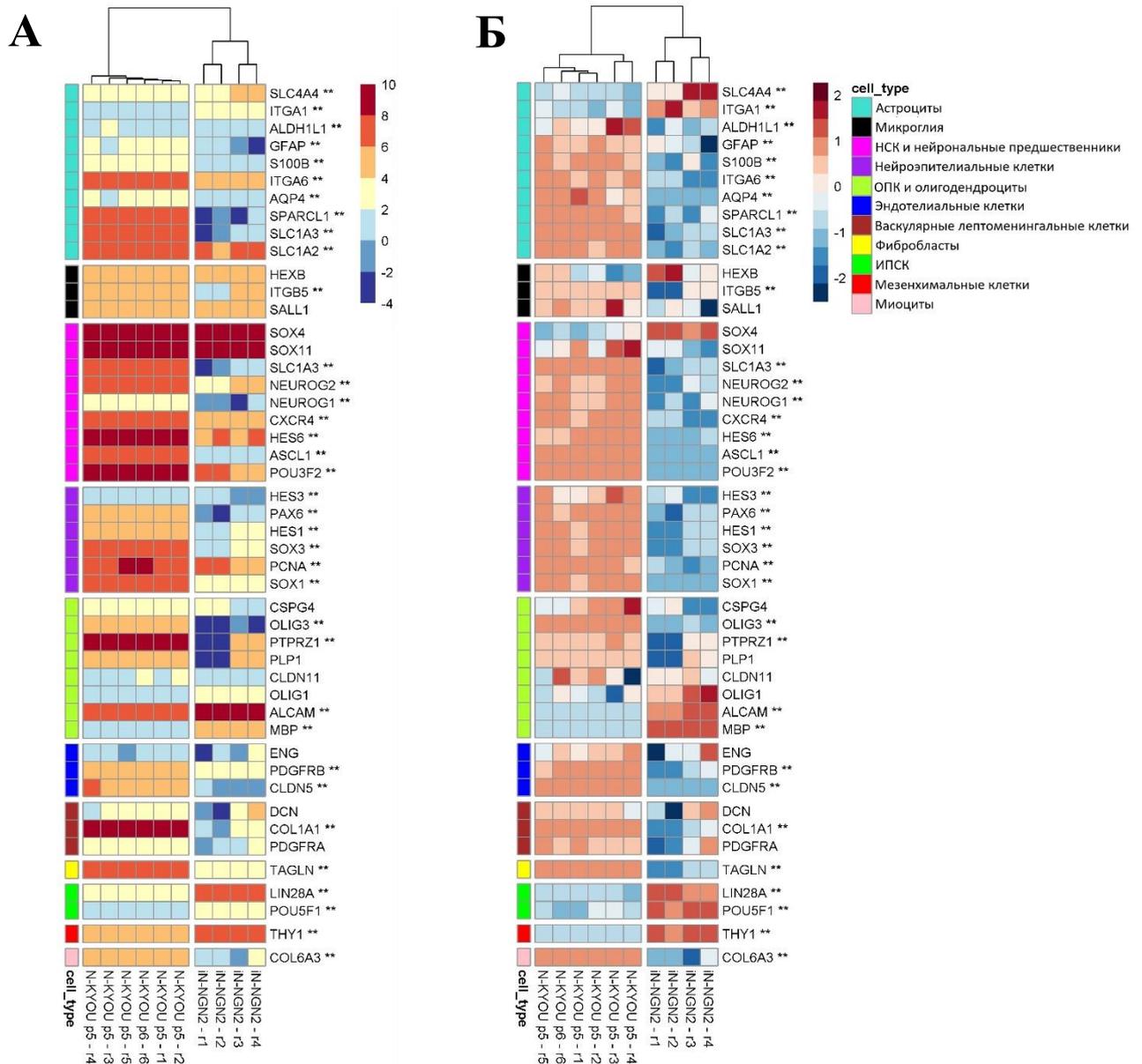


Рисунок 27. Тепловые карты изменения экспрессии генов-маркеров различных не-нейрональных типов клеток. Двумя звездочками (**) обозначены гены с $|\log FC| > 1$ и скорректированным значением $p < 0,05$. Легенда (клеточные типы) является общей для обеих тепловых карт и представлена на рисунке Б.

НСК – нейральные стволовые клетки, ОПК – олигодендроцитарные предшественники, ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

А – Карта с абсолютными значениями уровней транскрипции генов

Б – Карта с относительными значениями уровней транскрипции генов по шкале z-score

Экспрессия генов-маркеров нейроэпителия и нейральных предшественников различных стадий сильно выражена в N-KYOU p5 и в абсолютных, и в относительных значениях по сравнению с iN-NGN2 (Рис. 27 А, Б). Эти данные

согласуются результатами ПЦР и иммуноцитохимического окрашивания, а также scRNA-seq для N-KYOU p5, полученные нами ранее. Что говорит о присутствии в нейральных культурах N-KYOU p5 значительной доли недифференцированных нейральных предшественников в сравнении с iN-NGN2.

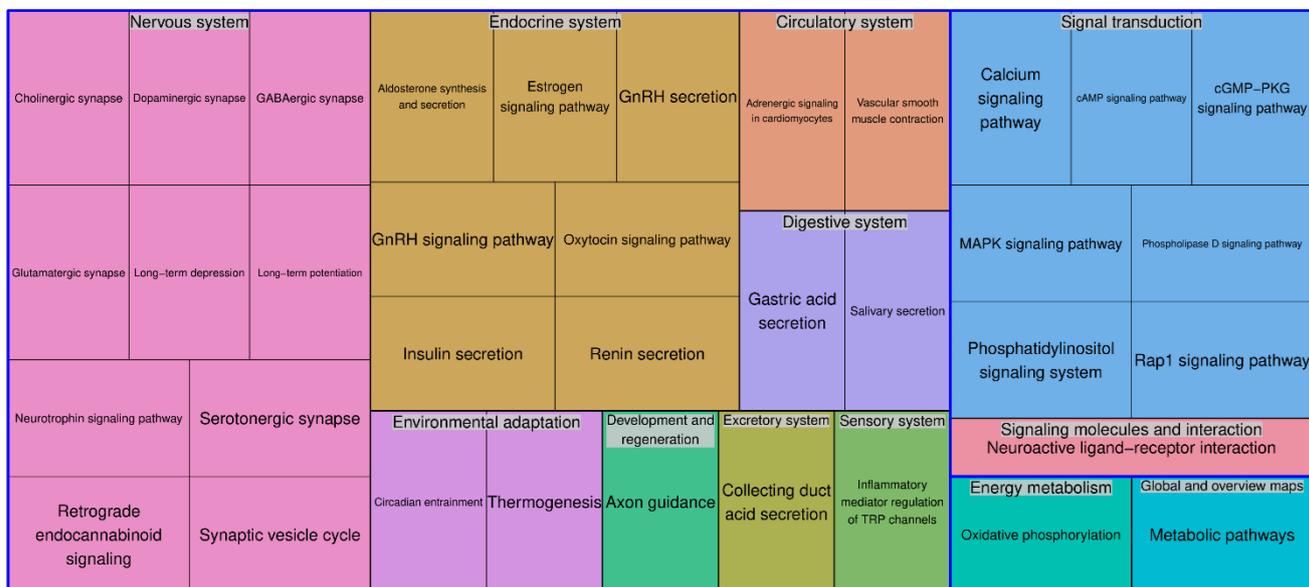
В отличие от iN-NGN2, нейральные культуры N-KYOU p5 значительно обогащены экспрессией маркеров астроцитов (*S100b*, *GFAP*, *SPARCL1*, *SLC1A3*, *ITGA6* и др.), олигодендроцитов (*PTPRZ1*, *PLP1*, *OLIG3*), а кроме того, маркеров других типов клеток, таких как эндотелиальные (*PDGFRB*, *CLDN5*), сосудистые лептоменингальные (*DCN*, *COL1A1*, *PDGFRA*), фибробласты (*TAGLN*), миоциты (*COL6A3*). В iN-NGN2 же повышена экспрессия двух маркеров ИПСК (*LIN28A*, *POU5F1*), мезенхимального маркера *THY1* и некоторых маркеров олигодендроцитов (*ALCAM*, *MBP*) (Рис. 27 А, Б).

Затем мы провели идентификацию сигнальных и метаболических путей KEGG и процессов Gene Ontology, «насыщенных» дифференциально-экспрессирующимися генами в нейральных культурах iN-NGN2 по сравнению с N-KYOU p5.

Анализ обогащения сигнальных и метаболических путей (Khatri et al., 2012) заключается в поиске путей, в большей степени «насыщенных» исследуемыми ДЭ генами по сравнению с референтным набором генов. Нейральные культуры iN-NGN2 были значительно обогащены путями, характерными для нервной системы (пути, связанные с синапсами различной ергичности, сигнальный путь нейротрофинов, долговременная потенция, долговременная депрессия и др.) и эндокринной системы (сигнальные пути эстрогена, окситоцина, гонадотропин-рилизинг-гормона (ГРГ), а также секреция инсулина, ГРГ, альдостерона и ренина) (Рис. 28 А). Кроме того, в iN-NGN2 выражены пути, связанные с аксональным ростом, различными видами трансдукции, например, кальциевой (Рис. 28 А). При этом, по сравнению с N-KYOU p5, здесь гипо-экспрессированы гены, связанные прогрессией клеточного цикла, регуляцией плюрипотентного состояния клеток,

репликацией и репарацией ДНК, а также сигнальными путями WNT и TGF β (Рис. 28 Б).

А



Б

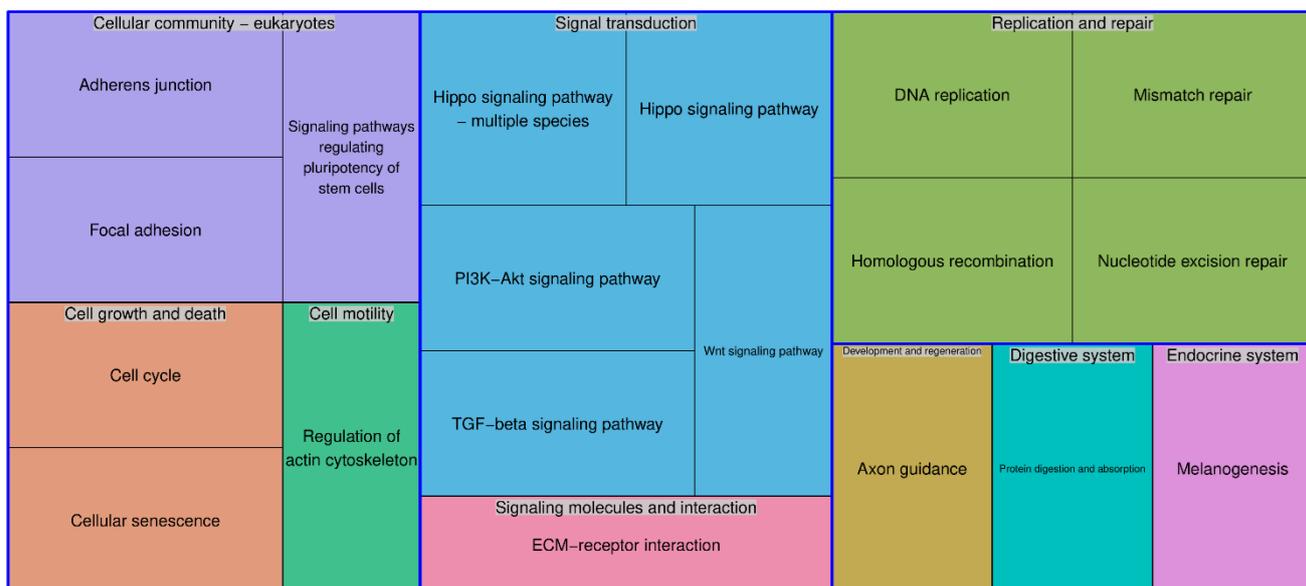


Рисунок 28. Сигнальные и метаболические пути KEGG, идентифицированные для дифференциально экспрессированных генов в iN-NGN2 по сравнению с N-KYOU p5 ($|\log FC| > 1$ при скорр. значении $p < 0,05$).

А – пути KEGG для гипер-экспрессированных генов

Б – пути KEGG для гипо-экспрессированных генов

Топ 100 процессов Gene Ontology, идентифицированных для гипер- и гипо-экспрессированных генов, представлены на рисунке 29. Процессы Gene Ontology

были разбиты на кластеры по семантическому сходству терминов.

Нейральные культуры iN-NGN2, по сравнению с N-KYOU p5, обогащены процессами, связанными с межклеточными взаимодействиями и сигналингом, организацией синапсов, нейрональной синаптической пластичностью и трансмиссией, различными синаптическими процессами, включая экзоцитоз и секрецию нейротрансмиттеров, генерацией потенциалов действия, а также аксоногенезом (Рис. 29 А).

В то же время в N-KYOU p5 более выражены процессы, связанные с регуляцией и прогрессией клеточного цикла, митотическими процессами и делением, регуляцией транскрипции, метаболизмом РНК и макромолекул, эмбриогенезом, развитием нервной трубки и нервной системы, а также клеточной адгезией и миграцией (Рис. 29 Б).

A

action potential	cell communication	positive regulation of synaptic transmission	regulation of membrane potential	regulation of short-term neuronal synaptic plasticity	regulation of signaling	regulation of synaptic plasticity	axon development	cell morphogenesis	cellular component morphogenesis	generation of neurons	nervous system development	neurogenesis	regulation of cation channel activity	regulation of localization	regulation of metal ion transport
anterograde trans-synaptic signaling	chemical synaptic transmission	regulation of biological quality	regulation of neuronal synaptic plasticity	regulation of trans-synaptic signaling	signaling	synaptic signaling	axonogenesis	cell part morphogenesis	neuron development	neuron projection morphogenesis	plasma membrane bounded cell projection morphogenesis		regulation of monoatomic cation transmembrane transport	regulation of monoatomic ion transmembrane transport	regulation of monoatomic ion transporter activity
cell-cell signaling	modulation of chemical synaptic transmission	regulation of cell communication	regulation of neurotransmitter levels	regulation of transporter activity	synaptic transmission, glutamatergic	trans-synaptic signaling	cell morphogenesis involved in differentiation	cell projection morphogenesis	neuron differentiation	plasma membrane bounded cell projection organization	synapse organization		regulation of monoatomic ion transport	regulation of secretion	regulation of transmembrane transport
calcium-ion regulated exocytosis	exocytosis	neurotransmitter secretion	regulation of calcium ion-dependent exocytosis	regulation of exocytosis	regulation of regulated secretory pathway	regulation of secretion by cell	calcium ion transport	inorganic ion transmembrane transport	monoatomic cation transmembrane transport	monoatomic ion transport	neurotransmitter transport	potassium ion transmembrane transport	regulation of neurotransmitter transport	regulation of transmembrane transporter activity	regulation of transport
catecholamine secretion	export from cell	regulated exocytosis	regulation of catecholamine secretion	secretion by cell	signal release	synaptic vesicle cycle	establishment of localization	localization	monoatomic cation transport	potassium ion transport	sodium ion transmembrane transport	sodium ion transport	cardiac conduction	learning or memory	memory
dopamine secretion	monoamine transport	regulation of amine transport	regulation of dopamine secretion	signal release from synapse	synaptic vesicle exocytosis	vesicle-mediated transport in synapse	inorganic cation transmembrane transport	metal ion transport	monoatomic ion transmembrane transport	secretion	transmembrane transport	transport	heart contraction	regulation of system process	system process
													heart process		

B

cell cycle phase transition	cell cycle process	cell cycle	positive regulation of biosynthetic process	positive regulation of macromolecule biosynthetic process	animal organ development	central nervous system development	circulatory system development	anatomical structure development	anatomical structure formation involved in morphogenesis	cell cycle checkpoint signaling	mitotic cell cycle checkpoint signaling	cell differentiation	cellular developmental process				
microtubule cytoskeleton organization	mitotic cell cycle	mitotic nuclear division	positive regulation of macromolecule metabolic process	positive regulation of metabolic process	animal organ morphogenesis	nervous system development	system development	vasculature development	anatomical structure morphogenesis	developmental process	tissue development	negative regulation of cell cycle	negative regulation of mitotic cell cycle	regulation of mitotic cell cycle	generation of neurons	neurogenesis	regulation of cell differentiation
mitotic cell cycle phase transition	mitotic sister chromatid segregation	sister chromatid segregation	positive regulation of nitrogen compound metabolic process	regulation of nitrogen compound metabolic process	biological regulation	positive regulation of biological process	positive regulation of developmental process	embryo development	multicellular organism development	cell adhesion	cell population proliferation	positive regulation of cellular biosynthetic process	positive regulation of cellular metabolic process	cellular response to growth factor stimulus	locomotion		
mitotic cell cycle process	nuclear chromosome segregation		regulation of macromolecule metabolic process	regulation of primary metabolic process	negative regulation of biological process	regulation of biological process	regulation of developmental process	regulation of multicellular organismal development	tube development	tube morphogenesis	cellular process	chromosome segregation	regulation of cellular metabolic process	response to growth factor			
negative regulation of cell cycle phase transition	negative regulation of cell cycle process	negative regulation of mitotic cell cycle phase transition	positive regulation of DNA-templated transcription	positive regulation of nucleic acid-templated transcription	chromosome organization	cytoskeleton organization	cellular component organization or biogenesis	cell migration	cell motility	negative regulation of cellular process	positive regulation of cellular process	DNA-templated DNA replication	DNA replication	regulation of cellular component organization			
positive regulation of cell cycle process	regulation of cell cycle phase transition	regulation of cell cycle process	positive regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	positive regulation of RNA biosynthetic process	positive regulation of RNA metabolic process	regulation of DNA-templated DNA replication								regulation of mitotic nuclear division			
positive regulation of cell cycle	regulation of cell cycle	regulation of mitotic cell cycle phase transition	positive regulation of transcription by RNA polymerase II	regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	nuclear division	organelle fission	cellular component organization	regulation of cell migration	regulation of cell motility	regulation of cellular process	regulation of chromosome segregation	DNA metabolic process	nucleic acid metabolic process	DNA damage response			

Рисунок 29. Биологические процессы Gene Ontology, идентифицированные для дифференциально экспрессированных генов в iN-NGN2 по сравнению с N-KYOU p5 ($|\log_{2}FC| > 1$ при скорр. значении $p < 0.05$).

A – процессы Gene Ontology для гипер-экспрессированных генов

B – процессы Gene Ontology для гипо-экспрессированных генов

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Galiakberova A. A., Brovkina O. I., Kondratyev N. V., Artyuhov A. S., Momotyuk E. D., Kulmukhametova O. N., Lagunin A. A., Shilov B. V., Zadorozhny A. D., Zakharov I. S., Okorokova L. S., Golimbet V. E., Dashinimaev E. B. Different iPSC-derived neural stem cells shows various spectrums of spontaneous differentiation during long term cultivation // *Frontiers in molecular neuroscience*. — 2023. — Vol. 16.

Galiakberova A.A., Surin A.M., Bakaeva Z.V., Sharipov R.R., Zhang D., Dorovskoy D.A., Shakirova K.M., Fisenko A.P., Dashinimaev E.B. iPSC-Derived Human Neurons with GCaMP6s Expression Allow In Vitro Study of Neurophysiological Responses to Neurochemicals // *Neurochem Res*. — 2022. — Vol. 47, no 4. P. — 952-966.

5.1. Исследование спонтанно дифференцированных нейральных культур, полученных через стадию НСК с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием

Метод с DUAL SMAD ингибированием является популярным подходом получения нейральных стволовых клеток (НСК) из плюрипотентных стволовых клеток в условиях *in vitro*. Метод основывается на ингибировании двух путей SMAD-сигналинга (BMP и TGF β) при помощи малых молекул, добавляемых в культуральную среду (Chambers et al., 2009). В дальнейшем НСК могут быть культивированы в течение некоторого количества пассажей, а затем направлены в нейрональную или глиальную дифференцировку. В целом известно, что такие нейральные культуры, дифференцированные из НСК, даже при направленной дифференцировке являются довольно гетерогенными (Nilsson et al., 2021). Более того, соотношение типов клеток в культурах, полученных из разных линий НСК, также может отличаться (Wu et al., 2007; Hu et al., 2010). Также есть предположение, что спектр типов клеток в нейральных культурах, дифференцированных из таких НСК, может меняться в зависимости от длительности культивирования НСК (Viero et al., 2014).

Мы исследовали вариабельность нейральных культур в зависимости от линии ИПСК – источника НСК, а также в зависимости от длительности культивирования НСК на примере спонтанной дифференцировки НСК, полученных с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием. Спонтанная дифференцировка НСК проводилась путем удаления из среды факторов, направляющих дифференцировку, а также факторов, поддерживающих пролиферацию НСК.

Как и ожидалось, при одинаковом протоколе получения НСК и их спонтанной дифференцировке с одинаковой продолжительностью культивирования (5 пассажей) разные линии ИПСК (KYOU, AFS17, DYP0730, DP) образуют гетерогенные нейральные культуры с разной степенью гетерогенности. Источником таких различий, вероятно, являются генетические и эпигенетические свойства линий ИПСК. Неоднократно отмечалось, что различные линии ПСК могут отличаться друг от друга и, как следствие, демонстрировать в процессе дифференцировки различный спектр клеточных типов. Например, было показано, что разные линии ИПСК человека дифференцируются в НСК с повышенной вариабельностью по сравнению с разными линиями ЭСК (Hu et al., 2010; Kim et al., 2010; Wock et al., 2011). Тем не менее, нельзя сказать, что разные линии ЭСК всегда демонстрируют одинаковый спектр дифференцировки. Например, сравнение нейральной дифференцировки двух линий ЭСК показало существенное различие в соотношении типов клеток в дифференцированных культурах (Wu et al., 2007). Предполагается, что линии по-разному программируются уже на стадии ПСК. Это выражается в том, что, хотя клетки разных линий ПСК потенциально способны дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков, но даже в одинаковых условиях они могут отдавать предпочтение к дифференцировке в определенный тип клеток, причем для каждой линии он может быть свой (Wu et al., 2007; Hu et al., 2010). Такое «предварительное программирование», вероятно, связано с эпигенетическими различиями клеточных линий, такими как метилирование ДНК, модификации гистонов и экспрессия микроРНК. Было показано, что статус метилирования ряда генов различается между ЭСК и ИПСК (Wock et al., 2011; Koynagi-Aoi et al., 2013). Обычное репрограммирование соматических клеток при помощи коктейля генов плюрипотентности приводит к получению так называемых праймированных ИПСК, которые несут в себе эпигенетическую память о соматических клетках, из которых они были получены (Kim et al., 2010; Ohi et al., 2011; Buckberry et al., 2023). Этим же фактом объясняется и повышенная вариабельность между линиями ИПСК по сравнению с разными линиями ЭСК. Соответственно, в потенциальные различия вносит вклад метод

репрограммирования. Так, репрограммирование с помощью транскрипционных факторов плюрипотентности может приводить к нестабильности генома и мутагенезу, что может приводить к гетерогенности получаемых ИПСК (Zheng et al., 2013; Ma et al., 2014). Таким образом, линии ИПСК, полученные от разных доноров или из разных типов клеток, могут демонстрировать различия или ограничения в спектрах дифференцировки при одинаковых условиях (Ohi et al., 2011; Kajiwara et al., 2012). Более того, было замечено, что при нейральной или энтодермальной дифференцировке ИПСК, репрограммированных из фибробластов, в качестве побочных линий дифференцировки наблюдались именно фибробластоподобные клетки (Godoy et al., 2018; Buckberry et al., 2023).

Далее мы исследовали изменение спектра спонтанной дифференцировки НСК с увеличением длительности их культивирования (до 25 и 30 пассажей) на двух линиях (НСК-KYOU и НСК-AFS17). В литературе имеются данные, что НСК, полученные методом с DUAL SMAD ингибированием, могут быть стабильно культивированы вплоть до 30-го пассажа (Chambers et al., 2009; Li et al., 2011; Reinhardt et al., 2013). Более того, существуют исследования, в которых авторы постулируют разработку протоколов, позволяющих получать и культивировать НСК в течение 150 пассажей без существенных изменений морфологических и иммуноцитохимических свойств культур (Koch et al., 2009). Однако ранее также было показано, что физиологическая кальциевая активность НСК, полученных из ПСК, значительно изменяется в течение 10 пассажей (Forostyak et al., 2013; Viero et al., 2014).

Наши результаты показали, что при длительном культивировании НСК в спонтанно дифференцированных из них нейральных культурах наблюдаются изменения транскрипционного профиля. Причем динамика этих изменений не одинакова в нейральных культурах двух разных линий. В частности, было замечено, что с увеличением длительности культивирования НСК в N-KYOU происходит снижение уровня экспрессии глиальных маркеров (*GFAP*, *CD44*, *S100b* и др.), в то время как в N-AFS17 уровень их экспрессии возрастает. Тем не менее,

обе линии можно объединить сходной динамикой некоторых процессов. Совокупный анализ двух клеточных линий позволяет предположить причастность истощения экспрессии некоторых генов сигнальных путей WNT и BMP к очевидным различиям между нейральными культурами с ранних и поздних пассажей НСК.

Пути WNT играют важную роль в формировании гомеостаза между нейрональными и глиальными клетками (Lie et al., 2005; Moreno-Estelles et al., 2012). В процессе нормального развития мозга сигналы WNT через индукцию BMP-сигнализации постепенно исчезают, в результате чего нейрогенез сменяется глиогенезом, который, в свою очередь, становится более перекошенным в сторону олигодендроцитов против астроцитов (Kasai et al., 2005; Gamez et al., 2013). В нашей искусственной системе мы наблюдаем аналогичную картину, когда уровни экспрессии некоторых генов WNT/BMP путей с пассажами становятся менее экспрессированными (BMP5, RNF43 и др.), экспрессия гена *SHISA3*, который кодирует ингибитор WNT, возрастает в кластерах стволовых клеток, астроглиальные клетки истощаются, а некоторые маркеры олигодендроцитов становятся более экспрессированными (в частности, *PLP1*).

С помощью анализа scRNA-seq мы подтвердили, что с увеличением длительности культивирования НСК в нейральных культурах происходят изменения не просто на уровне транскрипционных профилей, а на уровне клеточных популяций. Основным эффектом, наблюдаемым при анализе клеточного состава N-KYOU с помощью данных scRNA-seq, было резкое снижение представленности астроглиальных кластеров 0 и 2 с увеличением пассажа НСК. Интересным и обсуждаемым результатом является и то, что, несмотря на резкое истощение кластеров глиальной дифференцировки в N-KYOU, мы не наблюдали такого же эффекта для кластеров нейрональной дифференцировки. Очевидно, что НСК способны давать начало как нейронам, так и глиальным клеткам, и что направлением судьбы клеток можно манипулировать, изменяя клеточную среду, чтобы направить дифференцировку в определенные фенотипы. Однако в наших

экспериментах мы намеренно не добавляли специфических факторов (таких как FGF10, FGF8b, ретиноевая кислота и т.д.), чтобы наблюдать спектр именно спонтанной дифференцировки. И в этих условиях, несмотря на 25 пассажей, мы наблюдали последовательное прохождение всего пути дифференцировки N-KYOU от кластера 4 (НСК) через кластеры 7, 11, 3, 17, 1 (нейрональные предшественники и незрелые нейроны) до состояний кластеров 5, 16, 14, которые, по-видимому, характеризуют наиболее зрелые нейроны разных типов. В то же время, согласно данным, полученным в результате секвенирования тотальной РНК, мы видим значительное и достоверное снижение экспрессии генов-маркеров зрелых нейронов (*GAP43*, *RBFOX3* (NeuN), *SYN*, *TH*, *SLC6A1*, *GAD2* и др.). Возможно, это может свидетельствовать о снижении дифференцировочного потенциала НСК в сторону зрелых нейронов. Однако, безусловно, данный вопрос требует более детального изучения.

Общая теория нейрогенеза предполагает, что по мере развития нервной системы человека в эмбриогенезе волна образования нейронов должна опережать волны образования глии (Miller, Gauthier, 2007), однако в культурах N-KYOU мы наблюдаем иную картину: постоянную генерацию нейронов при затухании глиальной дифференцировки. Полученные нами данные по N-KYOU хорошо согласуются с опубликованным наблюдением о том, что астроциты корректно дифференцируются из НСК, полученных из ИПСК, только при культивировании НСК до 14-го пассажа (Tew et al., 2017). Хотя наши результаты общих транскриптомов и иммуноцитохимии по нейральным культурам N-AFS17 демонстрируют противоположную динамику: маркеры астроглии возрастают с увеличением количества пассажей.

Конечно, длительное культивирование нейральных стволовых клеток в условиях нашего эксперимента не имитирует нормальный нейрогенез человека, в том числе и по той причине, что развитие нервной системы плода человека занимает многие месяцы, включая постнатальный период. С другой стороны, гистологические данные подтверждают, что во всем мозге человека соотношение

глии и нейронов составляет примерно 1:1. Наши результаты scRNA-seq показали, что соотношение в N-KYOU p25 более приближено к естественному, чем в p5 (1,1 против 1,8). Для более прямой корреляции клеточной модели с естественным нейрогенезом, вероятно, необходимы трехмерные условия созревания клеток, таких как нейросферы и нейро-органойды, которые более полно имитируют эмбриональный нейрогенез. Тем не менее существуют эксперименты, показывающие, что увеличение времени созревания (дифференцировки) полученных из плюрипотентных стволовых клеток НСК в виде нейросфер с 8 до 15 недель увеличивает долю астроцитов (Paavilainen et al., 2018).

Данное исследование имеет ряд важных ограничений. Несмотря на то, что мы наблюдали сдвиг спектра дифференцировки несколькими независимыми методами анализа в ряде независимых биологических реплик, методологически наш эксперимент был ограничен конкретным протоколом дифференцировки НСК из конкретных линий ИПСК. Вполне возможно, что применение других протоколов на других аналогичных клеточных линиях может повлиять на результат, поскольку в данном случае мы работаем с системами с большим числом переменных (генетический и эпигенетический фон, различные партии используемых культуральных сред и добавок, особенности культивирования сотрудниками лаборатории и т.д.). Тем не менее даже на таком ограниченном наборе клеточных линий мы продемонстрировали существенные различия в спектре клеточных типов дифференцированных нейральных культур как полученных из разных линий ИПСК, так и в ходе длительного культивирования.

5.2. Гиперэкспрессия NGN2 в ИПСК при помощи лентивирусной доставки и системы регуляции транскрипции TetON позволяет получить нейрофизиологически активные нейральные культуры

Поскольку метод получения нейронов из ИПСК через стадию НСК с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием занимает довольно длительное время, а получаемые нейральные культуры оказываются гетерогенными, мы

решили изучить подход к дифференцировке ИПСК в нейроны с помощью индукции гиперэкспрессии *NGN2*. Оригинальный протокол, разработанный Zhang et al., основывается на лентивирусной доставке трансгена в составе тетрациклин активируемой системы TetON (Zhang et al., 2013). Для успешного воспроизведения подхода с индукцией *NGN2*, но без совместного культивирования с астроцитами, нам потребовалось оптимизировать оригинальный протокол путем добавления этапа пересадки дифференцирующихся клеток на новый субстрат.

Исходя из данных литературы, нейральные культуры, полученные из ИПСК при помощи одного и того же подхода, но с некоторыми различиями в протоколах, могут получиться неодинаковыми. Тип и морфология нейронов могут зависеть от конкретных условий культивирования, используемой линии плюрипотентных стволовых клеток, присутствия факторов роста в культуральной среде и типа субстрата (Zhang et al., 2013; Setien et al., 2020; Hulme et al., 2022). Например, культуры нейронов, полученные из ИПСК крыс на разных субстратах (поли-D-лизин, Geltrex, желатин и поли-ламинин), отличались по морфологии и зрелости (Setien et al., 2020). *NGN2*-индуцированные нейроны, которые со 2-го дня дифференцировки культивировались на покрытом матригелем субстрате совместно с глиальными клетками мыши, представляли собой довольно однородную культуру с признаками возбуждающих нейронов, экспрессирующих маркеры 2-3 слоев коры головного мозга (Zhang et al., 2013). При дифференцировке тем же методом, но на субстрате из поли-L-орнитина и мышинового ламинина с последующим совместным культивированием с мышинными астроцитами получались гетерогенные культуры с преобладанием кортикальных сенсорных нейронов (Schornig et al., 2021). В связи с этим возникла необходимость изучить *NGN2*-индуцированные нейральные культуры, полученные модифицированным нами протоколом.

С помощью оптимизированного нами протокола мы получили *NGN2*-индуцированные нейроны (iN-*NGN2*) на субстрате, последовательно покрытом поли-D-лизином и матригелем, без совместного культивирования с

астроглиальными клетками. Хотя морфологически культура выглядела достаточно гетерогенной, тем не менее, она не только окрашивалась на основные маркеры нейронов (β III-тубулин, синапсин, синаптофизин, NeuN, NSE), но и экспрессировала основные маркеры нейронов (*TUBB3*, *TH*, *MAP2*, *MAPT* и *NSE*). Более того, экспрессия *BRN2* в полученных нами нейронах свидетельствует об их принадлежности к кортикальным нейронам возбуждающего типа, что согласуется с ранее полученными результатами (Thoma et al., 2012; Zhang et al., 2013). Как и в культурах, полученных Thoma et al., в наших нейральных культурах была обнаружена высокая экспрессия генов нейральных предшественников, таких как *PAX6* и *SOX1* (Thoma et al., 2012). Известно, что принудительная экспрессия *NGN2* в плюрипотентных клетках приводит к активации *PAX6* и *SOX1*, несмотря на то, что *in vivo* их экспрессия предшествует экспрессии *NGN2*, а не наоборот (Pevny et al., 1998; Scardigli et al., 2003). Более того, было показано, что *PAX6* участвует в регуляции *NGN2*, а экспрессия *NGN2* подавлена в клетках мышинной нейробластомы *Pax6*^{-/-} (Scardigli et al., 2003; Mishra et al., 2015). Вероятно, *PAX6* и *SOX1*, активируемые экзогенной экспрессией *NGN2*, запускают экспрессию генов различных транскрипционных факторов, включая сам эндогенный ген *NGN2*, и активируют молекулярные каскады, необходимые для нейрональной дифференцировки. Действительно, транскриптомный анализ показал, что в течение первых 4-х дней дифференцировки, *NGN*-индуцированные клетки успевают пройти некоторые стадии нейрональных предшественников в «ускоренном формате», причем выявленные пути дифференцировки были сходны с таковыми *in vivo*. Более того, было обнаружено значительное сходство транскриптомов *NGN2*-индуцированных нейронов на 4-й день дифференцировки с развивающимся человеческим мозгом (Busskamp et al., 2014). Thoma et al. предполагают, что нейроны, полученные при гиперэкспрессии *NGN2*, являются преимущественно глутаматергическими, поскольку они положительны на везикулярный транспортер глутамата (*vGLUT1*), а также для *NMDA*-рецептор 1 (Thoma et al., 2012). К такому же выводу пришли и Zhang et al.: полученные ими

нейроны экспрессировали гены субъединиц AMPA-рецепторов глутамата, хотя не экспрессировали гены субъединиц NMDA-рецепторов (Zhang et al., 2013).

На модели NGN2-индуцированных нейронов, экспрессирующих генетически кодируемый флуоресцентный кальциевый индикатор GCaMP6s, мы показали, что данный протокол позволяет получать зрелые и функционально активные нейральные культуры, способные отвечать на воздействие глутамата.

Несмотря на то, что изучение морфологии клеток и методы иммуноцитохимии позволяют первоначально определить тип нейронов, зрелость нейронов *in vitro* плохо определяется по экспрессии специфических маркеров. Более верным свидетельством зрелости и функциональности полученных нейронов является наличие в этих клетках рецепторов, стимуляция которых приводит к быстрому изменению внутриклеточной концентрации ионов, выполняющих роль вторичных мессенджеров, а также тех ионов, которые обеспечивают распространение электрического импульса по дендритам и аксонам. Это, прежде всего, ионы кальция, натрия и калия (Nicholls, 2001). В центральной нервной системе основным возбуждающим агонистом нейронов является глутамат (Glu), который способен активировать ионотропные рецепторы (iGluRs), а также metabotropic рецепторы (mGluRs). iGluRs обеспечивают приток Ca^{2+} и Na^{+} в цитозоль из окружающей среды через каналы, являющиеся внутренними частями структуры рецептора (Nicholls, 2001; Lau, Tymianski, 2010; Twomey et al., 2018), в то время как mGluRs запускают ферментативные процессы.

Активация так называемых mGluRs 1-го типа (mGluR1 и mGluR5) приводит к мобилизации Ca^{2+} в цитозоль из внутриклеточных депо (из эндоплазматического ретикулума, ЭР) (Nicoletti et al., 2011; Reiner, Levitz, 2018). Мы проверили способность NGN2-индуцированных нейронов реагировать на Glu. Насколько нам известно, впервые было показано, что Glu вызывает повышение как $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^{+}]_i$ в NGN2-индуцированных нейронах.

Динамика этих процессов заметно отличается во время действия Glu и, особенно, после его удаления. Восстановление низкого уровня $[Na^+]_i$ в период после воздействия глутамата происходит намного медленнее, чем $[Ca^{2+}]_i$.

Аналогичные изменения как $[Ca^{2+}]_i$, так $[Na^+]_i$ были описаны для первичных культур, выделенных из коры головного мозга крыс (Sharipov et al., 2018). Различия в динамике изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ после промывки от Glu обусловлены гораздо большим потреблением АТФ Na^+/K^+ -АТФазой по сравнению с Ca^{2+} -АТФазами плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума, принимая во внимание резкое снижение цитозольной АТФ (Surin et al., 2014; Sharipov et al., 2018).

Следует отметить, что в наших экспериментах амплитуды повышений $[Ca^{2+}]_i$, вызванные Glu, не превышают половины максимального увеличения, наблюдаемого под действием иономицина. В первичных культурах нейронов Glu в той же концентрации (100 мкМ в присутствии 10 мкМ глицина) индуцирует повышение $[Ca^{2+}]_i$ на единицы микромолей/л, а при длительном воздействии – на десятки микромолей/л (Brustovetsky, Dubinsky, 2000; Khodorov, 2004; Kiedrowski, 2007). Вероятно, что в полученных нами нейральных культурах содержание NMDA и AMPA/каинатных рецепторов было ниже, чем в первичных культурах нейронов головного мозга. Отсутствие вызванного Glu повышения уровня $[Ca^{2+}]_i$ в бескальциевом буфере и значительное подавление повышения уровня $[Ca^{2+}]_i$ при добавлении смеси МК-801 и CNQX указывает на доминирующую роль ионотропных глутаматных рецепторов в передаче сигналов Ca^{2+} . Поступление Ca^{2+} из буфера обеспечивается рецепторами NMDA-типа и, в меньшей степени, рецепторами AMPA/каинатного типа.

Метаботропные глутаматные рецепторы mGluR1 и/или mGluR5, функционально связанные с мобилизацией Ca^{2+} в цитозоль из кальциевых депо, по видимому, не встречаются в полученных нами NGN2-индуцированных нейронах. По крайней мере, мы не смогли обнаружить их функционирование. Это

наблюдение можно рассматривать как аргумент в пользу зрелого статуса нейронов в полученной нами культуре, поскольку известно, что активация mGluR1/5 контролирует пролиферацию, выживание и дифференцировку культивируемых нейральных клеток-предшественников, выделенных из СВЗ взрослой мыши (Pandya et al., 2016). mGluR, не связанные с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных депо, такие как mGluR2 и mGluR3, стимулируют пролиферацию нейральных предшественников (Brazel et al., 2005), способствуют их дифференцировке в астроглию (Nakamichi et al., 2009) и в совокупности предотвращают апоптоз нейральных прогениторных клеток. Тем не менее для более конкретных утверждений в будущем требуется более подробный анализ.

Таким образом нам удалось получить NGN2-индуцированные нейральные культуры, которые содержат значительную долю функционально зрелых нейронов. В таких нейронах глутамат вызывает повышение уровня $[Ca^{2+}]_i$, которое опосредуется ионотропными рецепторами к Glu преимущественно NMDA-типа. Полученные нами NGN2-индуцированные нейральные культуры, экспрессирующие генетически кодируемый флуоресцентный кальциевый индикатор GCaMP6s, могут быть использованы в качестве модели для изучения нейрофизиологической активности нейронов в ответ на добавление различных нейрхимических веществ.

5.3. Нейральные культуры, полученные из ИПСК с помощью двух разных подходов, значительно отличаются друг от друга

Существует несколько различных подходов к дифференцировке ИПСК в нейральном направлении. И одной из наиболее важных проблем при получении нейронов является выбор подхода и протокола дифференцировки под конкретные задачи. Для этого необходимо понимать преимущества и недостатки каждого подхода и иметь представление о спектре клеточных типов в получаемых культурах.

В связи с этим мы решили протестировать и сравнить два наиболее популярных подхода к дифференцировке ИПСК в нейроны: подход с дифференцировкой через стадию НСК, получаемых с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием, и подход с индукцией гиперэкспрессии экзогенного *NGN2* при помощи лентивирусной доставки в составе тетрациклин регулируемой системой экспрессии трансгена.

В ходе проведения исследования мы выяснили, что нейральные культуры, спонтанно дифференцированные из НСК, полученных из ИПСК с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием, представляют собой гетерогенные культуры, которые, однако, содержат клетки, экспрессирующие основные маркеры нейронов и способные к проявлению кальциевой активности в ответ на добавление глутамата. Тем не менее на состав гетерогенных культур влияла длительность культивирования НСК, а также линия ИПСК – источник НСК.

Нейральные культуры, полученные из ИПСК с помощью гиперэкспрессии экзогенного *NGN2*, визуально оказались более однородными по клеточному составу. Большая часть клеток такой культуры обладала специфической кальциевой активностью и демонстрировала наличие ионотропных рецепторов к глутамату.

Для сравнения двух подходов к получению нейронов мы сопоставили данные экспрессии маркерных генов, полученные с помощью количественной ОТ-ПЦР, а также общие транскриптомные профили 14-дневных нейральных культур, полученных из одной и той же линии ИПСК-KYOU, но двумя разными подходами. iN-NGN2 – нейральные культуры, полученные с помощью гиперэкспрессии гена *NGN2* в ИПСК-KYOU; N-KYOU p5 – нейральные культуры, спонтанно дифференцированные из НСК (полученные из ИПСК-KYOU с помощью DUAL SMADi) на 5 пассаже.

Результаты количественной ОТ-ПЦР продемонстрировали, что обе нейральные культуры отличаются по уровням относительной экспрессии

нейрональных маркеров от ИПСК-KYOU, из которой нейральные культуры были получены. Однако уровень относительной экспрессии маркеров НСК и глиальных клеток в N-KYOU p5 оказался выше, чем в iN-NGN2, а маркеров нейронов – ниже.

Интересным результатом является экспрессия в N-KYOU p5 генов *ZIC3A* и *ZIC3B*, сопоставимая с таковой в ИПСК. *ZIC3A* и *ZIC3B* являются изоформами транскрипционного фактора *ZIC3* (Bedard et al., 2011). Экспрессия данного ТФ может свидетельствовать о стволовости клетки, поскольку его активность необходима во время раннего эмбрионального развития (гастрюляция, нейруляция) (Herman, El-Hodiri, 2002), а в мышинных ЭСК *ZIC3* поддерживает их плюрипотентность (Lim et al., 2007; Yang et al., 2019).

Результаты анализа транскриптомных профилей также показали значительные различия между нейральными культурами. Анализ обогащения метаболических и сигнальных путей показал, что транскрипционный профиль N-KYOU p5 по сравнению с iN-NGN2 значительно обогащен путями и процессами, связанными с пролиферацией, поддержанием клеточного цикла, а также сигнальными путями WNT и TGF β . В то же время транскрипционный профиль iN-NGN2 оказался обогащен различными процессами, связанными с химическими синапсами, нейрональной пластичностью, передачей сигналов и др.

По сравнению с iN-NGN2, культуры N-KYOU p5, помимо нейронов, содержали большое количество НСК и нейрональных предшественников разных стадий. Кроме того, была выявлена экспрессия различных астроглиальных и олигодендроцитарных генов, а также генов-маркеров некоторых других типов клеток, таких как фибробласты, эндотелиальные, сосудистые лептоменингальные клетки. Что еще раз подтверждает гетерогенность культур, полученных через стадию НСК.

В целом известно, что НСК, получаемые из ПСК с помощью метода с DUAL SMAD i , способны дать начало как нейрональному, так и глиальному дифференциям (Chambers et al., 2009; Perriot et al., 2018; Lam et al., 2019). На основе этого были

разработаны различные протоколы получения астроглии из таких НСК (Perriot et al., 2018; Shimbo et al., 2020). В нашем эксперименте мы направляли НСК в спонтанную дифференцировку, что позволило клеткам дифференцироваться в различном направлении: как в нейрональном, так в глиальном. Однако, имеются данные, что даже при направленной дифференцировке НСК в нейроны в культурах обнаруживаются глиальные клетки (Fujimori et al., 2017; Nilsson et al., 2021). В одном из исследований, направленном на получение дофаминергических нейронов, сообщалось, что полученные нейральные культуры, помимо дофаминергических нейронов и их непосредственных предшественников, содержали не только глиальные, но и сосудистые лептоменингальные клетки (Nilsson et al., 2021).

В iN-NGN2 же были обнаружены маркеры ИПСК и мезенхимальных стволовых клеток. Подобные нецелевые популяции клеток ранее уже обнаруживались в исследовании, где получали нейроны тем же подходом (Lin et al., 2021). А в другом исследовании были детектированы фибробласты (Schornig et al., 2021). В целом такие побочные не-нейральные фибробластоподобные типы клеток можно ожидать при дифференцировке ИПСК, полученных из фибробластов при помощи репрограммирования факторами плюрипотентности (Buckberry et al., 2023). При этом маркеры астроглиальных клеток в iN-NGN2 практически не экспрессировались, что также повторяет результаты других протоколов с индукцией экзогенной гиперэкспрессии *NGN2* (Chen et al., 2020; Lin et al., 2021; Schornig et al., 2021). В нейронах, полученных при помощи гиперэкспрессии *NGN2*, в качестве побочной линии возможно присутствие популяции нейральных стволовых клеток (Vainorius et al., 2023), однако в нашем протоколе добавление AraC способствует элиминации всех активно пролиферирующих клеток, в том числе НСК.

Также нейральные культуры iN-NGN2, в отличие от N-KYOU p5, демонстрировали повышенную экспрессию генов-маркеров холинергических и глутаматергических нейронов, однако экспрессия маркеров ГАМКергических

нейронов не наблюдалась. Интересно, что iN-NGN2 демонстрировали не только кортикальную судьбу, но и судьбу периферических сенсорных нейронов. Все эти результаты согласуются с данными литературы (Schuurmans et al., 2004; Nickolls et al., 2020), в том числе с данными, полученными при анализе транскриптомов единичных клеток нейральных культур, полученных с помощью гиперэкспрессии *NGN2* (Lin et al., 2021; Schornig et al., 2021). Напротив, в N-KYOU p5 экспрессировались некоторые маркеры ГАМКергических нейронов, что говорит о том, что для получения ГАМКергических нейронов протоколы на основе метода с DUAL SMAD_i являются более подходящими (Liu et al., 2013; Vigont et al., 2021).

Стоит отметить, что выбранный нами набор генов-маркеров не может в полной мере доказать присутствие тех или иных клеточных типов, поскольку зачастую клеточный тип характеризуется не одним-двумя маркерами, а целым набором генов, а также степенью их экспрессии. Причем некоторые из них могут маркировать и другие типы клеток тоже.

Тем не менее на основе полученных данных можно утверждать, что полученные нами культуры iN-NGN2 по сравнению с N-KYOU p5 являются более гомогенными. В нейральных культурах iN-NGN2 практически полностью отсутствуют клетки глиального типа, а также нейральные предшественники ранних стадий. Хотя в них возможно присутствие остаточных клеток-derivатов ИПСК, которые, по-видимому не пролиферируют, но могут оказывать влияние на данные транскриптомов.

Стоит отметить преимущества и недостатки каждого из подходов. К преимуществам подхода с DUAL SMAD ингибированием можно отнести простоту его исполнения: для получения НСК, а затем и нейронов, требуется только наличие малых молекул и некоторых других факторов (для поддержания пролиферации НСК, а также для направленной дифференцировки). Также данный подход имеет потенциал к получению более широкого спектра типов нейронов (а также глии), хотя для их реализации необходимо подобрать соответствующий протокол (Perriot et al., 2018; Nilsson et al., 2021; Vigont et al., 2021). Одним из главных недостатков

подхода с DUAL SMAD ингибированием является длительность получения терминально дифференцированных культур. Помимо того времени, что занимает индукция дифференцировки ИПСК в НСК, а также их культивирование, очевидно, что для получения зрелых нейронов требуется более длительное, чем 14 дней, культивирование (от 30 суток до года) (Lin et al., 2015; Nilsson et al., 2021; Dannert et al., 2023). Вторым существенным недостатком является значительная гетерогенность получаемых нейральных культур (Lam et al., 2019; Nilsson et al., 2021), при том, что среди всего получаемого клеточного разнообразия зрелые нейроны занимают лишь малую долю. Поэтому данный подход может не подойти для получения чистых культур определенного типа нейронов. Тем не менее, вероятно, существуют способы избавиться от нецелевых клеток в культуре путем добавления в протокол дополнительных этапов.

Основным преимуществом подхода индукции нейральной дифференцировки с помощью гиперэкспрессии *NGN2* является относительно короткие сроки получения нейронов. Кроме того, данный протокол позволяет получить более чистые культуры нейронов, которые содержат намного меньше нецелевых типов клеток. Однако индукция экспрессии одного лишь *NGN2* не позволяет получить такие типы нейронов, как ГАМКергические, серотонинергические и др., что является одним из недостатков данного подхода. Вторым значительным недостатком является наличие технических сложностей в выведении линии трансгенных ИПСК (с *NGN2* и системой TetON). Для данного подхода требуется наличие готовых лентивирусных конструкторов, что может быть доступно не для всех лабораторий. Кроме того, даже несмотря на селекцию трансдуцированных ИПСК с помощью селективных антибиотиков, часто некоторые клетки все равно «замалчивают» введенные трансгены. В результате не все клетки в получаемой культуре подвергаются *NGN2*-индуцированной дифференцировке под воздействием доксициклина.

Одним из решений замалчивания трансгенов является таргетная вставка генов интереса в так называемые *safe-harbor* локусы. *Safe-harbor* локусы обладают

повышенной генетической и эпигенетической стабильностью по сравнению с остальной частью генома, а потому позволяет сохранять вставленному в него трансгену более стабильную экспрессию (Sadelain et al., 2011). Однако такой подход требует использования системы редактирования генома CRISPR/Cas9, TALEN и др., что является непростой технологией, которая доступна далеко не всем лабораториям.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью данной диссертационной работы было изучение и сравнение двух разных подходов к дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в нейроны в условиях *in vitro*.

В ходе исследования протокола спонтанной нейральной дифференцировки НСК, полученных из ИПСК с помощью подхода с DUAL SMAD ингибированием, было показано, что получаемые таким образом нейральные культуры являются крайне гетерогенными и содержат не только нейроны различных типов, но и значительную долю нейральных стволовых клеток и предшественников разных стадий, а также различные глиальные и другие типы клеток. Гетерогенность таких нейральных культур была подтверждена как на уровне общего транскриптомного профиля, так и на уровне клеточных популяций при помощи анализа секвенирования РНК единичных клеток.

Было выявлено, что характер гетерогенности культур зависел как от исходной линии ИПСК, из которой были получены НСК, так и от длительности культивирования НСК. С помощью методов количественной ОТ-ПЦР и иммуноцитохимии мы продемонстрировали, что нейральные культуры, полученные из 4-х разных линий ИПСК различаются по экспрессии маркеров нейронов, глиальных клеток и НСК. На двух линиях нами было показано, что при долгосрочном культивировании НСК профиль их спонтанной дифференцировки в нейральном направлении изменяется. Причем, хотя транскриптомные профили нейральных культур от разных линий на одном и том же пассаже НСК являются разными, замечена общая тенденция их изменения с увеличением пассажа НСК. С помощью анализа секвенирования РНК единичных клеток на одной линии мы продемонстрировали, что с увеличением длительности культивирования НСК (с 5-го по 25-й пассаж) изменяется представленность некоторых клеточных популяций: наблюдается истощение астроглиальных популяций и обогащение некоторых популяций нейральных стволовых клеток.

Нами был оптимизирован и модифицирован протокол дифференцировки ИПСК в нейроны на основе подхода с лентивирусной доставкой трансгена *NGN2* в составе тетрациклин регулируемой системы TetON. На основе нового протокола мы разработали модель нейральных культур, экспрессирующих флуоресцентный кальциевый индикатор GCaMP6s. Такие *NGN2*-индуцированные нейральные культуры демонстрировали наличие потенциал-зависимых кальциевых каналов, а также повышение концентрации ионов кальция и натрия в ответ на добавление важнейшего возбуждающего нейромедиатора глутамата. Ответ на глутамат был опосредован ионотропными, но не метаботропными рецепторами. При этом основной приток кальция обеспечивали глутаматные рецепторы NMDA типа.

В результате анализа данных количественной ПЦР и общих транскриптомов было обнаружено, что нейральные культуры, полученные из одной и той же линии ИПСК, но с помощью разных подходов, значительно различаются. Сравнение показало, что нейральные культуры, полученные при помощи метода с DUAL SMAD ингибированием через стадию НСК (N-KYOU p5), являются более гетерогенными, по сравнению с нейральными культурами, полученными с помощью экзогенной гиперэкспрессии *NGN2* (iN-NGN2). Кроме того, среди всего клеточного разнообразия нейральной культуры N-KYOU p5 сами нейроны занимали лишь небольшую долю. По данным общих транскриптомов в N-KYOU p5, в отличие от iN-NGN2, была выявлена экспрессия маркеров НСК и промежуточных предшественников, глиальных клеток (в частности астроглии), а также других не-нейрональных типов клеток. Кроме того, в транскрипционном профиле этих нейральных культур различные процессы и пути, связанные с пролиферацией, клеточным циклом и эмбриогенезом, преобладали над нейрональными процессами. Транскрипционный профиль iN-NGN2, напротив, был обогащен различными процессами, связанными с химическими синапсами, нейрональной пластичностью, передачей сигналов и др. При этом по сравнению с N-KYOU p5 в iN-NGN2 уровень экспрессии маркеров зрелых нейронов был

значительно выше. Тем не менее в них вероятно наличие остаточных клеточных дериватов ИПСК.

Хотя в нейральных культурах, полученных разными подходами, среди нейронов преобладают кортикальные возбуждающие (глутаматергические) нейроны, остальные наблюдаемые в культурах минорные типы нейронов различны. Так, подход с DUAL SMAD ингибированием позволяет получать нейроны различной эргичности: ГАМКергические, серотонинергические и дофаминергические. В то же время в NGN2-индуцированных нейральных культурах экспрессия маркеров данных типов не выражена, однако детектируются маркеры, свидетельствующие о наличии холинергических нейронов, а кроме того, периферических сенсорных нейронов (неуточненной эргичности).

Опираясь на результаты данной работы можно утверждать, что каждый из двух исследованных подходов имеет свои преимущества и недостатки, которые стоит учитывать при выборе протокола получения нейронов из ИПСК.

7. ВЫВОДЫ

1. Нейральные культуры, спонтанно дифференцированные из НСК, получаемых из ИПСК с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием:

- Являются гетерогенными на уровне клеточных популяций, среди которых преобладают НСК и предшественники различных стадий.
- Соотношение клеточных типов в таких нейральных культурах зависит от изначальной линии ИПСК.
- Длительность культивирования НСК влияет на клеточный спектр получаемых из них нейральных культур

2. На модели NGN2-индуцированных нейральных культур, экспрессирующих генетически кодируемый кальциевый индикатор GCaMP6s, было показано, что данный протокол позволяет получать нейрофизиологически активные нейральные культуры, которые обладают функциональными ионотропными глутаматными рецепторами преимущественно NMDA-типа.

3. Нейральные культуры, полученные из одной и той же линии ИПСК, но при помощи разных подходов, значительно различаются по транскрипционному профилю, экзогенная гиперэкспрессия *NGN2* позволяет получать гомогенную культуру, содержащую значительную долю зрелых нейронов.

8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- А(П)ПК – астроцитарная промежуточная прогениторная клетка
 ДЭ – дифференциально экспрессированный (ген)
 ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
 ЛГБ, КГБ и МГБ – латеральный, каудальный и медиальный ганглионарные бугорки
 Н(П)ПК – нейрональная (промежуточная) прогениторная клетка
 НСК – нейральные стволовые клетки
 НЭ – нейроэпителий
 ОПК – олигодендроцитарная прогениторная клетка
 ППК – промежуточная прогениторная клетка
 ПСК – плюрипотентные стволовые клетки
 РГ – радиальная глия
 СВЗ – субвентрикулярная зона бокового желудочка
 СГЗ – субгранулярная зона зубчатой извилины гиппокампа
 ТФ – транскрипционный фактор
 ЦНС – центральная нервная система
 ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
 BDNF – нейротрофический фактор головного мозга
 BMP – костный морфогенетический белок
 DUAL SMAD_i – DUAL SMAD ингибирование – ингибирование двух путей SMAD сигналинга
 EGF – эпидермальный фактор роста,
 FGF2 – (основной) фактор роста фибробластов второго типа
 GCaMP – генетически кодируемый кальциевый индикатор на основе кальмодулина и зеленого флуоресцентного белка
 GSEA – анализ обогащения набора генов
 iN-NGN2 – NGN2 индуцированные нейральные культуры
 N- – нейральные культуры
 NGF – фактор роста нервов
 NGN2 – нейрогенин 2
 p – пассаж
 ROCK_i – ингибитор Pho-ассоциированной протеинкиназы,
 rtTA – reverse tetracycline-controlled transactivator – тетрациклин-зависимый белок-трансактиватор
 scRNA-seq – секвенирование РНК единичных клеток
 SMAD – семейство белков-преобразователей сигналов, которые опосредуют различные сигнальные пути
 TGFβ – трансформирующий ростовой фактор бета

9. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

9.1. Статьи

1. **Galiakberova A. A.**, Dashinimaev E. B. Neural Stem Cells and Methods for Their Generation From Induced Pluripotent Stem Cells in vitro // Front Cell Dev Biol. – 2020. – Vol. 8. – P. 815. **Q1, IF (SJR) = 5.882** (1,1/0,97)*
2. **Galiakberova A.A.**, Surin A.M., Bakaeva Z.V., Sharipov R.R., Zhang D., Dorovskoy D.A., Shakirova K.M., Fisenko A.P., Dashinimaev E.B. iPSC-Derived Human Neurons with GCaMP6s Expression Allow In Vitro Study of Neurophysiological Responses to Neurochemicals // Neurochem Res. – 2022. – Vol. 47, no 4. P. – 952-966. **Q1, IF (SJR) = 4.529** (0,825/0,74)
3. **Galiakberova A. A.**, Brovkina O. I., Kondratyev N. V., Artyuhov A. S., Momotyuk E. D., Kulmukhametova O. N., Lagunin A. A., Shilov B. V., Zadorozhny A. D., Zakharov I. S., Okorokova L. S., Golimbet V. E., Dashinimaev E. B. Different iPSC-derived neural stem cells shows various spectrums of spontaneous differentiation during long term cultivation // Frontiers in molecular neuroscience. – 2023. – Vol. 16. **Q2, IF (SJR) = 4.511** (0,99/0,68)
4. Степанов А. И., Путляева Л. В., Дидыч Д. А., **Галиакберова А. А.**, Гурская Н. Г., Лукьянов, К. А. Экспрессия фактора АТОН1 индуцирует быструю дифференцировку ИПСК в нейронном направлении // Вестник РГМУ. 2023. №5. С. 4–9. **Q4, IF (SJR) = 0.387** (0,33/0,35)

*В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.

9.2. Тезисы докладов

Галиакберова А.А., Сурин А.М., Бакаева З.В. Модель дифференцировки нейронов из ИПСК человека, экспрессирующих кальциевый индикатор GCaMP6s, для исследования нейрофизиологических процессов // Материалы Конференции молодых ученых «Актуальные проблемы биологии развития», 12-14 октября 2021 г., Москва, ИБР РАН. — М. Издательство Перо, 2021. — Москва: Москва, 2021. — С. 29–30.

Галиакберова А.А., Дашинимаев Э.Б. Разные линии нейральных стволовых клеток, полученные из человеческих ИПСК, демонстрируют различные спектры спонтанной дифференцировки в условиях длительного культивирования *in vitro* // сборник материалов конференции «StemCellBio-2023. Трансляционная медицина — спектр возможностей», 16-18 ноября 2023 г. Санкт Петербург, Спб. Издательство ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2023 — С. 85.

10. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aaku-Saraste E., Hellwig A., Huttner W. B. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis // *Dev Biol.* – 1996. – Vol. 180. № 2. – P. 664-679.
2. Adachi K., Mirzadeh Z., Sakaguchi M., Yamashita T., Nikolcheva T., Gotoh Y., Peltz G., Gong L., Kawase T., Alvarez-Buylla A., Okano H., Sawamoto K. Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25. № 11. – P. 2827-2836.
3. Akaike N., Hattori K., Oomura Y., Carpenter D. O. Bicuculline and picrotoxin block gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ conductance by different mechanisms // *Experientia.* – 1985. – Vol. 41. № 1. – P. 70-71.
4. Akimoto J., Itoh H., Miwa T., Ikeda K. Immunohistochemical study of glutamine synthetase expression in early glial development // *Brain Res Dev Brain Res.* – 1993. – Vol. 72. № 1. – P. 9-14.
5. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb // *J Comp Neurol.* – 1969. – Vol. 137. № 4. – P. 433-457.
6. Altman J., Das G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats // *J Comp Neurol.* – 1965. – Vol. 124. № 3. – P. 319-335.
7. Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J. M., Tramontin A. D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells // *Nature Rev. Neurosci.* – 2001. – Vol. 2. – P. 287–293.
8. Alvarez-Buylla A., Lim D. A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain // *Neuron.* – 2004. – Vol. 41. № 5. – P. 683-686.
9. Andersen J., Urban N., Achimastou A., Ito A., Simic M., Ullom K., Martynoga B., Lebel M., Goritz C., Frisen J., Nakafuku M., Guillemot F. A transcriptional

- mechanism integrating inputs from extracellular signals to activate hippocampal stem cells // *Neuron*. – 2014. – Vol. 83. № 5. – P. 1085-1097.
10. Artavanis-Tsakonas S., Rand M. D., Lake R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development // *Science*. – 1999. – Vol. 284. № 5415. – P. 770-776.
 11. Attwell P. J., Rahman S., Ivarsson M., Yeo C. H. Cerebellar cortical AMPA-kainate receptor blockade prevents performance of classically conditioned nictitating membrane responses // *J Neurosci*. – 1999. – Vol. 19. № 24. – P. RC45.
 12. Bahmad H., Hadadeh O., Chamaa F., Cheaito K., Darwish B., Makkawi A. K., Abou-Kheir W. Modeling Human Neurological and Neurodegenerative Diseases: From Induced Pluripotent Stem Cells to Neuronal Differentiation and Its Applications in Neurotrauma // *Front Mol Neurosci*. – 2017. – Vol. 10. – P. 50.
 13. Balordi F., Fishell G. Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons // *J Neurosci*. – 2007. – Vol. 27. № 22. – P. 5936-5947.
 14. Basak O., Giachino C., Fiorini E., Macdonald H. R., Taylor V. Neurogenic subventricular zone stem/progenitor cells are Notch1-dependent in their active but not quiescent state // *J Neurosci*. – 2012. – Vol. 32. № 16. – P. 5654-5666.
 15. Basak O., Taylor V. Stem cells of the adult mammalian brain and their niche // *Cell Mol Life Sci*. – 2009. – Vol. 66. № 6. – P. 1057-1072.
 16. Bayraktar O. A., Fuentealba L. C., Alvarez-Buylla A., Rowitch D. H. Astrocyte development and heterogeneity // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2014. – Vol. 7. № 1. – P. a020362.
 17. Bedard J. E., Haaning A. M., Ware S. M. Identification of a novel ZIC3 isoform and mutation screening in patients with heterotaxy and congenital heart disease // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. № 8. – P. e23755.
 18. Bel-Vialar S., Medevielle F., Pituello F. The on/off of Pax6 controls the tempo of neuronal differentiation in the developing spinal cord // *Dev Biol*. – 2007. – Vol. 305. № 2. – P. 659-673.

19. Ben-Arie N., Hassan B. A., Bermingham N. A., Malicki D. M., Armstrong D., Matzuk M., Bellen H. J., Zoghbi H. Y. Functional conservation of atonal and Math1 in the CNS and PNS // *Development*. – 2000. – Vol. 127. № 5. – P. 1039-1048.
20. Benchoua A., Lasbareilles M., Tournois J. Contribution of Human Pluripotent Stem Cell-Based Models to Drug Discovery for Neurological Disorders // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. № 12.
21. Bermingham N. A., Hassan B. A., Price S. D., Vollrath M. A., Ben-Arie N., Eatock R. A., Bellen H. J., Lysakowski A., Zoghbi H. Y. Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells // *Science*. – 1999. – Vol. 284. № 5421. – P. 1837-1841.
22. Bertrand N., Castro D. S., Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types // *Nat Rev Neurosci*. – 2002. – Vol. 3. № 7. – P. 517-530.
23. Bock C., Kiskinis E., Verstappen G., Gu H., Boulting G., Smith Z. D., Ziller M., Croft G. F., Amoroso M. W., Oakley D. H., Gnirke A., Eggan K., Meissner A. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines // *Cell*. – 2011. – Vol. 144. № 3. – P. 439-452.
24. Boldrini M., Fulmore C.A., Tartt A.N., Simeon L.R., Pavlova I., Poposka V., Rosoklija G.B., Stankov A., Arango V., Dwork A.J., Hen R., Mann J.J. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging // *Cell Stem Cell*. – 2018. – Vol. 22. № 4. – P. 589-599.
25. Bonaguidi M. A., Peng C. Y., McGuire T., Falciglia G., Gobeske K. T., Czeisler C., Kessler J. A. Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus // *J Neurosci*. – 2008. – Vol. 28. № 37. – P. 9194-9204.
26. Bordoni M., Rey F., Fantini V., Pansarasa O., Di Giulio A. M., Carelli S., Cereda C. From Neuronal Differentiation of iPSCs to 3D Neuro-Organoids: Modelling and Therapy of Neurodegenerative Diseases // *Int J Mol Sci*. – 2018. – Vol. 19. № 12.

27. Brazel C. Y., Nunez J. L., Yang Z., Levison S. W. Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone // *Neuroscience*. – 2005. – Vol. 131. № 1. – P. 55-65.
28. Brill M. S., Ninkovic J., Winpenny E., Hodge R. D., Ozen I., Yang R., Lepier A., Gascon S., Erdelyi F., Szabo G., Parras C., Guillemot F., Frotscher M., Berninger B., Hevner R. F., Raineteau O., Gotz M. Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons // *Nat Neurosci*. – 2009. – Vol. 12. № 12. – P. 1524-1533.
29. Britsch S., Goerich D. E., Riethmacher D., Peirano R. I., Rossner M., Nave K. A., Birchmeier C., Wegner M. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development // *Genes Dev*. – 2001. – Vol. 15. № 1. – P. 66-78.
30. Brittain M. K., Brustovetsky T., Sheets P. L., Brittain J. M., Khanna R., Cummins T. R., Brustovetsky N. Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse Na⁺/Ca²⁺ exchanger // *Neurobiol Dis*. – 2012. – Vol. 46. № 1. – P. 109-117.
31. Brustovetsky N., Dubinsky J. M. Dual responses of CNS mitochondria to elevated calcium // *J Neurosci*. – 2000. – Vol. 20. № 1. – P. 103-113.
32. Buckberry S., Liu X., Poppe D., Tan J. P., Sun G., Chen J., Nguyen T. V., de Mendoza A., Pflueger J., Frazer T., Vargas-Landin D. B., Paynter J. M., Smits N., Liu N., Ouyang J. F., Rossello F. J., Chy H. S., Rackham O. J. L., Laslett A. L., Breen J., Faulkner G. J., Nefzger C. M., Polo J. M., Lister R. Transient naive reprogramming corrects hiPS cells functionally and epigenetically // *Nature*. – 2023. – Vol. 620. № 7975. – P. 863-872.
33. Busskamp V., Lewis N. E., Guye P., Ng A. H., Shipman S. L., Byrne S. M., Sanjana N. E., Murn J., Li Y., Li S., Stadler M., Weiss R., Church G. M. Rapid neurogenesis through transcriptional activation in human stem cells // *Mol Syst Biol*. – 2014. – Vol. 10. № 11. – P. 760.
34. Cai N., Kurachi M., Shibasaki K., Okano-Uchida T., Ishizaki Y. CD44-positive cells are candidates for astrocyte precursor cells in developing mouse cerebellum // *Cerebellum*. – 2012. – Vol. 11. № 1. – P. 181-193.

35. Calzolari F., Michel J., Baumgart E. V., Theis F., Gotz M., Ninkovic J. Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone // *Nat Neurosci.* – 2015. – Vol. 18. № 4. – P. 490-492.
36. Camus A., Perea-Gomez A., Moreau A., Collignon J. Absence of Nodal signaling promotes precocious neural differentiation in the mouse embryo // *Dev Biol.* – 2006. – Vol. 295. № 2. – P. 743-755.
37. Castro D. S., Martynoga B., Parras C., Ramesh V., Pacary E., Johnston C., Drechsel D., Lebel-Potter M., Garcia L. G., Hunt C., Dolle D., Bithell A., Ettwiller L., Buckley N., Guillemot F. A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets // *Genes Dev.* – 2011. – Vol. 25. № 9. – P. 930-945.
38. Chambers S. M., Fasano C. A., Papapetrou E. P., Tomishima M., Sadelain M., Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling // *Nat Biotechnol.* – 2009. – Vol. 27. № 3. – P. 275-280.
39. Chanda S., Ang C. E., Davila J., Pak C., Mall M., Lee Q. Y., Ahlenius H., Jung S. W., Sudhof T. C., Wernig M. Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor *ASCL1* // *Stem Cell Reports.* – 2014. – Vol. 3. № 2. – P. 282-296.
40. Chen M., Maimaitili M., Habekost M., Gill K. P., Mermet-Joret N., Nabavi S., Febbraro F., Denham M. Rapid generation of regionally specified CNS neurons by sequential patterning and conversion of human induced pluripotent stem cells // *Stem Cell Res.* – 2020. – Vol. 48. – P. 101945.
41. Chen T. W., Wardill T. J., Sun Y., Pulver S. R., Renninger S. L., Baohan A., Schreiter E. R., Kerr R. A., Orger M. B., Jayaraman V., Looger L. L., Svoboda K., Kim D. S. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity // *Nature.* – 2013. – Vol. 499. № 7458. – P. 295-300.
42. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease // *Cell.* – 2006. – Vol. 127. № 3. – P. 469-480.

43. Colak D., Mori T., Brill M. S., Pfeifer A., Falk S., Deng C., Monteiro R., Mummery C., Sommer L., Gotz M. Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells // *J Neurosci.* – 2008. – Vol. 28. № 2. – P. 434-446.
44. Cuny G. D., Yu P. B., Laha J. K., Xing X., Liu J. F., Lai C. S., Deng D. Y., Sachidanandan C., Bloch K. D., Peterson R. T. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2008. – Vol. 18. № 15. – P. 4388-4392.
45. Dahmane N., Ruiz i Altaba A. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum // *Development.* – 1999. – Vol. 126. № 14. – P. 3089-3100.
46. Dannert A., Klimmt J., Cardoso Goncalves C., Crusius D., Paquet D. Reproducible and scalable differentiation of highly pure cortical neurons from human induced pluripotent stem cells // *STAR Protoc.* – 2023. – Vol. 4. № 2. – P. 102266.
47. Dashinimaev E. B., Artyuhov A. S., Bolshakov A. P., Vorotelyak E. A., Vasiliev A. V. Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells of Patients with Down Syndrome Reproduce Early Stages of Alzheimer's Disease Type Pathology in vitro // *J Alzheimers Dis.* – 2017. – Vol. 56. № 2. – P. 835-847.
48. Davis R. L., Weintraub H., Lassar A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts // *Cell.* – 1987. – Vol. 51. № 6. – P. 987-1000.
49. de Rus Jacquet A., Denis H. L., Cicchetti F., Alpaugh M. Current and future applications of induced pluripotent stem cell-based models to study pathological proteins in neurodegenerative disorders // *Mol Psychiatry.* – 2021. – Vol. 26. № 7. – P. 2685-2706.
50. deAzevedo L. C., Fallet C., Moura-Neto V., Dumas-Duport C., Hedin-Pereira C., Lent R. Cortical radial glial cells in human fetuses: depth-correlated transformation into astrocytes // *J Neurobiol.* – 2003. – Vol. 55. № 3. – P. 288-298.
51. Delgado R. N., Lim D. A. Embryonic Nkx2.1-expressing neural precursor cells contribute to the regional heterogeneity of adult V-SVZ neural stem cells // *Dev Biol.* – 2015. – Vol. 407. № 2. – P. 265-274.

52. Desai A. R., McConnell S. K. Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development // *Development*. – 2000. – Vol. 127. № 13. – P. 2863-2872.
53. Dimou L., Gotz M. Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain // *Physiol Rev*. – 2014. – Vol. 94. № 3. – P. 709-737.
54. Doetsch F., Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. – Vol. 93. № 25. – P. 14895-14900.
55. Doetsch F., Caille I., Lim D. A., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // *Cell*. – 1999. – Vol. 97. № 6. – P. 703-716.
56. Doetsch F., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain // *J Neurosci*. – 1997. – Vol. 17. № 13. – P. 5046-5061.
57. Doi A., Park I. H., Wen B., Murakami P., Aryee M. J., Irizarry R., Herb B., Ladd-Acosta C., Rho J., Loewer S., Miller J., Schlaeger T., Daley G. Q., Feinberg A. P. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts // *Nat Genet*. – 2009. – Vol. 41. № 12. – P. 1350-1353.
58. Drago J., Murphy M., Carroll S. M., Harvey R. P., Bartlett P. F. Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1991. – Vol. 88. № 6. – P. 2199-2203.
59. Dzwonek J., Wilczynski G. M. CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system // *Front Cell Neurosci*. – 2015. – Vol. 9. – P. 175.
60. Eiraku M., Watanabe K., Matsuo-Takasaki M., Kawada M., Yonemura S., Matsumura M., Wataya T., Nishiyama A., Muguruma K., Sasai Y. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals // *Cell Stem Cell*. – 2008. – Vol. 3. № 5. – P. 519-532.

61. Ellis P., Fagan B. M., Magness S. T., Hutton S., Taranova O., Hayashi S., McMahon A., Rao M., Pevny L. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult // *Dev Neurosci.* – 2004. – Vol. 26. № 2-4. – P. 148-165.
62. Elmslie K. S., Yoshikami D. Effects of kynurenate on root potentials evoked by synaptic activity and amino acids in the frog spinal cord // *Brain Res.* – 1985. – Vol. 330. № 2. – P. 265-272.
63. Evans M. J., Kaufman M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature.* – 1981. – Vol. 292. № 5819. – P. 154-156.
64. Farah M. H., Olson J. M., Sucic H. B., Hume R. I., Tapscott S. J., Turner D. L. Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells // *Development.* – 2000. – Vol. 127. № 4. – P. 693-702.
65. Favaro R., Valotta M., Ferri A. L., Latorre E., Mariani J., Giachino C., Lancini C., Tosetti V., Ottolenghi S., Taylor V., Nicolis S. K. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh // *Nat Neurosci.* – 2009. – Vol. 12. № 10. – P. 1248-1256.
66. Fedorova V., Vanova T., Elrefae L., Pospisil J., Petrasova M., Kolajova V., Hudacova Z., Baniariova J., Barak M., Peskova L., Barta T., Kaucka M., Killinger M., Vecera J., Bernatik O., Cajanek L., Hribkova H., Bohaciakova D. Differentiation of neural rosettes from human pluripotent stem cells in vitro is sequentially regulated on a molecular level and accomplished by the mechanism reminiscent of secondary neurulation // *Stem Cell Res.* – 2019. – Vol. 40. – P. 101563.
67. Feng W., Khan M. A., Bellvis P., Zhu Z., Bernhardt O., Herold-Mende C., Liu H. K. The chromatin remodeler CHD7 regulates adult neurogenesis via activation of SoxC transcription factors // *Cell Stem Cell.* – 2013. – Vol. 13. № 1. – P. 62-72.
68. Ferri A. L., Cavallaro M., Braida D., Di Cristofano A., Canta A., Vezzani A., Ottolenghi S., Pandolfi P. P., Sala M., DeBiasi S., Nicolis S. K. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain // *Development.* – 2004. – Vol. 131. № 15. – P. 3805-3819.

69. Filippov V., Kronenberg G., Pivneva T., Reuter K., Steiner B., Wang L. P., Yamaguchi M., Kettenmann H., Kempermann G. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes // *Mol Cell Neurosci.* – 2003. – Vol. 23. № 3. – P. 373-382.
70. Ford E., Pearlman J., Ruan T., Manion J., Waller M., Neely G. G., Caron L. Human Pluripotent Stem Cells-Based Therapies for Neurodegenerative Diseases: Current Status and Challenges // *Cells.* – 2020. – Vol. 9. № 11.
71. Forostyak O., Romanyuk N., Verkhratsky A., Sykova E., Dayanithi G. Plasticity of calcium signaling cascades in human embryonic stem cell-derived neural precursors // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol. 22. – P. 1506–1521.
72. Francis F., Koulakoff A., Boucher D., Chafey P., Schaar B., Vinet M. C., Friocourt G., McDonnell N., Reiner O., Kahn A., McConnell S. K., Berwald-Netter Y., Denoulet P., Chelly J. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons // *Neuron.* – 1999. – Vol. 23. № 2. – P. 247-256.
73. Frega M., van Gestel S. H., Linda K., van der Raadt J., Keller J., Van Rhijn J. R., Schubert D., Albers C. A., Nadif Kasri N. Rapid Neuronal Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells for Measuring Network Activity on Micro-electrode Arrays // *J Vis Exp.* – 2017. № 119.
74. Fu Y., Yang M., Yu H., Wang Y., Wu X., Yong J., Mao Y., Cui Y., Fan X., Wen L., Qiao J., Tang F. Heterogeneity of glial progenitor cells during the neurogenesis-to-gliogenesis switch in the developing human cerebral cortex // *Cell Rep.* – 2021. – Vol. 34. № 9. – P. 108788.
75. Fujimori K., Matsumoto T., Kisa F., Hattori N., Okano H., Akamatsu W. Escape from Pluripotency via Inhibition of TGF-beta/BMP and Activation of Wnt Signaling Accelerates Differentiation and Aging in hPSC Progeny Cells // *Stem Cell Reports.* – 2017. – Vol. 9. № 5. – P. 1675-1691.

76. Galichet C., Guillemot F., Parras C. M. Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus // *Development*. – 2008. – Vol. 135. № 11. – P. 2031-2041.
77. Gamez B., Rodriguez-Carballo E., Ventura F. BMP signaling in telencephalic neural cell specification and maturation // *Front Cell Neurosci*. – 2013. – Vol. 7. – P. 87.
78. Gan Q., Lee A., Suzuki R., Yamagami T., Stokes A., Nguyen B. C., Pleasure D., Wang J., Chen H. W., Zhou C. J. Pax6 mediates ss-catenin signaling for self-renewal and neurogenesis by neocortical radial glial stem cells // *Stem Cells*. – 2014. – Vol. 32. № 1. – P. 45-58.
79. Gao Z., Ure K., Ding P., Nashaat M., Yuan L., Ma J., Hammer R. E., Hsieh J. The master negative regulator REST/NRSF controls adult neurogenesis by restraining the neurogenic program in quiescent stem cells // *J Neurosci*. – 2011. – Vol. 31. № 26. – P. 9772-9786.
80. Garitaonandia I., Gonzalez R., Christiansen-Weber T., Abramihina T., Poustovoitov M., Noskov A., Sherman G., Semechkin A., Snyder E., Kern R. Neural Stem Cell Tumorigenicity and Biodistribution Assessment for Phase I Clinical Trial in Parkinson's Disease // *Sci Rep*. – 2016. – Vol. 6. – P. 34478.
81. Garone M. G., de Turris V., Soloperto A., Brighi C., De Santis R., Pagani F., Di Angelantonio S., Rosa A. Conversion of Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) into Functional Spinal and Cranial Motor Neurons Using PiggyBac Vectors // *J Vis Exp*. – 2019. № 147.
82. Giffin-Rao Y., Sheng J., Strand B., Xu K., Huang L., Medo M., Risgaard K. A., Dantine S., Mohan S., Keshan A., Daley R. A., Jr., Levesque B., Amundson L., Reese R., Sousa A. M. M., Tao Y., Wang D., Zhang S. C., Bhattacharyya A. Altered patterning of trisomy 21 interneuron progenitors // *Stem Cell Reports*. – 2022. – Vol. 17. № 6. – P. 1366-1379.
83. Godoy P., Schmidt-Heck W., Hellwig B., Nell P., Feuerborn D., Rahnenfuhrer J., Kattler K., Walter J., Bluthgen N., Hengstler J. G. Assessment of stem cell

- differentiation based on genome-wide expression profiles // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2018. – Vol. 373. № 1750.
84. Gomez-Pinilla F., Lee J. W., Cotman C. W. Distribution of basic fibroblast growth factor in the developing rat brain // *Neuroscience.* – 1994. – Vol. 61. № 4. – P. 911-923.
85. Goncalves J. T., Schafer S. T., Gage F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior // *Cell.* – 2016. – Vol. 167. № 4. – P. 897-914.
86. Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Muller G., Hillen W., Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells // *Science.* – 1995. – Vol. 268. № 5218. – P. 1766-1769.
87. Gotz M., Hartfuss E., Malatesta P. Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice // *Brain Res Bull.* – 2002. – Vol. 57. № 6. – P. 777-788.
88. Gotz M., Stoykova A., Gruss P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex // *Neuron.* – 1998. – Vol. 21. № 5. – P. 1031-1044.
89. Graham V., Khudyakov J., Ellis P., Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity // *Neuron.* – 2003. – Vol. 39. № 5. – P. 749-765.
90. Grelat A., Benoit L., Wagner S., Moigneu C., Lledo P. M., Alonso M. Adult-born neurons boost odor-reward association // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2018. – Vol. 115. № 10. – P. 2514-2519.
91. Gritti A., Parati E. A., Cova L., Frolichsthal P., Galli R., Wanke E., Faravelli L., Morassutti D. J., Roisen F., Nickel D. D., Vescovi A. L. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor // *J Neurosci.* – 1996. – Vol. 16. № 3. – P. 1091-1100.
92. Hanna J. H., Saha K., Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues // *Cell.* – 2010. – Vol. 143. № 4. – P. 508-525.
93. Hartfuss E., Galli R., Heins N., Gotz M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia // *Dev Biol.* – 2001. – Vol. 229. № 1. – P. 15-30.

94. Haubensak W., Attardo A., Denk W., Huttner W. B. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – Vol. 101. № 9. – P. 3196-3201.
95. Hegarty S. V., O'Keefe G. W., Sullivan A. M. BMP-Smad 1/5/8 signalling in the development of the nervous system // *Prog Neurobiol.* – 2013. – Vol. 109. – P. 28-41.
96. Heldin C. H., Miyazono K., ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins // *Nature.* – 1997. – Vol. 390. № 6659. – P. 465-471.
97. Herman G. E., El-Hodiri H. M. The role of ZIC3 in vertebrate development // *Cytogenet Genome Res.* – 2002. – Vol. 99. № 1-4. – P. 229-235.
98. Hevner R. F., Shi L., Justice N., Hsueh Y., Sheng M., Smiga S., Bulfone A., Goffinet A. M., Campagnoni A. T., Rubenstein J. L. Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6 // *Neuron.* – 2001. – Vol. 29. № 2. – P. 353-366.
99. Hindley C., Ali F., McDowell G., Cheng K., Jones A., Guillemot F., Philpott A. Post-translational modification of Ngn2 differentially affects transcription of distinct targets to regulate the balance between progenitor maintenance and differentiation // *Development.* – 2012. – Vol. 139. № 10. – P. 1718-1723.
100. Hirabayashi Y., Itoh Y., Tabata H., Nakajima K., Akiyama T., Masuyama N., Gotoh Y. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells // *Development.* – 2004. – Vol. 131. № 12. – P. 2791-2801.
101. Hochstim C., Deneen B., Lukaszewicz A., Zhou Q., Anderson D. J. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code // *Cell.* – 2008. – Vol. 133. № 3. – P. 510-522.
102. Hu B. Y., Weick J. P., Yu J., Ma L. X., Zhang X. Q., Thomson J. A., Zhang S. C. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – Vol. 107. № 9. – P. 4335-4340.

103. Hulme A. J., Maksour S., St-Clair Glover M., Miellet S., Dottori M. Making neurons, made easy: The use of Neurogenin-2 in neuronal differentiation // *Stem Cell Reports*. – 2022. – Vol. 17. № 1. – P. 14-34.
104. Huttner W. B., Brand M. Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells // *Curr Opin Neurobiol*. – 1997. – Vol. 7. № 1. – P. 29-39.
105. Imaizumi K., Okano H. Modeling neurodevelopment in a dish with pluripotent stem cells // *Dev Growth Differ*. – 2021. – Vol. 63. № 1. – P. 18-25.
106. Imayoshi I., Isomura A., Harima Y., Kawaguchi K., Kori H., Miyachi H., Fujiwara T., Ishidate F., Kageyama R. Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors // *Science*. – 2013. – Vol. 342. № 6163. – P. 1203-1208.
107. Imayoshi I., Sakamoto M., Ohtsuka T., Takao K., Miyakawa T., Yamaguchi M., Mori K., Ikeda T., Itohara S., Kageyama R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain // *Nat Neurosci*. – 2008. – Vol. 11. № 10. – P. 1153-1161.
108. Imayoshi I., Sakamoto M., Yamaguchi M., Mori K., Kageyama R. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains // *J Neurosci*. – 2010. – Vol. 30. № 9. – P. 3489-3498.
109. Inman G. J., Nicolas F. J., Callahan J. F., Harling J. D., Gaster L. M., Reith A. D., Laping N. J., Hill C. S. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7 // *Mol Pharmacol*. – 2002. – Vol. 62. № 1. – P. 65-74.
110. James D., Levine A. J., Besser D., Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells // *Development*. – 2005. – Vol. 132. № 6. – P. 1273-1282.
111. Jiang M., Yu D., Xie B., Huang H., Lu W., Qiu M., Dai Z. M. WNT signaling suppresses oligodendrogenesis via Ngn2-dependent direct inhibition of Olig2 expression // *Mol Brain*. – 2020. – Vol. 13. № 1. – P. 155.

112. Jo A. Y., Park C. H., Aizawa S., Lee S. H. Contrasting and brain region-specific roles of neurogenin2 and mash1 in GABAergic neuron differentiation in vitro // *Exp Cell Res.* – 2007. – Vol. 313. № 19. – P. 4066-4081.
113. Jones C. M., Kuehn M. R., Hogan B. L., Smith J. C., Wright C. V. Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation // *Development.* – 1995. – Vol. 121. № 11. – P. 3651-3662.
114. Kageyama R., Ohtsuka T., Kobayashi T. Roles of Hes genes in neural development // *Dev Growth Differ.* – 2008a. – Vol. 50 Suppl 1. – P. S97-103.
115. Kageyama R., Ohtsuka T., Shimojo H., Imayoshi I. Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition // *Nat Neurosci.* – 2008b. – Vol. 11. № 11. – P. 1247-1251.
116. Kajiwara M., Aoi T., Okita K., Takahashi R., Inoue H., Takayama N., Endo H., Eto K., Toguchida J., Uemoto S., Yamanaka S. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – Vol. 109. № 31. – P. 12538-12543.
117. Kalcheim C., Neufeld G. Expression of basic fibroblast growth factor in the nervous system of early avian embryos // *Development.* – 1990. – Vol. 109. № 1. – P. 203-215.
118. Karagiannis P., Takahashi K., Saito M., Yoshida Y., Okita K., Watanabe A., Inoue H., Yamashita J. K., Todani M., Nakagawa M., Osawa M., Yashiro Y., Yamanaka S., Osafune K. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development // *Physiol Rev.* – 2019. – Vol. 99. № 1. – P. 79-114.
119. Kasai M., Satoh K., Akiyama T. Wnt signaling regulates the sequential onset of neurogenesis and gliogenesis via induction of BMPs // *Genes Cells.* – 2005. – Vol. 10. № 8. – P. 777-783.
120. Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S., Kaneko S., Kuwana Y., Nakanishi S., Nishikawa SI, Sasai Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity // *Neuron.* – 2000. – Vol. 28. – P. 31–40.

121. Kazanis I., Lathia J. D., Vadakkan T. J., Raborn E., Wan R., Mughal M. R., Eckley D. M., Sasaki T., Patton B., Mattson M. P., Hirschi K. K., Dickinson M. E., French-Constant C. Quiescence and activation of stem and precursor cell populations in the subependymal zone of the mammalian brain are associated with distinct cellular and extracellular matrix signals // *J Neurosci.* – 2010. – Vol. 30. № 29. – P. 9771-9781.
122. Kele J., Simplicio N., Ferri A. L., Mira H., Guillemot F., Arenas E., Ang S. L. Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons // *Development.* – 2006. – Vol. 133. № 3. – P. 495-505.
123. Kempermann G., Kuhn H. G., Gage F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment // *Nature.* – 1997. – Vol. 386. № 6624. – P. 493-495.
124. Kessar N., Fogarty M., Iannarelli P., Grist M., Wegner M., Richardson W. D. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage // *Nat Neurosci.* – 2006. – Vol. 9. № 2. – P. 173-179.
125. Khatri P., Sirota M., Butte A. J. Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges // *PLoS Comput Biol.* – 2012. – Vol. 8. № 2. – P. e1002375.
126. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones // *Prog Biophys Mol Biol.* – 2004. – Vol. 86. № 2. – P. 279-351.
127. Kiedrowski L. Critical role of sodium in cytosolic [Ca²⁺] elevations in cultured hippocampal CA1 neurons during anoxic depolarization // *J Neurochem.* – 2007. – Vol. 100. № 4. – P. 915-923.
128. Kim J. E., O'Sullivan M. L., Sanchez C. A., Hwang M., Israel M. A., Brennand K., Deerinck T. J., Goldstein L. S., Gage F. H., Ellisman M. H., Ghosh A. Investigating synapse formation and function using human pluripotent stem cell-derived neurons // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – Vol. 108. № 7. – P. 3005-3010.

129. Kim K., Doi A., Wen B., Ng K., Zhao R., Cahan P., Kim J., Aryee M. J., Ji H., Ehrlich L. I., Yabuuchi A., Takeuchi A., Cunniff K. C., Hongguang H., McKinney-Freeman S., Naveiras O., Yoon T. J., Irizarry R. A., Jung N., Seita J., Hanna J., Murakami P., Jaenisch R., Weissleder R., Orkin S. H., Weissman I. L., Feinberg A. P., Daley G. Q. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells // *Nature*. – 2010. – Vol. 467. № 7313. – P. 285-290.
130. Klisch T. J., Xi Y., Flora A., Wang L., Li W., Zoghbi H. Y. In vivo Atoh1 targetome reveals how a proneural transcription factor regulates cerebellar development // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – Vol. 108. № 8. – P. 3288-3293.
131. Knobloch M., Pilz G. A., Ghesquiere B., Kovacs W. J., Wegleiter T., Moore D. L., Hruzova M., Zamboni N., Carmeliet P., Jessberger S. A Fatty Acid Oxidation-Dependent Metabolic Shift Regulates Adult Neural Stem Cell Activity // *Cell Rep*. – 2017. – Vol. 20. № 9. – P. 2144-2155.
132. Koch P., Opitz T., Steinbeck J. A., Ladewig J., Brustle O. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2009. – Vol. 106. № 9. – P. 3225-3230.
133. Kowalczyk T., Pontious A., Englund C., Daza R. A., Bedogni F., Hodge R., Attardo A., Bell C., Huttner W. B., Hevner R. F. Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex // *Cereb Cortex*. – 2009. – Vol. 19. № 10. – P. 2439-2450.
134. Koyanagi-Aoi M., Ohnuki M., Takahashi K., Okita K., Noma H., Sawamura Y., Teramoto I., Narita M., Sato Y., Ichisaka T., Amano N., Watanabe A., Morizane A., Yamada Y., Sato T., Takahashi J., Yamanaka S. Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2013. – Vol. 110. № 51. – P. 20569-20574.
135. Kucukdereli H., Allen N.J., Lee A.T., Feng A., Ozlu M.I., Conatser L.M., Chakraborty C., Workman G., Weaver M., Sage E.H., Barres B.A., Eroglu C.

- Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – Vol. 108. № 32. – P. 440-449.
136. Kunath T., Saba-El-Leil M. K., Almousaillekh M., Wray J., Meloche S., Smith A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment // *Development.* – 2007. – Vol. 134. № 16. – P. 2895-2902.
137. Kuwabara T., Hsieh J., Muotri A., Yeo G., Warashina M., Lie D. C., Moore L., Nakashima K., Asashima M., Gage F. H. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis // *Nat Neurosci.* – 2009. – Vol. 12. № 9. – P. 1097-1105.
138. Lacinova L. Voltage-dependent calcium channels // *Gen Physiol Biophys.* – 2005. – Vol. 24 Suppl 1. – P. 1-78.
139. Lai K., Kaspar B. K., Gage F. H., Schaffer D. V. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo // *Nat Neurosci.* – 2003. – Vol. 6. № 1. – P. 21-27.
140. Lam M., Sanosaka T., Lundin A., Imaizumi K., Etal D., Karlsson F. H., Clausen M., Cairns J., Hicks R., Kohyama J., Kele M., Okano H., Falk A. Single-cell study of neural stem cells derived from human iPSCs reveals distinct progenitor populations with neurogenic and gliogenic potential // *Genes Cells.* – 2019. – Vol. 24. № 12. – P. 836-847.
141. Lattke M., Guillemot F. Understanding astrocyte differentiation: Clinical relevance, technical challenges, and new opportunities in the omics era // *WIREs Mech Dis.* – 2022. – Vol. 14. № 5. – P. e1557.
142. Lau A., Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration // *Pflugers Arch.* – 2010. – Vol. 460. № 2. – P. 525-542.
143. Li S., Mattar P., Zinyk D., Singh K., Chaturvedi C. P., Kovach C., Dixit R., Kurrasch D. M., Ma Y. C., Chan J. A., Wallace V., Dilworth F. J., Brand M., Schuurmans C. GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex // *J Neurosci.* – 2012. – Vol. 32. № 23. – P. 7791-7805.

144. Li W., Sun W., Zhang Y., Wei W., Ambasudhan R., Xia P., Talantova M., Lin T., Kim J., Wang X., Kim W. R., Lipton S. A., Zhang K., Ding S. Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – Vol. 108. – P. 8299–8304.
145. Lie D. C., Colamarino S. A., Song H. J., Desire L., Mira H., Consiglio A., Lein E. S., Jessberger S., Lansford H., Dearie A. R., Gage F. H. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis // *Nature.* – 2005. – Vol. 437. № 7063. – P. 1370-1375.
146. Liem K. F., Jr., Tremml G., Roelink H., Jessell T. M. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm // *Cell.* – 1995. – Vol. 82. № 6. – P. 969-979.
147. Lim D.A., Tramontin A.D., Trevejo J.M., Herrera D.G., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis // *Neuron.* – 2000. – Vol. 28. № 3. – P. 713-726.
148. Lim L. S., Loh Y. H., Zhang W., Li Y., Chen X., Wang Y., Bakre M., Ng H. H., Stanton L. W. Zic3 is required for maintenance of pluripotency in embryonic stem cells // *Mol Biol Cell.* – 2007. – Vol. 18. № 4. – P. 1348-1358.
149. Lin H. C., He Z., Ebert S., Schornig M., Santel M., Nikolova M. T., Weigert A., Hevers W., Kasri N. N., Taverna E., Camp J. G., Treutlein B. NGN2 induces diverse neuron types from human pluripotency // *Stem Cell Reports.* – 2021. – Vol. 16. № 9. – P. 2118-2127.
150. Lin L., Yuan J., Sander B., Golas M. M. In Vitro Differentiation of Human Neural Progenitor Cells Into Striatal GABAergic Neurons // *Stem Cells Transl Med.* – 2015. – Vol. 4. № 7. – P. 775-788.
151. Lindsell C. E., Boulter J., diSibio G., Gossler A., Weinmaster G. Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development // *Mol Cell Neurosci.* – 1996. – Vol. 8. № 1. – P. 14-27.

152. Linnerbauer M., Löblein L., Farrenkopf D., Vandrey O., Tsaktanis T., Naumann U., Rothhammer V. Astrocyte-Derived Pleiotrophin Mitigates Late-Stage Autoimmune CNS Inflammation // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 12. – P. 800128.
153. Liu A., Niswander L. A. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development // *Nat Rev Neurosci.* – 2005. – Vol. 6. № 12. – P. 945-954.
154. Liu J., Wu X., Lu Q. Molecular divergence of mammalian astrocyte progenitor cells at early gliogenesis // *Development.* – 2022. – Vol. 149. № 5.
155. Liu Y., Han S. S., Wu Y., Tuohy T. M., Xue H., Cai J., Back S. A., Sherman L. S., Fischer I., Rao M. S. CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells // *Dev Biol.* – 2004. – Vol. 276. № 1. – P. 31-46.
156. Liu Y., Liu H., Sauvey C., Yao L., Zarnowska E. D., Zhang S. C. Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells // *Nat Protoc.* – 2013. – Vol. 8. № 9. – P. 1670-1679.
157. Llorens-Bobadilla E., Zhao S., Baser A., Saiz-Castro G., Zwadlo K., Martin-Villalba A. Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury // *Cell Stem Cell.* – 2015. – Vol. 17. № 3. – P. 329-340.
158. Lois C., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors // *Science.* – 1996. – Vol. 271. № 5251. – P. 978-981.
159. Lois C., Hong E. J., Pease S., Brown E. J., Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors // *Science.* – 2002. – Vol. 295. № 5556. – P. 868-872.
160. Lund C., Yellapragada V., Vuoristo S., Balboa D., Trova S., Allet C., Eskici N., Pulli K., Giacobini P., Tuuri T., Raivio T. Characterization of the human GnRH neuron developmental transcriptome using a GNRH1-TdTomato reporter line in human pluripotent stem cells // *Dis Model Mech.* – 2020. – Vol. 13. № 3.
161. Ma H., Morey R., O'Neil R. C., He Y., Daughtry B., Schultz M. D., Hariharan M., Nery J. R., Castanon R., Sabatini K., Thiagarajan R. D., Tachibana

- M., Kang E., Tippner-Hedges R., Ahmed R., Gutierrez N. M., Van Dyken C., Polat A., Sugawara A., Sparman M., Gokhale S., Amato P., Wolf D. P., Ecker J. R., Laurent L. C., Mitalipov S. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms // *Nature*. – 2014. – Vol. 511. № 7508. – P. 177-183.
162. MacDonald B. T., Tamai K., He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases // *Dev Cell*. – 2009. – Vol. 17. № 1. – P. 9-26.
163. Machold R., Hayashi S., Rutlin M., Muzumdar M. D., Nery S., Corbin J. G., Gritli-Linde A., Dellovade T., Porter J. A., Rubin L. L., Dudek H., McMahon A. P., Fishell G. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches // *Neuron*. – 2003. – Vol. 39. № 6. – P. 937-950.
164. Madsen U., Stensbol T. B., Krogsgaard-Larsen P. Inhibitors of AMPA and kainate receptors // *Curr Med Chem*. – 2001. – Vol. 8. № 11. – P. 1291-1301.
165. Malatesta P., Appolloni I., Calzolari F. Radial glia and neural stem cells // *Cell Tissue Res*. – 2008. – Vol. 331. № 1. – P. 165-178.
166. Malatesta P., Hack M. A., Hartfuss E., Kettenmann H., Klinkert W., Kirchhoff F., Gotz M. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate // *Neuron*. – 2003. – Vol. 37. № 5. – P. 751-764.
167. Malatesta P., Hartfuss E., Gotz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage // *Development*. – 2000. – Vol. 127. № 24. – P. 5253-5263.
168. Mariani J., Simonini M. V., Palejev D., Tomasini L., Coppola G., Szekely A. M., Horvath T. L., Vaccarino F. M. Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – Vol. 109. № 31. – P. 12770-12775.
169. Martynoga B., Mateo J. L., Zhou B., Andersen J., Achimastou A., Urban N., van den Berg D., Georgopoulou D., Hadjurs S., Wittbrodt J., Ettwiller L., Piper M., Gronostajski R. M., Guillemot F. Epigenomic enhancer annotation reveals a key role for NFIX in neural stem cell quiescence // *Genes Dev*. – 2013. – Vol. 27. № 16. – P. 1769-1786.

170. Massague J. TGF-beta signal transduction // *Annu Rev Biochem.* – 1998. – Vol. 67. – P. 753-791.
171. Miller F. D., Gauthier A. S. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex // *Neuron.* – 2007. – Vol. 54. № 3. – P. 357-369.
172. Minelli A., Brecha N. C., Karschin C., DeBiasi S., Conti F. GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex // *J Neurosci.* – 1995. – Vol. 15. № 11. – P. 7734-7746.
173. Ming G. L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions // *Neuron.* – 2011. – Vol. 70. № 4. – P. 687-702.
174. Mira H., Andreu Z., Suh H., Lie D. C., Jessberger S., Consiglio A., San Emeterio J., Hortiguera R., Marques-Torres M. A., Nakashima K., Colak D., Gotz M., Farinas I., Gage F. H. Signaling through BMPRII regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus // *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 7. № 1. – P. 78-89.
175. Mishra S., Maurya S. K., Srivastava K., Shukla S., Mishra R. Pax6 influences expression patterns of genes involved in neuro- degeneration // *Ann Neurosci.* – 2015. – Vol. 22. № 4. – P. 226-231.
176. Mission J. P., Takahashi T., Caviness V. S., Jr. Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex // *Glia.* – 1991. – Vol. 4. № 2. – P. 138-148.
177. Mollo N., Esposito M., Aurilia M., Scognamiglio R., Accarino R., Bonfiglio F., Cicatiello R., Charalambous M., Procaccini C., Micillo T., Genesio R., Cali G., Secondo A., Paladino S., Matarese G., De Vita G., Conti A., Nitsch L., Izzo A. Human Trisomic iPSCs from Down Syndrome Fibroblasts Manifest Mitochondrial Alterations Early during Neuronal Differentiation // *Biology (Basel).* – 2021. – Vol. 10. № 7.
178. Moreno-Estelles M., Gonzalez-Gomez P., Hortiguera R., Diaz-Moreno M., San Emeterio J., Carvalho A. L., Farinas I., Mira H. Symmetric expansion of neural stem cells from the adult olfactory bulb is driven by astrocytes via WNT7A // *Stem Cells.* – 2012. – Vol. 30. № 12. – P. 2796-2809.

179. Moreno-Jimenez E.P., Flor-Garcia M., Terreros-Roncal J., Rabano A., Cafini F., Pallas-Bazarra N., Avila J., Llorens-Martin M. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease // *Nat Med.* – 2019. – Vol. 25. № 4. – P. 554-560.
180. Morizane A., Doi D., Kikuchi T., Nishimura K., Takahashi J. Small-molecule inhibitors of bone morphogenic protein and activin/nodal signals promote highly efficient neural induction from human pluripotent stem cells // *J Neurosci Res.* – 2011. – Vol. 89. № 2. – P. 117-126.
181. Muchkaeva I. A., Dashinimaev E. B., Artyuhov A. S., Myagkova E. P., Vorotelyak E. A., Yegorov Y. Y., Vishnyakova K. S., Kravchenko I. E., Chumakov P. M., Terskikh V. V., Vasiliev A. V. Generation of iPS Cells from Human Hair Follicle Dermal Papilla Cells // *Acta Naturae.* – 2014. – Vol. 6. № 1. – P. 45-53.
182. Mukherjee S., Brulet R., Zhang L., Hsieh J. REST regulation of gene networks in adult neural stem cells // *Nat Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 13360.
183. Munji R. N., Choe Y., Li G., Siegenthaler J. A., Pleasure S. J. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors // *J Neurosci.* – 2011. – Vol. 31. № 5. – P. 1676-1687.
184. Munoz S.S., Engel M., Balez R., Do-Ha D., Cabral-da-Silva M.C., Hernandez D., Berg T., Fifita J.A., Grima N., Yang S., Blair I.P., Nicholson G., Cook A.L., Hewitt A.W., Pebay A., Ooi L. A Simple Differentiation Protocol for Generation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Basal Forebrain-Like Cholinergic Neurons for Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia Disease Modeling // *Cells.* – 2020. – Vol. 9. № 9.
185. Murphy M., Drago J., Bartlett P. F. Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro // *J Neurosci Res.* – 1990. – Vol. 25. № 4. – P. 463-475.
186. Nait-Oumesmar B., Decker L., Lachapelle F., Avellana-Adalid V., Bachelin C., Baron-Van Evercooren A. Progenitor cells of the adult mouse subventricular

- zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination // *Eur J Neurosci.* – 1999. – Vol. 11. № 12. – P. 4357-4366.
187. Nakamichi N., Takarada T., Yoneda Y. Neurogenesis mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate signaling // *J Pharmacol Sci.* – 2009. – Vol. 110. № 2. – P. 133-149.
188. Nakayama T., Momoki-Soga T., Yamaguchi K., Inoue N. Efficient production of neural stem cells and neurons from embryonic stem cells // *Neuroreport.* – 2004. – Vol. 15. № 3. – P. 487-491.
189. Nazor K. L., Altun G., Lynch C., Tran H., Harness J. V., Slavin I., Garitaonandia I., Muller F. J., Wang Y. C., Boscolo F. S., Fakunle E., Dumevska B., Lee S., Park H. S., Olee T., D'Lima D. D., Semechkin R., Parast M. M., Galat V., Laslett A. L., Schmidt U., Keirstead H. S., Loring J. F., Laurent L. C. Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives // *Cell Stem Cell.* – 2012. – Vol. 10. № 5. – P. 620-634.
190. Ng A. H. M., Khoshakhlagh P., Rojo Arias J. E., Pasquini G., Wang K., Swiersy A., Shipman S. L., Appleton E., Kiaee K., Kohman R. E., Vernet A., Dysart M., Leeper K., Saylor W., Huang J. Y., Graveline A., Taipale J., Hill D. E., Vidal M., Melero-Martin J. M., Busskamp V., Church G. M. A comprehensive library of human transcription factors for cell fate engineering // *Nat Biotechnol.* – 2021. – Vol. 39. № 4. – P. 510-519.
191. Nicholls J.D., Martin A.R., Wallace B.G., Fuchs P.A. From neuron to brain. 4. Stamford: Sinauer Associated Inc. – 2001.
192. Nickolls A. R., Lee M. M., Espinoza D. F., Szczot M., Lam R. M., Wang Q., Beers J., Zou J., Nguyen M. Q., Solinski H. J., AlJanahi A. A., Johnson K. R., Ward M. E., Chesler A. T., Bonnemann C. G. Transcriptional Programming of Human Mechanosensory Neuron Subtypes from Pluripotent Stem Cells // *Cell Rep.* – 2020. – Vol. 30. № 3. – P. 932-946 e937.
193. Nicoletti F., Bockaert J., Collingridge G. L., Conn P. J., Ferraguti F., Schoepp D. D., Wroblewski J. T., Pin J. P. Metabotropic glutamate receptors: from

- the workbench to the bedside // *Neuropharmacology*. – 2011. – Vol. 60. № 7-8. – P. 1017-1041.
194. Nilsson F., Storm P., Sozzi E., Hidalgo Gil D., Birtele M., Sharma Y., Parmar M., Fiorenzano A. Single-Cell Profiling of Coding and Noncoding Genes in Human Dopamine Neuron Differentiation // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. № 1.
195. Nishizawa M., Chonabayashi K., Nomura M., Tanaka A., Nakamura M., Inagaki A., Nishikawa M., Takei I., Oishi A., Tanabe K., Ohnuki M., Yokota H., Koyanagi-Aoi M., Okita K., Watanabe A., Takaori-Kondo A., Yamanaka S., Yoshida Y. Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity // *Cell Stem Cell*. – 2016. – Vol. 19. № 3. – P. 341-354.
196. Noctor S. C., Martínez-Cerdeño V., Ivic L., Kriegstein A. R. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases // *Nature Neurosci.* – 2004. – Vol. 7. – P. 136–144.
197. Noctor S. C., Martinez-Cerdeno V., Kriegstein A. R. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis // *J Comp Neurol*. – 2008. – Vol. 508. № 1. – P. 28-44.
198. Nyfeler Y., Kirch R. D., Mantei N., Leone D. P., Radtke F., Suter U., Taylor V. Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal // *EMBO J*. – 2005. – Vol. 24. № 19. – P. 3504-3515.
199. Obernier K., Cebrian-Silla A., Thomson M., Parraguez J. I., Anderson R., Guinto C., Rodas Rodriguez J., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation // *Cell Stem Cell*. – 2018. – Vol. 22. № 2. – P. 221-234 e228.
200. Ohi Y., Qin H., Hong C., Blouin L., Polo J. M., Guo T., Qi Z., Downey S. L., Manos P. D., Rossi D. J., Yu J., Hebrok M., Hochedlinger K., Costello J. F., Song J. S., Ramalho-Santos M. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells // *Nat Cell Biol*. – 2011. – Vol. 13. № 5. – P. 541-549.

201. Ohtsuka T., Ishibashi M., Gradwohl G., Nakanishi S., Guillemot F., Kageyama R. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18. № 8. – P. 2196-2207.
202. Okano H., Morimoto S. iPSC-based disease modeling and drug discovery in cardinal neurodegenerative disorders // *Cell Stem Cell.* – 2022. – Vol. 29. № 2. – P. 189-208.
203. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // *Nature.* – 2007. – Vol. 448. № 7151. – P. 313-317.
204. Paavilainen T., Pelkonen A., Makinen M. E., Peltola M., Huhtala H., Fayuk D., Narkilahti S. Effect of prolonged differentiation on functional maturation of human pluripotent stem cell-derived neuronal cultures // *Stem Cell Res.* – 2018. – Vol. 27. – P. 151-161.
205. Pandya N. J., Klaassen R. V., van der Schors R. C., Slotman J. A., Houtsmuller A., Smit A. B., Li K. W. Group 1 metabotropic glutamate receptors 1 and 5 form a protein complex in mouse hippocampus and cortex // *Proteomics.* – 2016. – Vol. 16. № 20. – P. 2698-2705.
206. Pang Z. P., Yang N., Vierbuchen T., Ostermeier A., Fuentes D. R., Yang T. Q., Citri A., Sebastiano V., Marro S., Sudhof T. C., Wernig M. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors // *Nature.* – 2011. – Vol. 476. № 7359. – P. 220-223.
207. Patani R., Compston A., Puddifoot C. A., Wyllie D. J., Hardingham G. E., Allen N. D., Chandran S. Activin/Nodal inhibition alone accelerates highly efficient neural conversion from human embryonic stem cells and imposes a caudal positional identity // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4. № 10. – P. e7327.
208. Patro N., Naik A., Patro I. K. Differential temporal expression of S100beta in developing rat brain // *Front Cell Neurosci.* – 2015. – Vol. 9. – P. 87.
209. Pauly M. G., Krajka V., Stengel F., Seibler P., Klein C., Capetian P. Adherent vs. Free-Floating Neural Induction by Dual SMAD Inhibition for Neurosphere Cultures Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells // *Front Cell Dev Biol.* – 2018. – Vol. 6. – P. 3.

210. Pera E. M., Ikeda A., Eivers E., De Robertis E. M. Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction // *Genes Dev.* – 2003. – Vol. 17. № 24. – P. 3023-3028.
211. Pera M. F., Andrade J., Houssami S., Reubinoff B., Trounson A., Stanley E. G., Ward-van Oostwaard D., Mummery C. Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin // *J Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117. № Pt 7. – P. 1269-1280.
212. Perea-Gomez A., Vella F. D., Shawlot W., Oulad-Abdelghani M., Chazaud C., Meno C., Pfister V., Chen L., Robertson E., Hamada H., Behringer R. R., Ang S. L. Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks // *Dev Cell.* – 2002. – Vol. 3. № 5. – P. 745-756.
213. Perrier A. L., Tabar V., Barberi T., Rubio M. E., Bruses J., Topf N., Harrison N. L., Studer L. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – Vol. 101. № 34. – P. 12543-12548.
214. Perriot S., Mathias A., Perriard G., Canales M., Jonkmans N., Merienne N., Meunier C., El Kassar L., Perrier A. L., Laplaud D. A., Schlupe M., Deglon N., Du Pasquier R. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Astrocytes Are Differentially Activated by Multiple Sclerosis-Associated Cytokines // *Stem Cell Reports.* – 2018. – Vol. 11. № 5. – P. 1199-1210.
215. Pevny L. H., Sockanathan S., Placzek M., Lovell-Badge R. A role for SOX1 in neural determination // *Development.* – 1998. – Vol. 125. № 10. – P. 1967-1978.
216. Poliandri A., Miller D., Howard S., Nobles M., Ruiz-Babot G., Harmer S., Tinker A., McKay T., Guasti L., Dunkel L. Generation of kisspeptin-responsive GnRH neurons from human pluripotent stem cells // *Mol Cell Endocrinol.* – 2017. – Vol. 447. – P. 12-22.
217. Pollen A. A., Nowakowski T. J., Chen J., Retallack H., Sandoval-Espinosa C., Nicholas C. R., Shuga J., Liu S. J., Oldham M. C., Diaz A., Lim D. A., Leyrat A. A., West J. A., Kriegstein A. R. Molecular identity of human outer radial glia during cortical development // *Cell.* – 2015. – Vol. 163. № 1. – P. 55-67.

218. Ponti G., Obernier K., Guinto C., Jose L., Bonfanti L., Alvarez-Buylla A. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – Vol. 110. № 11. – P. E1045-1054.
219. Raballo R., Rhee J., Lyn-Cook R., Leckman J. F., Schwartz M. L., Vaccarino F. M. Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex // *J Neurosci.* – 2000. – Vol. 20. № 13. – P. 5012-5023.
220. Rai K. S., Hattiangady B., Shetty A. K. Enhanced production and dendritic growth of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF-2 infusions // *Eur J Neurosci.* – 2007. – Vol. 26. № 7. – P. 1765-1779.
221. Reiner A., Levitz J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert // *Neuron.* – 2018. – Vol. 98. № 6. – P. 1080-1098.
222. Reinhardt P., Glatza M., Hemmer K., Tsytsyura Y., Thiel C. S., Höing S., Moritz S., Parga J. A., Wagner L., Bruder J. M., Wu G., Schmid B., Röpke A., Klingauf J., Schwamborn J.C., Gasser T., Schöler H.R., Sternecker J. Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – №3. – P. e59252.
223. Reynolds B. A., Tetzlaff W., Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes // *J Neurosci.* – 1992. – Vol. 12. № 11. – P. 4565-4574.
224. Reynolds B. A., Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell // *Dev Biol.* – 1996. – Vol. 175. № 1. – P. 1-13.
225. Ribeiro F. F., Xapelli S. An Overview of Adult Neurogenesis // *Adv Exp Med Biol.* – 2021. – Vol. 1331. – P. 77-94.

226. Rivers L. E., Young K. M., Rizzi M., Jamen F., Psachoulia K., Wade A., Kessaris N., Richardson W. D. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice // *Nat Neurosci.* – 2008. – Vol. 11. № 12. – P. 1392-1401.
227. Roybon L., Mastracci T. L., Ribeiro D., Sussel L., Brundin P., Li J. Y. GABAergic differentiation induced by Mash1 is compromised by the bHLH proteins Neurogenin2, NeuroD1, and NeuroD2 // *Cereb Cortex.* – 2010. – Vol. 20. № 5. – P. 1234-1244.
228. Ruiz i Altaba A. Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog // *Development.* – 1998. – Vol. 125. № 12. – P. 2203-2212.
229. Sadelain M., Papapetrou E. P., Bushman F. D. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome // *Nat Rev Cancer.* – 2011. – Vol. 12. № 1. – P. 51-58.
230. Sagal J., Zhan X., Xu J., Tilghman J., Karuppagounder S. S., Chen L., Dawson V. L., Dawson T. M., Laterra J., Ying M. Proneural transcription factor Atoh1 drives highly efficient differentiation of human pluripotent stem cells into dopaminergic neurons // *Stem Cells Transl Med.* – 2014. – Vol. 3. № 8. – P. 888-898.
231. Scardigli R., Baumer N., Gruss P., Guillemot F., Le Roux I. Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6 // *Development.* – 2003. – Vol. 130. № 14. – P. 3269-3281.
232. Scardigli R., Schuurmans C., Gradwohl G., Guillemot F. Crossregulation between Neurogenin2 and pathways specifying neuronal identity in the spinal cord // *Neuron.* – 2001. – Vol. 31. № 2. – P. 203-217.
233. Schier A. F. Nodal signaling in vertebrate development // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2003. – Vol. 19. – P. 589-621.
234. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J.,

- Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods.* – 2012. Vol. 9, – P. 676–682.
235. Schornig M., Ju X., Fast L., Ebert S., Weigert A., Kanton S., Schaffer T., Nadif Kasri N., Treutlein B., Peter B. M., Hevers W., Taverna E. Comparison of induced neurons reveals slower structural and functional maturation in humans than in apes // *Elife.* – 2021. – Vol. 10.
236. Schuurmans C., Armant O., Nieto M., Stenman J. M., Britz O., Klenin N., Brown C., Langevin L. M., Seibt J., Tang H., Cunningham J. M., Dyck R., Walsh C., Campbell K., Polleux F., Guillemot F. Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23. № 14. – P. 2892-2902.
237. Setien M. B., Smith K. R., Howard K., Williams K., Suhr S. T., Purcell E. K. Differentiation and characterization of neurons derived from rat iPSCs // *J Neurosci Methods.* – 2020. – Vol. 338. – P. 108693.
238. Sharipov R.R., Krasilnikova I.A., Pinelis V.G., Gorbacheva L.R., Surin A.M. Study of the mechanism of the neuron sensitization to the repeated glutamate challenge // *Biochem Mosc.* – 2018. – Vol. 12. № 4. – P. 369–381.
239. Shen Q., Wang Y., Dimos J. T., Fasano C. A., Phoenix T. N., Lemischka I. R., Ivanova N. B., Stifani S., Morrissey E. E., Temple S. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells // *Nat Neurosci.* – 2006. – Vol. 9. № 6. – P. 743-751.
240. Shi Y., Kirwan P., Smith J., Robinson H. P., Livesey F. J. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses // *Nat Neurosci.* – 2012. – Vol. 15. № 3. – P. 477-486, S471.
241. Shibata T., Yamada K., Watanabe M., Ikenaka K., Wada K., Tanaka K., Inoue Y. Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord // *J Neurosci.* – 1997. – Vol. 17. № 23. – P. 9212-9219.
242. Shimbo E., Nukuzuma S., Tagawa Y. I. Human iPS cell-derived astrocytes support efficient replication of progressive multifocal leukoencephalopathy-type

- JC polyomavirus // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2020. – Vol. 533. № 4. – P. 983-987.
243. Shimojo H., Ohtsuka T., Kageyama R. Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells // *Front Neurosci.* – 2011. – Vol. 5. – P. 78.
244. Shimozaki K., Zhang C. L., Suh H., Denli A. M., Evans R. M., Gage F. H. SRY-box-containing gene 2 regulation of nuclear receptor tailless (Tlx) transcription in adult neural stem cells // *J Biol Chem.* – 2012. – Vol. 287. № 8. – P. 5969-5978.
245. Simons B. D., Clevers H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues // *Cell.* – 2011. – Vol. 145. № 6. – P. 851-862.
246. Smith J. R., Vallier L., Lupo G., Alexander M., Harris W. A., Pedersen R. A. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm // *Dev Biol.* – 2008. – Vol. 313. № 1. – P. 107-117.
247. Smith W. C., Harland R. M. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos // *Cell.* – 1992. – Vol. 70. № 5. – P. 829-840.
248. Sorrells S.F., Paredes M.F., Cebrian-Silla A., Sandoval K., Qi D., Kelley K.W., James D., Mayer S., Chang J., Auguste K.I., Chang E.F., Gutierrez A.J., Kriegstein A.R., Mathern G.W., Oldham M.C., Huang E.J., Garcia-Verdugo J.M., Yang Z., Alvarez-Buylla A. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults // *Nature.* – 2018. – Vol. 555. – № 7696. – P. 377-381.
249. Spassky N., Goujet-Zalc C., Parmantier E., Olivier C., Martinez S., Ivanova A., Ikenaka K., Macklin W., Cerruti I., Zalc B., Thomas J. L. Multiple restricted origin of oligodendrocytes // *J Neurosci.* – 1998. – Vol. 18. № 20. – P. 8331-8343.
250. Spassky N., Merkle F. T., Flames N., Tramontin A. D., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from

- radial glial cells during embryogenesis // *J Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. № 1. – P. 10-18.
251. Stavridis M. P., Lunn J. S., Collins B. J., Storey K. G. A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification // *Development.* – 2007. – Vol. 134. № 16. – P. 2889-2894.
252. Stump G., Durrer A., Klein A. L., Lutolf S., Suter U., Taylor V. Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain // *Mech Dev.* – 2002. – Vol. 114. № 1-2. – P. 153-159.
253. Sun G. J., Zhou Y., Stadel R. P., Moss J., Yong J. H., Ito S., Kawasaki N. K., Phan A. T., Oh J. H., Modak N., Reed R. R., Toni N., Song H., Ming G. L. Tangential migration of neuronal precursors of glutamatergic neurons in the adult mammalian brain // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2015. – Vol. 112. № 30. – P. 9484-9489.
254. Sun S., Zhu X. J., Huang H., Guo W., Tang T., Xie B., Xu X., Zhang Z., Shen Y., Dai Z. M., Qiu M. WNT signaling represses astrogliogenesis via Ngn2-dependent direct suppression of astrocyte gene expression // *Glia.* – 2019. – Vol. 67. № 7. – P. 1333-1343.
255. Sun Y., Nadal-Vicens M., Misono S., Lin M. Z., Zubiaga A., Hua X., Fan G., Greenberg M. E. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms // *Cell.* – 2001. – Vol. 104. № 3. – P. 365-376.
256. Surin A. M., Gorbacheva L. R., Savinkova I. G., Sharipov R. R., Khodorov B. I., Pinelis V. G. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis // *Biochemistry (Mosc).* – 2014. – Vol. 79. № 2. – P. 146-157.
257. Szabadkai G., Duchen M. R. Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling // *Physiology (Bethesda).* – 2008. – Vol. 23. – P. 84-94.

258. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*. – 2007. – Vol. 131. № 5. – P. 861-872.
259. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. – 2006. – Vol. 126. № 4. – P. 663-676.
260. Takebayashi H., Nabeshima Y., Yoshida S., Chisaka O., Ikenaka K., Nabeshima Y. The basic helix-loop-helix factor *olig2* is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages // *Curr Biol*. – 2002. – Vol. 12. № 13. – P. 1157-1163.
261. Tcw J., Wang M., Pimenova A. A., Bowles K. R., Hartley B. J., Lacin E., Machlovi S. I., Abdelaal R., Karch C. M., Phatnani H., Slesinger P. A., Zhang B., Goate A. M., Brennand K. J. An Efficient Platform for Astrocyte Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells // *Stem Cell Reports*. – 2017. – Vol. 9. № 2. – P. 600-614.
262. Thoma E. C., Wischmeyer E., Offen N., Maurus K., Siren A. L., Scharl M., Wagner T. U. Ectopic expression of neurogenin 2 alone is sufficient to induce differentiation of embryonic stem cells into mature neurons // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. № 6. – P. e38651.
263. Tolomeo A. M., Laterza C., Grespan E., Michielin F., Canals I., Kokaia Z., Muraca M., Gagliano O., Elvassore N. NGN2 mmRNA-Based Transcriptional Programming in Microfluidic Guides hiPSCs Toward Neural Fate With Multiple Identities // *Front Cell Neurosci*. – 2021. – Vol. 15. – P. 602888.
264. Tropepe V., Sibilina M., Ciruna B. G., Rossant J., Wagner E. F., van der Kooy D. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon // *Dev Biol*. – 1999. – Vol. 208. № 1. – P. 166-188.
265. Twomey E. C., Sobolevsky A. I. Structural Mechanisms of Gating in Ionotropic Glutamate Receptors // *Biochemistry*. – 2018. – Vol. 57. № 3. – P. 267-276.

266. Urban N., Blomfield I. M., Guillemot F. Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest // *Neuron*. – 2019. – Vol. 104. № 5. – P. 834-848.
267. Urban N., Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles // *Front Cell Neurosci*. – 2014. – Vol. 8. – P. 396.
268. Urban N., van den Berg D. L., Forget A., Andersen J., Demmers J. A., Hunt C., Ayrault O., Guillemot F. Return to quiescence of mouse neural stem cells by degradation of a proactivation protein // *Science*. – 2016. – Vol. 353. № 6296. – P. 292-295.
269. Urlinger S., Baron U., Thellmann M., Hasan M. T., Bujard H., Hillen W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2000. – Vol. 97. № 14. – P. 7963-7968.
270. Vaccarino F. M., Schwartz M. L., Raballo R., Rhee J., Lyn-Cook R. Fibroblast growth factor signaling regulates growth and morphogenesis at multiple steps during brain development // *Curr Top Dev Biol*. – 1999. – Vol. 46. – P. 179-200.
271. Vainorius G., Novatchkova M., Michlits G., Baar J. C., Raupach C., Lee J., Yelagandula R., Wernig M., Elling U. *Ascl1* and *Ng2* convert mouse embryonic stem cells to neurons via functionally distinct paths // *Nat Commun*. – 2023. – Vol. 14. № 1. – P. 5341.
272. Valadez-Barba V., Cota-Coronado A., Hernandez-Perez O. R., Lugo-Fabres P. H., Padilla-Camberos E., Diaz N. F., Diaz-Martinez N. E. iPSC for modeling neurodegenerative disorders // *Regen Ther*. – 2020. – Vol. 15. – P. 332-339.
273. Vallier L., Reynolds D., Pedersen R. A. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway // *Dev Biol*. – 2004. – Vol. 275. № 2. – P. 403-421.
274. Varela-Nallar L., Inestrosa N. C. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis // *Front Cell Neurosci*. – 2013. – Vol. 7. – P. 100.

275. Verkhatsky A. Endoplasmic reticulum calcium signaling in nerve cells // Biol Res. – 2004. – Vol. 37. № 4. – P. 693-699.
276. Vescovi A. L., Reynolds B. A., Fraser D. D., Weiss S. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells // Neuron. – 1993. – Vol. 11. № 5. – P. 951-966.
277. Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z. P., Kokubu Y., Sudhof T. C., Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // Nature. – 2010. – Vol. 463. № 7284. – P. 1035-1041.
278. Viero C., Forostyak O., Sykova E., Dayanithi G. Getting it right before transplantation: example of a stem cell model with regenerative potential for the CNS // Front Cell Dev Biol. – 2014. – Vol. 2. – P. 36.
279. Vigont V. A., Grekhnev D. A., Lebedeva O. S., Gusev K. O., Volovikov E. A., Skopin A. Y., Bogomazova A. N., Shuvalova L. D., Zubkova O. A., Khomyakova E. A., Glushankova L. N., Klyushnikov S. A., Illarioshkin S. N., Lagarkova M. A., Kaznacheyeva E. V. STIM2 Mediates Excessive Store-Operated Calcium Entry in Patient-Specific iPSC-Derived Neurons Modeling a Juvenile Form of Huntington's Disease // Front Cell Dev Biol. – 2021. – Vol. 9. – P. 625231.
280. Wallace V. A. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum // Curr Biol. – 1999. – Vol. 9. № 8. – P. 445-448.
281. Watanabe K., Ueno M., Kamiya D., Nishiyama A., Matsumura M., Wataya T., Takahashi J. B., Nishikawa S., Nishikawa S., Muguruma K., Sasai Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells // Nat Biotechnol. – 2007. – Vol. 25. № 6. – P. 681-686.
282. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D., François R., Grolemond G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the tidyverse // Journal of Open Source Software. – 2019. – Vol. 4. № 43. – P. 1686.

283. Williams B. P., Price J. Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex // *Neuron*. – 1995. – Vol. 14. № 6. – P. 1181-1188.
284. Wilson P. A., Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4 // *Nature*. – 1995. – Vol. 376. № 6538. – P. 331-333.
285. Wrobel C. N., Mutch C. A., Swaminathan S., Taketo M. M., Chenn A. Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors // *Dev Biol*. – 2007. – Vol. 309. № 2. – P. 285-297.
286. Wu H., Xu J., Pang Z. P., Ge W., Kim K. J., Blanchi B., Chen C., Sudhof T. C., Sun Y. E. Integrative genomic and functional analyses reveal neuronal subtype differentiation bias in human embryonic stem cell lines // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2007. – Vol. 104. № 34. – P. 13821-13826.
287. Xue Y., Zhan X., Sun S., Karuppagounder S. S., Xia S., Dawson V. L., Dawson T. M., Laterra J., Zhang J., Ying M. Synthetic mRNAs Drive Highly Efficient iPS Cell Differentiation to Dopaminergic Neurons // *Stem Cells Transl Med*. – 2019. – Vol. 8. № 2. – P. 112-123.
288. Yang S. H., Andrabi M., Biss R., Murtuza Baker S., Iqbal M., Sharrocks A. D. ZIC3 Controls the Transition from Naive to Primed Pluripotency // *Cell Rep*. – 2019. – Vol. 27. № 11. – P. 3215-3227 e3216.
289. Yeh H. J., He Y. Y., Xu J., Hsu C. Y., Deuel T. F. Upregulation of pleiotrophin gene expression in developing microvasculature, macrophages, and astrocytes after acute ischemic brain injury // *J Neurosci*. – 1998. – Vol. 18. № 10. – P. 3699-3707.
290. Yellapragada V., Eskici N., Wang Y., Madhusudan S., Vaaralahti K., Tuuri T., Raivio T. FGF8-FGFR1 signaling regulates human GnRH neuron differentiation in a time- and dose-dependent manner // *Dis Model Mech*. – 2022. – Vol. 15. № 8.
291. Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin, II, Thomson J. A.

- Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // *Science*. – 2007. – Vol. 318. № 5858. – P. 1917-1920.
292. Yu P. B., Deng D. Y., Lai C. S., Hong C. C., Cuny G. D., Boussein M. L., Hong D. W., McManus P. M., Katagiri T., Sachidanandan C., Kamiya N., Fukuda T., Mishina Y., Peterson R. T., Bloch K. D. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification // *Nat Med*. – 2008a. – Vol. 14. № 12. – P. 1363-1369.
293. Yu P. B., Hong C. C., Sachidanandan C., Babitt J. L., Deng D. Y., Hoyng S. A., Lin H. Y., Bloch K. D., Peterson R. T. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism // *Nat Chem Biol*. – 2008b. – Vol. 4. № 1. – P. 33-41.
294. Zeltner N., Fattahi F., Dubois N. C., Saurat N., Lafaille F., Shang L., Zimmer B., Tchieu J., Soliman M. A., Lee G., Casanova J. L., Studer L. Capturing the biology of disease severity in a PSC-based model of familial dysautonomia // *Nat Med*. – 2016. – Vol. 22. № 12. – P. 1421-1427.
295. Zhang Y., Musci T., Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function // *Curr Biol*. – 1997. – Vol. 7. № 4. – P. 270-276.
296. Zhang M., Niibe K., Kondo T., Kamano Y., Saeki M., Egusa H. Gene Delivery and Expression Systems in Induced Pluripotent Stem Cells. – 2017. In: Sasaki K., Suzuki O., Takahashi N. (eds) *Interface Oral Health Science*. Springer, Singapore. – 2016.
297. Zhang Y., Pak C., Han Y., Ahlenius H., Zhang Z., Chanda S., Marro S., Patzke C., Acuna C., Covy J., Xu W., Yang N., Danko T., Chen L., Wernig M., Sudhof T. C. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells // *Neuron*. – 2013. – Vol. 78. № 5. – P. 785-798.
298. Zhao P., Zhu T., Lu X., Zhu J., Li L. Neurogenin 2 enhances the generation of patient-specific induced neuronal cells // *Brain Res*. – 2015. – Vol. 1615. – P. 51-60.

299. Zheng W., Wang Y., Chang T., Huang H., Yee J. K. Significant differences in genotoxicity induced by retrovirus integration in human T cells and induced pluripotent stem cells // *Gene*. – 2013. – Vol. 519. № 1. – P. 142-149.
300. Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-Melody J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., Musi N., Hirshman M. F., Goodyear L. J., Moller D. E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action // *J Clin Invest*. – 2001. – Vol. 108. № 8. – P. 1167-1174.
301. Zirlinger M., Lo L., McMahan J., McMahan A. P., Anderson D. J. Transient expression of the bHLH factor neurogenin-2 marks a subpopulation of neural crest cells biased for a sensory but not a neuronal fate // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2002. – Vol. 99. № 12. – P. 8084-8089.

ПРИЛОЖЕНИЕ

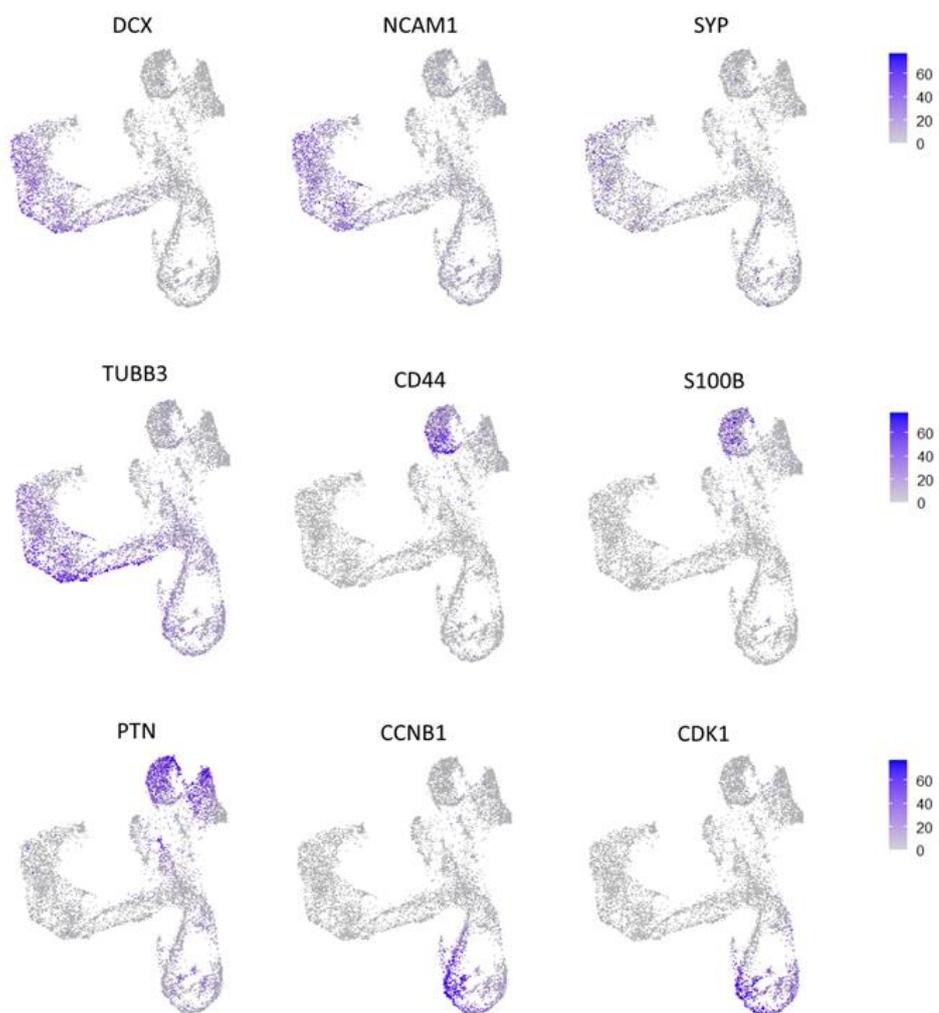


Рисунок 30. Результаты анализа данных scRNAseq нейральных культур N-KYOU p5 и p25: распределение экспрессии конкретных генов в пространстве UMAP. Маркеры популяций нейрональных и глиальных клеток, а также маркеры клеточного цикла.

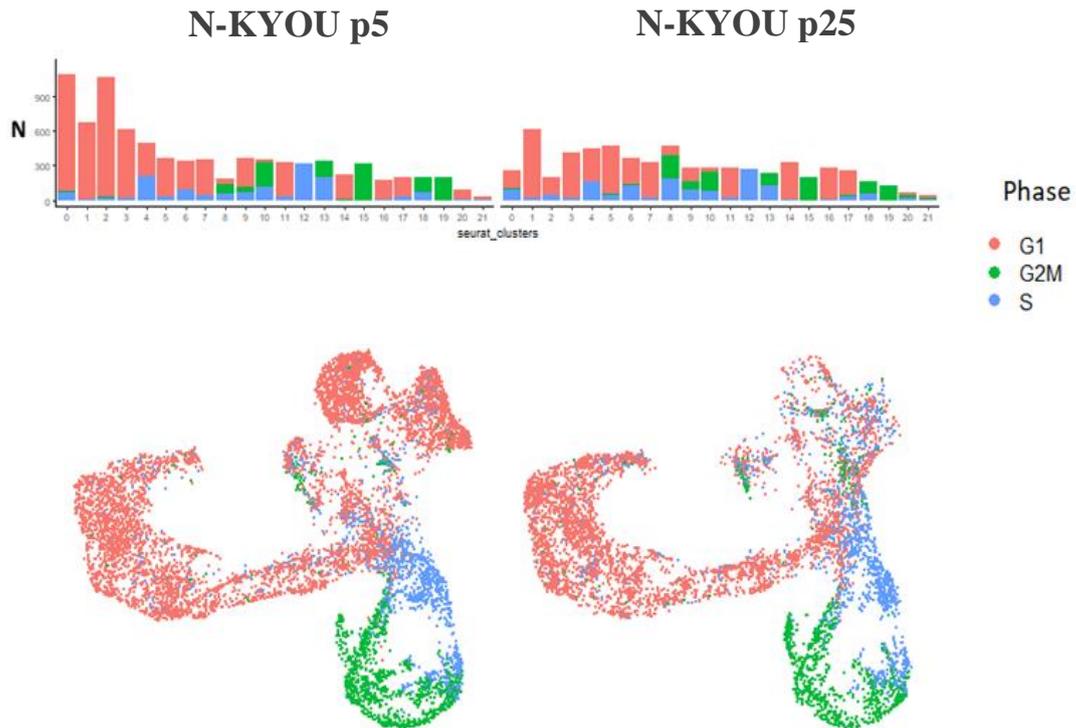


Рисунок 31. Результаты анализа данных scRNAseq нейральных культур N-KYOU p5 и p25: разделение кластеров клеток по фазам клеточного цикла. Верхняя часть картинки отражает представленность (долю) в кластере клеток с соответствующей цвету фазе клеточного цикла.

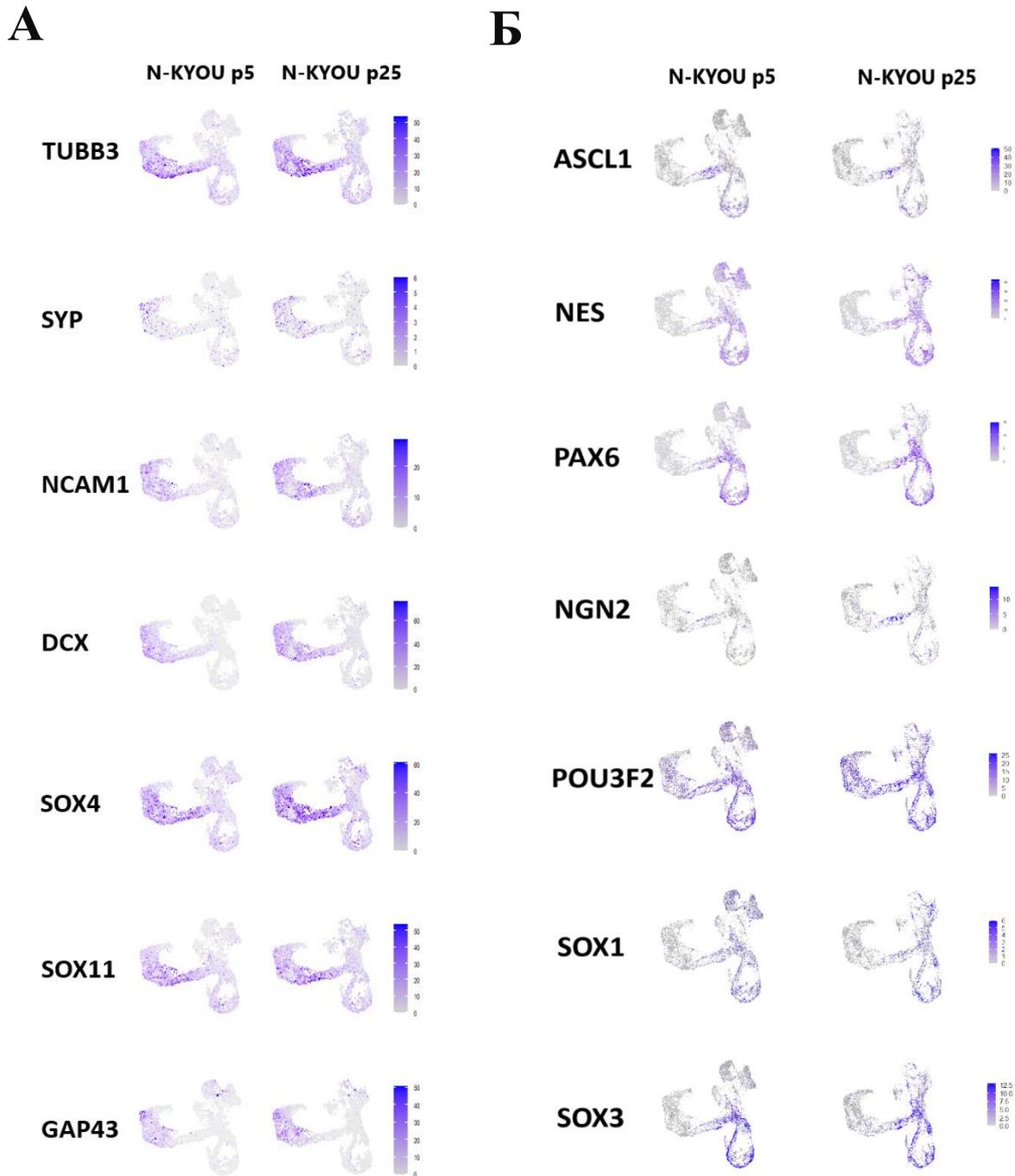


Рисунок 32. Результаты анализа данных scRNAseq нейральных культур N-KYOU p5 и p25: экспрессия генов-маркеров в N-KYOU p5 и p25 на пространстве UMAP

А – нейрональные маркеры

Б – маркеры нейральных предшественников

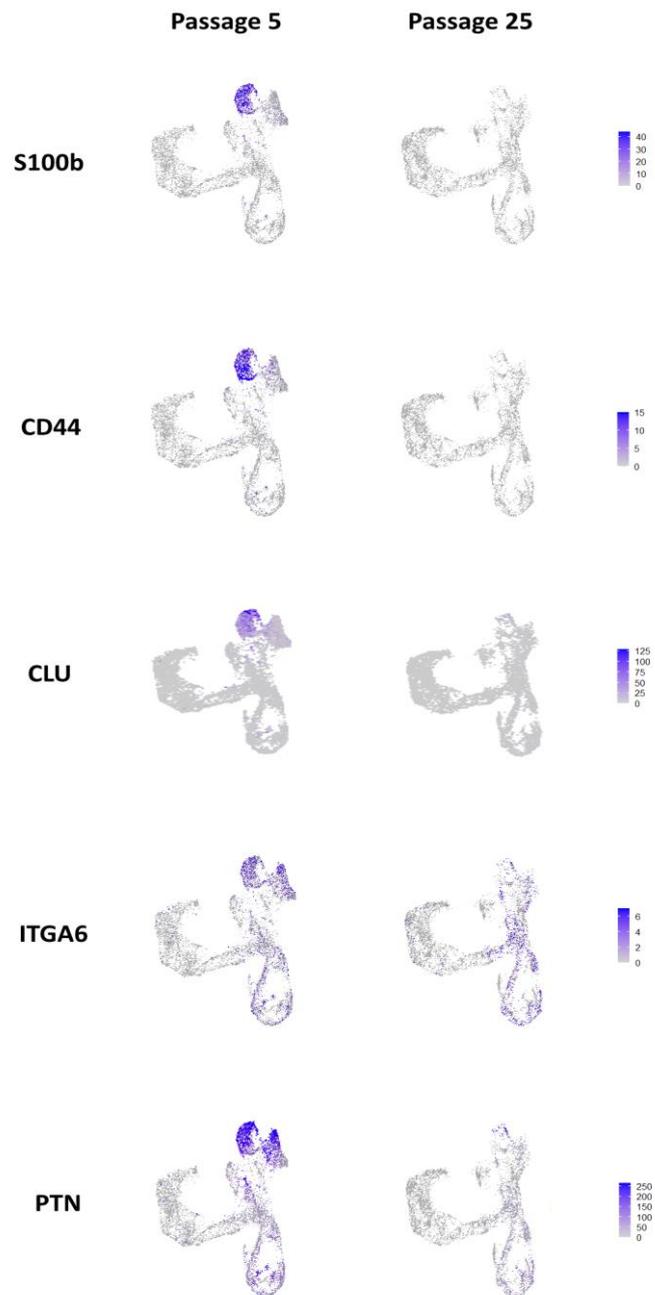


Рисунок 33. Результаты анализа данных scRNAseq нейральных культур N-KYOU p5 и p25: экспрессия глиальных генов-маркеров в N-KYOU p5 и p25 на пространстве UMAP.

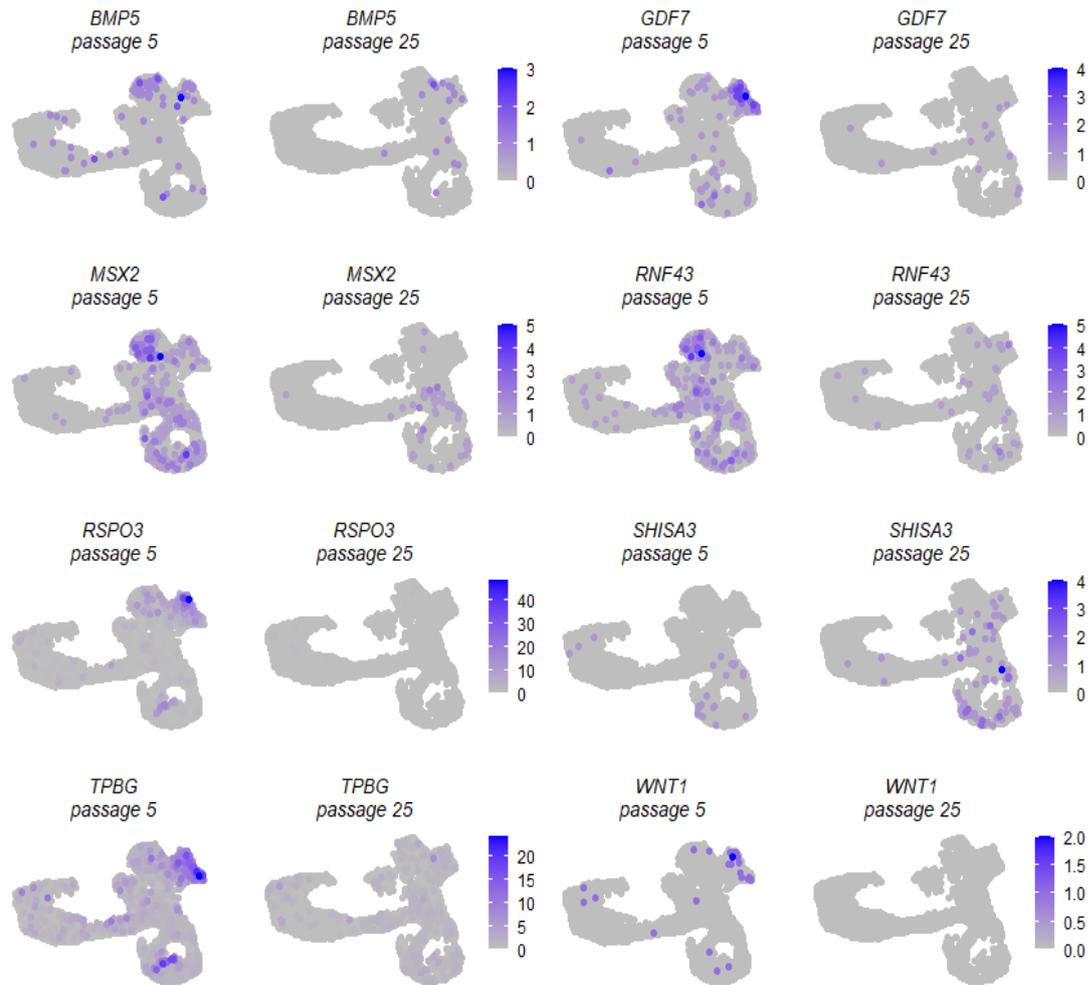


Рисунок 34. Результаты анализа данных scRNAseq нейральных культур N-KYOU p5 и p25: локализация экспрессии общих дифференциально экспрессированных генов, вовлеченных в WNT/BMP-пути, в N-KYOU на пространстве UMAP.

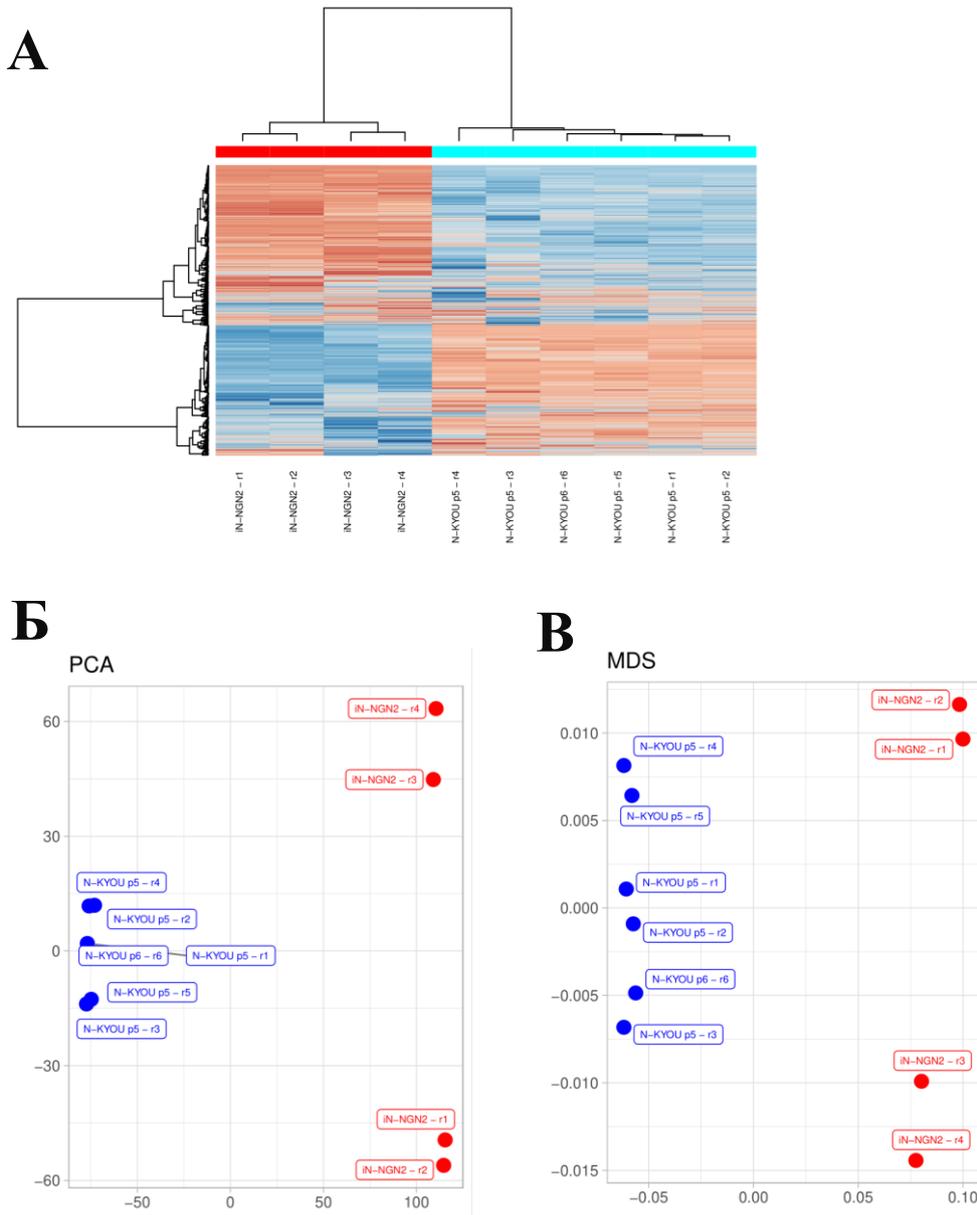


Рисунок 35. Результаты анализа методов снижения размерности пространства для данных общих транскриптомов нейральных культур N-KYOU p5 и iN-NGN2 по всем выявленным генам, которые имели достаточную экспрессию.

А – кластерный анализ, визуализированный в виде тепловой карты дифференциально экспрессированных генов.

Б – анализ главных компонент (PCA), примененный к стабилизированным по дисперсии преобразованным данным экспрессии. Оси X и Y – главные компоненты 1 и 2 соответственно, объясняющие 64,66 и 9,4% дисперсии (variance).

В – метод многомерного шкалирования (MDS). В качестве меры сходства использованы величины коэффициента корреляции Пирсона. Ось X описывает максимум различий между объектами.