

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

им. М. В. Ломоносова

На правах рукописи

Галиакберова Аделя Альбертовна

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

1.5.22 – Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и в центре компетенций по анализу единичных клеток центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Научные руководители: *Исаев Николай Константинович, доктор биологических наук*
Дашинимаев Эрдэм Баирович, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: *Новосадова Екатерина Вячеславовна, кандидат биологических наук, начальник лаборатории клеточной дифференцировки, старший научный сотрудник Научно-исследовательского центра «Курчатовский институт»*

Малышев Алексей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН»

Рубина Ксения Андреевна, доктор биологических наук, профессор РАН, доцент, заведующая лабораторией морфогенеза и репарации тканей Факультета фундаментальной медицины Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «15» октября 2024 г. в ___ часов ___ минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation-council/015.9>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.В. Липина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

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. Наиболее подходящим источником НСК и/или нейронов *in vitro* являются культуры плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) в частности, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). 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). 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 нейроны человека (Benchoua et al., 2021; Okano et al., 2022).

Существует большое разнообразие подходов и протоколов дифференцировки ИПСК в нейроны *in vitro*. 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 в ИПСК с помощью малых молекул (Smith et al., 2008; Yu et al., 2008b; Chambers et al., 2009). В результате такого ингибирования происходит дифференцировка ПСК в нейральные стволовые клетки, которые затем могут быть культивированы или направлены в терминальную дифференцировку в нейроны. 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). 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*, *NeuroD1*, *ASCL1* и др. (Zhang et al., 2013; Chanda et al., 2014; Lin et al., 2021). Однако наиболее популярным фактором является *NGN2*. Одним из самых эффективных и используемых протоколов является лентивирусная трансдукция ИПСК геном *NGN2* в составе системы TetON для регулируемой тетрациклин-зависимой экспрессии

(Urlinger et al., 2000; Zhang et al., 2013). Индукция гиперэкспрессии *NGN2* в ИПСК приводит к их быстрой дифференцировке в нейроны. При этом получаемые нейральные культуры в основном состоят из нейронов и не содержат глиальных клеток (Zhang et al., 2013).

Одной из основных проблем в области получения нейронов является выбор подхода и протокола дифференцировки нейронов, а также способов их культивирования. Оба вышеупомянутых подхода получения нейронов достаточно активно используются и изучаются, однако у каждого из них существует множество различных протоколов и модификаций, от которых может зависеть конечный результат. Поэтому выявление основных преимуществ и недостатков различных подходов и протоколов дифференцировки нейронов из ИПСК, а также их сравнение, является актуальной задачей современной клеточной биологии.

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*.

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.

Научная новизна полученных результатов. В результате выполнения данной работы впервые было показано влияние длительности культивирования НСК, полученных из ИПСК методом 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 спонтанно дифференцированных из НСК нейральных культурах. При этом, хотя нейральные культуры, полученные таким способом из разных линий ИПСК, отличаются между собой, имеется общая тенденция изменения их транскриптомных профилей с увеличением количества 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.

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.

Методология 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.

Достоверность. 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.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на 1 российской и 1 международной конференциях.

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.

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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

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

ИПСК-KYOU, ИПСК-KYOU-GCaMP6s (полученная нами ранее из клеток линии ИПСК-KYOU с помощью транспозонной системы Sleeping Beauty), ИПСК-AFS17, ИПСК-DR, ИПСК-DYP0730 (получена от донора-пациента с синдромом Дауна).

2. Получение ИПСК-KYOU, экспрессирующих tetON-NGN2. Для получения ИПСК-KYOU, экспрессирующих систему TetON и ген *NGN2*, использовали плазмиды rtTA-N144 (#66810) и TRET-hNgn2-UBC-PuRo (#61474), полученные из депозитария Addgene. Супернатант, содержащий упакованные лентивирусы, наливали на культуры ИПСК, смешивая с ростовой средой соотношении 1:1. Полибрен добавляли 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: пуромицином (0,5 мкг/мл) и гигромицином В (50 мкг/мл). Затем ИПСК-TetON-NGN2 были клонированы методом предельного разведения для отбора клонов, способных к эффективной дифференцировке в ответ на добавление доксициклина.

3. 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 ROCKi (5 мкМ) до 14-го и 21-го дня.

4. NGN2-индуцированная нейральная дифференцировка ИПСК. В день 0 ИПСК, экспрессирующие TetON-NGN2 (или GCaMP6s и TetON-NGN2), были посажены на покрытые матригелем чашки Петри в концентрации 3×10^4 клеток/см² в среде mTeSR1, дополненной ROCKi (5 мкМ) и мышинным ламинином (0,5 мкг/мл). Доксициклин в концентрации 1 мкг/мл добавляли с 0 по 5 день для индукции экспрессии трансгена NGN2. Во 2-й и 3-й дни добавляли цитозин-арабинозид (Ara-C) в концентрации 0,1 мкг/мл. На 4-й день дифференцирующиеся культуры пересевали на новые культуральные сосуды, последовательно покрытые раствором поли-D-лизина и матригеля, сокращая площадь поверхности в ~2-3 раза. На 5 день среду заменяли на N2B27, дополненную человеческим BDNF (10 нг/мл), NGF (20 нг/мл), ROCKi (5 мкМ) и мышинным ламинином (0,5 мкг/мл). После 7-го дня половину культуральной среды меняли дважды в неделю. Нейральные культуры культивировали без пересева в течение еще 7-14 дней.

5. Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени. Для выделения тотальной РНК из исследуемых клеток использовали готовый набор «ExtractRNA kit» (Евроген) согласно инструкции производителя. Концентрацию и чистоту полученной РНК измеряли с помощью спектрофотометра Implen NanoPhotometer P-Class P360. Обратную транскрипцию проводили с использованием 1 мкг общей РНК и готового набора «Обратная транскриптаза MMLV» (Евроген). Перед реакцией обратной транскрипции проводили предварительную обработку РНК ДНКазой с использованием набора DNaseI, RNase-free (Thermo scientific). Для проведения ПЦР в реальном времени с использованием готовой смеси для ПЦР 5X qPCRmix-HS SYBR фирмы «Евроген» и амплификатора «CFX96 PCR System» фирмы «Bio-Rad». Уровни экспрессии исследуемых генов рассчитывали относительно экспрессии нормировочных генов *EMC7* и *PSMB4* при помощи метода $\Delta\Delta C_t$.

6. Секвенирование РНК. Библиотеки кДНК были получены из 1 мкг РНК с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep (New England Biolabs) и штрих-кодированы индексными праймерами для пулового секвенирования. Секвенирование

проводилось для получения медианы 20,9 млн. прочтений по 2×150 пар оснований на библиотеку. *Анализ транскриптомных данных нейральных культур N-KYOU и N-AFS17.* 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.* 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`. Для оценки гипер- и гипо-экспрессированных генов были отобраны гены, транскрипция которых изменялась в два раза ($|\log_{2}FC| > 1$) со скорректированным значением $p < 0,0505$ (скорр. по методу Беньямини-Хохберга). Анализ обогащения сигнальных и метаболических путей был выполнен при помощи веб-сервиса `g:Profiler` с использованием информации по путям из базы данных KEGG и информации по биологическим процессам Gene Ontology.

7. Секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq). Библиотеки подготавливались с помощью набора «The 10X Genomics Chromium Single Cell 3' GEM Library and Gel Bead Kit v3». Пакет программ `Seurat` (версия 3.1.1) в программе R (версия 3.6.3, R-Foundation) был использован для создания матрицы ген-штрих-код, содержащей штрих-кодированные клетки и количество экспрессии генов. Функция преобразования SCT использовалась для нормализации данных о количестве молекул к размеру библиотеки в каждой клетке. Анализ кластеризации и субкластеризации клеток проводился с помощью функции `FindClusters` пакета программ `Seurat`. Для аппроксимации и проецирования кластерного многообразия применялся UMAP – алгоритм снижения размерности. Анализ клеточного цикла проводили с помощью функции `CellCycleScoring` пакета программ `Seurat`. Анализ псевдовременной траектории проводили с помощью пакета программ `Monocle 3` (версия 0.2.3.0).

8. Микросъемка в фазовом контрасте, иммуноцитохимическое окрашивание и количественный анализ флуоресцентных фотографий. Микросъемка производилась на флуоресцентном микроскопе EVOS FL AUTO (Life Technologies). Клетки при этом находились в полной ростовой среде. Для иммуноцитохимического окрашивания нейральные культуры фиксировали в 4% параформальдегиде, а затем последовательно инкубировали с первичными и вторичными антителами, разведенными в блокирующем растворе (PBS, 10% FBS, 0,1% Triton-X-100) в

соотношении 1:200 и 1:1000 соответственно. После инкубации с антителами культуры промывали раствором DPBS. Ядра клеток контрастировали при помощи красителя DAPI (1 мг/мл в DPBS). Флуоресцентную микросъемку проводили с использованием флуоресцентного микроскопа EVOS FL AUTO, обработка изображений производилась в программе ImageJ. Для количественной оценки флуоресцентных сигналов использовали систему интегральной оценки для каждого канала флуоресценции, разработанную Шиловым Б. В. и Задорожным А. Д. (кафедра биоинформатики, РНИМУ им. Пирогова). Процесс анализа изображений был реализован и автоматизирован с помощью скрипта на макроязыке ImageJ. Для статистического анализа и визуализации использовался R версии 4.2.2 с пакетами tidyverse и arsenal.

9. Кальциевый имиджинг. Измерения $[Ca^{2+}]_i$ проводили с помощью генетически кодируемого Ca^{2+} -индикатора GCaMP6s. Для измерения $[Na^+]_i$ использовали флуоресцентный индикатор SBFI, который вводили в клетки в виде ацетоксиметилового эфира (8 мкМ) на 50-60 мин при 37°C. Измерения проводили при 26-29°C в буфере, содержащем (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 5 D-глюкозы. Номинально бескальциевые растворы содержали 2 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ EGTA и не содержали CaCl₂. Измерения изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ проводили с помощью системы анализа изображений на основе микроскопа Nikon Ti2, 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. Регистрация, хранение и обработка полученной информации осуществлялась с помощью программного обеспечения NIS. Построение графиков и статистический анализ проводили с помощью программы Prism 8.1.

Результаты и обсуждение

Дифференцировка ИПСК в нейроны с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием

Мы получили культуры НСК из 5 линий ИПСК (KYOU, KYOU-GCaMP6s, AFS17, DP и DYP0730) с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием (DUAL SMADi). 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. 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.

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, что мы интерпретировали как инициацию дифференцировки в нейроны. Важно отметить, что и НСК, и нейральные культуры, полученные путем спонтанной дифференцировки, имели очень неоднородный по морфологии клеточный состав. В нейральных культурах (N) хотя мы определили большинство клеток как нейроноподобные, некоторые клетки сохраняли морфологию НСК и продолжали пролиферировать. Кроме того, наблюдались уплощенные клетки неправильной формы с большим ядром, без нейритов и с включениями вакуолей в цитоплазме. Мы провели эксперименты по регистрации внутриклеточного кальциевого сигнала при помощи флуоресцентного генетически кодируемого кальциевого индикатора GCaMP6s индикатора в 21-дневных культурах N-KYOU-GCaMP6s. Результаты показали, что нейральные культуры, полученные при помощи подхода с DUAL SMADi, демонстрируют кальциевую активность в ответ на добавление глутамата.

Нейральные 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, при помощи метода иммуноцитохимического окрашивания были обнаружены маркеры нейрональных предшественников – Nestin, PAX6, а также маркеры нейронов – β -III-тубулин, синаптофизин (SYN) и тирозингидроксилаза (TH) (Рис. 1 А, Б). Однако меньше всего TH-позитивных клеток было обнаружено в N-DYP0730. Маркер глиальных клеток, GFAP, наблюдался во всех нейральных культурах, однако количество GFAP-положительных клеток было различно (Рис. 1 Б). Так, культура N-DYP0730 была значительно обогащена GFAP⁺ клетками по сравнению с другими культурами (Рис. 1 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).

Анализ уровней экспрессии маркерных генов методом количественной ОТ-ПЦР также показал значительные различия между нейральными культурами четырех линий

(Рис. 2). Мы обнаружили корреляцию между данными, полученными с помощью иммуноцитохимии и измеренными уровнями экспрессии генов. Например, нейральные культуры с хромосомной аномалией T21 (N-DYP0730) экспрессировали гены-маркеры глиальных клеток значительно сильнее, а гены-маркеры нейронов значительно слабее, чем три другие культуры.

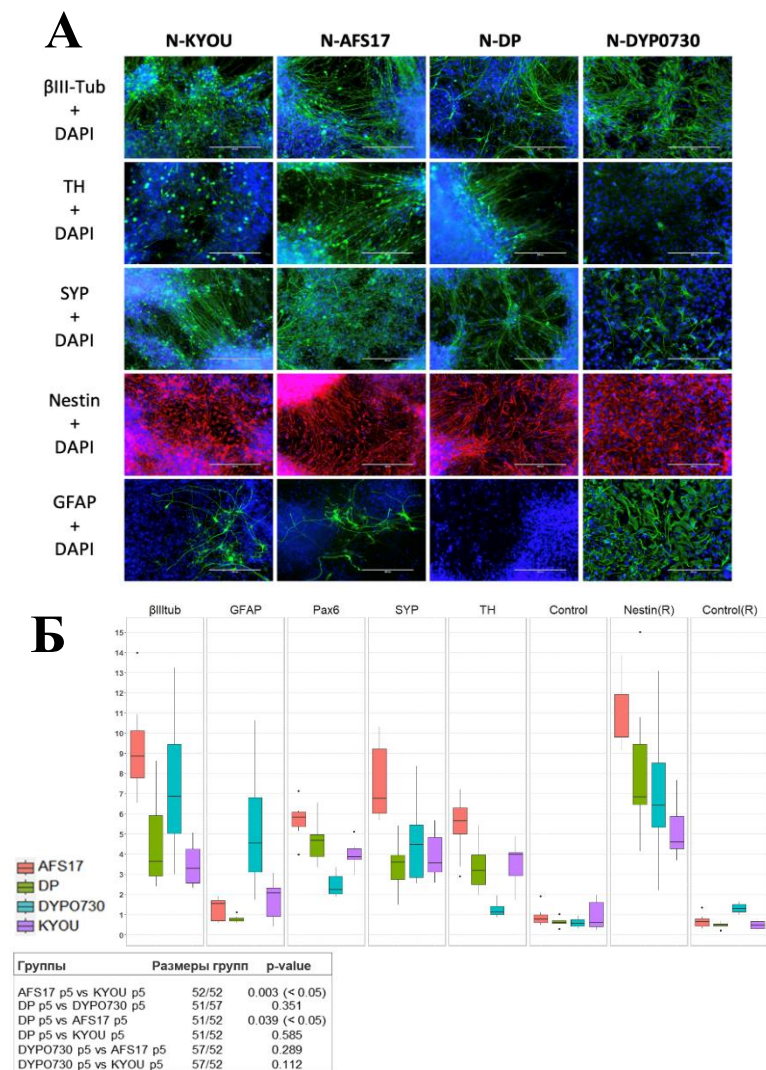


Рисунок 1. Результаты иммуноцитохимического окрашивания нейральных культур N-KYOU, N-AFS17, N-DP и N-DYP0730 на 21-й день спонтанной дифференцировки, полученные из соответствующих линий НСК на 5-м пассаже. **А** – Флуоресцентная микроскопия, шкала 200 мкм. Ядра окрашены DAPI (синий). **Б** – Количественный 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. βIII-Tub – β-III-тубулин, TH – тирозингидроксилаза, SYP – синаптофизин, control – контроль без первичных антител по зеленому сигналу, control (R) – контроль по красному сигналу.

Экспрессия различных других маркерных генов 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.

Далее мы исследовали, как продолжительность культивирования НСК влияет на их дифференцировочный потенциал и спектр клеточных типов в получаемых нейральных культурах. Для этого культивирование линий НСК-KYOU и НСК-AFS17 было продолжено до 30 пассажа. На 5-м, 10-м, 15-м, 20-м, 25-м (для KYOU и AFS17) и 30-м (только KYOU) пассажах часть культур НСК были отправлены в спонтанную нейральную дифференцировку.

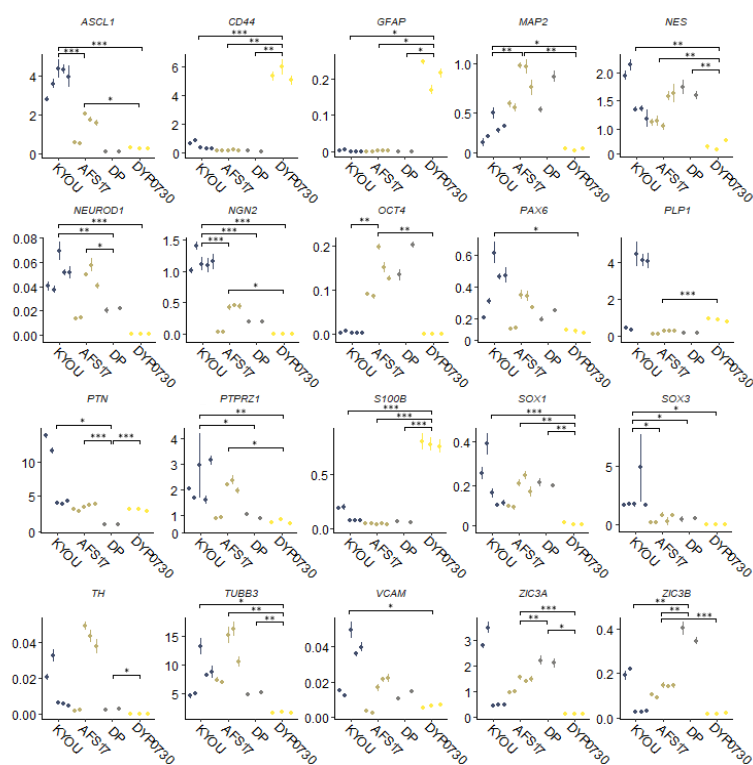


Рисунок 2. Уровни относительной экспрессии маркерных генов, определенные методом количественной ОТ-ПЦР, в 14-дневных нейральных культурах N-KYOU, N-AFS17, N-DP и N-DYP0730, полученных из соответствующих линий НСК на 5 пассаже. По оси Y показан уровень экспрессии, рассчитанный методом $-\Delta\Delta C_t$, 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).

Через 14 дней дифференцировки нейральные культуры были проанализированы при помощи различных методов. 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, ни в морфологии культивируемых клеток. 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 (SYP) и тирозингидроксилазу (TH)) в обоих случаях у обеих линий (Рис. 3 А, Б). Однако анализ результатов окрашивания показал снижение уровней маркеров НСК в N-культурах p25 по сравнению с N-культурами p5 в обеих линиях (KYOU и AFS17). β -III-тубулин, хотя и детектировался на достаточно высоком уровне, имел различную динамику в двух линиях (Рис. 3 Б). Изменение количества клеток, положительных на глиальный маркер GFAP, также имело разную динамику в N-KYOU и N-AFS17 с увеличением количества пассажей НСК (Рис. 3 Б).

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 на одном пассаже, так и между разными пассажами в одной культуре (Рис. 4). Уровни экспрессии генов глиальной дифференцировки снижались с увеличением пассажа НСК в культуре N-KYOU, в то время как в культуре N-AFS17

наблюдалось их увеличение. Мы также наблюдали, что с увеличением пассажа НСК экспрессия ряда генов имела сходную динамику в обеих культурах (Рис. 4).

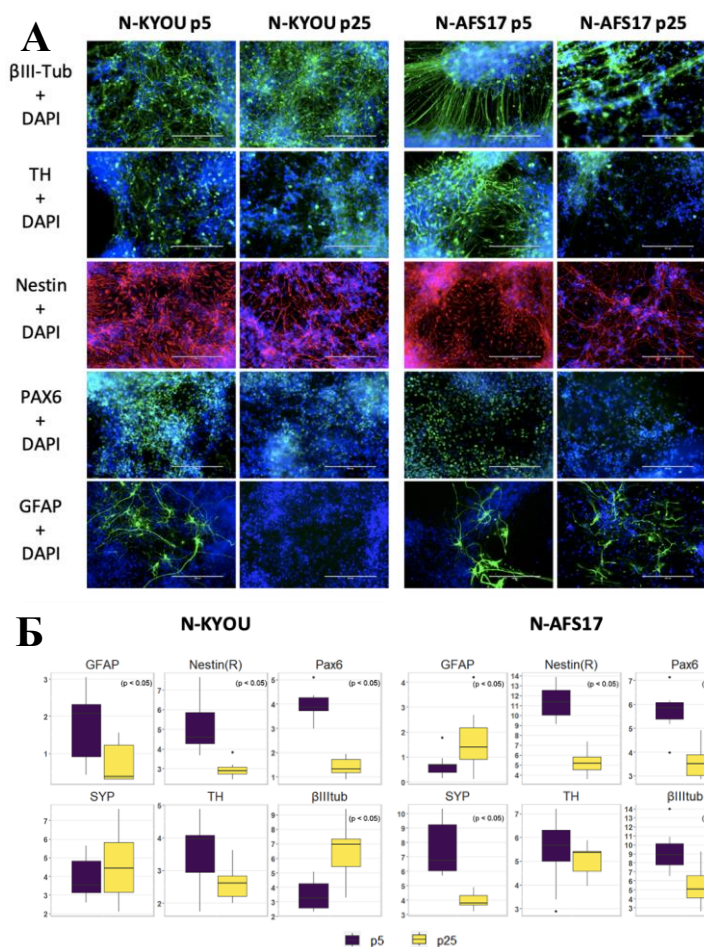
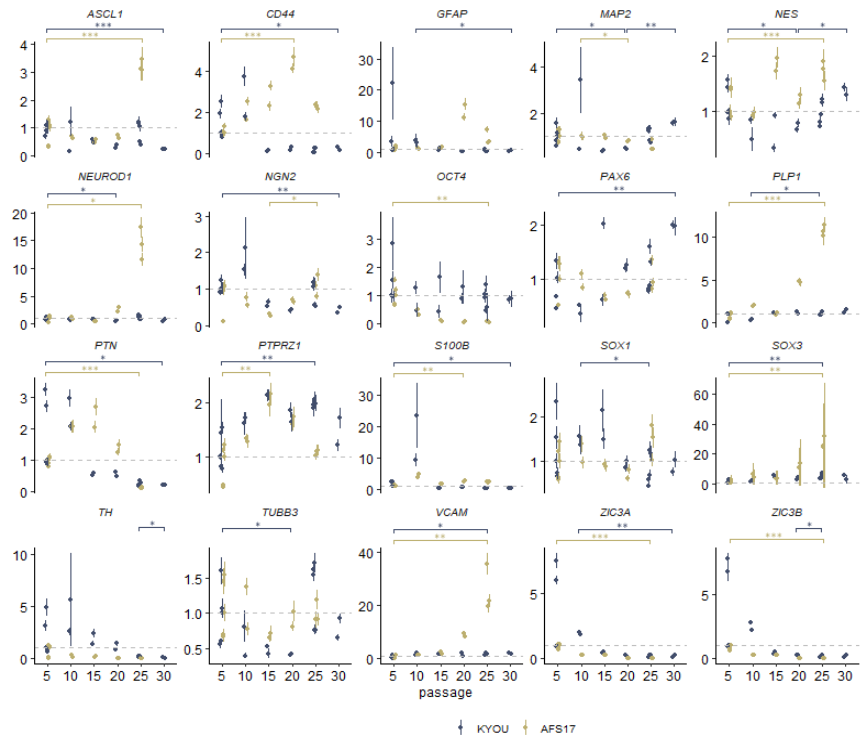


Рисунок 3. Результаты иммуноцитохимического окрашивания нейральных культур N-KYOU и N-AFS17 p5 и p25 на 21-й день спонтанной дифференцировки. **А** – Флуоресцентная микроскопия, шкала 200 мкм. Ядра окрашены DAPI (синий). **Б** – Количественный анализ данных иммуноцитохимического окрашивания нейральных 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

Анализ транскриптомных данных методом главных компонент (PCA) показал, что длительность культивирования НСК (количество пассажей) вносит основной вклад в различия дифференцированных из этих НСК нейральных культур (Рис. 5 А, Б). И это справедливо для обеих линий: и KYOU, и AFS17. При этом нейральные культуры разных линий отличаются: на графике PCA видно, что N-AFS17 разных пассажей группируются отдельно от таковых N-KYOU по оси первого главного компонента (оси X) (Рис. 5 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), 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. 5 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.

Рисунок 4. Уровни относительной экспрессии маркерных генов в 14-дневных нейральных культурах (N-KYOU и N-AFS17), полученных из соответствующих линий НСК на разных пассажах, 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).

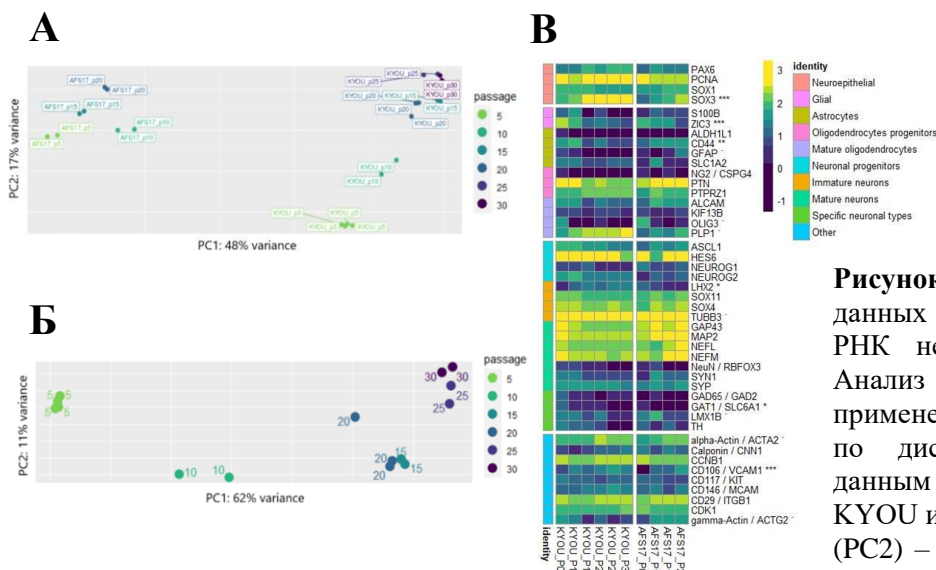


Рисунок 5. Результаты анализа данных секвенирования тотальной РНК нейральных культур. **А** – Анализ главных компонент, примененный к стабилизированным по дисперсии преобразованным данным экспрессии для культур N-KYOU и N-ASF17. Оси X (PC1) и Y (PC2) – главные компоненты 1 и 2 соответственно, объясняющие 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) для каждого гена на всех пассажах.

В то же время мы наблюдали увеличение экспрессии генов, характерных для нейроэпителиальных и не-нейрональных типов клеток.

Затем 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. Первичный анализ показал, что обе клеточные культуры были гетерогенными. Согласно автоматизированному аннотатору SingleR, было идентифицировано 22 отдельных кластера (популяции клеток). Большинство из них мы определили как нейральные прогениторные/стволовые клетки (НСК), остальные кластеры были определены как астроциты, астроцитарные предшественники (АПК), нейроны и предшественники нейронов (Рис. 6 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. 6 А, черные стрелки). Мы идентифицировали эти кластеры как астроциты и АПК, поскольку клетки из этих кластеров экспрессируют глиальные маркеры. 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. 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. Мы рассматривали клетки, находящиеся в G₁, как терминально дифференцирующиеся, а клетки в фазах G₂/M и S – как активно делящиеся прогениторные и/или стволовые клетки. Поэтому мы определили группу клеточных кластеров, расположенных в нижней части UMAP (кластеры 10, 12, 13, 15, 18, 19), как циклирующие нейральные стволовые/прогениторные клетки (цНСК). Согласно анализу траектории Monocle, в полученных нами нейральных культурах существует несколько направлений дифференцировки стволовых клеток, точка бифуркации которых находится в кластере 4. Траектория дифференцировки делится на две глобальные группы кластеров, «верхнюю» группу (9, 20, 0, 2), которая характеризуется экспрессией генов, специфичных для астроглии и ее предшественников, и «левую» группу (3, 17, 14, 1, 16, 5), которая экспрессирует нейрон-специфические гены (Рис. 6 Б). При этом кластеры 7 и 11, которые находятся на пути к кластерам нейронов, наряду с маркерами нейронов также содержат маркеры нейрональных предшественников и поэтому идентифицируются как ранние предшественники нейронов.

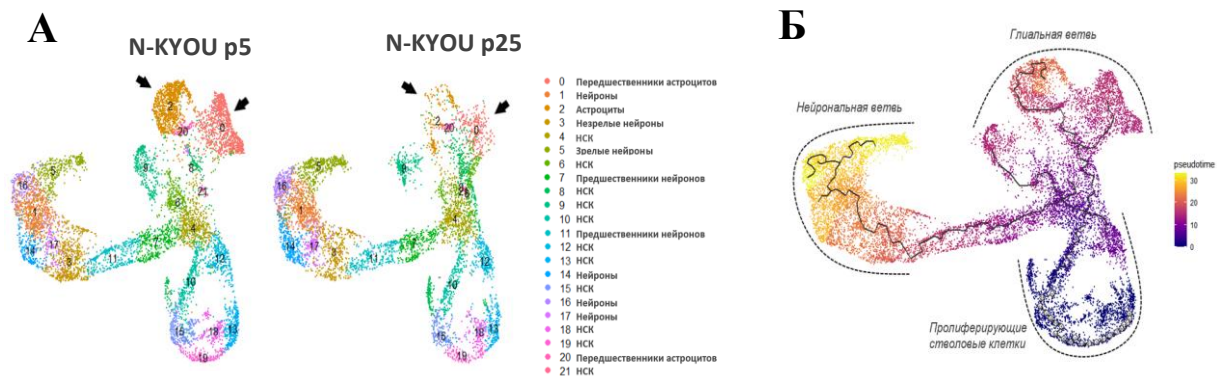


Рисунок 6. Результаты анализа данных scRNAseq из нейральных культур N-KYOU p5 и p25.

А – 22 кластера, выявленные в результате сокращения размерности алгоритма UMAP для данных scRNAseq 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.

Как следует из нашего анализа псевдовремени (Рис. 6 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, причем большинство клеток кластера 8 находились в фазах G₂M и S. Вероятно, он состоит из постоянно делящейся популяции НСК, которая дифференцируется в глиальном направлении, но теряет способность к полной дифференцировке по мере прохождения 25 пассажей.

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.

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 пронеурального транскрипционного фактора *NGN2* нами был выбран наиболее известный протокол с лентивирусной доставкой трансгенов и системы трансаактивации TetON под доксициклин-активируемым промотором.

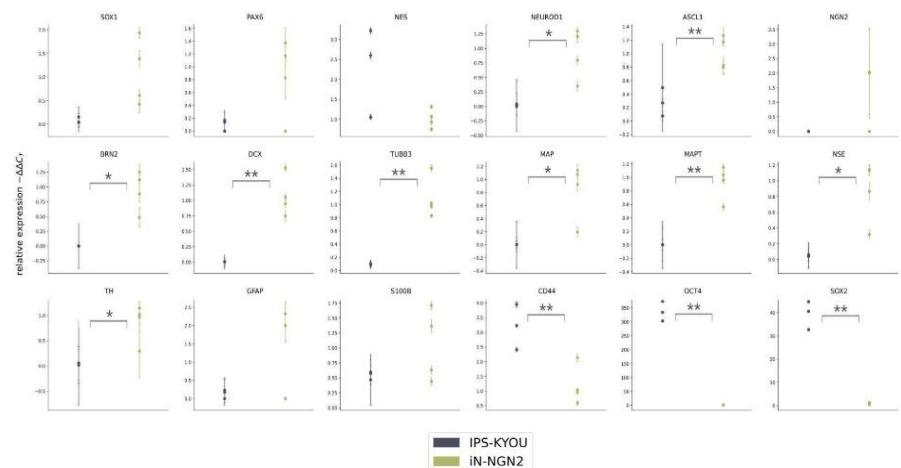
Мы вывели линию ИПСК-KYOU с трансгенами *NGN2* и системы трансаактивации TetON (ИПСК-KYOU-TetON-NGN2). Затем мы оптимизировали оригинальный протокол дифференцировки Zhang et al., 2013 добавлением дополнительного шага –

пересадки дифференцирующихся клеток на новый субстрат с увеличением плотности культуры. 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.

Добавление доксициклина приводило к немедленному началу дифференцировки ИПСК. Добавление AraC на 2-й и 3-й дни дифференцировки позволяло нам эффективно избавиться от оставшихся пролиферирующих ИПСК. Пересадка клеток с сокращением площади культурального сосуда в 2-3 раза на 4й день дифференцировки обеспечивала достаточную плотность нейральных культур для их долгосрочного выживания. Кроме того, отростки нейронов плохо адгезируются на матрикеле и легко отделяются от него при смене культуральной среды, поэтому пересадка производилась на новый культуральный сосуд, последовательно покрытый раствором поли-Д-лизина, а затем раствором матрикеля. На таком субстрате нейроны имели более хорошую адгезию. 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.

Анализ экспрессии генов методом количественной ОТ-ПЦР показал значительное повышение уровней экспрессии нейрональных маркеров, а также маркеров нейрональных предшественников в полученных NGN2-индуцированных нейральных культурах по сравнению с исходной культурой ИПСК (Рис. 7).

Рисунок 7. 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 $-\Delta\Delta Ct$, 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 βIII-тубулин, синаптофизин (SYN), синапсин

(SYN) (не показан), NeuN, hNCAM и NSE, а также на маркер клеток-предшественников нейронов – Nestin (Рис. 8). Глиальный маркер GFAP не был обнаружен. На изображениях, полученных при окрашивании антителом против синаптофизина, четко визуализировались обильные ветвящиеся дендриты, которые не были видны при использовании фазово-контрастной микроскопии (Рис. 8 Б). А изображение, полученное на малом увеличении при окрашивании антителом против β III-тубулина, демонстрирует узоры, образованные отростками нейронов (Рис. 8 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.

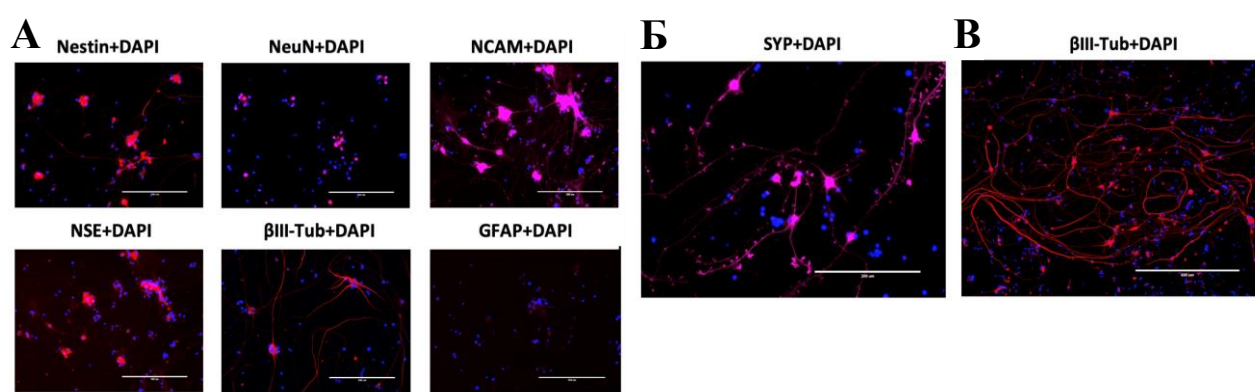


Рисунок 8. Результаты иммуноцитохимического окрашивания iN-NGN2 на 21-й день дифференцировки. Флуоресцентная микроскопия, ядра докрашены DAPI (синий). А, Б – шкала 200 мкм, В – шкала 400 мкм.

Для подтверждения наличия функциональных нейронов в NGN2-индуцированных нейральных культурах, полученных оптимизированным протоколом, мы исследовали нейрофизиологическую кальциевую активность в культуре iN-GCaMP6s-NGN2, экспрессирующей генетически кодируемый кальциевый индикатор GCaMP6s. Добавление глутамата (Glu) в концентрации 100 мкМ приводило к увеличению концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в клетках 23-дневной культуры iN-GCaMP6s-NGN2 (Рис. 9). Мы продемонстрировали наличие ионотропных глутаматных рецепторов по снижению $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на Glu в присутствии ингибиторов глутаматных рецепторов: CNQX (ингибитора AMPA- и каинатных рецепторов) (Рис. 9 А, Д) и МК-801 (ингибитора NMDA-рецепторов) (Рис. 9 Б, Е). При добавлении Glu в бескальциевом буфере в присутствии хелатора EGTA и Mg^{2+} мы не наблюдали повышения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках (Рис. 9 Б). Это говорит о том, что увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на Glu не связано с его высвобождением из внутриклеточных депо, а реализуется только за счет притока ионов Ca^{2+} из буфера (извне клетки). Затем 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 подъему как [Ca²⁺]_i, так и [Na⁺]_i. Добавление Glu в присутствии коктейля ингибиторов ионотропных глутаматных рецепторов MK-801 и CNQX вызывало снижение как [Ca²⁺]_i (Рис. 9 В, Ж), так и [Na⁺]_i (Рис. 9 Г, З). Таким образом, модифицированный нами протокол NGN2-индуцированной дифференцировки ИПСК позволяет получать функционально активные культуры человеческих нейронов, которые на добавление глутамата реагируют повышением концентраций Ca²⁺ и Na⁺ внутри клетки. Поступление Ca²⁺ из буфера обеспечивается преимущественно рецепторами NMDA-типа и в меньшей степени рецепторами AMPA/каинатного типа. Метаботропные глутаматные рецепторы, связанные с мобилизацией Ca²⁺ в цитозоль из кальциевых депо, по-видимому, отсутствуют в полученных нами нейронах.

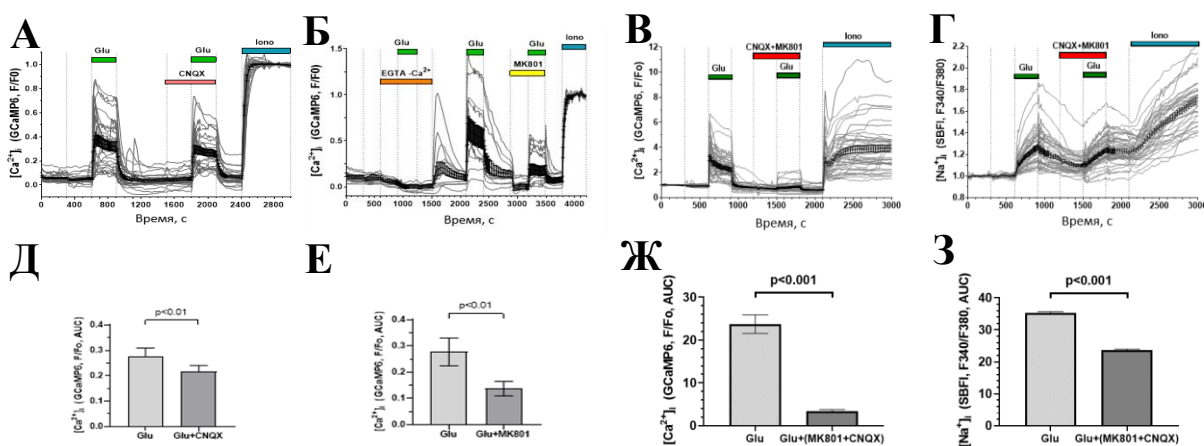


Рисунок 9. Результаты кальциевого (А, Б, В, Д, Е, Ж) и натриевого (Г, З) имиджинга в нейральных культурах iN-GCaMP6s-NGN2. Glu – глутамат (100 мкМ), CNQX – ингибитор AMPA и/или каинатных рецепторов (9 мкМ), MK801 – ингибитор NMDA-рецепторов (9 мкМ), Iono – иономицин (2 мкМ), EGTA- Ca²⁺ – буфер без кальция с хелатором, p – p-value – результат парного t-теста. А-Г – графики зависимости интенсивности флуоресцентного сигнала GCaMP6s или SBFI, нормализованного на флуоресценцию клетки в покое (F/F₀), от времени. Изменение флуоресцентного сигнала клетки отражает изменения [Ca²⁺]_i / [Na⁺]_i в ней. Каждая кривая представляет собой одну клетку, изменяющую интенсивность флуоресценции в течение времени. Д-З – количественная оценка изменения кальциевого ответа, рассчитанная на основе площади под кривыми изменений флуоресцентного сигнала ([Ca²⁺]_i или [Na⁺]_i) (AUC, отн. ед.) графиков А-Г.

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.

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 (общий источник для обеих нейральных культур), показали повышенную экспрессию маркеров НСК и нейрональных предшественников, а также глии в N-KYOU p5 по сравнению с ИПСК и iN-NGN2. Нейрональные же маркеры, напротив, имели более высокий уровень экспрессии в iN-NGN2 (Рис. 10). Таким образом, в N-KYOU p5 преобладают не-нейрональные типы клеток.

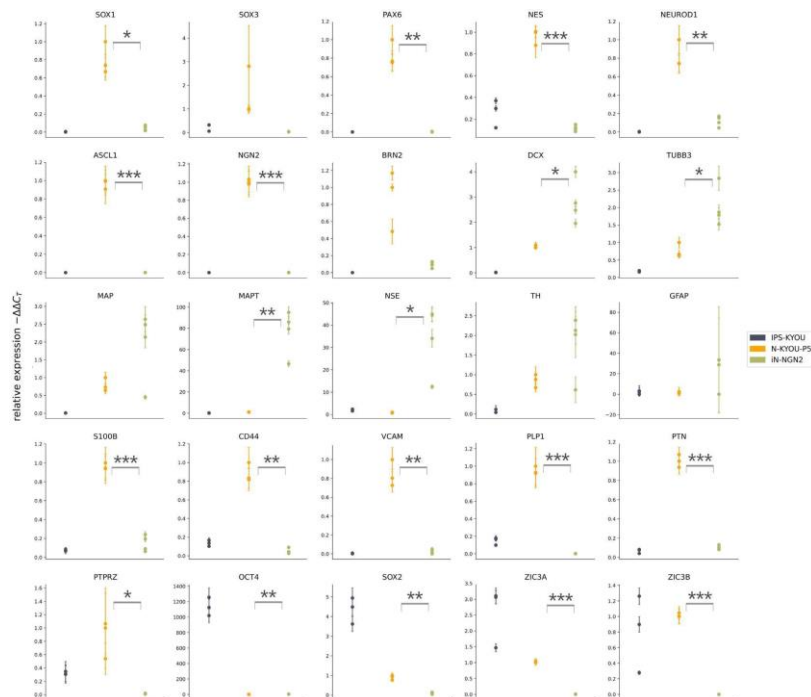


Рисунок 10. Уровни относительной экспрессии маркерных генов, определенные методом количественной ОТ-ПЦР, в образцах линии ИПСК-KYOU, 14-дневных нейральных культурах N-KYOU p5 и 17-дневных нейральных культурах iN-NGN2. Обе нейральные культуры были получены из ИПСК-KYOU, но разными подходами. По оси Y 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).

Тепловая карта дифференциальной экспрессии с результатами кластеризации генов демонстрирует различия в транскриптомных профилях между 14-дневными культурами N-KYOU p5 и iN-NGN2 (Рис. 11 А). На графиках PCA и MDS образцы N-KYOU p5 и iN-NGN2 группируются по разным концам пространства графика, что говорит о наличии различий между ними (Рис. 11 Б, В). Разброс в расположении биологических повторов внутри обеих групп вдоль осей Y на PCA и MDS может говорить о естественных различиях нейральных культур, полученных одним и тем же методом. Таким образом, на основе полученных графиков можно утверждать, что нейральные культуры N-KYOU p5 и iN-NGN2 значительно отличаются друг от друга.

На рисунках 12 и 13 представлены тепловые карты абсолютной и относительной (Z-score) экспрессии выбранных генов-маркеров разных типов нейронов (Рис. 12), а также различных нейральных предшественников и других клеточных типов (Рис. 13). На рисунке 12 А видно, что обе культуры имеют высокий уровень абсолютной экспрессии маркеров незрелых нейронов, а также некоторых маркеров зрелых

нейронов. Однако iN-NGN2 отличается от N-KYOU p5 более высокой экспрессией большей части выбранных генов-маркеров зрелых нейронов (Рис. 12 А). Более того, относительный уровень экспрессии маркеров и зрелых, и незрелых нейронов в iN-NGN2 намного выше, чем в N-KYOU p5 (Рис. 12 Б).

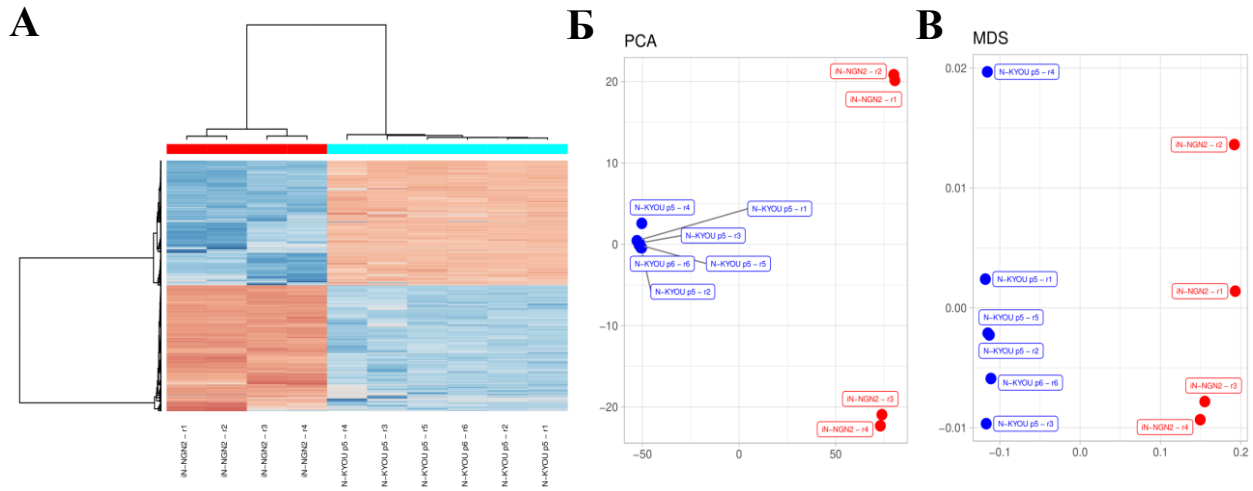


Рисунок 11. Результаты применения методов снижения размерности пространства для данных общих транскриптомов нейральных культур N-KYOU p5 и iN-NGN2 при $|\logFC| > 1$ и скорр. значении $p < 0,05$. **А** – кластерный анализ, визуализированный в виде тепловой карты дифференциально экспрессированных генов. **Б** – анализ главных компонент (PCA), примененный к стабилизированным по дисперсии преобразованным данным экспрессии. Оси X и Y – главные компоненты 1 и 2 соответственно, объясняющие 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.

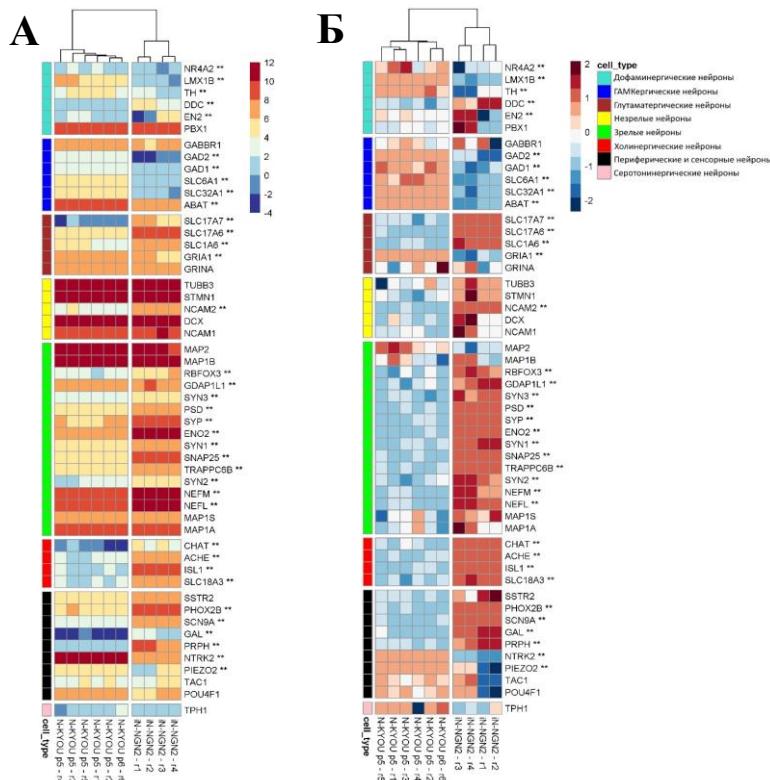


Рисунок 12. Тепловые карты изменения экспрессии генов-маркеров разных типов нейронов. Двумя звездочками (**) обозначены гены с $|\logFC| > 1$ и скорректированным значением $p < 0,05$. Легенда (клеточные типы) является общей для обеих тепловых карт и представлена на рисунке Б. **А** – Карта с абсолютными значениями уровней транскрипции генов **Б** – Карта с относительными значениями уровней транскрипции генов по шкале z-score

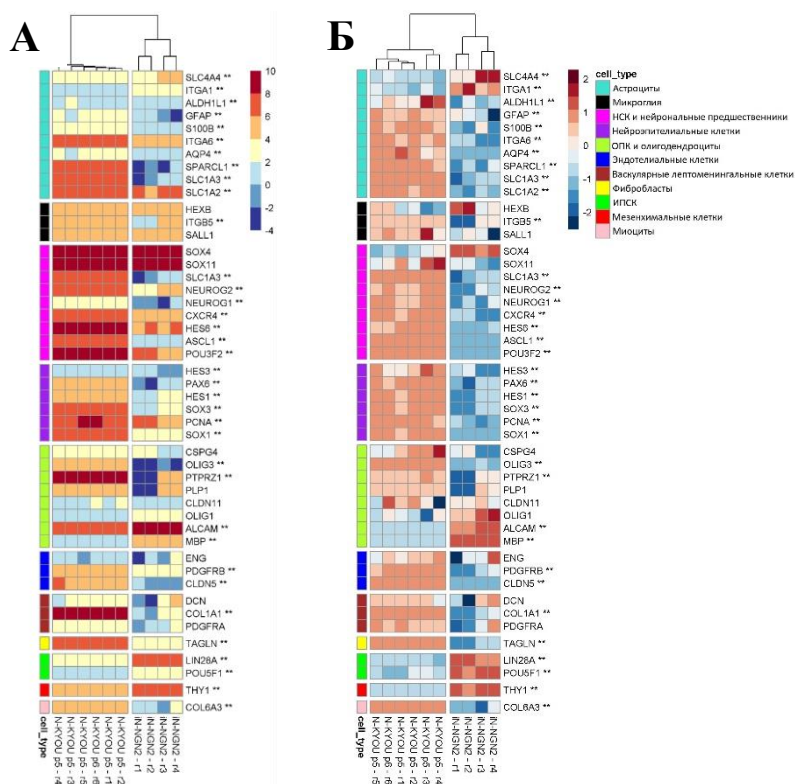


Рисунок 13. Тепловые карты изменения экспрессии генов-маркеров различных не-нейрональных типов клеток. Двумя звездочками (**) обозначены гены с $|\log FC| > 1$ и скорректированным значением $p < 0,05$. Легенда (клеточные типы) является общей для обеих тепловых карт и представлена на рисунке Б. НСК – 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

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). В то же время в нейральных культурах N-KYOU р5 представлена повышенная экспрессия маркеров ГАМКергических, серотонинергических и дофаминергических типов нейронов (Рис. 12 А, Б), хотя маркеры глутаматергических нейронов также присутствуют (Рис. 12 Б).

Экспрессия генов-маркеров нейроэпителлия и нейральных предшественников различных стадий сильно выражена в N-KYOU р5 и в абсолютных, и в относительных значениях, по сравнению с iN-NGN2 (Рис. 13 А, Б). В отличие от iN-NGN2, нейральные культуры N-KYOU р5 значительно обогащены экспрессией маркеров астроцитов, олигодендроцитов, а кроме того, маркеров других типов клеток, таких как эндотелиальные, сосудистые лептоменингальные, фибробласты, миоциты. В iN-NGN2 же повышена экспрессия двух маркеров ИПСК, мезенхимального маркера *THY1* и некоторых маркеров олигодендроцитов (Рис. 13 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 р5. Нейральные культуры iN-NGN2, в отличие от N-KYOU р5, были значительно обогащены путями, характерными для нервной системы, а также различными синаптическими процессами

и процессами, связанными с аксональным ростом. В то же время в N-KYOU p5 были более выражены сигнальные пути, связанные прогрессией клеточного цикла, регуляцией плюрипотентного состояния клеток, а также процессы, связанные с эмбриогенезом, развитием нервной трубки и нервной системы.

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. 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 отличаются, 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, нейроны занимают лишь небольшую долю по сравнению с нейральными культурами, полученными с помощью экзогенной гиперэкспрессии *NGN2* (iN-NGN2). 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 ергичности: 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 ергичности). 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.

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.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова

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. **Q1, 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.