

УДК 577.2

## ЭКСПРЕССИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА NMDA- И GABA<sub>A</sub>- РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ВЕНТРАЛЬНЫЕ МЕЗЕНЦЕФАЛИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ

© 2019 С.А. Антонов<sup>1\*</sup>, Е.В. Новосадова<sup>1</sup>, А.Г. Кобылянский<sup>1</sup>,  
С.Н. Иллариошкин<sup>2</sup>, В.З. Тарантул<sup>1</sup>, И.А. Гривенников<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва,  
Россия; электронная почта: [vamore@inbox.ru](mailto:vamore@inbox.ru)

<sup>2</sup> Научный центр неврологии, 125367 Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.10.2018

После доработки 29.11.2018

Принята к публикации 29.11.2018

Ионотропные глутаматные и ГАМК-рецепторы регулируют процесс дифференцировки и определяют функциональные свойства зрелых нейронов. Как недостаточная, так и избыточная активность этих систем нейротрансмиссии ассоциирована с различными заболеваниями нервной системы. В современной литературе имеются ограниченные сведения относительно профиля экспрессии данных рецепторов и механизмов их регуляции при дифференцировке специализированных типов нейронов человека. В настоящей работе с использованием ПЦР в реальном времени и иммуноцитохимического окрашивания был изучен профиль экспрессии NMDA- и GABA<sub>A</sub>-рецепторов при дифференцировке *in vitro* вентральных мезенцефалических нейронов, получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека. Исследована связь между процессом созревания нейронов и динамикой экспрессии данных генов. Также посредством прижизненного наблюдения клеток с применением флуоресцентного кальциевого индикатора была изучена функциональная активность рецепторов. С помощью трансдукции нейральных предшественников репортерными генами *TagGFP* и *TagRFP* проанализирована роль NMDA- и GABA<sub>A</sub>-рецепторов в регуляции роста нейритов и развитии спонтанной активности изучаемых клеток. Из полученных в работе результатов следует, что агонисты изучаемых рецепторов могут быть использованы для оптимизации существующих протоколов нейральной дифференцировки ИПСК, в частности для ускорения созревания нейронов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** NMDA-рецепторы, GABA<sub>A</sub>-рецепторы, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, мезенцефалические нейроны, дифференцировка.

DOI: 10.1134/S0320972519030138

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека [1] и возможность их направленной дифференцировки в специализированные типы нейронов открывают уникальные возможности для изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний *in vitro* [2]. При этом условия и временные сроки, в которых происходит дифференцировка нейронов при онтогенезе, не могут быть полностью воссозданы в культуре *in vitro*, что приводит к фенотипическим отличиям у культивируемых нейронов [3] и создает ограничения в их

применении для моделирования конкретных физиологических и патологических процессов.

Функционирование нейронов в роли активных элементов нервной системы зависит от экспрессии рецепторов нейротрансмиттеров, среди которых важную роль играют ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы (GABA<sub>A</sub>-R) и глутаматные NMDA-рецепторы (NMDA-R). Нарушения функций данных рецепторов ассоциированы с различными психическими и неврологическими заболеваниями [4–7]. NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R играют важную роль в развитии нервной системы, регули-

Принятые сокращения: ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; NMDA – N-метил-D-аспарагиновая кислота; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; GABA<sub>A</sub>-R – ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы; NMDA-R – NMDA-рецепторы; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; VM-нейроны – вентральные мезенцефалические нейроны; НП – нейральные предшественники; кНП – коммитированные нейральные предшественники; рНП – ранние нейральные предшественники; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; BDNF – нейротрофический фактор мозга; GDNF – фактор роста нервов, выделенный из глии; ТД – терминальная дифференцировка.

\* Адресат для корреспонденции.

руя пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток [8, 9].

В ряде работ было показано, что функциональные NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R экспрессируются в нейронах, получаемых из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и ИПСК человека [10–12]. В то же время функции данных рецепторов при дифференцировке ИПСК в специализированные типы нейронов, а также сходство профилей экспрессии данных генов *in vitro* и *in vivo* остаются малоизученными.

Целью настоящей работы являлся анализ профиля экспрессии ряда субъединиц NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R при дифференцировке ИПСК человека в мезенцефалические нейроны и исследование функциональной активности данных рецепторов.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Культуры ИПСК и нейрональная дифференцировка.** ИПСК линий IPSHD1.1S и IPSPDL2.15L были получены путем репрограммирования фибробластов кожи человека с помощью лентивирусных векторов, несущих гены *OCT4*, *SOX2*, *Nanog* и *Klf4* [13]. Дифференцировку в вентральные мезенцефалические нейроны (ВМ-нейроны) проводили в среде DMEM-F12, содержащей 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия) и 1× добавку инсулин-трансферрин-селенит («ПанЭко», Россия), по ранее опубликованному протоколу [14], состоящему из трех стадий: 1) нейральной индукции с помощью двойного ингибирования SMAD-пути с использованием 10 мкМ SB431542 («Stemgent», США) и 80 нг/мл рекомбинантного Noggin («Peprotech», США); 2) региональной спецификации с использованием 100 нг/мл Sonic hedgehog (Shh) и 20 нг/мл FGF8 (фактор роста фибробластов 8; «Peprotech», США); 3) терминальной дифференцировки (ТД), которую проводили в монокультуре в среде с добавлением 20 нг/мл BDNF и 20 нг/мл GDNF («Peprotech», США) либо при совместном культивировании с астроцитами мыши, полученными из мозга 19–20-дневных эмбрионов, в стандартной среде DMEM-F12 без добавок (кроме 2 мМ L-глутамин).

**Измерение внутриклеточной концентрации ионов кальция.** Измерение проводили с использованием флуоресцентного индикатора Fluo4 («Thermo Fisher Scientific», США) с помощью конфокального микроскопа LSM 510 («Zeiss», Германия) [15]. При аппликации L-глутамата («Sigma-Aldrich», США) одновременно в среду вводили 15 мкМ глицина (коагониста NMDA-R).

**Трансфекция ИПСК.** Трансфекцию осуществляли с помощью вектора Lv-Tag-GFP2 («Евро-

ген», Россия), следуя рекомендациям производителя.

**ОТ-ПЦР в реальном времени.** Образцы РНК выделяли с помощью набора РИБО-золь-А («Интерлабсервис», Россия), следуя инструкции производителя. ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора Mini-Opticon («Bio-Rad», США), набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) и праймеров, специфичных к указанным генам («ДНК-Синтез», Россия). Последовательности праймеров представлены в таблице. Анализ полученных данных осуществляли по методу  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [16].

**Иммунофлуоресцентная детекция.** Иммунофлуоресцентную детекцию проводили, как описано ранее [15], с использованием поликлональных антител кролика к Glun2A («Sigma-Aldrich», США) в разведении 1 : 300 и моноклональных антител мыши к нестину («Millipore», США) в разведении 1 : 750. Детекцию осуществляли с помощью поликлональных антител козы к иммуноглобулинам мыши и кролика, конъюгированных с красителями Alexa 546 и Alexa 488 соответственно, в разведении 1 : 1000 («Thermo Fisher Scientific», США).

**Метод TUNEL.** Окрашивание апоптотических клеток проводили по методу, описанному в работе Zhao и Darzynkiewicz [17], с использованием Br-dUTP («ДНК-Синтез», Россия) и терминальной нуклеотидилтрансферазы («NEB», Великобритания). Детекцию BrdU осуществляли с помощью моноклональных антител мыши (1 : 200; «Santa Cruz», США). Для подтверждения специфичности реакции окрашивание TUNEL<sup>+</sup> клеток сопоставляли с морфологией их ядер.

Визуализацию препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Imager Z1 («Zeiss», Германия). Изображения анализировали с использованием программного пакета ImageJ 1.49r (NCBI, США).

**Статистическую обработку** данных проводили с помощью программы SigmaPlot 11 («Systat Software Inc», США).

В экспериментах по измерению внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>, оценке выживаемости клеток и роста нейритов применяли МК-801, мусцимол и глутамат натрия («Sigma-Aldrich», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Экспрессия генов, кодирующих субъединицы NMDA-R, GABA<sub>A</sub>-R и хлорные переносчики NKCC1 и KCC2, при дифференцировке ИПСК человека в ВМ-нейроны.** Для изучения субъединичного состава NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R в ВМ-ней-

Праймеры, используемые для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени

Ген	Прямой праймер, 5' → 3'	Обратный праймер, 5' → 3'
<i>gapdh</i>	AGCCACATCGCTCAGACACC	GTA CTCAGCGGCCAGCATCG
<i>grin1</i>	AGGATGGGGACCGGAAGTTCG	AGGGCTCCTGGTGGATCGTCA
<i>grin2a</i>	GAAGTAATGGCACCGTCTCACC	GATTCTGGACAGGCACGGAGTT
<i>grin2b</i>	TCATCCCTGAGCCCCAAAAGCAG	CCTCCAGGGTCACAATGCTCAG
<i>grin2c</i>	CATCAGTGTGATGGTGGCTCGCA	CCCGGACTTCTTGCTCTGGTGA
<i>grin2d</i>	CGCTCGTGCTCACGCCCAA	GTAGGACAGGAAGGCCCGGTGG
<i>grin3a</i>	AAGGGGAGGGGATGTGGTAAGCG	GGCCACAACCTTGCTTTGCCCTT
<i>grin3b</i>	CCCGGGGCGCTTCTTGGA	AAGTCCAGCTGGCCGTCCCG
<i>gabra1</i>	ATGCCCATGCTTGCCCACTA	TGTTGAGCCAGAAGGAGACTTGTG
<i>gabra2</i>	AAAGAGGATGGGCTTGGGATGGG	GGCTTCTTGTGGGTTCTGGCGT
<i>gabra3</i>	GCTGCGACCTGGGCTTGGAGAT	TGGAAGAAGGTGTCCGGTGTCCA
<i>gabrb1</i>	ATTCGCTTGC GGCCGGACT	GCAGCTGTGGTTGTGATTCGGA
<i>gabrb2</i>	ACGATGCTTCACTGCAAGGGTG	GGGCCCCCTCCCAAAGAAGATGT
<i>gabrg1</i>	GAGCTAGTGCAGCACACGTA	ACCCAGGTTTTGTTCCACCGT
<i>gabrg2</i>	GAGCTAGTGCAGCACACGTA	CACGTGGATAGCCATAACTGGA
<i>slc12a2</i>	TTCCAGAAGTTTAGGGCCCCGA	CGTGGCCCCAAGTTTTCTGCAA
<i>slc12a5</i>	CCTCAGTCACAGGGATCATGGC	CACAATGCCATCCCTCGAGATG

ронах человека была осуществлена направленная дифференцировка ИПСК, как описано ранее [14], и получены популяции клеток с содержанием значительной доли (>35%) дофаминергических нейронов, иммунопозитивных к тирозингидроксилазе, а также ГАМК<sup>+</sup>-нейронов (5–10%).

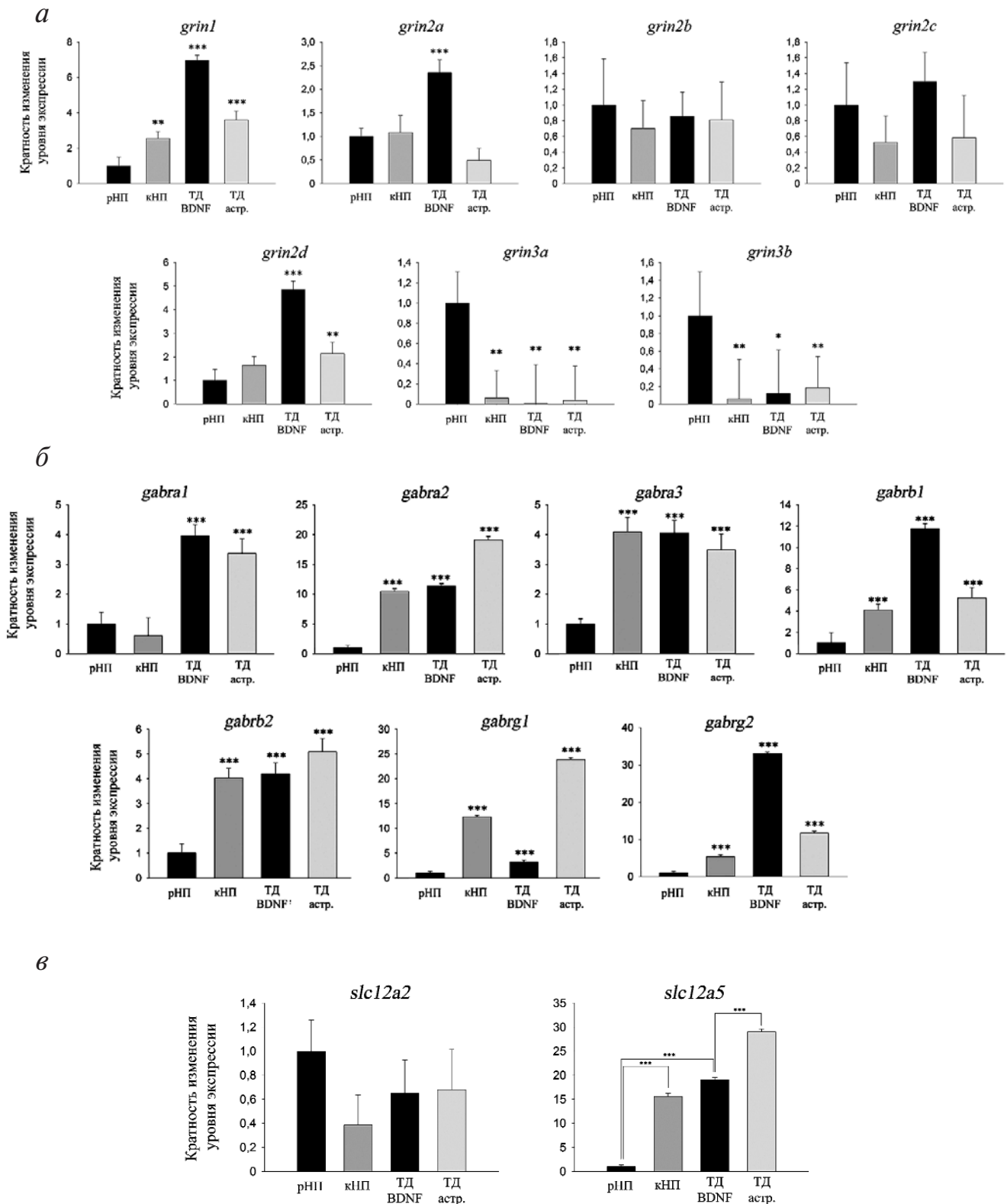
С помощью ОТ-ПЦР в реальном времени в этих культурах были проанализированы уровни транскрипции генов, кодирующих субъединицы NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R, а также генов *slc12a2* и *slc12a5* на трех последовательных стадиях дифференцировки: ранних мультипотентных нейральных предшественниках (рНП), коммитированных ВМ-предшественниках (кНП) и нейронах при терминальной дифференцировке (ТД). Последнюю стадию дифференцировки осуществляли в двух вариантах условий: в среде с рекомбинантными нейротрофическими факторами BDNF и GDNF (ТД BDNF) или в стандартной среде при совместном культивировании изучаемых клеток с астроцитами мыши (ТД астр.). Анализ транскрипции генов при ТД проводили на 15-й день культивирования. Такие условия широко используются в современных протоколах получения специализированных типов нейронов из ИПСК [12, 18]. Изменения уровня экспрессии генов рассчитывали относительно уровня экспрессии в рНП, принимаемого за единицу.

Исходя из значений  $\Delta C_T$ , соотношение уровней транскрипции генов, кодирующих субъединицы NMDA-R, было следующим (от большего к меньшему): *grin1* >> *grin2a* = *grin2b* > *grin2c* > *grin3a* > *grin2d* > *grin3b*.

Уровни транскрипции генов *grin1*, *grin2a* и *grin2d* прогрессивно увеличивались на последовательных стадиях дифференцировки. Эти изменения имели сходный характер в обеих линиях ИПСК, поэтому далее приводятся репрезентативные данные только по линии IPSHD1.1S (рис. 1, а). Уровень транскрипции указанных генов был значительно выше при ТД клеток с рекомбинантными BDNF/GDNF по сравнению с ТД в совместной культуре с астроцитами мыши. Уровень транскрипции гена *grin2b* оставался стабильным на всех изученных стадиях и не зависел от условий ТД.

Из семи изученных субъединиц GABA<sub>A</sub>-R наиболее выраженные изменения в транскрипции наблюдались для генов *gabra2*, *gabrb1*, *gabrg1* и *gabrg2* (рис. 1, б). При ТД с рекомбинантными факторами был обнаружен более высокий уровень транскрипции генов *gabrb1* и *gabrg2*, а при ТД в совместной культуре с астроцитами мыши – более высокий уровень транскрипции генов *gabra2*, *gabrb2* и *gabrg1*.

Дифференцировка изучаемых клеток сопровождалась значительным увеличением уровня транскрипции гена *slc12a5*, что в наибольшей



**Рис. 1.** Динамика транскрипции генов при нейрональной дифференцировке ИПСК (линия IPShD1.1S). рНП – ранние мультипотентные предшественники, кНП – коммитированные ВМ-предшественники, ТД BDNF – терминальная дифференцировка в среде с рекомбинантным нейротрофическим фактором, ТД астр. – терминальная дифференцировка в совместной культуре с астроцитами мыши. *а* – Субъединицы NMDA-R; *б* – субъединицы GABA<sub>A</sub>-R; *в* – хлорные переносчики Slc12a2 (NKCC1) и Slc12a5 (KCC2). *n* = 4; \* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001 по *t*-критерию Стьюдента

степени проявлялось при ТД в совместных культурах с астроцитами мыши. Уровень экспрессии гена *slc12a2* при этом оставался стабильным (рис. 1, *в*).

**Glun2A-субъединица NMDA-R экспрессируется в нейральных предшественниках и незрелых нейронах человека.** Известно, что у мыши Glun2A-субъединица NMDA-R, кодируемая геном *grin2a*, специфически локализуется в зрелых нейронах [19]. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания была проанализирована экспрессия Glun2A на последовательных стадиях нейрональной дифференцировки ИПСК человека (рис. 2, *а*). Окрашивание Glun2A отсутствовало в недифференцированных ИПСК человека (данные не приведены). В культурах рНП встречались отдельные клетки, экспрессирующие Glun2A, в то время как все клетки в культурах кНП являлись Glun2A-положительными. Иммунореактивность Glun2A наблюдалась также во всех клетках при ТД, при этом наиболее интенсивно окрашивались нейриты.

Было обнаружено, что в формирующих розетки НП человека, являющихся специализированным типом мультипотентных НП [20], как в адгерентной культуре, так и в суспензионных нейросферах иммунореактивность Glun2A преобладает в апикальной области клеток (рис. 2, *б*).

Для сравнения профилей экспрессии Glun2A при нейрональной дифференцировке у человека и мыши было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание первичных культур НП мыши с помощью антител к Glun2A и маркеру НП нестину (рис. 2, *в*). В данных культурах наблюдалась Glun2A-иммунореактивность в нейритах, однако солокализация с нестином не была обнаружена.

Для сопоставления экспрессии Glun2A в НП человека *in vitro* и мыши *in vivo* было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание срезов эмбрионального мозга мыши. Иммунореактивность различной интенсивности присутствовала в кортикальной пластинке, полиморфном и молекулярном слоях гиппокампа – зонах, в которых происходит созревание нейронов после их миграции (рис. 2, *г*). В то же время окрашивание Glun2A отсутствовало в неокортикальной субвентрикулярной зоне, гиппокампальном нейроэпителии и зубчатой извилине гиппокампа, которые являются прогениторными зонами, содержащими популяции делящихся НП (рис. 2, *г*, врезка).

**Экспрессия субъединиц NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R в ВМ-нейронах человека *in vitro* ассоциирована с образованием в этих клетках функциональных рецепторов.** NMDA-R являются катионными каналами, проницаемыми для ионов Ca<sup>2+</sup> [21]. GABA<sub>A</sub>-R представляют собой анионные кана-

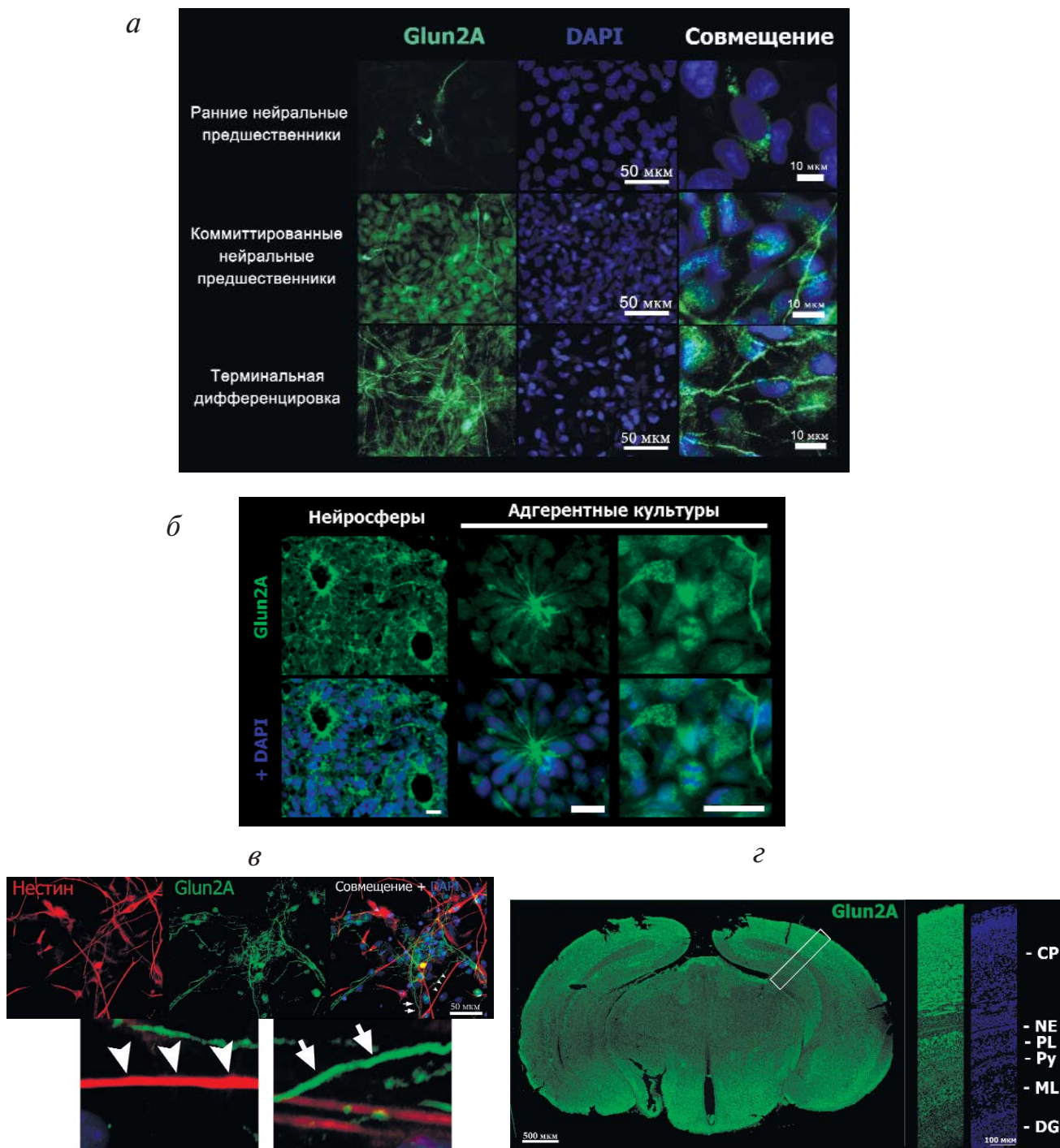
лы, активация которых в незрелых нейронах вызывает деполяризацию клеточной мембраны и открытие потенциал-зависимых кальциевых каналов [22]. Таким образом, активность NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R ассоциирована с изменениями внутриклеточной концентрации ионов кальция ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>).

Для установления корреляции между экспрессией генов, кодирующих субъединицы NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R, и формированием в изучаемых клетках функциональных рецепторов были проведены измерения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в клетках на стадии ТД при аппликации агонистов глутаматных рецепторов и GABA<sub>A</sub>-R, с использованием для этой цели кальциевого индикатора Fluo4.

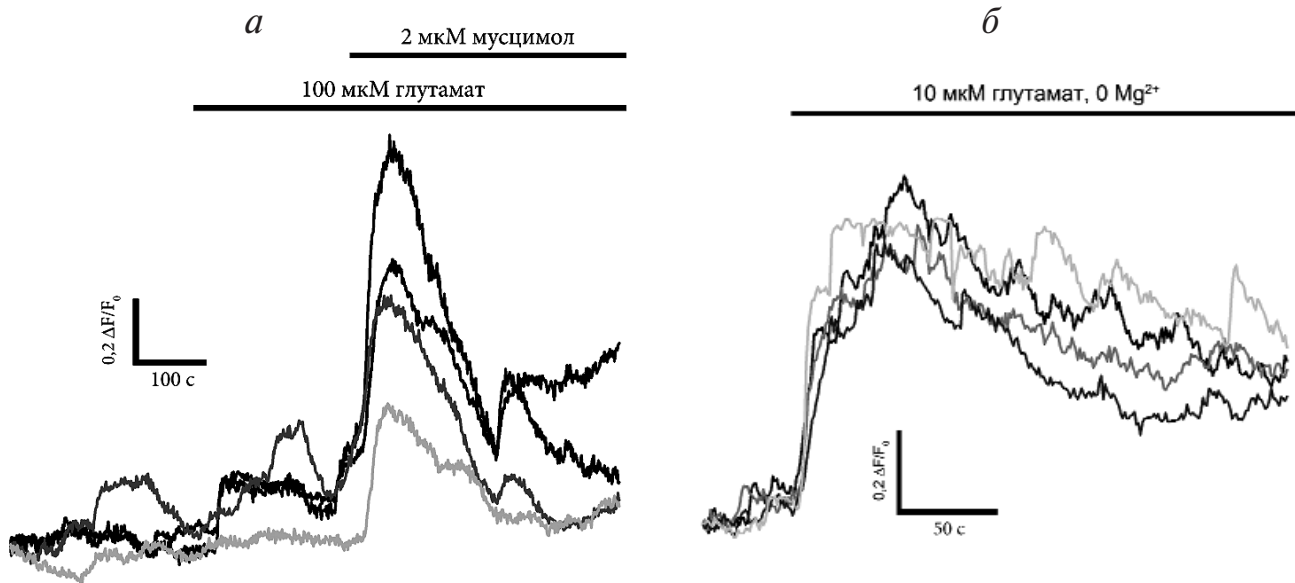
Ранее нами было продемонстрировано, что с 8-го по 30-й дни в ИПСК, находящихся на стадии ТД, активация GABA<sub>A</sub>-R оказывает в изучаемых нейронах возбуждающее действие, вызывая увеличение [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [15]. В настоящей работе аналогичное возбуждающее действие ГАМК и селективного агониста GABA<sub>A</sub>-R мусцимола наблюдалось на 15-й день ТД нейронов при их совместном культивировании с астроцитами мыши. В тех же клетках аппликация глутамата (100 мкМ) в среде, содержащей 0,7 мМ Mg<sup>2+</sup>, не приводила к изменению [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (рис. 3, *а*). В отсутствие ионов Mg<sup>2+</sup> в значительной доле клеток при аппликации 10 мкМ глутамата наблюдалось выраженное увеличение [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (рис. 3, *б*). Поскольку известно, что ионы Mg<sup>2+</sup> вызывают потенциал-зависимое ингибирование NMDA-R, не влияя при этом на функционирование других типов ионотропных глутаматных рецепторов [21], данный результат указывает на наличие в изучаемых клетках на данном этапе дифференцировки функциональных NMDA-R, но не других типов (AMPA или каинатных) ионотропных глутаматных рецепторов.

Согласно литературным данным, преобладающим типом глутаматных рецепторов в развивающихся нейронах является NMDA-R [23], в то время как в зрелых нейронах – AMPA-R [24]. По результатам настоящего исследования, аналогичное преобладание NMDA-R наблюдается и при дифференцировке ВМ-нейронов человека.

**Глутамат проявляет умеренную цитотоксичность в культурах ВМ-нейронов, полученных из ИПСК человека.** Ранее Gupta et al. [25] продемонстрировали эксайтотоксическое действие глутамата в культурах нейронов неустановленного типа, получаемых из ЭСК человека. Восприимчивость к глутамату отсутствовала у 2-недельных нейронов и увеличивалась в ходе дифференцировки, достигая максимума в 8-недельных культурах [25]. Сведения о токсичности глутамата в культурах ВМ-нейронов, получаемых из



**Рис. 2.** *a* – Иммунофлуоресцентное окрашивание Glun2A при нейрональной дифференцировке ИПСК. Левый столбец – Glun2A, средний столбец – окрашивание ядер клеток DAPI, правый столбец – увеличенные фрагменты совмещенных изображений; *б* – локализация Glun2A в апикальной области формирующих розетки НП человека. Как в суспензионных нейросферах (слева), так и в адгерентной культуре (центральная колонка) интенсивность окрашивания Glun2A преобладает в апикальной зоне клеток. В других типах НП человека (справа) Glun2A не проявляет асимметричного распределения. Масштабный отрезок – 20 мкм; *в* – двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток НП мыши с помощью антител к Glun2A (зеленый цвет) и нестину (красный цвет). Иммунореактивность Glun2A<sup>+</sup> (длинные стрелки) не сококализуется с нестин-положительными отростками (короткие стрелки). В нижнем ряду представлены увеличенные фрагменты изображений; *г* – иммунофлуоресцентное окрашивание Glun2A (зеленый цвет) в мозге 19-дневного эмбриона мыши. Выделенный рамкой участок изображения приведен в увеличенном виде справа. CP – кортикальная пластинка, NE – гиппокампальный нейроэпителиальный слой, PL – полиморфный слой гиппокампа, Py – слой гиппокампальных пирамидальных нейронов, ML – молекулярный слой гиппокампа, DG – зубчатая извилина гиппокампа. Ядра окрашены DAPI (синий цвет)



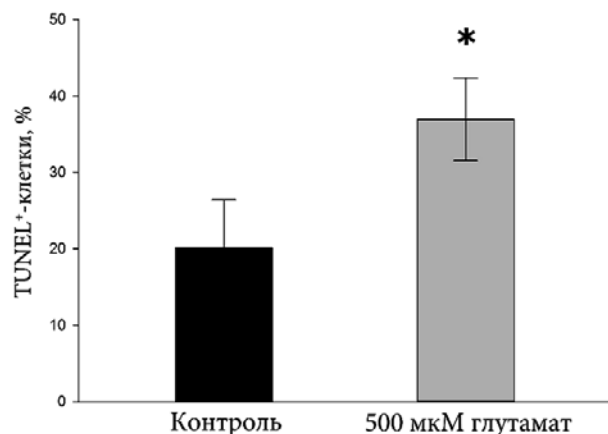
**Рис. 3.** Динамика изменений  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках на 15-й день ТД в совместной культуре с астроцитами мыши: *а* — при воздействии глутамата и мусцимола в стандартной среде (раствор Хенкса). Представлены графики изменения интенсивности флуоресценции  $Ca^{2+}$ -индикатора Fluo4 от времени в четырех репрезентативных клетках; *б* — при воздействии глутамата в среде, не содержащей  $Mg^{2+}$  (раствор Хенкса без добавления солей  $Mg^{2+}$ ). Представлены графики изменения интенсивности флуоресценции  $Ca^{2+}$ -индикатора Fluo4 от времени в четырех репрезентативных клетках

ИПСК человека, в современной литературе отсутствуют.

В данной работе для выявления апоптотических клеток в культурах ВМ-нейронов человека был использован метод TUNEL. В наших экспериментах глутамат вводился в культуральную среду в концентрации 500 мкМ на 14–15-й день ТД. Было установлено, что в изучаемых культурах исходно существует относительно высокий базальный уровень апоптотической гибели клеток: доля TUNEL<sup>+</sup>-ядер составляла  $(20,1 \pm 6,3)\%$  (рис. 4). В присутствии 500 мкМ глутамата доля TUNEL<sup>+</sup>-ядер возрастала до  $(36,9 \pm 5,4)\%$ . Этот результат свидетельствует о существовании в изучаемых культурах субпопуляции нейронов, уязвимых к токсическому действию глутамата.

**Участие NMDA-R в регуляции спонтанной активности ВМ-нейронов.** Спонтанная активность критически важна для созревания различных типов нейронов [26]. Возникновение спонтанной активности рассматривалось в ряде работ в качестве критерия оценки функциональной зрелости нейронов, получаемых из ИПСК человека [12, 27, 28]. Поскольку известно, что NMDA-R вовлечены в регуляцию созревания многих типов нейронов [29, 30], было проанализировано участие этого рецептора в формировании спонтанной возбудимости клеток посредством оценки максимальной амплитуды  $Ca^{2+}$ -спайков.

Поскольку базовая среда DMEM-F12, используемая для культивирования клеток в данной работе, содержит 50 мкМ L-глутамат, для изучения роли NMDA-R в созревании нейронов был применен МК-801 (селективный антагонист NMDA-R) в концентрации 10 мкМ. ТД проводили в присутствии МК-801, за 24 ч до регистрации спонтанной активности ингибитор отмывали. Характеристики спонтанной активности определяли с помощью измерения динамики изменений  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Рис. 4.** Оценка токсичности глутамата в культурах ВМ-нейронов человека с помощью метода TUNEL. Общее число клеток определяли по числу ядер, окрашенных DAPI. \*  $p < 0,001$ ;  $n = 3$

Появление спонтанной активности наблюдалось в нейронах, получаемых из ИПСК на 10–15-й дни ТД. Репрезентативные записи спонтанной активности индивидуальных клеток представлены на рис. 5, а. Было установлено, что амплитуда спонтанных Ca<sup>2+</sup>-спайков была значительно ниже в клетках, дифференцировавшихся в среде с добавлением МК-801, по сравнению с контролем (рис. 5, б). Полученные результаты указывают на участие NMDA-R в регуляции функционального созревания ВМ-нейронов человека.

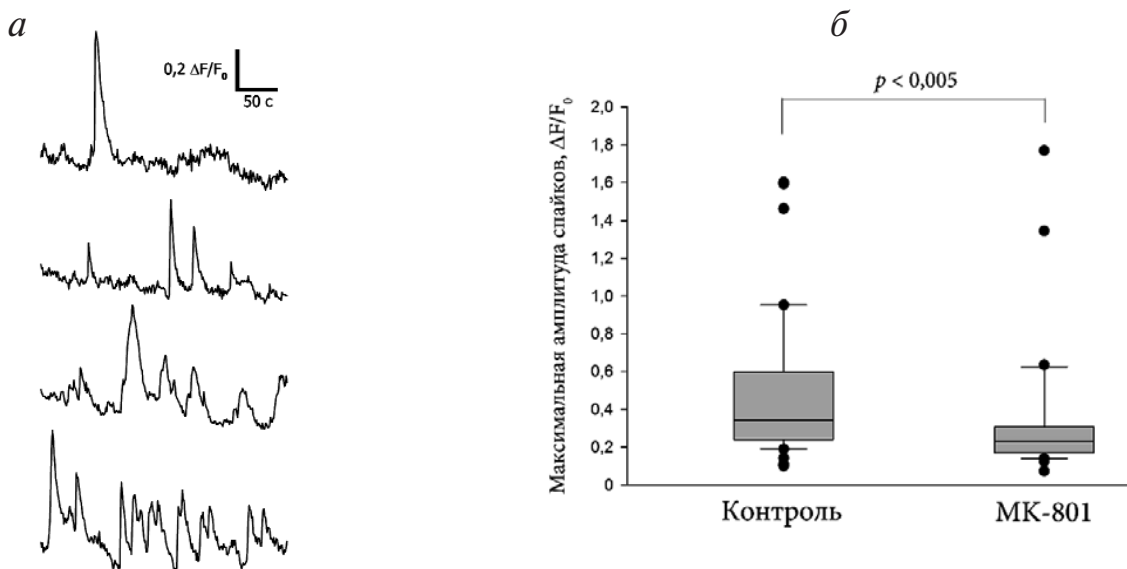
**Роль GABA<sub>A</sub>-R в регуляции роста нейритов ВМ-нейронов человека.** Для изучения роста нейритов индивидуальных клеток была проведена трансдукция лентивирусными векторами, несущими репортерные гены *Tag-GFP2* и *Tag-RFP*. Иммунофлуоресцентное окрашивание цитоскелетных белков βIII-тубулина и MAP-2 не позволяло нам установить принадлежность нейритов к той или иной отдельной клетке в связи с тяготением данных культур к росту в относительно высокой плотности и формированием многослойных структур и плотных сплетений нейритов. Клетки, меченые *Tag-GFP2* либо *Tag-RFP*, смешивали с нетрансдуцированными клетками исходной линии в отношении 1 : 10, что обеспечивало легкость идентификации и отслеживания нейритов отдельных меченых клеток при сохранении оптимальной для роста плотности культуры (рис. 6, а). Полученные статистически значимые различия длины нейритов на после-

довательных временных точках дифференцировки (4, 7 и 11-й дни ТД) свидетельствуют об эффективности данного подхода для изучения факторов, влияющих на нейритогенез (данные не приведены).

Дифференцировка в присутствии мусцимола, селективного агониста GABA<sub>A</sub>-R, в концентрации 2 мкМ приводила к достоверному увеличению длины нейритов индивидуальных клеток при ТД (рис. 6, б). Этот результат согласуется с описанными ранее эффектами агонистов GABA<sub>A</sub>-R для других типов нейронов [31] и указывает на важную регуляторную роль GABA<sub>A</sub>-R в определении фенотипа дифференцирующихся ВМ-нейронов человека. Поскольку увеличение длины нейритов является одним из характерных изменений, сопровождающих созревание нейронов [22], агонисты GABA<sub>A</sub>-R могут рассматриваться в качестве стимуляторов созревания нейронов человека. Данный вывод согласуется с результатами Rushton et al. [32], обнаружившими способность ГАМК стимулировать созревание нейронов не установленного регионального фенотипа, получаемых из ИПСК человека.

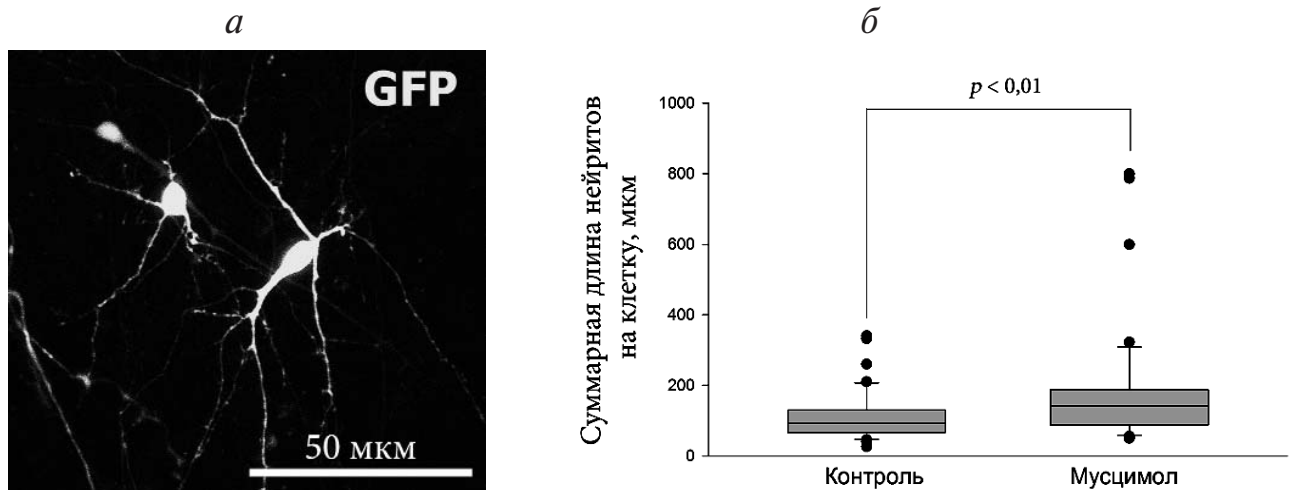
### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что дифференцировка и созревание нейронов сопровождаются реорганизацией субъединичного состава NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R [9, 33].



**Рис. 5.** Спонтанные изменения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в культурах ВМ-нейронов человека на 15-й день ТД. а – На репрезентативных графиках представлены изменения флуоресценции Ca<sup>2+</sup>-индикатора Fluo4 в индивидуальных клетках в зависимости от времени. Спонтанная активность проявлялась в виде отдельных Ca<sup>2+</sup>-спайков, очередей спайков или пейсмейкерной активности; б – снижение максимальной амплитуды спонтанных Ca<sup>2+</sup>-спайков в культурах нейронов после 10 дней дифференцировки в среде с МК-801. Медианные значения вычисляли для 70 и более нейронов для каждой повторности, n = 4. Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни





**Рис. 6.** Влияние мусцимола на длину нейритов индивидуальных клеток. В сумме было проанализировано >300 нейронов в трех независимых экспериментах. *a* – Репрезентативное изображение нейронов, экспрессирующих Tag-GFP; *б* – результаты анализа общей длины нейритов на клетку на 4-й день ТД

Несмотря на значительное число работ, посвященных направленной дифференцировке ИПСК в ВМ-нейроны, функции рецепторов нейротрансмиттеров в получаемых клетках детально не изучались [34, 35]. В данной работе впервые был проанализирован субъединичный состав и функциональная активность NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R в ВМ-нейронах человека, получаемых из ИПСК. Гены *grin2a*, *gabral* и *slc12a5* являются потенциальными маркерами зрелых нейронов. Было показано, что в изучаемых культурах профиль экспрессии этих генов может значительно варьировать в зависимости от условий ТД и не предопределяется региональным фенотипом нейронов. Это наблюдение позволяет предположить, что созревание нейронов не является единым процессом – обретение отдельных зрелых фенотипических характеристик может иметь независимую регуляцию.

Согласно нашим данным, Glun2A экспрессируется во всех кНП и постмитотических ВМ-нейронах человека. Сходный профиль экспрессии наблюдается в переднем мозге эмбриона человека, где Glun2A экспрессируется совместно с маркерами различных типов НП и молодых постмитотических нейронов [36]. Кроме того, экспрессия Glun2A была продемонстрирована в незрелых нейронах неустановленного регионального фенотипа, получаемых из ИПСК человека [11]. Наши результаты анализа экспрессии Glun2A у мыши *in vitro* и *in vivo* согласуются с литературными данными [33], из чего следует, что Glun2A может рассматриваться как маркер зрелых нейронов мыши, но не человека.

Известно, что в ходе созревания различных типов нейронов *in vivo*, в т.ч. ВМ-нейронов, сни-

жается уровень транскрипции гена *gabral*, кодирующего преобладающую эмбриональную  $\alpha$ -субъединицу GABA<sub>A</sub>-R. Параллельно усиливается экспрессия *gabral*, доминантной  $\alpha$ -субъединицы в различных регионах центральной нервной системы взрослого организма [37]. Было показано, что в ходе дифференцировки ВМ-нейронов человека *in vitro* уровень экспрессии *gabral* значительно увеличивается на стадии ТД, превышая уровень экспрессии *gabral*. Таким образом, в изучаемых клетках, независимо от условий ТД, преобладали GABA<sub>A</sub>-R эмбрионального типа. Наблюдаемая нами динамика экспрессии генов *grin1*, *gabral* и *gabrb1* согласуется с результатами полнотранскриптомного анализа культур ВМ-нейронов, получаемых из ИПСК человека [38]. Аналогично нашим результатам, Momcilovic et al. было показано, что уровень транскрипции гена *gabral* превышает уровень транскрипции гена *gabral* при ТД [38]. В то же время транскриптомный анализ не выявил прогрессивного роста экспрессии *grin2a* и *grin2d* на рассматриваемых в настоящей работе стадиях дифференцировки (рНП, кНП и ТД) [38]. Возможно, данные противоречия объясняются различиями в используемых протоколах дифференцировки.

Было установлено, что в ходе дифференцировки усиливается экспрессия гена *slc12a5*, что также наблюдалось в работе Momcilovic et al. [38]. Это явление характерно для созревания большинства типов нейронов в ЦНС [22], кроме дофаминергических мезенцефалических нейронов крысы [39]. Можно предположить, что профиль экспрессии *slc12a5* различается в данном типе нейронов у человека и грызунов. Сообща-

лось, что в зрелых нейронах BDNF индуцирует снижение уровня экспрессии *slc12a5* [40], что может объяснять наблюдаемые нами различия уровня экспрессии данного гена в зависимости от условий ТД.

С помощью измерения динамики  $[Ca^{2+}]_i$  было показано, что уже на 15-й день ТД в изучаемых клетках происходит образование функциональных NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R (рис. 3). Эти данные указывают на возможность изучения эффектов ГАМКергических и глутаматергических препаратов в культурах ВМ-нейронов человека на данной стадии дифференцировки без необходимости продолжительного культивирования клеток с целью получения зрелых нейронов [27].

Активация GABA<sub>A</sub>-R в изучаемых клетках приводит к увеличению  $[Ca^{2+}]_i$ , что характерно для незрелых нейронов [22]. Данный характер ответов сохраняется до 30 дней ТД. Глутаматиндуцированный ток ионов  $Ca^{2+}$ , ингибируемый ионами  $Mg^{2+}$ , свидетельствует о наличии функциональных NMDA-R в изучаемых клетках (рис. 3, а). На 10–15-й дни ТД при аппликации глутамата в непроточной системе увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках имеет транзистентный характер. На более поздних сроках дифференцировки повышенный уровень  $[Ca^{2+}]_i$  сохраняется на протяжении длительного периода времени. Таким образом, в ходе созревания ВМ-нейронов человека снижается склонность NMDA-R к десенситизации.

Эксайтотоксичность рассматривается как одна из основных причин гибели нейронов при ишемическом инсульте и нейродегенеративных заболеваниях [4–6]. Моделирование этого процесса *in vitro* является важным для изучения патогенеза этих заболеваний и поиска новых лекарственных средств. Эксайтотоксичность опосредована через гиперактивацию глутаматных рецепторов и необратимое увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  [41]. Токсичность глутамата также может реализовываться через инверсию работы цистин-глутаматного антипортера [42]. Было показано, что на

14–15-й дни ТД аппликация высоких концентраций глутамата вызывает частичную гибель клеток (рис. 4), но процент уязвимых клеток значительно ниже, чем в первичных культурах ВМ-нейронов грызунов [43]. Вероятно, эти различия объясняются гетерогенностью изучаемых культур и асинхронностью созревания нейронов.

В настоящей работе впервые было показано, что рост нейритов и спонтанная активность клеток, т.е. характеристики нейронов, тесно связанные с их созреванием, способны регулироваться в культурах ВМ-нейронов человека при участии NMDA-R и GABA<sub>A</sub>-R и их лигандов (рис. 5, б; рис. 6, б). Таким образом, агонисты изучаемых рецепторов потенциально могут быть использованы для оптимизации существующих протоколов нейральной дифференцировки ИПСК, в частности для ускорения созревания нейронов.

#### Финансирование

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 17-04-01661; Антонов С.А., Новосадова Е.В., Кобылянский А.Г., Гривенников И.А.; эксперименты по кальциевому имиджингу, трансфекции, ОТ-ПЦР и иммунофлуоресценции) и РФФИ (грант № 14-15-01047-П; Новосадова Е.В., Иллариошкин С.Н., Гривенников И.А.; работы по культивированию, дифференцировке и исследованию апоптоза нейронов человека).

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Соблюдение этических норм

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, 861–872, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
2. Новосадова Е.В., Гривенников И.А. (2014) Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: от получения до применения в биохимических и биомедицинских исследованиях, *Успехи биологической химии*, **54**, 3–38.
3. Schaarschmidt, G., Schewtschik, S., Kraft, R., Wegner, F., Eilers, J., Schwarz, J., and Schmidt, H. (2009) A new culturing strategy improves functional neuronal development of human neural progenitor cells, *J. Neurochem.*, **109**, 238–247, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05954.x.
4. Zhou, Q., and Sheng, M. (2013) NMDA receptors in nervous system diseases, *Neuropharmacology*, **74**, 69–75, doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.030.
5. Koutsilieri, E., and Riederer, P. (2007) Excitotoxicity and new antiglutamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **13**, S329–S331, doi: 10.1016/s1353-8020(08)70025-7.
6. Dong, X.X., Wang, Y., and Qin, Z.H. (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to patho-

- genesis of neurodegenerative diseases, *Acta Pharmacol. Sin.*, **30**, 379–387, doi: 10.1038/aps.2009.24.
7. Rowley, N.M., Madsen, K.K., Schousboe, A., and Steve White, H. (2012) Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control, *Neurochem. Int.*, **61**, 546–558, doi: 10.1016/j.neuint.2012.02.013.
  8. Nacher, J., and McEwen, B.S. (2006) The role of N-methyl-D-aspartate receptors in neurogenesis, *Hippocampus*, **16**, 267–270, doi: 10.1002/hipo.20160.
  9. Galanopoulou, A.S. (2008) GABA<sub>A</sub> receptors in normal development and seizures: friends or foes? *Curr. Neuropharmacol.*, **6**, 1–20, doi: 10.2174/157015908783769653.
  10. Young, A., Machacek, D.W., Dhara, S.K., Macleish, P.R., Benveniste, M., Dodla, M.C., Sturkie, C.D., and Stice, S.L. (2011) Ion channels and ionotropic receptors in human embryonic stem cell derived neural progenitors, *Neuroscience*, **192**, 793–805, doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.04.039.
  11. Zhang, W.B., Ross, P.J., Tu, Y., Wang, Y., Beggs, S., Sengar, A.S., Ellis, J., and Salter, M.W. (2016) Fyn kinase regulates GluN2B subunit-dominant NMDA receptors in human induced pluripotent stem cell-derived neurons, *Sci. Rep.*, **6**, 23837, doi: 10.1038/srep23837.
  12. Ishii, M.N., Yamamoto, K., Shoji, M., Asami, A., and Kawamata, Y. (2017) Human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons respond to convulsant drugs when co-cultured with hiPSC-derived astrocytes, *Toxicology*, **389**, 130–138, doi: 10.1016/j.tox.2017.06.010.
  13. Некрасов Е.Д., Лебедева О.С., Честков И.В., Сюсина М.А., Федотова Е.Ю., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н. (2011) Получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, **6**, 1–7.
  14. Лебедева О.С., Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Хаспекров Л.Г., Иллариошкин С.Н., Гривенников И.А. (2014) Получение и характеристика клеточной модели болезни Паркинсона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в сб. *Стволовые клетки и регенеративная медицина* (под ред. Ткачука В.А.), Изд-во Московского Университета, Москва, с. 154–168.
  15. Antonov, S.A., Novosadova, E.V., Arsenyeva, E.L., Grefenstein, M.A., Zykova, A.A., Kobylansky, A.G., Manuilova, E.S., Grivennikov, I.A., Illarioshkin, S.N., and Myasoedov, N.F. (2016) Investigation of the effects of GABA receptor agonists in the differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons, *Dokl. Biol. Sci.*, **470**, 244–246, doi: 10.1134/s0012496616050045.
  16. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method, *Methods*, **25**, 402–408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
  17. Zhao, H., and Darzynkiewicz, Z. (2017) Rapid detection of DNA strand breaks in apoptotic cells by flow- and image-cytometry, *Methods Mol. Biol.*, **1644**, 139–149, doi: 10.1007/978-1-4939-7187-9\_12.
  18. Verpelli, C., Carlessi, L., Bechi, G., Fusar Poli, E., Orellana, D., Heise, C., Franceschetti, S., Mantegazza, R., Mantegazza, M., Delia, D., and Sala, C. (2013) Comparative neuronal differentiation of self-renewing neural progenitor cell lines obtained from human induced pluripotent stem cells, *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 1–14, doi: 10.3389/fncel.2013.00175.
  19. Liu, X.B., Murray, K.D., and Jones, E.G. (2004) Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development, *J. Neurosci.*, **24**, 8885–8895, doi: 10.1523/jneurosci.2476-04.2004.
  20. Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N.D., Tabar, V., and Studer, L. (2008) Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage, *Genes Dev.*, **22**, 152–165, doi: 10.1101/gad.1616208.
  21. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999) The glutamate receptor ion channels, *Pharmacol. Rev.*, **51**, 7–61.
  22. Ben-Ari, Y. (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture, *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 728–739, doi: 10.1038/nrn920.
  23. Herlenius, E., and Lagercrantz, H. (2010) Neurotransmitters and neuromodulators during brain development, in *The newborn brain: neuroscience and clinical applications* (Lagercrantz, H., ed.), 2nd edn, Cambridge University Press, pp. 99–119.
  24. Rogawski, M.A. (2011) Revisiting AMPA receptors as an anti-epileptic drug target, *Epilepsy Curr.*, **11**, 56–63, doi: 10.5698/1535-7511-11.2.56.
  25. Gupta, K., Hardingham, G.E., and Chandran, S. (2013) NMDA receptor-dependent glutamate excitotoxicity in human embryonic stem cell-derived neurons, *Neurosci. Lett.*, **543**, 95–100, doi: 10.1016/j.neulet.2013.03.010.
  26. Bergey, G.K., Fitzgerald, S.C., Schrier, B.K., and Nelson, P.G. (1981) Neuronal maturation in mammalian cell culture is dependent on spontaneous electrical activity, *Brain Res.*, **207**, 49–58, doi: 10.1016/0006-8993(81)90678-8.
  27. Lam, R.S., Topfer, F.M., Wood, P.G., Busskamp, V., and Bamberg, E. (2017) Functional maturation of human stem cell-derived neurons in long-term cultures, *PLoS One*, **12**, e0169506, doi: 10.1371/journal.pone.0169506.
  28. Gunhanlar, N., Shpak, G., van der Kroeg, M., Gouty-Colomer, L.A., Munshi, S.T., Lendemeijer, B., Ghazvini, M., Dupont, C., Hoogendijk, W.J.G., Gribnau, J., de Vrij, F.M.S., and Kushner, S.A. (2017) A simplified protocol for differentiation of electrophysiologically mature neuronal networks from human induced pluripotent stem cells, *Mol. Psychiatry*, **23**, 1336–1344, doi: 10.1038/mp.2017.56.
  29. Hirasawa, T., Wada, H., Kohsaka, S., and Uchino, S. (2003) Inhibition of NMDA receptors induces delayed neuronal maturation and sustained proliferation of progenitor cells during neocortical development, *J. Neurosci. Res.*, **74**, 676–687, doi: 10.1002/jnr.10795.
  30. Yamasaki, M., Okada, R., Takasaki, C., Toki, S., Fukaya, M., Natsume, R., Sakimura, K., Mishina, M., Shirakawa, T., and Watanabe, M. (2014) Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation, *J. Neurosci.*, **34**, 11534–11548, doi: 10.1523/jneurosci.1811-14.2014.
  31. Sernagor, E., Chabrol, F., Bony, G., and Cancedda, L. (2010) GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems, *Front. Cell Neurosci.*, **4**, 11, doi: 10.3389/fncel.2010.00011.
  32. Rushton, D.J., Mattis, V.B., Svendsen, C.N., Allen, N.D., and Kemp, P.J. (2013) Stimulation of GABA-induced Ca<sup>2+</sup> influx enhances maturation of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, *PLoS One*, **8**, e81031, doi: 10.1371/journal.pone.0081031.
  33. Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 383–400, doi: 10.1038/nrn3504.
  34. Hartfield, E.M., Yamasaki-Mann, M., Ribeiro Fernandes, H.J., Vowles, J., James, W.S., Cowley, S.A., and Wade-Martins, R. (2014) Physiological characterisation of human iPSC-derived dopaminergic neurons, *PLoS One*, **9**, e87388, doi: 10.1371/journal.pone.0087388.

35. Stanslowsky, N., Haase, A., Martin, U., Naujock, M., Leffler, A., Dengler, R., and Wegner, F. (2014) Functional differentiation of midbrain neurons from human cord blood-derived induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Res. Ther.*, **5**, 35, doi: 10.1186/scrt423.
36. Bagasrawala, I., Memi, F., Radonjic, N., and Zecevic, N. (2017) N-Methyl D-aspartate receptor expression patterns in the human fetal cerebral cortex, *Cereb. Cortex*, **27**, 5041–5053, doi: 10.1093/cercor/bhw289.
37. Skilbeck, K.J., Johnston, G.A., and Hinton, T. (2010) Stress and GABA receptors, *J. Neurochem.*, **112**, 1115–1130, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06539.x.
38. Momcilovic, O., Liu, Q., Swistowski, A., Russo-Tait, T., Zhao, Y., Rao, M.S., and Zeng, X. (2014) Genome wide profiling of dopaminergic neurons derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells, *Stem Cells Dev.*, **23**, 406–420, doi: 10.1089/scd.2013.0412.
39. Gulacsi, A., Lee, C.R., Sik, A., Viitanen, T., Kaila, K., Tepper, J.M., and Freund, T.F. (2003) Cell type-specific differences in chloride-regulatory mechanisms and GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition in rat substantia nigra, *J. Neurosci.*, **23**, 8237–8246, doi: 10.1523/jneurosci.23-23-08237.2003
40. Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M., and Voipio, J. (2014) Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, **15**, 637–654, doi: 10.1038/nrn3819.
41. Wang, C., Liu, F., Patterson, T.A., Paule, M.G., and Slikker, W., Jr. (2017) Relationship between ketamine-induced developmental neurotoxicity and NMDA receptor-mediated calcium influx in neural stem cell-derived neurons, *Neurotoxicology*, **60**, 254–259, doi: 10.1016/j.neuro.2016.04.015.
42. Kritis, A.A., Stamoula, E.G., Paniskaki, K.A., and Vavilis, T.D. (2015) Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study, *Front. Cell Neurosci.*, **9**, 1–18, doi: 10.3389/fncel.2015.00091.
43. Kikuchi, S., and Kim, S.U. (1993) Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture, *J. Neurosci. Res.*, **36**, 558–569, doi: 10.1002/jnr.490360508.

## EXPRESSION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF NMDA AND GABA<sub>A</sub> RECEPTORS DURING THE DIFFERENTIATION OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS INTO VENTRAL MESENCEPHALIC NEURONS

S. A. Antonov<sup>1\*</sup>, E. V. Novosadova<sup>1</sup>, A. G. Kobylansky<sup>1</sup>,  
S. N. Illarioshkin<sup>2</sup>, V. Z. Tarantul<sup>1</sup>, and I. A. Grivennikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,  
123182 Moscow, Russia; E-mail: [vamore@inbox.ru](mailto:vamore@inbox.ru)

<sup>2</sup> Research Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia

Received October 29, 2018  
Revised November 29, 2018  
Accepted November 29, 2018

Ionotropic glutamate and GABA receptors regulate differentiation and determine functional properties of mature neurons. Both insufficient and excessive activity of these neurotransmission systems is associated with various nervous system diseases. Our knowledge regarding the expression profiles of these receptors and the mechanisms of their regulation during differentiation of specialized human neuron subtypes is limited. Here, using real-time PCR and immunocytochemical staining, we have investigated expression profile of the NMDA and GABA<sub>A</sub> receptor subunits during *in vitro* differentiation of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) into ventral mesencephalic neurons. The most prominent changes were observed in expression levels of *grin1*, *grin2a*, *grin2d*, *gabrg2*, *gabrg1* and *gabrg2* genes. Furthermore, differentiation was accompanied with a significant increase in potassium-chloride KCC2 symporter expression, that is indicative of neuronal maturation. Using calcium imaging, it was shown that the expression of these genes is associated with the formation of functional receptors. We have found that NMDA and GABA<sub>A</sub> receptors are involved in the regulation of neurite outgrowth and the development of spontaneous activity in the studied cells. The obtained results indicate a possibility of using ligands of the NMDA and GABA<sub>A</sub> receptors for regulating the phenotype of human neurons during their differentiation *in vitro*.

**Keywords:** NMDA receptors, GABA<sub>A</sub> receptors, induced pluripotent stem, mesencephalic neurons, differentiation