

## АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГЕНОВ В НЕЙРАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

© 2023 В.Б. Федосеева\*\*, Е.В. Новосадова#, В.В. Ненашева#, Л.В. Новосадова,  
И.А. Гривенников, В.З. Тарангул

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
123182 Москва, Россия; электронная почта: fvb@img.msk.ru

Поступила в редакцию 31.10.2022

После доработки 03.03.2023

Принята к публикации 07.03.2023

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространённых в мире нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на многочисленные исследования, причины этой патологии остаются до конца неизвестными. Это, кроме прочего, связано с трудностью получения биологического материала для анализа. Большим потенциалом для изучения молекулярных событий, лежащих в основе патогенеза БП, обладают культуры нейральных клеток, получаемые из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека. В настоящей работе был проведён биоинформатический анализ данных, полученных с помощью технологии секвенирования полного транскриптома (RNA-seq) при исследовании нейральных предшественников (НП), полученных из ИПСК здоровых доноров (ЗД) и пациентов с БП, несущих различные мутации, которые являются частой причиной семейной формы БП. Было обнаружено, что в клетках НП, полученных от пациентов с БП, в отличие от ЗД, значительно повышен уровень транскрипции множества генов, активно экспрессирующихся при нормальном эмбриональном развитии нервной системы. Биоинформатические данные в целом подтверждаются с помощью ПЦР в реальном времени. Полученные результаты позволяют предположить, что одной из причин БП может быть сдвиг паттерна экспрессии генов в нейральных клетках в сторону эмбриональной программы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** болезнь Паркинсона, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, нейральные предшественники, RNA-seq, дифференциальная транскрипция генов, ПЦР, биоинформатический анализ.

DOI: 10.31857/S0320972523040073, EDN: AKRDJU

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – распространённое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся преимущественной гибелью дофаминергических (ДА) нейронов в центральной нервной системе. Это заболевание ассоциировано с возрастом и является одной из значимых причин инвалидизации пожилых лиц в современном обществе [1]. На основании имеющихся на сегодняшний день экспериментальных данных

построено множество гипотез о механизмах, приводящих к развитию БП [2]. Однако основная причина этого заболевания по-прежнему остаётся неизвестной. Выявление механизмов системного уровня, которые приводят к БП, является важным шагом на пути к разработке новых терапевтических средств.

Для исследований БП используются разнообразные модели. В последние годы для этой цели стали применяться индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), из которых можно получать ней-

Принятые сокращения: БП – болезнь Паркинсона; ДА нейроны – дофаминергические нейроны; ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; ЗД – здоровый донор; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; НП – нейральные предшественники; FDR – частота ложных обнаружений.

\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.

Таблица 1. Характеристика пациентов с БП и ЗД

Линии ИПСК	Описание пациентов с БП и ЗД	Генотип	Название клеточной линии НП
IPSRG2L [9]	здоровый мужчина, 60 лет	здоровый	NP RG2L
IPSHD1.1S [9]	здоровая женщина, 18 лет	здоровый	NP HD 1.1S
IPSPD3.9L [9]	здоровая женщина, 26 лет	здоровый	NP RFD 3.9 L
IPSPDPS8 [9]	женщина с БП, начало заболевания – 30 лет, биопсия – 41 год	гомозиготная делеция EX8 в гене <i>PARK2</i>	NP PDS13
IPSPDPS2d [9]	мужчина с БП, начало заболевания – 38 лет, биопсия – 40 лет	гетерозиготная делеция EX2 в гене <i>PARK2</i>	NP PDS14
IPSPDL2.15L [11]	мужчина с БП, начало заболевания – 50 лет, биопсия – 63 года	мутация G2019S в гене <i>PARK8</i>	NP PDL2.15L
IPSPDG1.1S [11]	мужчина с БП, начало заболевания – 44 года, биопсия – 60 лет	мутация N370S в гене <i>GBA</i>	NP PDG1.1S
IPSPDSP1.1S [11]	женщина с БП, начало заболевания – 57 лет, биопсия – 66 лет	отсутствуют известные мутации	NP PDSP1.1S

ральные предшественники (НП), терминально дифференцированные нейроны (ТДН) и клетки глии пациентов с БП и здоровых доноров (ЗД) [3–7].

Среди методов, используемых для изучения механизмов БП, наиболее информативным считается метод высокопроизводительного секвенирования полного транскриптома (RNA-seq). С помощью этого метода можно получать данные о дифференциальной экспрессии генов в норме и при патологии, что позволяет выявлять гены, прямо или косвенно вовлечённые в патологический процесс.

Первоначальный анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) в нейральных клетках, полученных из ИПСК двух пациентов с БП и трёх ЗД, привлек наше внимание к повышенной транскрипции многих функционирующих преимущественно на эмбриональной стадии развития *HOX*-генов у пациентов с БП при практически полном отсутствии экспрессии этих генов в клетках ЗД [8]. Биоинформатический анализ, проведённый в настоящей работе, показал, что, наряду с *HOX*-генами, многие другие «эмбриональные» гены повышено экспрессируются в клетках НП, дифференцированных из ИПСК пациентов с БП, по сравнению с соответствующими клетками от ЗД. Полученные данные позволяют предположить, что одной из причин БП может

быть аномальный процесс, выражающийся в повышенной экспрессии множества эмбриональных генов, участвующих в дифференцировке нейральных клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Биоинформатический анализ.** В предыдущей работе [9] нами опубликованы транскрипционные профили культур клеток НП и ТДН, которые были получены из ИПСК трёх ЗД и двух пациентов с БП, несущих различные мутации в гене *PARK2*, с помощью технологии RNA-seq [3, 7, 10]. Данные об этих и других пациентах с БП и ЗД, материал которых был использован в настоящей работе, приведены в таблице 1.

В ранее опубликованной статье [9] содержатся исходные нуклеотидные последовательности транскриптомов, преобразованные в формат FASTQ. Секвенирование ридов осуществлялось с двух концов каждого фрагмента. Необработанные считывания нуклеотидных последовательностей РНК были депонированы в GSE181029 серии Gene Expression Omnibus (GEO). Обрезку парных считываний для качественной и количественной оценок по сравнению с аннотацией генома *Homo sapiens* GRCh38.13 проводили, как описано ранее [9].

Таблица 2. Структура праймеров для ПЦР

Гены	Последовательности праймеров (F – прямые, R – обратные)	T, °C
<i>18s RNA</i>	F: CGGCTACCACATCCAAGGAA R: GCTGGAATTACCGCGGCT	60
<i>IRX2</i>	F: GCGCCTCAAGAAGGAGAACA R: CTGATCCCTTCGTCCTCTGC	60
<i>LHX1</i>	F: GCCAAGAGAACAGCCTTCACTC R: GGTCGTCATTCTCGTTGCTACC	60
<i>NEUROG1</i>	F: GCCTCCGAAGACTTCACTTACC R: GGAAAGTAACAGTGTCTACAAAGG	60
<i>PITX1</i>	F: GCGAGTCGTCTGACACGGA R: CAACTGCTGGCTTGTGAAGTG	55
<i>TFAP2A</i>	F: GACCTCTCGATCCACTCCTTAC R: GAGACGGCATTGCTGTTGGACT	60
<i>TFAP2B</i>	F: ATCTATGAGGACCGGCACGA R: CTCGAGTAGGGTCCCTTGGGA	60
<i>PTN</i>	F: CAAGCAAACCATGAAGACCCAG R: CTCGCTTCAGACTTCCAGTTCT	55

С использованием пакета «edgeR» [12] были получены данные по ДЭГ клеточных линий, полученных у пациентов с БП и ЗД. Количество прочтений нормализовали с использованием алгоритма ТММ в R-пакете «edgeR» [12]. В качестве фильтра выбирали количество картированных прочтений (ридов) на миллион фрагментов (CPM > 1,5) для генов, кодирующих белки. Для анализа экспрессии генных серий были выбраны следующие параметры ограничений: отношение числа картированных ридов FC (fold change) у пациентов с БП к аналогичному числу у ЗД ( $|\log_2(FC)| > 1$ ) и частоты ложных обнаружений (FDR < 0,05) и Pval (< 0,05). Данные по ДЭГ анализировали с использованием возможностей Web-инструмента анализа генных серий (Gene Set AnaLysis Toolkit), доступного на сайте <http://WebGestalt.org>. При обработке наших данных из множества баз данных этого сервера самые высокие значения с минимальными частотами ложных обнаружений показали темы «Биологический процесс» и «Молекулярная функция» из ресурса Gene Ontology (GO).

**ПЦР-анализ в режиме реального времени.** Суммарную клеточную РНК экстрагировали из клеток с помощью набора реактивов для очистки РНК Trizol («Thermo Fisher Scientific», США), как рекомендовано производителем, с последующей обработкой ДНКазой I («Thermo Fisher Scientific»). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали на 2 мкг суммарной

РНК с использованием обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия) и случайных гексапраймеров. Полученную кДНК амплифицировали с использованием системы LightCycler («Roche», Германия) и реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Условия реакции были следующими: денатурация при 95 °C (3 мин), затем 40 циклов (95 °C, 15 с; 60–65 °C, 20 с; и 72 °C, 45 с). Использовали реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Количественную оценку относительного уровня мРНК целевых генов проводили с использованием сравнительного метода 2-ΔCt [13]. В качестве референсного гена использовали ген 18S рРНК. Праймеры для ПЦР были подобраны с помощью ресурса NCBI Primer-BLAST (таблица 2). Результаты ПЦР представлены в виде среднего значения ± σ (стандартное отклонение) по трём экспериментам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ранее нами с помощью технологии RNA-seq были получены данные по ДЭГ НП, полученных от пациентов с БП и ЗД. Анализ полученных данных с помощью ресурса GO выявил категории, в которых находятся ДЭГ с наиболее высокой транскрипцией в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД (таблица 3). Наше предыдущее исследование показало,

**Таблица 3.** Список генов (дополнительно к *HOX*-генам) по категориям ресурса GO, имеющих более высокий уровень транскрипции в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД

Шифр категории	Название категории	Дифференциально экспрессирующиеся гены	Достоверность
GO:00355326	связывание с энхансером	<i>IRX5, OSR1, TFAP2A</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0001228	активатор связывания РНК-полимеразы II с ДНК	<i>EBF1-3, FOXF1, GATA4, GSX1, MEIS1, MYT1, NHLH1, NHLH2, ONECUT1, ONECUT2, PITX1, PITX2, POU4F1, TBX5, TFAP2A, WT1</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0033613	фактор активации транскрипции	<i>GATA4, NHLH2, PITX2</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0048706	развитие эмбриональной скелетной системы	<i>IRX5, OSR1, TFAP2A</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0048705	морфогенез скелетной системы	<i>IRX5, OSR1, TFAP2A, MGP, NPPC, NEUROG1, TBX15, LHX5, COL14A1</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0007389	паттерн процессов спецификации	<i>PITX2, WT1, GATA4, GATA5, FOXF1, PCDH8, LBX1, OSR1, GDF3, HES5, IRX3, GSX2, DLL3, TBX18, NEUROG1, LHX1, WNT6, AMHR2, HES3, TBX5, EVX1, PAX7, DLL1, IRX2, ASCL1</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0048568	развитие эмбриональных органов	<i>FOXF1, GATA4, LBX1, IRX5, OSR1, FRZB, GJA5, GDF3, TFAP2A, POU3F4, STRA6, TBX15, NEUROG1, LHX1, PKDCC, DLL1, ALDH1A2, HNF1B, MYO3A, PROX1</i>	FDR < 0,001; Pval = 0
GO:0021675	развитие нервной системы	<i>POU4F1, PHOX2A, TFAP2A, NEUROG1, 2, NTRK1, HES3, NHLH1, 2, CHRNB2, UNC13A, PITX2, PAX3, 7</i>	FDR < 0,001; Pval = 0

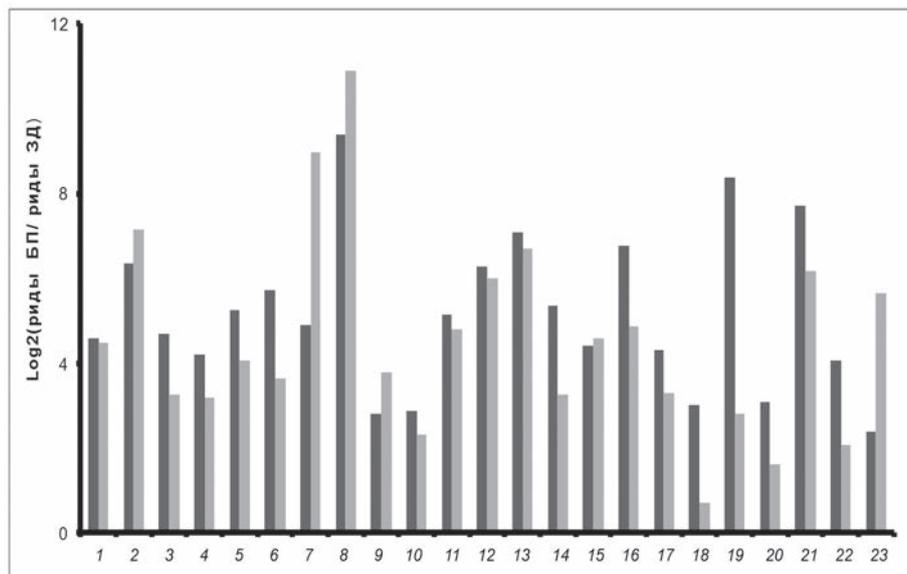
что в этих категориях присутствуют преимущественно гены *HOX*-кластеров [8]. Биоинформатический анализ, проведённый в настоящей работе, позволил выявить, кроме *HOX*-генов, дополнительно 87 генов с существенно более высоким уровнем транскрипции в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД (таблица 3), которые также относятся к этим категориям.

Для многих из ДЭГ в НП пациентов с БП повышенная экспрессия в норме характерна преимущественно для эмбриональных стадий развития. Затем в норме многие из этих генов сильно снижают свою активность во взрослых нейральных клетках. На рис. 1 приведены данные по ДЭГ, относящиеся к этим категориям GO-ресурса. Были отобраны ДЭГ (таблица 3), имеющие TPM > 10 (TPM – число транскриптов на 1 миллион картированных фрагментов) у обоих пациентов с БП, несущих мутации в гене *PARK2*, а также ДЭГ, которые имеют отношение к развитию нервной системы.

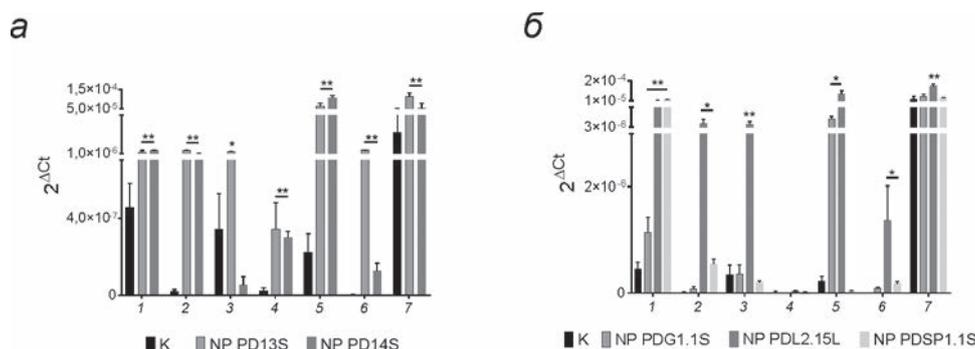
Среди генов, которые повышено транскрибируются в НП пациентов с БП по сравнению со ЗД (рис. 1), выделяется большой набор генов, кодирующих факторы тран-

скрипции (ФТ) (*TFAP2A, TFAP2B, NEUROG1, NEUROG2, ASCL1, PITX1, PITX2, LHX1, PAX7, NHLH2, OSR1, OSR2, IRX2, IRX3, IRX5, DATA6*).

Был проведён детальный анализ нуклеотидных мотивов связывания этих ФТ с регуляторными областями генов, повышенно экспрессирующихся в НП, от пациентов с БП по сравнению со ЗД. Для такого анализа использовали базу данных по последовательностям узнавания (респонсивных элементов) HOCOMO (Homo sapiens Comprehensive MOdel Collection [14], release 10) и нуклеотидные последовательности регуляторных областей генов вокруг стартовой точки транскрипции в диапазоне  $\pm 1000$ , представленных в DRCh38/p14-сборке. Из набора ФТ, гены которых имеют повышенную транскрипционную активность в НП пациентов с БП по сравнению со ЗД, наиболее часто по сравнению с другими встречаются респонсивные элементы для ФТ *TFAP2A, TFAP2B, NEUROG2* и *FOXA2*. В литературе отсутствуют данные об участии этих ФТ в развитии БП. Однако они активно участвуют в процессах эмбрионального



**Рис. 1.** ДЭГ в НП пациентов с БП по сравнению со ЗД. Данные для клеточной линии NP PDS13 по отношению к среднему значению в НП ЗД обозначены чёрным цветом, для клеточной линии NP PDS14 – серым цветом. Представлены усреднённые данные по 3 образцам РНК всех пациентов с БП и ЗД. Гены имеют обозначения: 1 – *TFAP2A*, 2 – *TFAP2B*, 3 – *PAX7*, 4 – *IRX2*, 5 – *NHLH2*, 6 – *LHX1*, 7 – *PITX1*, 8 – *PITX2*, 9 – *NEUROG1*, 10 – *NEUROG2*, 11 – *IRX3*, 12 – *IRX5*, 13 – *PCDH8*, 14 – *DLL1*, 15 – *DLL3*, 16 – *HES5*, 17 – *PTN*, 18 – *PTPRZ1*, 19 – *RALDH2*, 20 – *RALDH3*, 21 – *ASCL1*, 22 – *FRZB*, 23 – *GBX2*. Для всех генов FDR < 0,05 и Pval < 0,05, кроме гена *PTPRZ1* (NP PDS14), для которого FDR < 0,3 и Pval < 0,1



**Рис. 2.** ПЦР-анализ транскрипции ряда генов в линиях НП, полученных из ИПСК ЗД и пациентов с БП. *а* – НП от пациентов с БП, несущих мутации в гене *PARK2* (NP PD13S и NP PD14S); *б* – НП от пациентов с БП, несущих мутации в генах *GBA* (NP PDG1.1S), *PARK8* (NP PDL2.15L) и спорадической формой БП (NP PDSP1.1S). К – усреднённый контроль (НП трёх ЗД). В качестве референсного гена использовали ген 18S рРНК. Гены: 1 – *IRX2*, 2 – *LHX1*, 3 – *NEUROG1*, 4 – *PITX1*, 5 – *TFAP2A*, 6 – *TFAP2B*, 7 – *PTN*. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

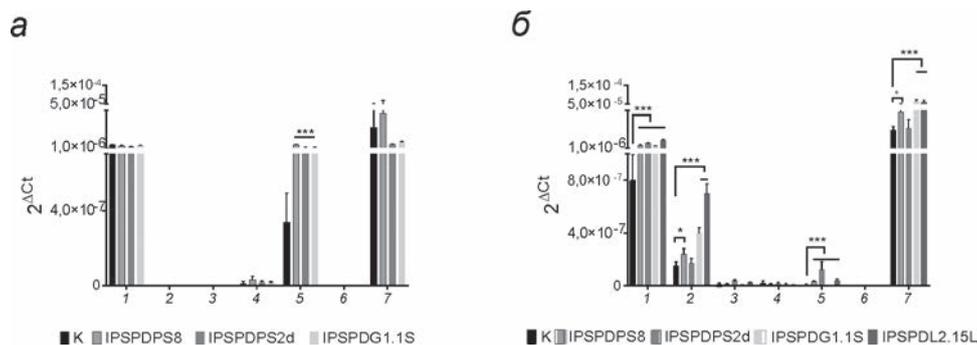
развития нервной системы [15–17]. Полученные данные позволяют предположить, что одна из причин повышенной транскрипции генов эмбрионального развития в НП, полученных от пациентов с БП, может заключаться в аномальной повышенной экспрессии отдельных генов, кодирующих эти ФТ.

**ПЦР-анализ экспрессии генов.** Данные биоинформатического анализа экспрессии генов в НП, полученных из ИПСК пациентов с БП, несущих мутации в гене *PARK2* (рис. 1), в целом подтверждаются результатами анализа, проведённого с помощью ПЦР в режиме реального времени (рис. 2, *а*). Кроме того, ПЦР-анализ показал, что многие из этих генов (хотя

и не все) также повышено экспрессируются в НП, полученных от пациентов с БП, несущих мутации в генах *PARK8* и *GBA* (рис. 2, *б*).

Следовательно, повышение транскрипции многих генов, участвующих в эмбриональном развитии, в НП, полученных от пациентов с БП, по сравнению со ЗД является общим свойством при различных ассоциированных с БП мутациях.

Было также интересно установить уровни экспрессии генов, высокоэкспрессирующихся в НП, полученных от пациентов с БП, в фибробластах и недифференцированных ИПСК, полученных как от пациентов с БП, так и ЗД. ПЦР-анализ показал (рис. 3),



**Рис. 3.** ПЦР-анализ уровней транскрипции ряда генов в (а) фибробластах, полученных от пациентов с БП, и (б) ИПСК, полученных из фибробластов пациентов с БП. К – усреднённый контроль (три ЗД). В качестве референсного гена использовали ген 18S рРНК. Гены: 1 – *IRX2*, 2 – *LHX1*, 3 – *NEUROG1*, 4 – *PITX1*, 5 – *TFAP2A*, 6 – *TFAP2B*, 7 – *PTN*. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$

что уже в ИПСК, полученных от пациентов с БП, отдельные гены (*TFAP2A*, *PTN*), высокоэкспрессирующиеся в норме на эмбриональной стадии развития и в НП от пациентов с БП, усиливают свою транскрипцию по сравнению со ЗД. Сходная картина наблюдается и в фибробластах. Здесь так же, как и в ИПСК, наблюдается усиление экспрессии гена *PTN*, и дополнительно происходит усиление экспрессии генов *IRX2* и *LHX1*.

Следовательно, включение эмбриональной программы транскрипции генов при мутациях в гене *PARK2* частично отражается в транскрипционной подпериодической уже на стадии фибробластов, использованных для получения ИПСК. Функционирует она частично и в ИПСК. Вместе с тем в НП, полученных из ИПСК от пациентов с БП, эта программа находит своё дальнейшее развитие.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наше понимание патологических механизмов, лежащих в основе БП, во многом зависит от моделей, используемых для её изучения, которые порой не в полной мере отражают сложность патологии или клеточный состав человеческого мозга. Так, модели животных, основанные на воздействии токсинов, часто неспособны адекватно отразить критические аспекты БП человека и не в полной мере воспроизводят фенотипы заболевания [18]. Посмертные ткани мозга пациентов с БП, как правило, малодоступны и демонстрируют лишь позднюю стадию прогрессирования заболевания. Открытие методологии получения ИПСК позволило преодолеть это препятствие и обеспечило доступ к нервным клеткам человеческого происхождения для моделирования изогенных заболеваний [19].

Использование недифференцированных ИПСК, полученных из фибробластов пациентов с БП, позволяет воспроизводить на их основе в достаточных для исследований количествах нервные клетки, находящиеся на разных этапах дифференцировки. Мы использовали этот широко распространённый подход для получения и последующего сравнительного анализа транскриптомов НП, дифференцированных из ИПСК от пациентов с БП и ЗД.

Ранее нами было показано, что в нейральных клетках-предшественниках, полученных из ИПСК от пациентов с БП, наблюдается повышенная транскрипция кластеров генов *HOX* по сравнению со ЗД [8]. Эти гены в норме активно экспрессируются на ранних стадиях эмбрионального развития, а в клетках взрослого организма их экспрессия практически полностью выключается. Для выяснения уровней транскрипции других специфичных для эмбриональных стадий развития генов в НП, полученных от пациентов с БП, в настоящей работе проведён дополнительный биоинформатический анализ. Был установлен большой набор кодирующих белки ДЭГ в клетках НП, которые, как и ранее обнаруженные *HOX*-гены, также повышено транскрибируются у пациентов с БП, но имеют очень низкие уровни транскрипции в НП ЗД.

Так, к повышено-транскрибирующимся генам в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД, обнаруженным в настоящей работе (рис. 1), относится ген плеiotрофина (*PTN*). Ген *PTPRZ1*, кодирующий рецептор *PTN*, также имеет повышенный уровень экспрессии. Ранее было показано [20], что гены семейства, к которым принадлежит *PTN* и их рецепторы, имеют высокую экспрессию в стриатуме и в чёрной субстанции мозга в процессе эмбрионального развития и играют важную роль в развитии ДА системы в норме и при дегенерации

у пациентов с БП [21]. *PTN* является естественным участником развития и реакции на повреждение в этой системе и может быть мишенью для использования в терапии для защиты или реконструкции нигростриального сегмента при БП.

Среди генов, повышенно-транскрибирующихся в НП пациентов с БП, выявлены гены (*DLL1* и *HES5*), имеющие отношение к работе сигнальной системы NOTCH, которая также является ключевой в морфогенезе мозга. Ранее отмечалось, что этот сигнальный путь имеет значительное обогащение по ДЭГ в чёрной субстанции мозга при БП [22]. Каноническим лигандом NOTCH-системы, запускающим сигнальный процесс, является белковый рецептор *DLL1*, эффектором которого служит ген *HES5*. Существуют данные о том, что *HES5* регулирует время перехода между фазами спецификации неокортикальных нейронов, а также между нейрогенезом и глиогенезом [23]. Известно, что повышенная экспрессия *HES5* приводит к подавлению экспрессии генов *HMGAI1*, 2, что существенно для компетенции нейральных стволовых клеток [23]. Ген *DLL3* также является компонентом NOTCH-системы и служит её ингибитором [24]. В промоторной области он содержит много регуляторных элементов, которые делают его мишенью для белков, кодируемых высокотранскрибируемыми генами *ASCL1* [25] и *NEUROG1*, 2 [26]. Ранее установлено, что ген *ASCL1* повышенно экспрессируется в нейральных стволовых клетках [27] и является маркером БП [28–30].

Обращает на себя внимание повышенная транскрипция генов нейроспецифических транскрипционных факторов *NEUROG1* и 2. Известно, что повышенная экспрессия этих генов в человеческих стволовых клетках приводит к появлению сети возбуждающих и ингибирующих нейронов [31]. *NEUROG1* служит также негативным регулятором развития неокортекса [32]. Установлено, что ген *NEUROG2* необходим для развития ДА нейронов среднего мозга [33]. Показано также, что искусственное повышение транскрипции *NEUROG1* в ИПСК приводит к повышению транскрипции *HOX*-генов всех 4 кластеров в производных нейронах [34], что мы наблюдали ранее в НП пациентов с БП [8]. Важно также отметить, что проведённый нами биоинформатический анализ указывает на то, что многие гены, которые имеют повышенную транскрипционную активность в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД, наиболее часто содержат репрессивные элементы, характерные для гена *NEUROG2*.

Повышенно-транскрибирующиеся в НП пациентов с БП гены *NHLH1* и 2 кодируют факторы транскрипции, экспрессия которых ограничена нервной системой и которые играют важную роль в дифференцировке нейронов [35–37].

Повышенный уровень транскрипции в НП от пациентов с БП имеют также гены *PITX1*, *PITX2*, *PAX3*, 7, *MYOD* (*MDF1*). ФТ *PITX1* регулирует экспрессию многих генов развития, включая гены, участвующие в ранних стадиях развития мозга [38]. Гены *PAX3*, 7 на ранних стадиях развития служат триггерами при формировании границы между средним и задним мозгом и регионализации тектума [39–41]. *PAX3* также является опорным модулятором миграции клеток нейронального гребня при эмбриогенезе [42].

Трансмембранный белок, кодируемый геном *PCDH8*, который повышенно экспрессируется в НП, полученных от пациентов с БП, также влияет на дифференцировку нейронов во время эмбрионального развития [43]. Было также установлено, что ген *PCDH8* в значительной степени связан с патологическими процессами, происходящими при БП, представляя собой потенциально новый биомаркер БП или терапевтическую мишень [44, 45].

Во время раннего нейрогенеза важную роль играет ретиноевая кислота (РК), синтез которой среди прочих определяется генами *RADLH2* и *RADLH3* [46, 47]. Высокая транскрипция этих генов, обнаруженная нами в НП, полученных от пациентов с БП (рис. 1), может приводить к повышению содержания РК в клетках выше нормы и тем самым оказывать влияние на их фенотип. На это указывают многочисленные данные об аномальном влиянии РК на процессы развития [48, 49]. РК контролирует экспрессию гена *GBX2* [50–53], который имеет высокий уровень транскрипции в НП, полученных от пациентов с БП, и низкий – в НП от ЗД. Имеются многочисленные указания на то, что этот ген играет важную роль в развитии центральной нервной системы. Он участвует в подавлении экспрессии гена *OTX2* [50–52], который, в свою очередь, влияет на экспрессию гена *LMX1A*. Эта группа генов участвует в судьбе нейральных предшественников и/или нейрогенезе ДА нейронов в значительной степени опосредованно через сигнальный путь WNT, в частности *WNT1* [33, 54, 55]. По нашим данным, экспрессия генов *WNT1*, *FGF8*, *OTX2* и *LMX1A* существенно понижена в НП пациентов с БП по сравнению со ЗД, тогда как повышенный уровень экспрессии *FRZB*, ингибитора сигнального

пути WNT [54, 56, 57], и гена *GBX2* выявлен у пациентов с БП по сравнению со ЗД. По данным литературы, продукты этих генов при нормальном развитии без патологий взаимодействуют с компонентами сигнального пути WNT, модулируя их сигналы [58–60]. Можно предположить, что при мутантных вариантах генов *PARK2* возможны изменения всей структуры WNT-пути, приводящие к аномалиям в нейрогенезе ДА нейронов.

У пациентов с БП по сравнению со ЗД на этапе НП наблюдается также повышенный уровень транскрипции генов *TFAP2A* и *TFAP2B*. Известно, что транскрипционный фактор, кодируемый *TFAP2A*, в составе гетеродимера с *TFAP2B* участвует в нейруляции на отдельных стадиях развития нервного гребня и необходим для индукции границы нервной пластинки и спецификации клеток нервного гребня [61, 62]. Упомянутый выше ген *FRZB*, отрицательно влияющий на нейрогенез ДА нейронов при высокой активности, имеет в промоторной зоне несколько сайтов связывания ФТ *TFAP2A* и *TFAP2B*, с чем может быть связан его высокий уровень транскрипции. Как показано нами выше с помощью биоинформатического анализа, многие гены, которые имеют повышенную транскрипционную активность в НП пациентов с БП по сравнению со ЗД, часто содержат респонсивные элементы также для этих двух ФТ.

В нормальном нейрогенезе участвует также гомеобокс-содержащий ген *IRX2* [63], который повышенно экспрессируется в НП, полученных из ИПСК от пациентов с БП. Ранее уже имелись указания на то, что повышенная транскрипция этого гена может быть биомаркером БП [64].

Следует также обратить внимание на повышенный уровень транскрипции некоторых из исследуемых «эмбриональных» генов в фибробластах и недифференцированных ИПСК от пациентов с БП. Эти результаты показывают, что у пациентов с БП изменение транскрипционного профиля частично происходит не только в НП, но и в других типах клеток.

Таким образом, в НП, полученных из ИПСК пациентов с БП, наблюдается повышенная транскрипция многих генов, активно экспрессирующихся в норме на эмбриональных стадиях развития нервной системы человека. Важно, что все эти гены слабо или вообще не транскрибируются в НП, полученных из ИПСК трёх ЗД. Следовательно, «эмбриональные» гены, активно экспрессирующиеся в НП, полученных от пациентов с БП, не требуются для нормального функционирования нейральных клеток. Наблюдаемый процесс можно на-

звать дематурацией НП при БП. Термин «дематурация» был использован ранее при изучении транскриптома нейральных клеток гиппокампа и префронтальной коры после воздействия антидепрессантом флуоксетином [65, 66]. Кроме того, существует предположение, что гены, которые функционируют в основном на ранних стадиях эмбриогенеза в головном мозге, могут быть активированы десятилетиями позже (например, в результате воспаления или вирусной инфекции) и разрушать своим действием те же нервные структуры, которые они создали при внутриутробном развитии [67]. Существует также ряд косвенных указаний на то, что механизмы, приводящие к дедифференцировке (дематурации) и подавлению идентичности зрелых нейронов, способствуют нейродегенерации [68]. Вместе с тем нельзя исключить, что наблюдаемая нами картина экспрессии генов в НП пациентов с БП может быть также результатом обратного процесса – имматурации (задержки дифференцировки).

На основании полученных данных можно заключить, что в НП, полученных от пациентов с БП, по сравнению с НП ЗД происходит изменение транскриптома, которое выражается в значительном повышении экспрессии ряда генов, в норме принимающих участие в эмбриональном развитии и прекращающих экспрессироваться во взрослом организме.

Хотя полученные результаты дают принципиально новый взгляд на механизмы развития БП, следует отметить некоторые проблемы, связанные с использованным нами подходом. Во-первых, эксперименты проводились на модели *in vitro*, которая имеет определённые ограничения [69]. Во-вторых, число «эмбриональных» генов, проанализированных нами с помощью биоинформатического анализа и верифицированных с использованием ПЦР, достаточно ограничено и не включает всю «панель» таких генов. Тем не менее общая тенденция значительного повышения уровня транскрипции «эмбриональных» генов в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД представляется очевидной. В дальнейшем планируется исследовать экспрессию наиболее интересных генов на белковом уровне.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли свой вклад в разработку концепции и дизайна исследования. Подготовку материала осуществляли Новосадова Е.В. и Ненашева В.В. Сбор и анализ данных были выполнены Новосадовой Е.В., Новосадовой Л.В., Ненашевой В.В., Гривениковым И.А. и Федосеевой В.Б. Первый черновик рукописи был написан Федосеевой В.Б.

и Тарантулом В.З. Все авторы прочитали и одобрили окончательную рукопись.

**Финансирование.** Работа была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1357) (получение клеточных линий) и Российским научным фондом (проект № 21-15-00103) (биоинформатический анализ).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность академику Иллариошкину С.Н. (Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии») за предоставленный биопсийный материал пациентов с БП, проф. М.А. Лагарковой (Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального

медико-биологического агентства) за предоставление части линий ИПСК. Исследование проводилось с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Центр клеточных и геновых технологий» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов. Описание клеточных линий, полученных от людей с их согласия, содержится в предыдущих статьях, где они впервые упоминаются.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Lau, L. M., and Breteler, M. M. B. (2006) Epidemiology of Parkinson's disease, *Lancet Neurol.*, **5**, 525-535, doi: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.
- Okano, H., and Yamanaka, S. (2014) iPSC cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease, *Mol. Brain*, **7**, 22, doi: 10.1186/1756-6606-7-22.
- Day, J. O., and Mullin, S. (2021) The genetics of Parkinson's disease and implications for clinical practice, *Genes (Basel)*, **12**, 1006, doi: 10.3390/genes12071006.
- Rathore, A. S., Birla, H., Singh, S. S., Zahra, W., Dilmashin, H., Singh, R., Keshri, P. K., and Singh, S. P. (2021) Epigenetic modulation in Parkinson's disease and potential treatment therapies, *Neurochem. Res.*, **46**, 1618-1626, doi: 10.1007/s11064-021-03334-w.
- Rouaud, T., Corbillé, A.-G., Leclair-Visonneau, L., de Lataillade, A. G., Lionnet, A., Preterre, C., Damier, P., and Derkinderen, P. (2021) Pathophysiology of Parkinson's disease: mitochondria, alpha-synuclein and much more, *Rev. Neurol. (Paris)*, **177**, 260-271, doi: 10.1016/j.neurol.2020.07.016.
- Novosadova, E.V., Grivennikov, I.A. Induced pluripotent stem cells: From derivation to application in biochemical and biomedical research. *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1425-1441, doi: 10.1134/S000629791413001X.
- Новосадова Е. В., Некрасов Е. Д., Честков И. В., Сурдина А. В., Васина Е. М., Богомазова А. Н., Мануилова Е. С., Арсеньева Е. Л., Симонова В. В., Коновалова Е. В., Федотова Е. Ю., Абрамичева Н. Ю., Хаспеков Л. Г., Гривенников И. А., Тарантул В. З., Киселев С. Л., Иллариошкин С. Н. (2016) Платформа для изучения молекулярных и клеточных механизмов болезни Паркинсона, основанная на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, *Совр. Технол. Мед.*, **8**, 157-166, doi: 10.17691/stm2016.8.4.20.
- Fedoseeva, V. B., Novosadova, E. V., Novosadova, V. V., Nenasheva, V. V., Grivennikov, I. A., and Tarantul, V. Z. (2022) The level of transcription of HOX genes increased in neural precursors derived from iPSC from patients with Parkinson's disease, In *Smart and Innovative Farming for Sustainable Agriculture and Food Systems*, Springer Nature.
- Novosadova, E., Anufrieva, K., Kazantseva, E., Arsenyeva, E., Fedoseyeva, V., Stepanenko, E., Poberezhniy, D., Illarioshkin, S., Novosadova, L., Gerasimova, T., Nenasheva, V., Grivennikov, I., Lagarkova, M., and Tarantul, V. (2022) Transcriptome datasets of neural progenitors and neurons differentiated from induced pluripotent stem cells of healthy donors and Parkinson's disease patients with mutations in the PARK2 gene, *Data Brief*, **41**, 107958, doi: 10.1016/j.dib.2022.107958.
- Avazzadeh, S., Baena, J. M., Keighron, C., Feller-Sanchez, Y., and Quinlan, L. R. (2021) Modeling Parkinson's disease: iPSCs towards better understanding of human pathology, *Brain Sci.*, **11**, 373, doi: 10.3390/brainsci11030373.
- Novosadova, E. V., Nenasheva, V. V., Makarova, I. V., Dolotov, O. V., Inozemtseva, L. S., Arsenyeva, E. L., Chernyshenko, S. V., Sultanov, R. I., Illarioshkin, S. N., Grivennikov, I. A., and Tarantul, V. Z. (2020) Parkinson's disease-associated changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors upon neuronal differentiation of human induced pluripotent stem cells, *J. Mol. Neurosci.*, **70**, 514-521, doi: 10.1007/s12031-019-01450-5.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010) EdgeR: a Bioconductor package for differential

- expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics*, **26**, 139-140, doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
13. Livak, K., and Schmittgen, T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method, *Methods*, **25**, 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
  14. Kulakovskiy, I. V., Vorontsov, I. E., Yevshin, I. S., Sharipov, R. N., Fedorova, A. D., Rumynskiy, E. I., Medvedeva, Y. A., Magana-Mora, A., Bajic, V. B., Papatsenko, D. A., Kolpakov, F. A., and Makeev, V. J. (2018) HOCOMOCO: towards a complete collection of transcription factor binding models for human and mouse via large-scale ChIP-Seq analysis, *Nucleic Acids Res.*, **46(D1)**, D252-D259, doi: 10.1093/nar/gkx1106.
  15. Wang, W. D., Melville, D. B., Montero-Balaguer, M., Hatzopoulos, A. K., and Knapik, E. W. (2011) Tfp2a and Foxd3 regulate early steps in the development of the neural crest progenitor population, *Dev. Biol.*, **360**, 173-185, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.09.0194.
  16. Hulme, A. J., Maksour, S., St-Clair Glover, M., Mielliet, S., and Dottori, M. (2022) Making neurons, made easy: the use of neurogenin-2 in neuronal differentiation, *Stem Cell Rep.*, **17**, 14-34, doi: 10.1016/j.stemcr.2021.11.015.
  17. Ang, S-L. (2009) Foxa1 and Foxa2 transcription factors regulate differentiation of midbrain dopaminergic neurons, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **651**, 58-65, doi: 10.1007/978-1-4419-0322-8\_5.
  18. Blesa, J., and Przedborski, S. (2014) Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability, *Front. Neuroanat.*, **8**, 155-167, doi: 10.3389/fnana.2014.00155.
  19. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663-676, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
  20. Marchionini, M., Lehrmann, E., Chu, Y., He, B., Sorwell, C. E., Beckerc, K. G., Freed, W. J., Kordower, J. H., and Collier, T. J. (2007) Role of heparin binding growth factors in nigrostriatal dopamine system development and Parkinson's disease, *Brain Res.*, **1147**, 77-88, doi: 10.1016/j.brainres.2007.02.028.
  21. Zagare, A., Barmppa, K., Smajic, S., Smits, L. M., Grzyb, K., Grünewald, A., Skupin, A., Nickels, S. L., and Schwamborn, J. C. (2022) Midbrain organoids mimic early embryonic neurodevelopment and recapitulate LRRK2-p.Gly2019Ser-associated gene expression, *Am. J. Hum. Genet.*, **109**, 311-327, doi: 10.1016/j.ajhg.2021.12.009.
  22. Wang, Y., and Wang, Z. (2020) An integrated network analysis of mRNA and gene expression profiles in Parkinson's disease, *Med. Sci. Monit.*, **26**, 920846, doi: 10.12659/msm.920846.
  23. Bansod, S., Kageyama, R., and Ohtsuka, T. (2017) HES5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development, *Development*, **144**, 3156-3167, doi: 10.1242/dev.147256.
  24. Chapman, G., Sparrow, D. B., Kremmer, E., and Dunwoodie, S. L. (2011) Notch inhibition by the ligand DELTA-LIKE 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 905-916, doi: 10.1093/hmg/ddq529.
  25. Augustyn, A., Borromeo, M., Wang, T., Fujimoto, J., Shao, C., Dospoy, P. D., Lee, V., Tan, C., Sullivan, J. P., Larsen, J. E., Girard, L., Behrens, C., Wistuba, I. I., Xie, Y., Cobb, M. H., Gazdar, A. F., Johnson, J. E., and Minna, J. D. (2014) ASCL1 is a lineage oncogene providing therapeutic targets for high-grade neuroendocrine lung cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14788-14793, doi: 10.1073/pnas.1410419111.
  26. Henke, R. M., Meredith, D. M., Borromeo, M. D., Savage, T. K., and Johnson, J. E. (2009) Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube, *Dev. Biol.*, **328**, 529-540, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.01.007.
  27. Kageyama, R., Shimojo, H., and Ohtsuka, T. (2019) Dynamic control of neural stem cells by bHLH factors, *Neurosci. Res.*, **138**, 12-18, doi: 10.1016/j.neures.2018.09.005.
  28. Ide, M., Yamada, K., Toyota, T., Iwayama, Y., Ishitsuka, Y., Minabe, Y., Nakamura, K., Hattori, N., Asada, T., Mizuno, Y., Mori, N., and Yoshikawa, T. (2005) Genetic association analyses of PHOX2B and ASCL1 in neuropsychiatric disorders: evidence for association of ASCL1 with Parkinson's disease, *Hum. Genet.*, **117**, 520-527, doi: 10.1007/s00439-005-1342-8.
  29. Oliveira, M. A. P., Balling, R., Smidt, M. P., and Fleming, R. M. T. (2017) Embryonic development of selectively vulnerable neurons in Parkinson's disease, *NPJ Parkinson Dis.*, **3**, 21, doi: 10.1038/s41531-017-0022-4.
  30. Caiazzo, M., Dell'Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T. D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., Russo, G., Carninci, P., Pezzoli, G., Gainetdinov, R. R., Gustincich, S., Dityatev, A., and Broccoli, V. (2011) Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts, *Nature*, **476**, 224-227, doi: 10.1038/nature10284.
  31. Lu, C., Shi, X., Allen, A., Baez-Nieto, D., Nikish, A., Sanjana, N. E., and Pan, J. Q. (2019) Overexpression of NEUROG2 and NEUROG1 in human embryonic stem cells produces a network of excitatory and inhibitory neurons, *FASEB J.*, **33**, 5287-5299, doi: 10.1096/fj.201801110RR.
  32. Han, S., Dennis, D. F., Balakrishnan, A., Dixit, R., Britz, O., Zinyk, D., Touahri, Y., Olender, T., Brand, M., Guillemot, F., Kurrasch, D., and Schuurmans, C. (2018) A non-canonical role for the proneural gene *Neurog1* as a negative regulator

- of neocortical neurogenesis, *Development*, **145**, dev157719, doi: 10.1242/dev.157719.
33. Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L. M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., and Ang, S.-L. (2006) Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons, *Development*, **133**, 495-505, doi: 10.1242/dev.02223.
  34. Dasen, J. S., Tice, B. C., Brenner-Morton, S., and Jessell, T. M. (2005) A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity, *Cell*, **123**, 477-491, doi: 10.1016/j.cell.2005.09.009.
  35. Schmid, T., Krüger, M., and Braun, T. (2007) NSCL-1 and -2 control the formation of precerebellar nuclei by orchestrating the migration of neuronal precursor cells, *Neurochemistry*, **102**, 2061-2072, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04694.x.
  36. Kratochwil, C. F., Maheshwari, U., and Rijli, F. M. (2017) The long journey of pontine nuclei neurons: from rhombic lip to cortico-ponto-cerebellar circuitry, *Front. Neurol. Circuits*, **11**, 33, doi: 10.3389/fncir.2017.00033.
  37. Krüger, M., Ruschke, K., and Braun, T. (2004) NSCL-1 and NSCL-2 synergistically determine the fate of GnRH-1 neurons and control necdin gene expression, *EMBO J.*, **23**, 4353-4364, doi: 10.1038/sj.emboj.7600431.
  38. Byun, J. S., Oh, M., Lee, S., Gil, J.-E., Mo, Y., Ku, B., Kim, W. K., Oh, K. J., Lee, E. W., Bae, K. H., Lee, S. C., and Han, B. S. (2020) The transcription factor PITX1 drives astrocyte differentiation by regulating the SOX9 gene, *J. Biol. Chem.*, **295**, 13677-13690, doi: 10.1074/jbc.RA120.013352.
  39. Agoston, Z., Li, N., Haslinger, A., Wizenmann, A., and Schulte, D. (2012) Genetic and physical interaction of Meis2, Pax3 and Pax7 during dorsal midbrain development, *BMC Dev. Biol.*, **12**, 10, doi: 10.1186/1471-213X-12-10.
  40. Mansouri, A. (1998) The role of Pax3 and Pax7 in development and cancer, *Crit. Rev. Oncog.*, **9**, 141-149, doi: 10.1615/critrevoncog.v9.i2.40.
  41. Agoston, Z., and Schulte, D. (2009) Meis2 competes with the Groucho co-repressor Tle4 for binding to Otx2 and specifies tectal fate without induction of a secondary midbrain-hindbrain boundary organizer, *Development*, **136**, 3311-3322, doi: 10.1242/dev.037770.
  42. Xu, M., Li, Y., Du, J., Lin, H., Cao, S., Mao, Z., Wu, R., Liu, M., Liu, Y., and Yin, Q. (2018) PAX3 promotes cell migration and CXCR4 gene expression in neural crest cells, *J. Mol. Neurosci.*, **64**, 1-8, doi: 10.1007/s12031-017-0995-9.
  43. Green, Y. S., and Vetter, M. L. (2021) EBF factors drive expression of multiple classes of target genes governing neuronal development, *Neural. Dev.*, **6**, 19, doi: 10.1186/1749-8104-6-19.
  44. Chandrasekaran, S., and Bonchev, D. (2013) A network view on Parkinson's disease, *Comput. Struct. Biotechnol.*, **7**, 201304004, doi: 10.5936/csbj.201304004.
  45. Cruz-Monteagudo, M., Borges, F., Paz-Y-Miño, C., Cordeiro, M. N. D. S., Rebelo, I., Perez-Castillo, Y., Helguera, A. M., Sánchez-Rodríguez, A., and Tejera, E. (2016) Efficient and biologically relevant consensus strategy for Parkinson's disease gene prioritization, *BMC Med. Genomics*, **9**, 12, doi: 10.1186/s12920-016-0173-x.
  46. Maden, M. (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 755-765, doi: 10.1038/nrn2212.
  47. Napoli, J. L. (2012) Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1821**, 152-167, doi: 10.1016/j.bbali.2011.05.004.
  48. Yamamoto, M., Zhang, J., Smith, D., Hayakawa, Y., and McCaffery, P. (2003) A critical period for retinoic acid teratogenesis and loss of neurophilic migration of pontine nuclei neurons, *Mech. Dev.*, **120**, 701-709, doi: 10.1016/s0925-4773(03)00047-9.
  49. Yamamoto, M., Fujinuma, M., Hirano, S., Hayakawa, Y., Clagett-Dame, M., Zhang, J., and McCaffery, P. (2005) Retinoic acid influences the development of the inferior olivary nucleus in the rodent, *Dev. Biol.*, **280**, 421-433, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.007.
  50. Bouillet, P., Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Dollé, P., and Chambon, P. (1995) Sequence and expression pattern of the Stra7 (Gbx-2) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells, *Dev. Dyn.*, **204**, 372-382, doi: 10.1002/aja.1002040404.
  51. Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A. L., Rubenstein, J. L., Martinez, S., and Martin, G. R. (1997) Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function, *Development*, **124**, 2923-2934, doi: 10.1242/dev.124.15.2923.
  52. Millet, S., Campbell, K., Epstein, D. J., Losos, K., Harris, E., and Joyner, A. (1999) A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer, *Nature*, **401**, 161-164, doi: 10.1038/43664.
  53. Mesman, S., and Smidt, M. P. (2020) Acquisition of the midbrain dopaminergic neuronal identity, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4638, doi: 10.3390/ijms21134638.
  54. Prakash, N., Brodski, C., Naserke, T., Puelles, E., Gogoi, R., Hall, A., Panhuysen, M., Echevarria, D., Sussel, L., Weisenhorn, D. M., Martinez, S., Arenas, E., Simeone, A., and Wurst, W. (2006) A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors *in vivo*, *Development*, **133**, 89-98, doi: 10.1242/dev.02181.
  55. Yang, J., Brown, A., Ellisor, D., Paul, E., Hagan, N., and Zervas, M. (2013) Dynamic temporal requirement of Wnt1 in midbrain dopamine neuron development, *Development*, **140**, 1342-1352, doi: 10.1242/dev.080630.

56. Arenas, E. (2014) Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuron development and regenerative medicine for Parkinson's disease, *J. Mol. Cell. Biol.*, **6**, 42-53, doi: 10.1093/jmcb/mju001.
57. Akane, H., Saito, F., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Wang, L., and Shibutani, M. J. (2014) Gene expression profile of brain regions reflecting aberrations in nervous system development targeting the process of neurite extension of rat offspring exposed developmentally to glycidol, *Appl. Toxicol.*, **34**, 1389-1399, doi: 10.1002/jat.2971.
58. Rawal, N., Corti, O., Sacchetti, P., Ardilla-Osorio, H., Sehat, B., Brice, A., and Arenas, E. (2009) Parkin protects dopaminergic neurons from excessive Wnt/beta-catenin signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **388**, 473-478, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.014.
59. Sancho, R. M., Law, B. M. H., and Harvey, K. (2009) Mutations in the LRRK2 Roc-COR tandem domain link Parkinson's disease to Wnt signaling pathways, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 3955-3968, doi: 10.1093/hmg/ddp337.
60. Berwick, D. C., and Harvey, K. (2012) LRRK2 functions as a Wnt signaling scaffold, bridging cytosolic proteins and membrane-localized LRP6, *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 4966-4979, doi: 10.1093/hmg/ddc342.
61. Rothstein, M., and Simoes-Costa, M. (2020) Heterodimerization of TFAP2 pioneer factors drives epigenomic remodeling during neural crest specification, *Genome Res.*, **30**, 35-48, doi: 10.1101/gr.249680.119.
62. Kousa, Y. A., Zhu, H., Fakhouri, W. D., Lei, Y., Kinoshita, A., Roushangar, R. R., Patel, N. K., Agopian, A. J., Yang, W., Leslie, E. J., Busch, T. D., Mansour, T. A., Li, X., Smith, A. L., Li, E. B., Sharma, D. B., Williams, T. J., Chai, Y., Amendt, B. A., Liao, E. C., Mitchell, L. E., Bassuk, A. G., Gregory, S., Ashley-Koch, A., Shaw, G. M., Finnell, R. H., and Schutte, B. C. (2019) *TFAP2A-IRF6-GRHL* genetic pathway is conserved in neurulation, *Hum. Mol. Genet.*, **28**, 1726-1737, doi: 10.1093/hmg/ddz010.
63. Ahn, J.-I., Lee, K.-H., Shin, D.-M., Shim, J.-W., Lee, J.-S., Chang, S.Y., Lee, Y.-S., Brownstein, M. J., Lee, S.-H., and Lee, Y.-S. (2004) Comprehensive transcriptome analysis of differentiation of embryonic stem cells into midbrain and hindbrain neurons, *Dev. Biol.*, **265**, 491-501, doi: 10.1016/j.ydbio.2003.09.041.
64. Sim, H., Lee, J.-E., Yoo, H. M., Cho, S., Lee, H., Baek, A., Kim, J., Seo, H., Kweon, M. N., Kim, H. G., Jeon, Y. J., Son, M. Y., and Kim, J. (2020) Iroquois homeobox protein 2 identified as a potential biomarker for Parkinson's disease, *Int. J. mol. Sci.*, **21**, 3455, doi: 10.3390/ijms21103455.
65. Hagihara, H., Ohira, K., and Miyakawa, T. (2019) Transcriptomic evidence for immaturity induced by antidepressant fluoxetine in the hippocampus and prefrontal cortex, *Neuropsychopharmacol. Rep.*, **39**, 78-89, doi: 10.1002/npr2.12048.
66. Hagihara, H., Murano, T., Ohira, K., Miwa, M., Nakamura, K., and Miyakawa, T. (2019) Expression of progenitor cell/immature neuron markers does not present definitive evidence for adult neurogenesis, *Mol. Brain*, **12**, 108, doi: 10.1186/s13041-019-0522-8.
67. Lehrer, S., and Rheinstein, P. H. (2021) Alzheimer's disease and Parkinson's disease may result from reactivation of embryologic pathways silenced at birth, *Discov. Med.*, **31**, 89-94.
68. Caldwell, A. B., Liu, Q., Schroth, G. P., Galasko, D. R., Yuan, S. H., Wagner, S. T., and Subramaniam, S. (2020) Dedifferentiation and neuronal repression define familial Alzheimer's disease, *Sci. Adv.*, **6**, eaba5933, doi: 10.1126/sciadv.aba5933.
69. Weykopf, B., Haupt, S., Jungverdorben, J., Flitsch, L. J., Hebisch, M., Liu, G.-H., Suzuki, K., Belmonte, J. C. I., Peitz, M., Blaess, S., Till, A., and Brüstle, O. (2019) Induced pluripotent stem cell-based modeling of mutant LRRK2-associated Parkinson's disease, *Eur. J. Neurosci.*, **49**, 561-589, doi: 10.1111/ejn.14345.

## ACTIVATION OF EMBRYONIC GENE TRANSCRIPTION IN NEURAL PRECURSOR CELLS DERIVED FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS OF PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE

**V. B. Fedoseyeva\*<sup>\*,#</sup>, E. V. Novosadova<sup>#</sup>, V. V. Nenasheva<sup>#</sup>, L. V. Novosadova,  
I. A. Grivennikov, and V. Z. Tarantul**

*National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia; e-mail: fvb@img.msk.ru*

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative diseases in the world. Despite numerous studies, the causes of this pathology remain completely unknown. This is, among other things, due to the difficulty of obtaining biological material for analysis. Neural cell cultures derived from induced

pluripotent stem cells (iPSCs) serve as a great potential for studying the molecular events underlying the pathogenesis of PD. This paper presents the results of bioinformatic analysis of data obtained using RNA-seq technology in the study of neural precursors (NP) obtained from iPSCs of healthy donors and patients with PD carrying various mutations that are a common cause of familial PD. This analysis showed that in NP cells obtained from PD patients, unlike healthy donors, the level of transcription of genes actively expressed in the nervous system at the embryonic stage of development was significantly increased. Bioinformatic data are generally confirmed by real-time PCR. The data obtained suggest that one of the causes of PD may be an abnormal process of enhancing the expression of embryonic genes during differentiation of neural cells (dematuration).

*Keywords:* Parkinson's disease, induced pluripotent stem cells, neural precursors, RNA-seq, differentiation gene expression, PCR, bioinformatic analysis