

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Католикова Наталия Викторовна

Дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны в условиях *in vitro*: изучение роли рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, и модуляции сигнального пути Notch

Научная специальность 1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научные руководители:
кандидат медицинский наук
Гайнетдинов Рауль Радикович,
доктор биологических наук
Малашичева Анна Борисовна

Санкт-Петербург

2023

Содержание

Введение	5
Актуальность исследования	5
Теоретическая и практическая значимость	7
Цели и задачи исследования	8
Положения, выносимые на защиту	9
Научная новизна исследования.....	9
Личный вклад автора.....	10
1. Обзор литературы	11
1.1. Клеточная заместительная терапия болезни Паркинсона и дифференцировка плюрипотентных клеток человека в дофаминергические нейроны	11
1.2 Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами	17
1.3 Сигнальный путь Notch	20
2. Материалы и методы.....	23
2.1 Животные	23
2.2 Гистологическое исследование.....	23
2.3 Клеточные линии	24
2.4 Дифференцировка iPСК человека	25
2.5 Иммунофлуоресцентное окрашивание	26
2.6 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).....	28
2.7 Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp).....	28
2.8 Проточная цитометрия	29
2.9 Выделение РНК и обратная транскрипция	29
2.10 ПЦР в реальном времени	29
2.11 TaqMan ПЦР	31
2.12 Критерии включения, выбор наборов, нормализация и анализ данных РНК секвенирования, полученных из открытых источников	32
2.13 Производство лентивирусов	33
2.14 Оценка эффективности вирусных частиц для ингибирования/активации сигнального пути Notch	33
2.15 Оценка эффективности ингибирования/активации сигнального пути Notch во время дифференцировки iPСК человека в дофаминергические нейроны	34
2.16 РНК-секвенирование	34
2.17 Обработка данных.....	34

2.18 Доступ к данным	35
3. Результаты.....	36
3.1 Дифференцировка иПСК человека в дофаминергические нейроны в условиях <i>in vitro</i>	36
3.1.1 иПСК человека эффективно дифференцируются в дофаминергические нейроны в условиях <i>in vitro</i>	36
3.2 Взаимосвязь системы TAARs, нейрогенеза и дифференцировки дофаминергических нейронов <i>in vitro</i>.....	42
3.2.1 Мыши, нокаутные по гену TAAR5, имеют повышенное число дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга, а также повышенный уровень GDNF в стриатуме	42
3.2.2 Мыши, нокаутные по гену TAAR2, имеют повышенный уровень BDNF в стриатуме	44
3.2.3 Анализ экспрессии TAARs, сделанный на данных РНК секвенирования, полученных из открытых баз данных, показал, что TAARs экспрессируются в нейрогенных зонах, в частности в гиппокампе мыши, и их экспрессия обнаруживается в разных типах клеток	44
3.2.4 TAARs экспрессируются на поздних этапах дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны, что было показано при помощи анализа данных РНК секвенирования, полученных из открытых баз данных, и данных TaqMan ПЦР на разных стадиях дифференцировки	48
3.3 Влияние модуляции сигнального пути Notch на начальные этапы дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны.....	52
3.3.1 Нокаут <i>RBPJ</i> и оверэкспрессия <i>NICD</i> эффективно ингибируют и активируют соответственно сигнальный путь Notch во время дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны.....	53
3.3.2 Анализ данных секвенирования РНК с помощью метода главных компонент (principal component analysis (PCA)) выявил сходства и различия между группами	55
3.3.3 Кластерный анализ выявил группы генов, характерные для человеческих иПСК и ЭСК, для дифференцированного состояния и отдельную группу, характерную для оверэкспрессии <i>NICD</i>	57
3.3.4 При помощи анализа дифференциальной экспрессии было показано преобладающее сходство контрольной дифференцировки (группа CONTR) и дифференцировки с ингибированием сигнального пути Notch (группы SH и DAPT) и их значительное отличие	

по сравнению с дифференцировкой на фоне активации сигнального пути Notch (группа NICD).....	57
Заключение.....	63
Выводы.....	67
Публикации и апробация работы	68
Список литературы	71
Список использованных сокращений.....	80
Приложения.....	82

Введение

Актуальность исследования

Болезнь Паркинсона (БП) – это нейродегенеративное заболевание, которое широко распространено среди людей старшей возрастной группы. БП – это тяжелое заболевание, оно значительно снижает качество жизни пациентов и в большом числе случаев приводит к их инвалидизации [1]. При БП происходит гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга и поэтому основным препаратом для лечения БП в настоящее время является предшественник дофамина – леводопа. Несмотря на свою эффективность данный вариант лечения имеет много недостатков и сопряжен с развитием целого ряда побочных эффектов. По этой причине в настоящее время ведется активный поиск новых способов лечения БП.

Клеточная заместительная терапия, подразумевающая введение в соответствующие структуры мозга экзогенных нейронов, продуцирующих дофамин, является одним из исследуемых способов лечения БП [2–4]. В настоящий момент основным источником для получения клеток для трансплантации является дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток человека в предшественники дофаминергических нейронов, проводимая *in vitro*. Эффективность введения экзогенных нейронов для восполнения уровня дофамина и соответственно лечения БП была подтверждена целым рядом исследований, и это привело к тому, что за последние несколько лет был начат ряд клинических испытаний, основанных на использовании этого метода [2; 4; 5]. Нельзя не отметить значительный прогресс в данной области, но, несмотря на это, актуальность усовершенствования используемых методов сохраняется до сих пор, поскольку еще не решен целый ряд практических задач, а именно уменьшение длительности протоколов дифференцировки, повышение специфичности получаемых клеточных культур и создание оптимизированных условий для введения трансплантата, обеспечивающих максимальную выживаемость вводимых клеток, их конечное созревание и функциональную интеграцию в существующую нейрональную систему.

Следовые амины (trace amines (TA)) в качестве нейромедиаторов были известны давно, однако рецепторы к ним – рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, (trace amine-associated receptors (TAARs)) – были открыты только в 2001 году [6; 7]. Показано, что TAARs экспрессируются в разных структурах головного мозга, играют роль в регуляции движения, питания, внимания, настроения [6]. Изменения в системе TA и TAARs связаны с такими заболеваниями как шизофрения, при которой обнаружено повышение TA, большое

депрессивное расстройство, синдром дефицита внимания и гиперактивности, при которых описано снижение концентрации определенного вида ТА в мозге, и с целым рядом других [8–10]. TAARs стали новой мишенью для создания лекарственных препаратов и разработки новых подходов к терапии целого спектра заболеваний. Поиск модуляторов ТА и TAAR как потенциальных терапевтических агентов ведут мировые фармацевтические гиганты, такие как Sunovion и F. Hoffman La Roche. Однако полностью спектр функций TAARs еще не изучен. В последнее время появились данные, позволяющие предположить, что ТА и TAARs могут играть определенную роль в регулировании нейрогенеза [11–14]. Учитывая эти данные, изучение роли системы ТА и TAARs в нейрогенезе дофаминергических нейронов и в дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток человека и их влияние на эффективность трансплантации предшественников дофаминергических нейронов при их введении в качестве клеточной заместительной терапии БП крайне актуально, поскольку полученные в ходе выполнения представляемой работы данные могут в значительной степени расширить существующие представления о функциях TAARs, а также внести вклад в развитие методов клеточной терапии БП.

Большинство существующих протоколов для дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в дофаминергические нейроны начинаются с так называемого двойного ингибирования SMAD [15], которое включает в себя ингибирование сигнальных каскадов BMP (Bone morphogenetic protein) и TGF- β (Transforming growth factor beta), и регионализации посредством активации сигнальных путей SHH (Sonic Hedgehog), Wnt и FGF8 (Fibroblast growth factor 8). На более поздних этапах дифференцировки происходит созревание полученных нейрональных предшественников в присутствии факторов роста нейронов [5; 16; 17]. Однако существуют и другие сигнальные пути, которые также играют важную роль в нейрогенезе, и потенциально их модуляция может способствовать повышению специфичности и эффективности протоколов дифференцировки. Одним из таких является сигнальный путь Notch.

Notch играет чрезвычайно важную роль как во время эмбрионального развития центральной нервной системы, так и постнатально, принимая участие в регуляции пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза [18–20]. Сигнальный путь Notch и в частности белок RBPJ необходимы для поддержания нейрональных предшественников в недифференцированном/самообновляющемся состоянии, тем самым поддерживая пул стволовых клеток мозга [20]. Ингибирование Notch запускает в астроцитах стриатума латентную нейрогенную программу даже в отсутствии повреждения ткани [21]. Notch также важен для развития аксонов и дендритов [22; 23]. Однако эффекты модуляции передачи сигналов Notch не всегда однозначны. Последствия активации или ингибирования передачи

сигналов Notch чрезвычайно зависят от окружения [24; 25]. Поэтому, принимая во внимание значимую роль, которую этот сигнальный путь играет в нейрогенезе, изучение модуляции Notch применительно к дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны важно для разработки протоколов дифференцировки и развития методов регенеративной медицины.

Таким образом, изучение роли TAARs и модуляции сигнального пути Notch в дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека в дофаминергические нейроны, и влияния данных систем на дифференцировку, выживаемость, конечное созревание и эффективность интеграции в существующую нейрональную систему предшественников дофаминергических нейронов, при введении их в стриатум модельным животным является крайне актуальной задачей. Представляемая работа имеет фундаментальное значение, поскольку позволяет расширить существующие представления о функции TAARs и сигнального пути Notch и их роли в нейрогенезе и нейрогенезе дофаминергических нейронов в частности. Прикладное значение работы в области высокотехнологичного здравоохранения состоит в том, что полученные данные могут внести вклад в развитие новых методов лечения БП.

Теоретическая и практическая значимость

Разработка эффективных и оптимальных по времени протоколов дифференцировки иПСК человека в предшественники дофаминергических нейронов, а также протоколов трансплантации полученных клеток являются важнейшими задачами на этапе разработки методов клеточной заместительной терапии для лечения БП.

Система TAARs была открыта относительно недавно, и на данный момент TAARs являются крайне перспективной мишенью для разработки новых лекарственных средств, однако при этом только часть из функций TAARs изучены. Полученные в ходе выполнения работы данные вносят значимый вклад в развитие представлений о роли TAARs в нейрогенезе и нейрогенезе дофаминергических нейронов, в частности, а также динамике изменения экспрессии TAARs во время дифференцировки иПСК в дофаминергические нейроны в условиях *in vitro*.

Сигнальный путь Notch играет важную роль в развитии нервной системы в эмбриональный период и в регулировании работы нейрогенных зон после рождения. Изучение

роли сигнального пути Notch применительно к дифференцировке иПСК человека в дофаминергические нейроны имеет важное фундаментальное значение, поскольку конечные эффекты модуляции Notch в значительной степени зависят от окружения, а влияние на сигнальный путь Notch может иметь значение для оптимизации протоколов получения дофаминергических предшественников *in vitro*.

Таким образом, полученные в работе результаты имеют как фундаментальное, так и прикладное значение, поскольку способствуют расширению существующих представлений о функциях TAAR, их роли в нейрогенезе и нейрогенезе дофаминергических нейронов, в частности, роли сигнального пути Notch на ранних этапах дифференцировки иПСК человека, а также потенциально могут внести вклад в развитие методов клеточной заместительной терапии БП.

Цели и задачи исследования

Цель:

Целью данной работы является изучение роли рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, в регуляции нейрогенеза дофаминергических нейронов и анализ эффектов модуляции сигнального пути Notch на ранних этапах дифференцировки как потенциальных мишеней для оптимизации протоколов получения дофаминергических нейронов и их предшественников из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Задачи:

1. Оптимизировать протокол дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны в условиях *in vitro*.
2. Оценить роль рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, в регуляции нейрогенеза дофаминергических нейронов на примере TAAR2 и TAAR5 рецепторов.
3. Оценить влияние ингибирования и активации сигнального пути Notch на ранние этапы дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны.

Положения, выносимые на защиту

1. TAAR2 и TAAR5 рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, оказывают влияние на регуляцию нейрогенеза и нейрогенеза дофаминергических нейронов в частности.
2. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, экспрессируются в зонах нейрогенеза у взрослых, в частности в гиппокампе, и на разных этапах дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны.
3. Ингибирование сигнального пути Notch на ранних этапах дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны, независимо от его уровня, имеет минимальные эффекты.
4. Активация сигнального пути Notch на ранних этапах дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны значительно влияет на паттерн экспрессии генов, имеющих значение для спецификации нейронов и их морфологического формирования.

Научная новизна исследования

В ходе выполнения работы был отработан эффективный протокол получения дофаминергических нейронов из иПСК человека в условиях *in vitro*. Получены новые данные об эффекте нокаута двух разных типов TAARs на экспрессию нейрогенных факторов и нейрогенез дофаминергических нейронов. Описана экспрессия TAARs в нейрогенных зонах, в частности в гиппокампе. Проанализированы наличие и динамика экспрессии TAARs на разных этапах дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны, что было сделано впервые.

В работе дана оценка эффектов модулирования сигнального пути Notch на ранние этапы дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны: проанализированы эффекты ингибирования сигнального пути Notch и проведено сравнение наиболее часто применяемого ингибирования Notch с помощью ингибитора γ -секретазы DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-s-phenylglycinebutyl ester) и более специфичного с помощью короткой шпилечной РНК (short hairpin RNA (shRNA)) к гену *RBPJ*, а также оценены эффекты активации Notch за счет

оверэкспрессии внутриклеточного домена Notch (Notch intracellular domain (NICD)), что ранее не выполнялось и не было описано в литературе.

Личный вклад автора

Автор работы проводила анализ литературы, активно участвовала в разработке основных идей, выполняла планирование экспериментов, анализ полученных данных и написание статей.

Все работы, связанные с культурами клеток (ведение линий iPSC человека, дифференцировка iPSC человека в дофаминергические нейроны, работа с клеточной линией HEK293), а также наработка вирусных конструкций, трансдукция, проверка эффективности вирусов были выполнены автором работы.

Молекулярно-биологические методы, такие как выделение РНК, ПЦР в реальном времени, а также методы визуализации, такие как фиксация материала, иммунофлюоресценция, также были выполнены автором работы.

В ходе выполнения РНК секвенирования, автор выделяла РНК, подготовка библиотек и секвенирование осуществлялись на базе ресурсного центра СПбГУ при участии Машарского Алексея Эльвиновича, обработка сырых данных была выполнена Шафранской Дарьей Дмитриевной и Пржибельским Андреем Дмитриевичем, сотрудниками центра Алгоритмической Биотехнологии ИТБМ СПбГУ, анализ полученных данных выполнялся автором исследования.

Автор также выполнила значительную часть работы в области подбора и анализа данных, полученных из открытых баз данных. Биоинформатический анализ выбранных наборов был выполнен Шафранской Дарьей Дмитриевной и Вагановой Анастасией Николаевной, сотрудником лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии ИТБМ СПбГУ.

1. Обзор литературы

1.1. Клеточная заместительная терапия болезни Паркинсона и дифференцировка плюрипотентных клеток человека в дофаминергические нейроны

БП - это нейродегенеративное заболевание, которое широко распространено в старшей возрастной группе. По данным Американской ассоциации болезни Паркинсона (American Parkinson Disease Association, <https://www.apdaparkinson.org>), БП страдает 1 - 2% людей старше 60 лет и 3 - 5% населения старше 85 лет. Клинические проявления болезни могут быть разделены на две группы: моторные, к которым относится тремор, ригидность, брадикинезия, поструральная нестабильность, и не моторные, среди которых выделяют когнитивные нарушения, депрессию, снижение артериального давления, гипо- или аносмию, нарушение функции желудочно-кишечного тракта, сексуальные проблемы, проблемы с мочеиспусканием и другие [1].

Основной заболеванием является гибель дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга, что приводит к значимому снижению уровня дофамина в стриатуме. Поэтому основным препаратом для лечения БП уже более 50 лет является Леводопа (L-DOPA) - предшественник дофамина [26]. Несмотря на доказанную эффективность данный вариант лечения имеет много недостатков: постепенное развитие нечувствительности к препарату, что требует увеличения вводимой дозы, а также возникновение побочных эффектов, одним из тяжелых среди которых являются Леводопа-индуцированные дискинезии [1]. Другие варианты медикаментозной терапии БП включают препараты из групп агонистов дофаминергических рецепторов, ингибиторы катехол-О-метилтрансферазы (COMT) и моноаминоксидазы (MAO), антихолинергические препараты, антагонисты аденозиновых рецепторов и другие группы, но все существующие на данный момент варианты терапевтического лечения являются только симптоматическими. Хирургический метод лечения – глубокая стимуляция мозга (deep brain stimulation (DBS)) – показан только при тяжелых моторных нарушениях и имеет много противопоказаний и ограничений. Поэтому поиск новых подходов к лечению БП – это одно из важнейших направлений в области исследования нейродегенеративных заболеваний.

Одним из новых подходов, которые активно разрабатываются в настоящее время и в перспективе могут быть использованы для лечения дегенеративных заболеваний, является клеточная заместительная терапия [1].

Идея о возможности трансплантации нейронов с целью лечения БП появилась еще в конце 1970х годов. Изначально было показано, что нейроны в принципе могут быть трансплантированы в мозг взрослого животного [27; 28]. В дальнейших работах в качестве источника доаминаргических нейронов был использован материал из вентральной части среднего мозга плода (ВЧС графты) [29; 30]. Изначально ВЧС графты подсаживали целиком, но позже была разработана техника создания и введения суспензии клеток [29; 31]. Для получения ВЧС графтов в виде суспензии клеток использовали абортивный материал человека на 6-9 неделе развития [32; 33]. Работы, выполненные на 6-гидроксидофаминовых (6-Hydroxydopamine (6-OHDA)) моделях крыс, показали, что ВЧС графты, трансплатированные в стриатум крысы, выживают, прорастают в стриатум и снижают моторную асимметрию, индуцированную введением амфетамина [34].

Основываясь на проведенных исследованиях [33], Шведское общество медицины (Swedish Society of Medicine) в марте 1986 года одобрило протокол клинических испытаний с использованием человеческих ВЧС графтов для лечения БП. В ходе этих испытаний четырем пациентам были введены суспензии человеческие ВЧС графты, выделенные от 4 эмбрионов для каждого случая трансплантации. Введение клеток было выполнено унилатерально в две зоны в скорлупу и в одну зону в области головы хвостатого ядра [32]. В ходе этих исследований были получены данные, подтверждающие, что клетки ВЧС графтов выживают при введении в мозг взрослого человека и снижают клинические проявления болезни [35]. Для одного из пациентов эффект от операции был настолько выражен, что ему была полностью отменена терапия Леводопа и необходимость вернуться к поддерживающим дозам данного препарата на фоне прогрессирования симптомов, появилась только через 6 лет после проведенной операции [1].

Проведенные клинические испытания были расценены как успешные и в последующем в университете Лунда по их протоколу были прооперированы еще 18 пациентов. Однако результат операций был не стабильным – у части пациентов наблюдалось значительное уменьшение клинических проявлений болезни, однако у остальных операции не дали значимого эффекта.

В середине 90х годов под эгидой Национального Института Здоровья США (National Institute of Health) были проведены еще два новых клинических испытания, основанные на введении ВЧС графтов. Одно из них было выполнено на базе Больницы Университета Колорадо (University of Colorado Hospital (UCH), Colorado), другое было мультицентровым и включало Школу медицины горы Синай (Mount Sinai School of Medicine, New York), Пресвитерианский медицинский центр Раш (Rush Presbyterian Medical Center, Chicago), Университет Южной Флориды (University of South Florida, Tampa, Florida) и Тихоокеанский центр исследования болезни Паркинсона Университета Британской Колумбии (Pacific

Parkinson's Research Centre, University of British Columbia, Vancouver) [36; 37]. В исследованиях участвовали 40 и 34 пациента соответственно. Клинические испытания были организованы по принципу двойных-слепых плацебо-контролируемых исследований, где в качестве отрицательного контроля использовали нанесение шрама. Несмотря на ожидания, в обоих исследованиях не удалось показать значимого улучшения и снижения клинических проявлений болезни. Помимо этого у части пациентов, которые входили в группу, где была выполнена трансплантация ВЧС графтов, появились негативные последствия в виде появления ярко выраженных дискинезий, которые в последующем получили название «графт-индуцированные дискинезии». Полученные результаты значительно снизили скорость и интерес к разработке клеточной заместительной терапии, однако на сегодняшний день, когда уже видны результаты исследований, проведенных в более поздние годы, причины неуспешности данных испытаний предположительно можно свести к следующему: протоколы испытаний содержали много технических недоработок: для операций были выбраны пациенты с крайне тяжелым течением болезни, часть из которых уже прошла через другой вариант хирургического лечения БП в виде DBS, еще не были отработаны протоколы выделения и культивирования вводимых клеток, иммуносупрессивная терапия, вводимая после оперативного вмешательства, была недостаточно продолжительна, а также не были адекватно подобраны сроки для проведения контрольных исследований [1].

Несмотря на неудачу и снижение интереса к разработке клеточной заместительной терапии БП к 2000 году были разработаны и начаты новые клинические испытания под названием TRANSEURO [3; 38]. В данных исследованиях в качестве источника дофаминергических нейронов также были использованы ВЧС графты. К моменту написания данной работы эти клинические испытания уже закончены и в ближайшее время будут предоставлены их результаты, но на основании опубликованных промежуточных докладов и отчетов исследователей уже можно сделать вывод, что ВЧС графты не будут в дальнейшем использоваться как источник дофаминергических нейронов и их предшественников для клеточной заместительной терапии БП. Но не смотря на, казалось бы, негативный результат данных исследований, можно сказать, что TRANSEURO стали крайне важным этапом в процессе разработки клеточной заместительной терапии БП. Данные TRANSEURO [3] и предыдущих исследований [39] подтвердили, что экзогенные дофаминергические нейроны при введении в стриатум пациентов могут выживать, встраиваться в существующую нейрональную сеть и могут выделять дофамин, что приводит к снижению клинических проявлений БП. В ходе данных исследований были разработаны и прописаны четкие критерии отбора пациентов для проведения операций такого типа; были отработаны стандартные операционные процедуры (СОП) для сбора abortивного материала, диссекции и подготовки клеточной суспензии,

позволяющие сохранить максимальную выживаемость клеток при трансплантации; были просчитаны и проверены рекомендации по числу клеток, которое должно быть введено, а также выбраны оптимальные точки для введения; прописаны оптимальные сроки и состав иммуносупрессивной терапии, необходимой после трансплантации. Кроме того, на основании данных исследования TRANSEURO было показано, что позитронно-эмиссионно томографическое (ПЭТ) сканирование с меткой ^{11}C -PE2I имеет большую чувствительность и прогностическую значимость для выявления моторных нарушений, чем сканирование с меткой ^{18}F -DOPA [3]. Таким образом протоколы и результаты TRANSEURO стали одной из важных составляющих для разработки последующих клинических испытаний [1].

Современный этап развития клеточной заместительной терапии БП стал возможен благодаря созданию линий эмбриональных плюрипотентных стволовых клеток (ЭСК), которые впервые были описаны в 1998 году [40; 41], а также открытию репрограммирования клеток и созданию иПСК, которые впервые были описаны в 2006 году [42]. Плюрипотентные стволовые клетки, как ЭСК так и иПСК, могут стать источником для получения любого типа клеток.

Первые протоколы дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нейрональном направлении были выполнены на линиях мышей [43; 44]. Было показано, что в условиях *in vitro* плюрипотентные стволовые клетки могут быть дифференцированы в глиальные клетки и зрелые нейроны. Как было показано чуть позже, плюрипотентные стволовые клетки человека также могут быть дифференцированы в нейрональном направлении [45; 46].

Один из ранних и к настоящему времени ставший «классическим» протоколов дифференцировки ЭСК в нейрональном направлении, который был описан в 2003 году, это так называемый протокол Смита [47]. Дифференцировка мышинных ЭСК по данному протоколу проводится в адгезивных условиях в монослое. Другой достаточно часто используемый подход к дифференцировке ЭСК заключается в их рассеивании в неадгезивных условиях, что приводит к формированию эмбрионных теллец [43]. Эмбрионные телльца могут дать начало производным всех 3 зародышевых листков [48], однако, за счет добавления определенных факторов, можно сдвинуть дифференцировку эмбрионных теллец в нейрональном направлении.

В 2009 году был опубликован новый и крайне эффективный протокол нейрональной индукции, основанный на ингибировании BMP и TGF- β [15]. Подход, описанный в данном протоколе, получил название двойное ингибирование SMAD (dual SMAD inhibition), поскольку оба сигнальных каскада и от BMP и TGF-beta связаны с системой SMAD белков. Первоначально важность BMP сигнального пути в развитии нейрональной системы была показана в экспериментах на лягушках [49–51]. Чуть позже появились данные о том, что ингибирование TGF-beta крайне важно для спецификации нейронов и играет важную роль в контроле раннего нейронального развития плюрипотентных клеток [52]. Но сочетание

ингибирования этих двух сигнальных каскадов оказалось наиболее эффективным [15]. Большинство современных протоколов для получения нейронов основаны именно на двойном ингибировании SMAD.

В настоящее время существуют разные протоколы для получения дофаминергических предшественников и дофаминергических нейронов из плюрипотентных стволовых клеток, однако все они основываются на общих принципах. Обобщая, в них можно выделить нескольких стадий: 1) первоначальная нейрональная дифференцировка на основе ингибирования сигнальных каскадов BMP и TGF/Activin/Nodal со спецификацией в вентральном направлении за счет активации SHH сигнального каскада и в каудальном направлении за счет воздействия на Wnt сигнальный каскад и активации FGF, и 2) последующее созревание полученных нейрональных прогениторов в условиях присутствия нейрональных ростовых факторов: нейротрофического фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor (BDNF)) и глиального нейротрофического фактора (glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)) до зрелых нейронов.

Наиболее известными из существующих протоколов являются те, на основе которых начаты клинические испытания [5; 16; 17].

Протокол, описанный в статье Doi D. et al. [16], используется в клинических испытаниях по лечению БП, начаты в Центре исследования и применения iPСК, Киото, Япония (Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto, Japan) в 2018 году. Данный протокол включает три этапа.

На первом этапе выполняется нейрональная индукция за счет двойного ингибирования SMAD, описанного выше. В качестве ингибиторов TGF и BMP сигнальных каскадов используются A83-01 и LDN193189 соответственно. Помимо этого на первом этапе осуществляется регионализация дифференцировки в направлении дофаминергических нейронов за счет активации SHH, воздействия на Wnt сигнальный каскад и активации FGF при помощи Purmorphamine, CHIR99021 и FGF8b соответственно.

Сигнальный каскад SHH играет важную роль в формировании паттерна дорсовентральной оси нервной трубки [53; 54]. В эмбриональном периоде развития SHH экспрессируется сначала нотохордой, а затем хордой. Повышение концентрации SHH индуцирует экспрессию транскрипционного фактора FOXA2 в вентральной части срединной линии, что по принципу положительной обратной связи еще больше усиливает экспрессию SHH в вентральной части нервной трубки, которая потом становится базальной пластинкой. Концентрация и время экспрессии SHH непосредственно влияют на спецификацию и распределение дорзовентральных маркеров, в частности высокие концентрации SHH стимулируют экспрессию таких маркеров как Nkx2.2, и дифференцировку клеток-предшественников в вентральные типы

нейронов, в частности в дофаминергические нейроны [55]. В условиях *in vitro* на ЭСК [56; 57] также было показано, что SHH служит ключевым вентрализирующим фактором.

Wnt/ β -catenin сигнальный каскад играет важнейшую роль в регуляции клеточной пролиферации, определении направления дифференцировки клеток во время эмбрионального развития, формировании полярности клеток, а также в поддержании тканевого гомеостаза [58].

Перед вторым этапом дифференцировки по протоколу Doi D. et al. [16] проводится селекция клеток, положительных по маркеру CORIN, при помощи клеточного сортирования (Fluorescence activated cell sorting (FACS)). CORIN представляет собой сериновую протеазу, которая первоначально была обнаружена в сердце. CORIN превращает проатриальный натрийуретический пептид (pro-atrial natriuretic peptide (pro ANP)) в атриальный натрийуретический пептид (atrial natriuretic peptide (ANP)) [59]. Во время развития мозга CORIN экспрессируется в базальной пластинке нервной трубки, где расположены клетки-предшественники дофаминергических нейронов. Было показано, что количество дофаминергических нейронов, полученных из ЭСК грызунов, может быть увеличено за счет сортировки клеток с использованием антитела против CORIN [60]. Культуры клеток, полученные при дифференцировке человеческих ЭСК и iPСК, которые на стадии нейрональных прогениторов были отсортированы по CORIN, содержали большее количество клеток положительных по тирозин-гидроксилазе (tyrosine hydroxylase (TH)) (маркер дофаминовых нейронов), по сравнению с культурами, полученными из несортированных клеток. Помимо этого, клетки, которые были отсортированы по CORIN, на стадии предшественников дофаминергических нейронов имели меньший объем и содержали значительно меньшее число клеток, положительных по KI67 (маркер пролиферирующих клеток) по сравнению с несортированными клетками [16]. Таким образом CORIN может быть использован как маркер для селекции во время дифференцировки для увеличения процента дофаминергических нейронов в конечно-дифференцированной культуре клеток.

Второй этап дифференцировки подразумевает формирование эмбрионных тел в присутствии нейрональных ростовых факторов BDNF и GDNF, ретиноевой кислоты и дибутирил циклического аденозинмонофосфата (dibutyl cyclic adenosine monophosphate (dbc AMP)).

Третий этап дифференцировки может быть проведен двумя способами: 1) за счет непосредственного введения полученных нейрональных прогениторов в стриатум модельных животных; 2) при помощи дальнейшего культивирования нейрональных прогениторов в присутствии нейрональных ростовых факторов BDNF и GDNF, ретиноевой кислоты и dbc AMP, но уже в адгезивных условиях.

В ходе нашей работы мы использовали описанный выше протокол с небольшими изменениями.

Существующие на данный момент протоколы получения дофаминергических нейронов позволяют получить высокий процент ТН (+) клеток после пересадки их модельным животным [5; 61] и с использованием клеток, полученных на основе данных протоколов, уже проведены клинические испытания в Японии [4; 16; 62], начаты клинические испытания в США [5; 63] и Европе [17; 61]. Однако целый ряд вопросов по спецификации полученных нейронов и нейрональных прогениторов, а также по оптимизации условий выживания и встраивания их в нейрональную сеть при трансплантации остаются открытыми и являются предметом для дальнейших исследований.

1.2 Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами

ТА — это группа биогенных аминов, которые в организме млекопитающих обнаруживаются в крайне низких, т. е. «следовых» количествах, их концентрация составляет порядка 100 нг/г ткани [6; 7]. К этой группе относятся такие соединения как β -фенилэтиламин (β -phenylethylamine (PEA)), тирамин, триптамин, октопамин. По своей структуре ТА относятся к моноаминам, и близки с такими психотропными молекулами, как амфетамины и классические моноамины дофамин и серотонин [6; 64; 65], однако в центральной нервной системе млекопитающих они представлены в значительно меньшей степени. Важным отличием ТА является то, что они не накапливаются в везикулах аксонов как классические нейромедиаторы, а диффундируют в синаптическую щель [66]. В синаптической щели ТА быстро разрушаются при помощи ферментов МАО типов А и В, которые играют основную роль в распаде многих эндогенных моноаминов, и поэтому ТА имеют очень короткий период полужизни – не более 15 секунд. Их функции в физиологии беспозвоночных описаны давно и известно, что они играют важную роль как нейромедиаторы. Это характерно, например, для насекомых, у которых тирамин и октопамин являются ключевыми нейромедиаторами [67]. Считается, что в организме млекопитающих ТА обладают нейромодуляторными функциями классических нейромедиаторов, таких как дофамин, серотонин и норадреналин [6], однако функции ТА в организме млекопитающих еще малоизучены.

TAARs были открыты только в 2001 году [64; 65]. У грызунов описано 9 функциональных типов TAARs, в то время как у человека функциональных рецепторов идентифицировано 6:

TAAR1, TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8 и TAAR9 [6]. TAARs относятся к семейству рецепторов, сопряженных с G белком (G protein-coupled receptors (GPCRs)). Наиболее изученным на данный момент является TAAR1 [68].

Экспрессия TAAR1 описана в структурах головного мозга, которые связаны с дофаминергической системой [69; 70], в лимбической системе, дорсальном ядре шва [8; 71; 72], префронтальной коре, гиппокампе [73], спинном мозге [74]. За пределами центральной нервной системы TAAR1 экспрессируются в β -клетках поджелудочной железы, желудке, кишечнике, лейкоцитах [75]. Экспрессия всех TAARs за исключением TAAR1 обнаруживается в обонятельном эпителии [69].

Сигнальные каскады, запускаемые TAARs наиболее изучены на примере TAAR1 [68; 76]. TAAR1 связан с Gs белком, который в случае активации рецептора активирует аденилатциклазу, что приводит к повышению содержания внутриклеточного циклического АМФ (cyclic AMP (cAMP)), модулирует передачу сигналов через протеинкиназу А (PKA) и протеинкиназу С (PKC). Параллельно с этим запускается ответ через β -аррестин, который приводит к десенситизации рецептора, но в тоже время дефосфорелирует киназу Akt - и тем самым активирует киназу GSK-3 β [6].

Изначало считалось, что TAARs являются обонятельными рецепторами [6]. Позже было показано, что TAARs выступают в роли модуляторов дофаминергической системы [69; 77–79]. У мышей, нокаутных по TAAR1, повышен ответ на дофаминергические стимулы, такие как, например, введение амфетамина [69]. Активация TAAR1 при помощи селективных агонистов, уменьшает повышенную локомоторную активность, которая индуцируется дофаминергическими агонистами [10; 72]. Мыши, нокаутные по TAAR1, показывают сниженные результаты в когнитивных тестах [80], имеют нарушение сенсо-моторной активности [81], повышенную частоту спонтанного возбуждения дофаминергических нейронов в вентральной области покрышки (ventral tegmental area, VTA) и серотонинергических нейронов в ядрах шва [69; 71; 72].

Изменения в систем TA и TAARs обнаружены при целом ряде нейро-психических заболеваний [8; 9]. При шизофрении описано повышение уровня PEA в моче, а также изменения в метаболизме триптамина и р-тирамина, и изменения в ферментах, участвующих в синтезе и катаболических путях данных аминов [10]. Для пациентов, страдающих шизофренией, характерна повышенная реакция на стимуляторы высвобождения дофамина, такие как амфетамин и метилфенидат, развитие экстрапирамидных побочных эффектов, в ответ на введение антипсихотиков, воздействующих на D2 рецепторы дофамина. Те же проявления наблюдаются и у животных, нокаутных по TAAR1 [76]. Помимо этого, при шизофрении описано нарушение регуляции β -аррестин/Akt/ GSK-3 β сигнального каскада, а один из

механизмов действия антипсихотических средств связан с опосредованной через рецептором D2 передачей сигналов β -аррестина и ингибированием активности GSK-3 β [82]. Также нужно отметить, что все гены TAARs человека плотно сгруппированы в узкой области 109 Кб хромосомы 6q23.1 [64; 65; 83], что крайне близко к локусам, мутации в которых описаны при шизофрении и биполярном аффективном расстройстве [84].

Было показано, что дефицит PEA имеет связь с эндогенной депрессией: пилотные исследования показали, что применение этого амина или его предшественника снижают симптомы данного заболевания [85].

Помимо этого, описана связь изменений в системе следовых аминов и TAAR с такими заболеваниями, как синдром гиперактивности и дефицита внимания [86], было показано, что экспрессия TAAR1 в префронтальной коре, стриатуме и гиппокампе снижена у спонтанно гипертензивных крыс, а активация TAAR у таких животных снижает их локомоторную активность [87]; БП [76], было показано, что содержание тирамина, тирозина и PEA в плазме больных БП достоверно отличается от здоровых пациентов [88]; психоз [70], учитывая TAAR1-опосредованную регуляцию активности дофаминергической системы [75]; наркотическая зависимость [72], в частности была показана нейромодуляторная роль агонистов TAAR1, оказывающая влияние на выраженность поведенческой сенсibilизации к кокаину [89]; аффективные расстройства [10; 90] и другими.

TAARs стали перспективной мишенью для разработки новых лекарственных средств [90; 91]. Поскольку наиболее изученным является TAAR1, то и первыми модуляторами активности TAARs, исследования которых дошли до фазы клинических испытаний, являются модуляторы активности именно TAAR1. Продолжаются клинические испытания по исследованию эффективности агониста TAAR1 SEP-363856 (Sunovion and PsychoGenics) в качестве антипсихотического агента [92]. SEP-363856 получил от Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (U.S. Food and Drug Administration, FDA) статус «прорывной терапии». Предварительные данные показывают, что применение SEP-363856 у пациентов с шизофренией в стадии обострения приводит к серьезному снижению общей суммы баллов по шкале позитивных и негативных синдромов (Positive and Negative Syndrome Scale - PANSS) по сравнению с исходным уровнем и с плацебо [92].

Система TA и TAARs, как недавно открытая система нейромедиаторов, активно исследуется и постоянно появляется новая информация о роли TA и TAARs в регулировании различных процессов. В частности, нами было обнаружено, что TAAR5 экспрессируется в лимбических структурах, таких как миндалевидное тело, прилежащее ядро, таламус, гипоталамическое ядро, энтероринальная кора, пириформная кора [11; 12]. Поведенческие тесты показали, что животные, нокаутные по TAAR5, имеют сниженную тревожность и

сниженное депрессивно-подобное поведение в тестах «выученной беспомощности», а также повышенное исследовательское поведение в экспериментах с открытым полем [12]. Позже мы показали, что и TAAR2 экспрессируется в пириформной коре, гипоталамусе, боковой габенуле, а также в среднем мозге и ядрах шва [13]. Эти данные, позволили сделать предположение о возможной взаимосвязи системы ТА и TAARs с нейрогенезом как на этапе эмбрионального развития, так и во взрослом возрасте.

В ходе данной работы была оценена взаимосвязь TAARs с нейрогенезом и нейрогенезом дофаминергических нейронов в частности, и сделан первый шаг в изучении роли данной системы в дифференцировке ИПСК человека в направлении дофаминергических нейронов, что может иметь значение для оптимизации методов получения и трансплантации нейронов в ходе разработки методов клеточной заместительной терапии для лечения БП.

1.3 Сигнальный путь Notch

Сигнальный путь Notch – это эволюционно консервативный путь, который играет важную роль в регуляции клеточной судьбы в период развития, а кроме того поддерживает гомеостаз тканей во взрослом состоянии.

Рецепторы Notch представляют собой трансмембранные белки, которые состоят из 3х доменов: внеклеточного (Notch extracellular domain (NECD)), трансмембранного (Notch transmembrane domain (TM)) и внутриклеточного (Notch intracellular domain (NICD)). Лигандами для Notch рецепторов служат члены семейств Delta-like (DLL1, DLL3, DLL4) и Jagged (JAG1, JAG2). После связывания лиганда NECD отщепляется от доменов TM-NICD (расщепление S2) с помощью TACE (фермент, превращающий металлопротеазу TNF- α ADAM). NECD остается связанным с лигандом, и этот комплекс подвергается эндоцитозу/рециклингу внутри клетки, которая посылает сигнал. Каким способом осуществляется этот процесс, зависит от убиквитинирования Mib. В клетках, которые принимают сигнал, γ -секретаза отщепляет NICD от TM (расщепление S3), что делает возможной ядерную транслокацию NICD. В ядре NICD связывается с комплексом факторов транскрипции CSL (CBF1/Su(H)/Lag-1), что приводит к последующей активации генов-мишеней Notch: Muc, p21, членов семейства HES и ряда других [93].

Сигнальный путь Notch играет чрезвычайно важную роль во время эмбрионального развития центральной нервной системы, а также в постнатальном периоде, принимая участие в

поддержании пула стволовых клеток, пролиферации, дифференцировке, миграции и апоптозе [18–20]. Мыши, нокаутные по Dll1, лиганду Notch, погибают на 12 день эмбрионального развития [94]. Нелетальные мутации в генах, кодирующих рецепторы и лиганды Notch, могут приводить к нарушению миграции клеток во время эмбрионального развития. Эти мутации, а также нелетальные мутации белка RBPJ, обеспечивающего передачу сигналов от всех четырех рецепторов Notch, приводят к нарушению выживаемости нейрональных предшественников, что, в свою очередь, приводит к резкому уменьшению их количества. Во взрослом организме это приводит к потере, преждевременной дифференцировке и, таким образом, к истощению пула нейрональных стволовых клеток [20].

Notch играет важную роль и в регулировании миграции клеток в кортекс [95]. Повышение активности сигнального пути Notch приводит к биполяризации клеток, что способствует миграции, и наоборот ингибирование сигнального пути Notch приводит к формированию мультиформных клеток, что останавливает миграцию. Существует предположение, что Notch влияет на миграцию за счет рилин (reelin)-DAB1 сигнального каскада, который ингибирует деградацию NICD. [95]. Также считается, что в формировании коры важную роль играет и белок RBPJ, поскольку он необходим для правильного позиционирования корковых нейронов посредством регуляции миграции нейронов и сохранения радиальных глиальных каркасов [18].

Высокая активность сигнального пути Notch описана в субвентрикулярной и субгранулярных зонах, в которых образование нейронов продолжается во взрослом мозге. Notch важен для поддержания процесса самообновления клеток [19]. Известно, что белок RBPJ контролирует нейрогенез, поддерживая нейрональные клетки-предшественники и ингибируя их преждевременную дифференцировку в нейроны [18].

Важное значение сигнального пути Notch было описано и для развития дендритов. Активация Notch приводила к формированию «слабого» дендритного дерева. Было отмечено, что гранулярные нейроны в зубчатой извилине у мышей с индуцируемым нокаутом по Notch1 имеют более мелкие дендритные деревья. Считается, что рост дендритов регулируется взаимодействием двух сигнальных путей – Notch и нейрогенина 3 (neurogenin 3 (NGN3)). NGN3 способствует росту нейронов, в то время как активация Notch приводит к активации HES генов, которые ингибируют NGN3. Однако выключение сигнального пути Notch в уже зрелых нейронах не оказывало влияния на состояние их дендритного дерева – таким образом, предполагается, что существует какое-то критическое время, во время которого модуляция сигнального пути Notch имеет влияние на развитие нейронов [22].

Notch оказывает влияние не только на нейроны, но также на астроглию и олигодендроциты. Лиганды Notch, в частности Jag2 and не канонический Dlk2, которые экспрессируются нейронами, запускают и регулируют активность сигнального пути Notch в

астроцитах. Было показано, что под воздействием ингибитора γ -секретазы DAPT меняется активность глутаматного транспортера на поверхности астроцитов. Кроме того, добавление нейронов в астроцитарную культуру приводит к активации *Hes2* и *Hes5* генов [96].

Исследования *in vitro* показали, что нейрональные предшественники, полученные из ЭСК, экспрессируют все компоненты пути Notch: лиганды, рецепторы и мишени Notch. Сигнальный путь Notch необходим для поддержания нейрональных предшественников в недифференцированном состоянии [97].

При дифференцировке сфероидов, полученных из иПСК человека, в нейрональном направлении, ингибирование Notch при помощи DAPT способствовало снижению экспрессии маркеров, в частности гена *HOXB4*, характерных для заднего мозга [24]. Одновременного с этим Tieng et al., 2014 показали, что соединение E (compound E, ингибитор гамма-секретазы) увеличивает количество TH (+) нейронов при дифференцировке в 3D формате сфероидов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека, в дофаминергические нейроны [98].

Эффекты от влияния на Notch чрезвычайно зависят от типа клеток и ткани, состояния других сигнальных каскадов. Так, активность Notch очень тесно связана с состоянием сигнального каскада Wnt. Ингибирование Notch с помощью DAPT на фоне ингибирования Wnt каскада, способствует увеличению числа *Tuj1* (+) (нейрональный маркер) клеток во время дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нейроны коры. В тех же условиях, но при активации передачи сигнального каскада Wnt количество *Tuj1* (+) нейронов становится значительно меньше [25]. Низкомолекулярный активатор Wnt CHIR99021 увеличивает экспрессию нижестоящей мишени сигнального пути Notch гена *Hes1* независимо от ингибирования Notch при помощи DAPT, что позволяет предположить, что передача сигналов Wnt в определенных случаях может превалировать над Notch [24].

Суммируя вышесказанное, можно говорить о том, что Notch играет важнейшую роль в развитии и дифференцировке нейронов, однако эффекты от модулирования Notch в значительной степени зависят от состояния других сигнальных каскадов. Поэтому крайне важно изучение эффектов модулирования Notch применительно к конкретным условиям и процессам. В данной работе мы оценили влияние ингибирования и активации сигнального пути Notch в течение первых 7 дней дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны, что может позволить сделать вывод о том, какую роль сигнальный путь Notch играет на ранних этапах дифференцировки плюрипотентных клеток в направлении дофаминергических предшественников и дофаминергических нейронов в условиях *in vitro* и может ли модулирование сигнального пути Notch быть использовано для оптимизации протоколов получения клеток для создания клеточной заместительной терапии БП.

2. Материалы и методы

2.1 Животные

Уход за животными и все проводимые процедуры осуществляли в соответствии с международными рекомендациями по работе с лабораторными животными. Проводимые исследования были одобрены Комитетом по биоэтике Санкт-Петербургского Государственного Университета, Санкт-Петербург, Россия. Мыши содержались по 3–5 штук в клетке в стандартных условиях (цикл 12 ч свет/темнота), 21 ± 1 °C, влажность 40–70%, с едой и водой в свободном доступе.

В исследовании были использованы мыши, нокаутные по гену TAAR5 (TAAR5-KO) [99] и мыши, нокаутные по гену TAAR2 (TAAR2-KO) [13]. В качестве контрольных групп использовали животных дикого типа от каждой из линий, полученных из тех же пометов, что и нокаутные животные. В эксперименте использовали мышей возраста 3-5 месяцев, обоих полов.

2.2 Гистологическое исследование

Перфузию животных проводили под общей анестезией (смесь Золетил 200 мг/кг и Ксилазин 16 мг/кг). В каждую группу был взят материал от четырех животных ($n = 4$ в каждой группе). Транскардиально перфузировался раствор 0,9% NaCl на 0,1 М PBS, pH = 7,4, затем раствор 4% параформальдегида на 0,1 М PBS, pH = 7,4. После перфузии, мозг извлекали из черепа и последовательно выдерживали в 20% и 30% сахарозе. Нарезку мозга осуществляли на криостатирующем микротоме Leica CM-3050S, срезы выполняли во фронтальной плоскости, толщина срезов 50 мкм. Окрашивание срезов проводили в виде свободно плавающих; между процедурами срезы промывали 0,01 М PBS 3 раза по 10 мин. Для проведения ретривинга антигенов срезы обрабатывали 1% NaBH_4 в течение 30 мин; для блокировки эндогенной активности пероксидазы проводили инкубацию срезов в 0,3% H_2O_2 в течение 15 мин. Для блокировки неспецифического окрашивания срезы инкубировали в 1% нормальной козьей сыворотке (NGS, Vector Labs, UK) на PBS в течение 1 ч. В качестве первых антител использовали поликлональные кроличьи антитела к TH (Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-14007, RRID: AB_671397, США), разведенные на 1% NGS и 0,1% NaN_3 , разведение 1:6000,

инкубацию проводили в течение 70 ч. После этого срезы инкубировали со вторичными антителами (биотинилированные козы антикроличьи IgG, Vector Laboratories, Cat. № BA-1000, RRID: AB_2313606, Великобритания), разведенными на 1% NGS и 0,1% NaN₃, разведение 1:600, инкубацию проводили в течение 1 дня с последующей инкубацией с авидин-биотиновым комплексом пероксидазы хрена (система ABC Elite, Vector Labs, Великобритания) в течение 1 ч. Пероксидазную реакцию визуализировали смесью диаминобензидина (DAB), NaCl и 0,03% H₂O₂ (набор Vectatain DAB, Vector Labs, Великобритания). После промывки в дистиллированной воде срезы монтировали, обезвоживали в спирте, просветляли ксилолом и помещали под покровное стекло в Bio Mount (Bio-Optica, Италия). Изображения срезов были получены при помощи микроскопа Olympus CX31 (Olympus Corporation, Япония, объектив 10×), фотокамера Nikon (D3200, Nikon Corporation, Япония). Затем все изображения были обработаны с помощью программного обеспечения Fiji ImageJ.

2.3 Клеточные линии

Линии иПСК человека культивировали в стандартных условиях (CO₂ 5%, O₂ 20%, температура 37 °C). Клетки поддерживали в условиях без фидера на Geltrex (Thermo Fisher Scientific, A1413202) в разведении 1:100. Среда Essential 8 (Gibco, A1517001) с добавлением пенициллина-стрептомицина (Thermo Fisher Scientific) 1x. Для диссоциации клеток использовали ReLeSR (StemCell Technologies, Cat# 05872).

Линии иПСК человека:

1) линия иПСК человека AD3 была получена из гемопоэтических клеток человека с использованием набора для перепрограммирования Sendai (CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming kit (Invitrogen)) в соответствии с инструкциями производителя. Гемопоэтические клетки человека были приобретены у Lonza (Slough, Великобритания) и культивированы как описано [100]. Полученные иПСК человека культивировали в условиях без фидера на чашках, покрытых Matrigel с пониженным фактором роста (Matrigel growth factor reduced, BD) с использованием среды mTeSR1 (STEMCELL) при 37°C, 5% CO₂ и 21% O₂ в соответствии с протоколами WiCell Inc.. Клетки пересеивали каждые 4–5 дней при ~80% плотности с использованием 0,02% ЭДТА (Versene). Созданная линия иПСК человека, полученная из AD3 Sendai, была охарактеризована в соответствии с протоколом, опубликованным ранее [101] и соответствовали всем критериям плюрипотентности [100].

2) WTSIi004-A (HPSI1113i-qolg_3) из Европейского банка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (European Bank for Induced pluripotent Stem Cells (EBiSC)), Biosample ID [SAMEA2464810](#)

3) WTSIi032-A (HPSI1113i-bima_1) из EBiSC, Biosamples ID [SAMEA2399246](#)

4) WTSIi046-A (HPSI0214i-wibj_2) из EBiSC, Biosamples ID [SAMEA2627567](#)

EBiSC признает, что Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) является источником iPСК человека WTSIi004-A (HPSI1113i-qolg_3), WTSIi032-A (HPSI1113i-bima_1) и WTSIi046-A (HPSI0214i-wibj_2), которые были созданы при поддержке компаний EFPIA и European Union (IMI-JU').

2.4 Дифференцировка iPСК человека

Для дифференцировки iPСК человека был использован модифицированный протокол, описанный в статье Doi D. et al., 2014 [16].

iPСК человека вели на Geltrex (Thermo)/Knockout DMEM (Gibco) 1:100 на среде TeSR-E8 Basal Medium (STEMCELL). Для дифференцировки клетки были сняты при помощи TrypLE Select Enzyme (Gibco) и рассеяны на 6-луночные планшеты, покрытые Geltrex/Knockout DMEM в плотности 4×10^5 клеток на лунку. При расसेве в среду добавляли 5 мкМ Y27632. На третий день после рассева клетки переводили на среду GMEM (Gibco), содержащую 8% Knockout serum replacment (Thermo), 0.1 mM NEAA (Gibco), 0.1 mM бета-меркаптоэтанол, 1 mM Pyruvate (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycine и 2 mM L-Glutamine, с добавлением 500 нМ A83-01 (STEMCELL), 2 мкМ Purmorphamine (Sigma), 100 нг/мл FGF8b (STEMCELL) с 1 по 7 день, 100 нМ LDN193189 (STEMCELL) с 1 по 12 день и 3 мкМ CHIR99021 с 3 по 12 день. Среду меняли ежедневно.

На 12 день дифференцировки клетки снимали по помощи Accutax (STEMCELL) и рассевали на 24 луночные планшеты AggreWell-800 (STEMCELL) в плотности 1,2 млн клеток на лунку по протоколу производителя в среде, содержащей Neurobasal medium (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycine, 0,1 mM бета-меркаптоэтанол, 200 мкМ аскорбиновую кислоту (Sigma), 2 mM L-glutamine (Gibco), 400 мкМ dbc AMP (STEMCELL), B-27 supplement 1x (Gibco), с добавлением 10 нг/мл GDNF (STEMCELL), 20 нг/мл BDNF (STEMCELL) для образования эмбрионных телец. При рассева в среду добавляли Y27632 5 мкМ. Среду меняли на следующий день после рассева и затем 1 раз в 3 дня.

На 28 день дифференцировки эмбрионидные тельца диссоциировали при помощи Accutax (STEMCELL). Полученная суспензия клеток использовалась для конечной дифференцировки и созревания в условиях *in vitro*. Клетки рассевали на 96 луночные планшеты, покрытые Geltrex/Neurobasal medium (Gibco) в плотности $7,5 \times 10^4$ клеток на лунку в среде Neurobasal medium (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycine, 0,1 mM бета-меркаптоэтанол, 200 мкМ аскорбиновая кислота (Sigma), 2 mM L-glutamine (Gibco), 400 мкМ dbc AMP (STEMCELL), B-27 supplement 1x (Gibco), с добавлением 10 нг/мл GDNF (STEMCELL) и 20 нг/мл BDNF (STEMCELL). При расसेве в среду добавляли Y27632 5 мкМ. Среду меняли на следующий день после рассева и затем 1 раз в 3 дня. Культивирование клеток проводили до 53 дня.

2.5 Иммунофлуоресцентное окрашивание

Все этапы иммунофлуоресцентного окрашивания проводили в условиях комнатной температуры. Клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида (Sigma) в течение 12,5 мин, после чего клетки отмывали раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) 3 раза по 5 мин. Пермеабелизацию проводили раствором 0,5% Triton X-100 в течение 5 мин, с последующей отмывкой PBS 3 раза по 5 мин. Для блокировки неспецифического связывания образцы инкубировали с 5% лошадиной сывороткой (normal horse serum (NHS)), разведенной на PBS, в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубацию с 1 антителами проводили в течение 60 мин, антитела разводили на 5% NHS/PBS в соотношении 1:200 (Таблица 1). Вторичные антитела разводили на 5% NHS/PBS в соотношении 1:1000. Инкубацию со вторичными антителами выполняли в течение 1 ч, после чего образцы окрашивали водным раствором DAPI с концентрацией 0,1 мкг/мл.

Оценку полученных результатов и съемку проводили при помощи флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Observer Z1 и лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV3000.

Таблица 1. Антитела, которые были использованы в работе.

Мишень	Производитель, название, номер	Хозяин	Использованное разведение
Oct 4	Santa Cruz Biotechnology, Oct-3/4 Antibody (N-19), sc-8628	goat	1:200

Продолжение таблицы 1

Nanog	Sigma-Aldrich, Anti-NANOG Antibody, clone 7F7.1, MABD24	mouse	1:200
Doublecortin	Abcam, Anti-Doublecortin antibody, ab18723	rabbit	1:200
Sox1	Abcam, Recombinant Anti-SOX1 antibody, ab109290	rabbit	1:200
Brachyury	RandD Systems, Human/Mouse Brachyury Antibody, AF2085	goat	1:200
Foxa2	Santa Cruz Biotechnology, Anti-HNF- 3 β Antibody (A-12), sc-374375	mouse	1:200
TH	Santa Cruz Biotechnology, TH Antibody (H-196), sc-14007	rabbit	1:200
PitX3	Invitrogen PITX3 Polyclonal Antibody, Cat#38-2850	rabbit	1:200
Nestin	Sigma-Aldrich, Anti-Nestin (C- terminal) antibody produced in rabbit, SAB4200394	rabbit	1:200
MAP2	Sigma-Aldrich, Monoclonal Anti- MAP2 antibody produced in mouse, M4403	mouse	1:200
DAT	Sigma-Aldrich, Anti-Dopamine Transporter Antibody, NT, clone DAT- Nt, MAB369	rat	1:200
β -Tubulin	Sigma-Aldrich, Anti- β -Tubulin III antibody produced in rabbit, T2200	rabbit	1:200
β -Tubulin	Abcam, Anti-beta Tubulin antibody - Loading Control, Ab6046	rabbit	1:200
GFAP	DAKO, Polyclonal Rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (Concentrate), Z0334	rabbit	1:200

2.6 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

ВЭЖХ выполняли на клеточных лизатах. Пробы стабилизировали при помощи HClO_4 (конечная концентрация 0,1 М) и хранили при температуре $-80\text{ }^\circ\text{C}$ до проведения измерений.

Перед измерением пробы размораживали и гомогенизировали при помощи ультразвука, после чего фильтровали с использованием центрифужных фильтров (PVDF, Millipore) при помощи центрифугирования $14000g$ 1 мин, $4\text{ }^\circ\text{C}$

В супернатанте измеряли концентрации дофамина (DA), серотонина (5HT), норадреналина (NA) и их метаболитов: гомованилиновой кислоты (HVA), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (DOPAC) и 5-индолацетической кислоты (5-HIAA) с использованием метода обратно-фазовой ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Измерение проводили на хроматографе Eisom HTEC-500 с карбоновым электродом WE-3G (Eisom, Japan) при потенциале $+650\text{ мВ}$. Разделение проводили на обратно-фазной колонке CA-50DS ($150 \times 2.1\text{ мм}$, Eisom, Japan) на скорости потока 200 мкл/мин . Состав мобильной фазы: на 1 л раствора: NaH_2PO_4 – 14,9 г, Na_2HPO_4 — 1,376 г, EDTA - 50 мг, октилсульфонат натрия - 400 мг, метанол - 19,5%, pH - 4,26.

2.7 Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp)

Для проведения patch clamp за 2-3 дня до исследования нейроны в единичной плотности рассеивали на покровные стекла, покрытые Geltrex в разведении 1:100. Стеклообразные микроэлектроды для регистрации потенциалов действия изготавливали с помощью пуллера (P-1000, Sutter Instrument). Регистрацию потенциалов действия производили с помощью усилителя Axopatch 200B и программного обеспечения Clampex 10.3 (Molecular Devices Corporation).

Потенциалы регистрировали при 20-50 кГц с использованием низкочастотного фильтра 5 кГц с помощью АЦП (Digidata1440A acquisition system, Molecular Devices Corporation). Потенциалы действия регистрировали с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации “целая клетка” (whole-cell) в режиме фиксации тока при комнатной температуре. Состав внеклеточного раствора включал в себя 140 мМ NaCl, 5.4 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgCl_2 , 5.5 мМ глюкоза, 10 мМ HEPES, pH 7.4 (NaOH). Состав внутриклеточного раствора включал в себя 105 мМ глюконат калия, 20 мМ KCl, 5 мМ NaCl, 2

мМ MgCl₂, 1.5 мМ MgATP, 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES, pH 7.2 (NaOH). Регистрацию потенциалов проводили в режиме I=0.

2.8 Проточная цитометрия

Для выполнения проточной цитометрии клетки выращивали в лунках 96-луночных планшетов. Кондиционированную среду из каждой лунки удаляли, клетки промывали PBS и диссоциировали с помощью фермента TrypLE Select (Gibco), после чего растворяли в среде Neurobasal medium (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycine (Thermo), 0,1 мМ бета-меркаптоэтанол, 2 мМ L-glutamine (Gibco), содержащей Y27632 5 мкМ. Для внутриклеточного окрашивания клеток антителами Alexa Fluor® 594 против тирозингидроксилазы (TH) (BioLegend) использовали набор PerFix-nc-Kit (набор для анализа без центрифугирования) (Beckman Coulter, кат. номер B10825). Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter). Оценку проводили при подсчете 5000 клеток.

2.9 Выделение РНК и обратная транскрипция

Выделение РНК осуществляли при помощи TRIZOL (Invitrogen). Для проведения обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК. Обратную транскрипцию проводили при помощи набора MMLV RT kit (Евроген). Все процедуры выполняли в соответствии с рекомендациями производителей.

2.10 ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени выполняли при помощи набора qPCRmix-HS (Евроген) с использованием праймеров (Таблица 2). Для анализа данных, полученных в ходе количественной ПЦР в режиме реального времени, в качестве метода представления

относительной экспрессии гена использовали сравнительный Ct-метод (2- $\Delta\Delta$ Ct-метод) в модификации «относительное околичествление», при котором оценка экспрессии гена интереса производилась относительно экспрессии внутреннего контрольного гена. В ходе анализа для каждой реакции рассчитывали следующие показатели: значение Ct (Δ Ct), значение Δ Ct ($\Delta\Delta$ Ct) для репликатов, показатель $2\Delta\Delta$ Ct, кратность отношения уровней экспрессии в образцах (в сравнении индивидуальных экспериментальных групп со средним значением для внутреннего контрольного образца). Уровень экспрессии исследуемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Серии экспериментов повторяли трижды (биологические репликаты), для каждого эксперимента проверку уровня экспрессии соответствующего гена повторяли дважды (технические репликаты).

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе.

Название праймера	Последовательность
hGAPDH-F	AATGAAGGGGTCATTGATGG
hGAPDH-R	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA
hRBPJ-F	CAGTTCACAGCAGTGGGGAG
hRBPJ-R	GCGGTCTGCTTATCAACTTCC
hHey1-F	TGAGCTGAGAAGGCTGGTAC
hHey1-R	ATCCCAAACCTCCGATAGTCC
mGAPDH-F	TCAATGAAGGGGTCGTTGAT
mGAPDH-R	CGTCCCGTAGACAAAATGGT
mGDNF F	TCTTTCGATATTGCAGCGGTT
mGDNF R	GTCACCTTGTTAGCCTTCTACTCC
mCDNF-F	AAGAAAACCGCCTGTGCTATT
mCDNF-R	TCTTCACGGCAGGTATGTGTA
mBDNF-F	TCATACTTCGGTTGCATGAAGG
mBDNF-R	AGACCTCTCGAACCTGCCC

2.11 TaqMan ПЦР

Выделение РНК проводили как описано выше. кДНК синтезировали из 1 мкг РНК с использованием обратной транскриптазы RevertAid (EP0442, ThermoFisher Scientific). TaqMan ПЦР в реальном времени выполняли при помощи набора qPCRmix-HS SYBR+low Rox (PK156L, Евроген) с использованием следующих праймеров и проб (Таблица 3). Полученные данные оценивали с использованием 2- $\Delta\Delta C_t$ -метода, который описан выше. В качестве гена домашнего хозяйства использовали S18.

Таблица 3. Праймеры и пробы, использованные для проведения TaqMan ПЦР в реальном времени.

Название	Последовательность
TAAR1_Taq_F	TGACCACACTCGTTGGCAATCTG
TAAR1_Taq_Probe	JOE-GGCCACTGTGGACTTTCTTCTGGGGT-BHQ1
TAAR1_Taq_R	ACAGTGCTCAGCAGATCTCACCA
hTAAR2 Taq F	GGTCCCTGGAGCATTTGCCTTC
hTAAR2 Taq R	GCCATAAACAAGGTGGTCCCCC
hTAAR2 Taq Pr	FAM-TGGTTGCTTGTTCAGTTCCTGCCCA-BHQ6
TAAR5-1 -F	AGCACCATTTCGCTCAGTGGAGA
TAAR5-1-R	GTGAGGCAGAAGAGGGTGTCCA
TAAR5-1-Pr	FAM-TTCCTCTGCCGCCTGCACACCT-BHQ6
hTAAR6 Taq F	AGGAGGTTGTCAGACCGTTG
hTAAR6 Taq R	CTGGCCACTCTGGCTTTGTA
hTAAR6 Taq Pr	FAM-CTTGTGGCTAGACGACAGGCG-BHQ6
hTAAR8 Taq F	ACACAGGTGTCAATGATGATGGG
hTAAR8 Taq R	ATTTGACAGCCACCTACGCA
hTAAR8 Taq Pr	FAM-CTGGAGGAATTAGTAAGTGCTCTC-BHQ6
hTAAR9 Taq F	GCCAGGCTCCACTGAATCAA
hTAAR9 Taq R	AGCTTGGCTGGCTGTACTTT

Продолжение таблицы 3

hTAAR9 Taq PR	FAM-GGTGGCCAAGCATCAGGCTAGGAA-BHQ6
hHPRT Taq F	GGCTCCGTTATGGCGACC
hHPRT Taq R	TCGAGCAAGACGTTTCAGTCC
hHPRT Taq Pr	FAM-CAGCCCTGGCGTCGTGATTAGTG-BHQ6
hS18 Taq F	TCAACACCAACATCGATGGGCG
hS18 Taq R	GCTTTCCTCAACACCACATGAGCA
hS18 Taq Pr	FAM-ACTGCCATTAAGGGTGTGGGCCGA-BHQ6
hGAPDH Taq F	CACCACCAACTGCTTAGCACCC
hGAPDH Taq R	AGGGGCCATCCACAGTCTTCTG
hGAPDH Taq Pr	FAM-ACCACAGTCCATGCCATCACTGCCA-BHQ6

2.12 Критерии включения, выбор наборов, нормализация и анализ данных РНК секвенирования, полученных из открытых источников

Данные секвенирования РНК получали из открытой базы данных Национального центра биотехнологической информации (National Center of Biotechnology Information (NCBI)) Gene Expression Omnibus (GEO). Поиск данных осуществляли по терминам "hippocampus", "hippocampal", "CA1", "CA2", "CA3", "gyrus dentatus", "dentate gyrus" в период до 01 февраля 2022 г. Отбирали те данные, которые соответствовали следующим критериям: (1) имелся доступ к необработанным данным; (2) имелось четкое описание условий получения образцов и выделенной зоны гиппокампа; (3) данные имели минимальное количество прочтений в файлах SRA > 50 миллионов прочтений.

Для оценки уровней экспрессии все данные нормализовали по TPM (Transcripts Per Million). Значения TPM выше порогового уровня 0,5 считали положительными. Распределение уровней экспрессии, нормализованных по TPM, проанализировали и визуализировали с помощью пакета beeswarm R.

Набор данных РНК секвенирования одиночных клеток SCP1 (Single cell portal, https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell) изначально имел нормализацию по TPM. Данный набор был проанализирован с помощью интерактивного интерфейса Single Cell Portal.

2.13 Производство лентивирусов

Для активации сигнального пути Notch использована плаزمида, несущая участок гена Notch 1 мыши, соответствующий внутриклеточному домену (NICD) [102]. Для ингибирования сигнального пути Notch была использована плазмида, несущая короткую шпилечную РНК (shRNA) к *RBPJ*.

Плазмиды для упаковки лентивирусов были подарены профессором Дидье Троне (Didier Trono) (Федеральная политехническая школа Лозанны, Швейцария (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland)). Упаковку лентивирусов проводили в клетках HEK293, как описано ранее [103] при помощи кальций-фосфатного метода, для чего 100-мм чашки субконфлюэнтных клеток 293Т котрансфицировали 15 мкг pLVTHM-T7-NICD, 5,27 мкг pMD2.G и 9,73 мкг pCMV-dR8.74psPAX2. На следующий день среду меняли на свежую и клетки инкубировали в течение 24 ч для получения продукции вируса с высоким титром. Супернатант с полученными лентивирусными частицами концентрировали ультрацентрифугированием, ресуспендировали в 1% BSA/PBS и аликвоты замораживали при -80 °С. Титр вируса определяли по вирусу, экспрессирующему GFP. Эффективность трансдукции iPSC человека составила 80–85% при подсчете по GFP.

2.14 Оценка эффективности вирусных частиц для ингибирования/активации сигнального пути Notch

Для проверки эффективности ингибирования/активации сигнального пути Notch вирусные частицы добавляли к iPSC человека на следующий день после посева и инкубировали в течение 24 ч. Далее среду меняли каждый день. Клетки снимали для выделения РНК через 96 ч после трансдукции. Эффективность проверяли, оценивая уровень экспрессии генов *HEY1* и *RBPJ* методом ПЦР в реальном времени с праймерами HEY1 - F/R, RBPJ – F/R (таблица 2).

2.15 Оценка эффективности ингибирования/активации сигнального пути Notch во время дифференцировки и ПСК человека в дофаминергические нейроны

Для ингибирования/активации Notch сигнального пути вирусные частицы добавляли к культурам на следующий день после посева клеток, инкубировали в течение 24 ч, затем среду меняли на дифференцировочную. 10 мкМ DAPT (Sigma) добавляли в соответствующую лунку с 1 по 7 день дифференцировки. Смену среды проводили ежедневно. Для выделения РНК клетки снимали на 7-й день дифференцировки. Эффективность ингибирования/активации Notch сигнального пути проверяли, оценивая уровень экспрессии генов *HEY1* и *RBPJ* методом ПЦР в реальном времени.

2.16 РНК-секвенирование

Качество РНК проверяли при помощи флуориметрического анализа с помощью Quantus и капиллярного электрофореза с помощью QIAxcel. ПолиА-РНК очищали с помощью набора Dynabeads mRNA Purification Kit (Ambion). Библиотеки изготавливали из полиА РНК с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) в соответствии с инструкцией. Секвенирование с одноконцевым чтением проводили на Illumina HiSeq2500 с длиной считывания 140 п.н., при этом для каждого образца было выполнено не менее 30 миллионов прочтений.

2.17 Обработка данных

Риды проверяли на качество с помощью инструмента FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Затем последовательности fastq были обрезаны с помощью Cutadapt v4.1 [104] с использованием параметров для одноцепочечных прочтений. Для количественной оценки экспрессии транскриптов предварительно

обработанные чтения выравнивали с эталонным геномом с помощью STAR [105], экспрессию генов рассчитывали с помощью feature Counts из пакета Subread [106]. Дальнейший анализ экспрессии генов проводили с помощью пакета DeSeq2 R [107]. Варианты транскриптов аннотировали с помощью R-пакета AnnotationDbi [108].

Дальнейший анализ данных был выполняли с помощью modEnrichr и Appyters [109].

2.18 Доступ к данным

Данные РНК секвенирования загружены в базу GEO (Gene Expression Omnibus), набор данных номер GSE218635.

3. Результаты

3.1 Дифференцировка iPСК человека в дофаминергические нейроны в условиях *in vitro*

3.1.1 iPСК человека эффективно дифференцируются в дофаминергические нейроны в условиях *in vitro*

Для дифференцировки iPСК человека в дофаминергические нейроны в условиях *in vitro* был использован протокол, описанный в Doi et al., 2014 [16], в который были внесены изменения, включающие использование реактивов производства STEMCELL Technologies, вместо реактивов, производства Wako и STEMGENT, отсутствие сортировки после 12 дня дифференцировки и использование AggreWell™800 (STEMCELL) для культивирования на этапе эмбрионидных телец, что позволило получить эмбрионидные тельца, унифицированные по размеру (Рисунок 1А).

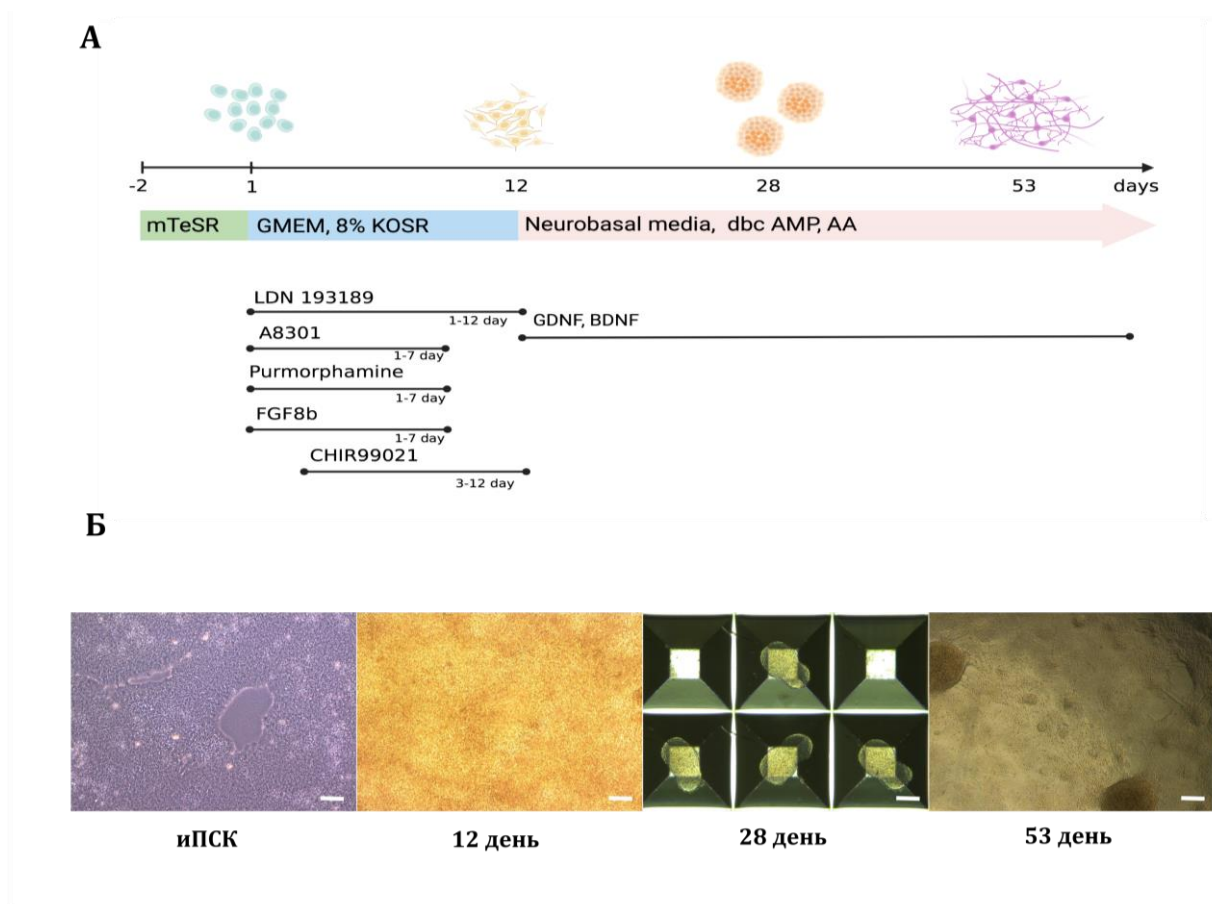


Рисунок 1. Дифференцировка iPСК человека в дофаминергические нейроны. А) Протокол дифференцировки Б) Световая микроскопия (на примере линии AD3). Масштабные линейки 200 мкм. iPСК человека перед началом дифференцировки, 12 день дифференцировки, 28 день дифференцировки (эмбрионидные тельца), 53 день дифференцировки [110].

Была выполнена дифференцировка четырех линий иПСК человека – AD3, WTSli004-A, WTSli032-A, WTSli046-A в дофаминергические нейроны в условиях *in vitro* и показано, что клетки, полученные на 53 день дифференцировки имеют форму, характерную для нейронов (Рисунок 1В).

Было показано, что перед началом дифференцировки клетки всех четырех линий иПСК человека, которые были использованы в работе, экспрессировали маркеры плюрипотентности Oct4 и Nanog (Рисунок 2).

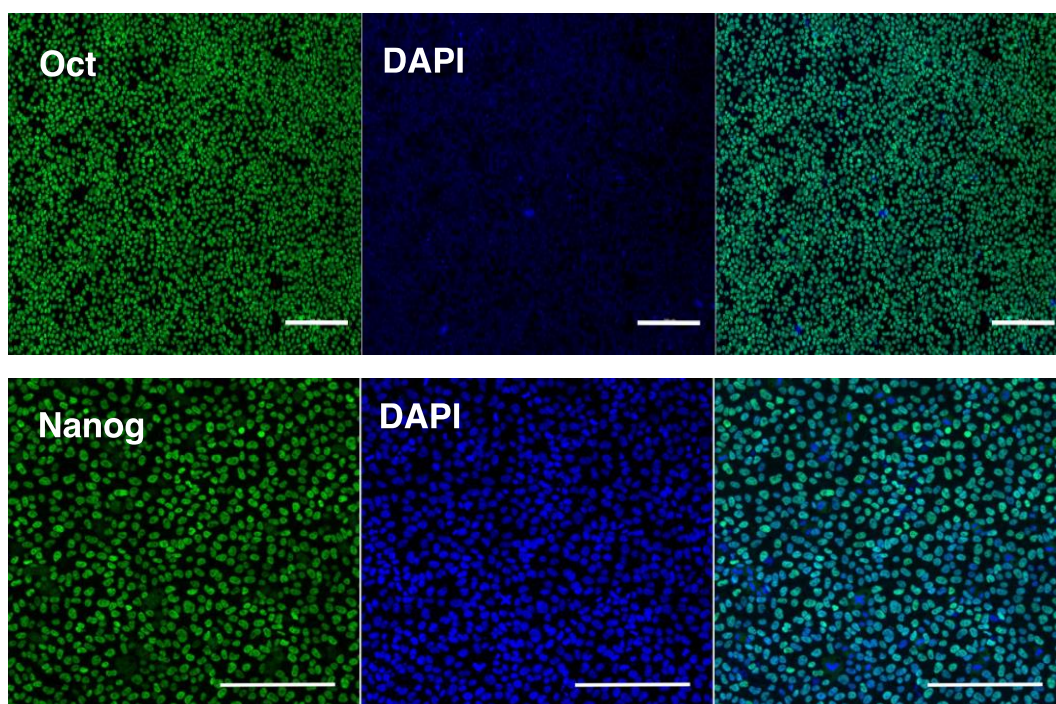
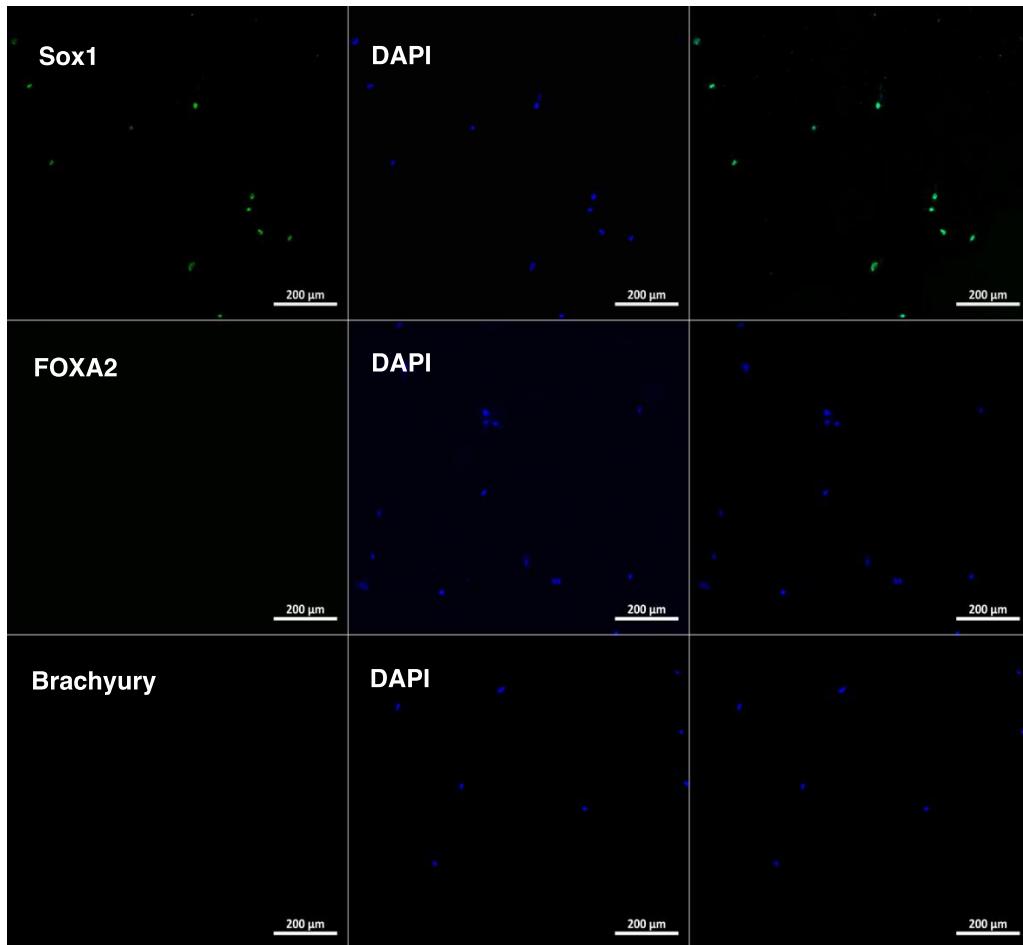


Рисунок 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание иПСК человека на маркеры плюрипотентности Oct4 и Nanog (на примере линии WTSli046-A). Масштабные линейки 100 мкм [110].

На 12 день дифференцировки полученные клетки располагались в культуре в несколько слоев (Рисунок 1Б), при пересеве они приобретали полигональную форму и экспрессировали маркер эктодермы Sox1 (Рисунок 3А, Б), и не экспрессировали маркеры плюрипотентности Oct4 и Nanog, а также маркеры мезо- и энтодермы Brachyury и FOXA2, соответственно (Рисунок 4, 3А).

A



Б

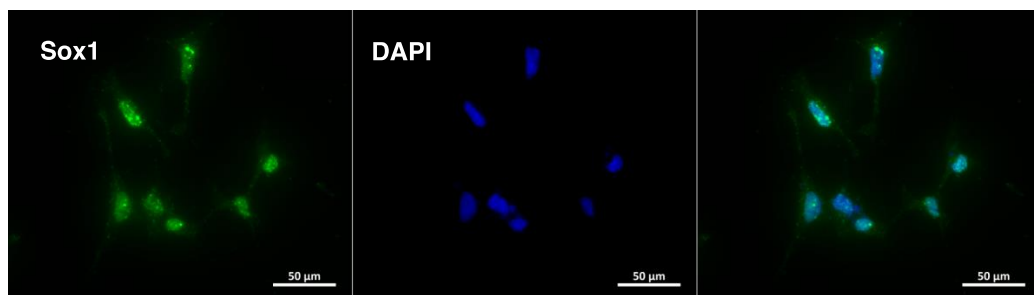


Рисунок 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на 12 день дифференцировки iPСК человека в дофаминергические нейроны. А). Окрашка на маркеры эктодермы, мезодермы и энтодермы, Sox1, Brachyury и FOXA2 соответственно (на примере линии WTSli046-A). Масштабные линейки 200 мкм. Б). Окрашка на Sox 1. Масштабная линейка 50 мкм. Иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что на 12 день дифференцировки клетки экспрессируют эктодермальный маркер Sox1 и не экспрессируют маркеров мезодермы и энтодермы Brachyury и FOXA2 соответственно.

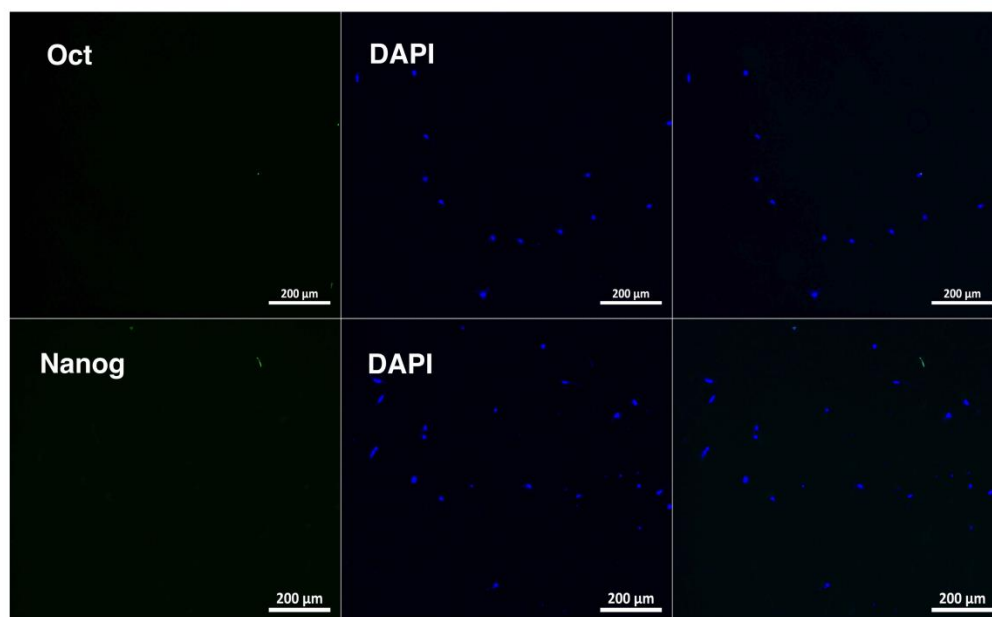


Рисунок 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на 12 день дифференцировки iPСК человека в дофаминергические нейроны. Окраска на маркеры плюрипотентности Oct4 и Nanog (на примере линии WTSli046-A). Масштабные линейки 200 мкм. Иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что на 12 день клетки не экспрессируют маркеров плюрипотентности Oct4 и Nanog.

На 28 день дифференцировки, к концу второго этапа дифференцировки, клетки экспрессировали маркер нейрональных прогениторов Doublecortin (DCX), нейрональные маркеры Nestin и Tubuline III (Tuj), маркер дофаминергических нейронов TH на небольшом уровне, а также маркер зрелых нейронов Microtubule-associated protein 2 (MAP2) на крайне низком уровне (Рисунок 5).

На 53-й день дифференцировки полученные клетки приобретали типичную для нейронов морфологию (Рисунок 1Б). Иммунофлуоресцентный анализ показал, что на этой стадии подавляющее большинство клеток экспрессировало маркеры зрелых дофаминергических нейронов: TH, MAP2, Lmx1a (Рисунок 6А, Б). При помощи метода проточной цитометрии было показано, что процент TH (+) клеток составлял более 85 % (Рисунок 6В). Методом ВЭЖХ было показано, что клетки содержали дофамин и его метаболиты DOPAC и HVA (Рисунок 6Д). Однако следует отметить, что было обнаружено небольшое количество серотонина и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)), что указывает на то, что полученная культура клеток состояла не только из дофаминергических нейронов, но, вероятно, содержала небольшое количество серотонинергических нейронов. Электрофизиологические параметры полученной культуры клеток оценивали методом patch-clamp в конфигурации “целая клетка” (Рисунок 6Г). Полученные нейроны были способны спонтанно генерировать потенциалы действия (ПД) с типичной для нейрональных клеток формой с выраженными фазами деполяризации и реполяризации.

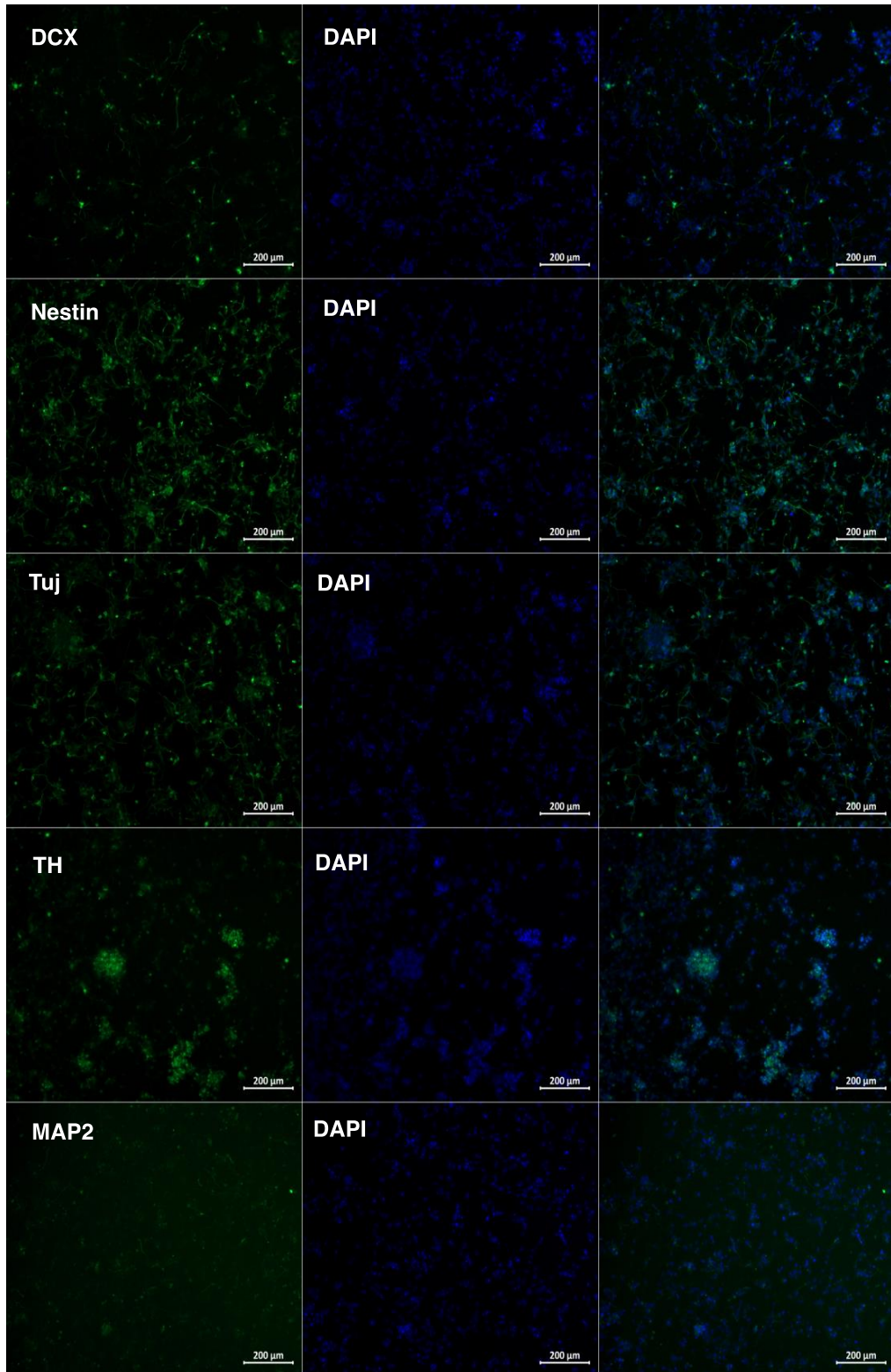
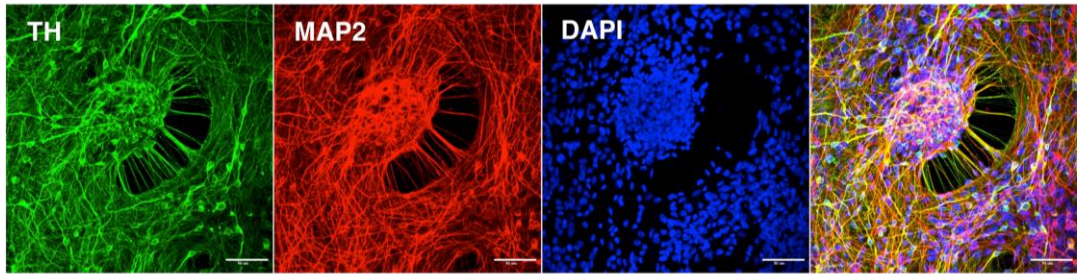
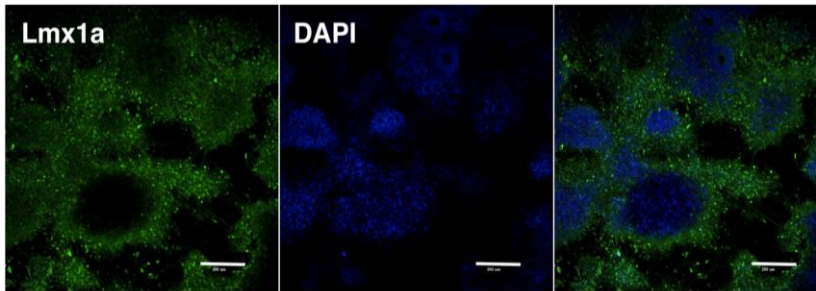


Рисунок 5. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на 28 день дифференцировки iPСК человека в дофаминергические нейроны. Окраска на маркер нейрональных прогениторов Doublecortin (DCX), нейрональные маркеры Nestin и Tubuline III (Tuj), маркер дофаминергических нейронов tyrosine hydroxylase (TH) и маркер зрелых нейронов Microtubule-associated protein 2 (MAP2) (на примере линии WTSli046-A). Масштабные линейки 200 мкм. Иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что на 28 день дифференцировки клетки экспрессировали DCX, Nestin и Tuj, а также TH на небольшом уровне и MAP2 на крайне низком уровне.

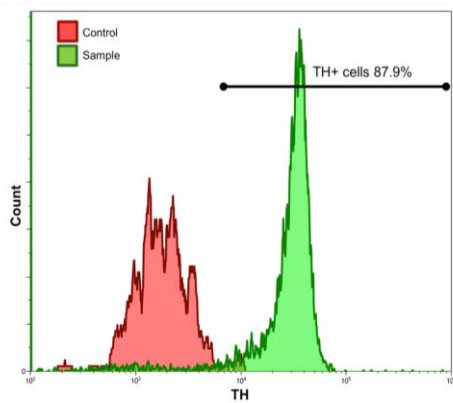
А



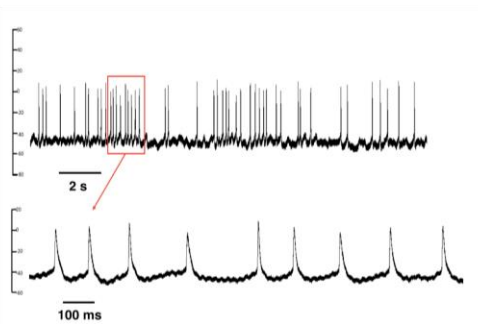
Б



В



Г



Д

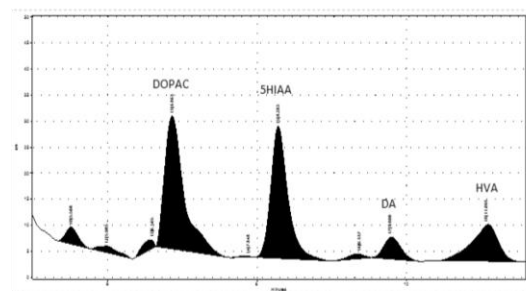


Рисунок 6. Дифференцировка иПСК человека в дофаминергические нейроны (на примере линии AD3). А-Б.) Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных клеток, день 53, на маркеры дофаминергических нейронов TH, MAP2, Lmx1a. Масштабные линейки 50 мкм. В). Проточная цитометрия клеток на 53 день дифференцировки. Окраска на TH. Анализ показал, что процент TH-положительных клеток равен 87%. Г). Patch-clamp анализ в конфигурации «целая клетка» показал способность дифференцированных клеток на 53-й день спонтанно генерировать потенциалы действия. Д). Высокоэффективная жидкостная хроматография. Показано наличие дофамина и его метаболитов (DOPAC и гомованилиновой кислоты (HVA)) в полученных клетках на 53-й день [110].

Итак, полученные данные свидетельствуют о том, что использованный протокол эффективен и может быть использован для получения дофаминергических нейронов из иПСК человека в условиях *in vitro*.

3.2 Взаимосвязь системы TAARs, нейрогенеза и дифференцировки дофаминергических нейронов *in vitro*

3.2.1 Мыши, нокаутные по гену TAAR5, имеют повышенное число дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга, а также повышенных уровень GDNF в стриатуме

Для оценки влияния TAAR5 на дофаминергическую систему и нейрогенез дофаминергических нейронов было выполнено сравнение количества TH (+) нейронов черной субстанции среднего мозга (*substantia nigra*, SN) у TAAR5-нокаутных (TAAR5-KO) мышей [99] и мышей дикого типа (WT).

На срезах среднего мозга у всех животных, как TAAR5-KO, так и WT, на всем протяжении VTA и SN визуализировались TH (+) нейроны (Рисунок 7 А, Б). Межъядерная граница между VTA и SN определялась по светло окрашенной ретикулярной ткани (рис. 7А, красный пунктир). TH (+) нейроны имели форму от овала до треугольника с небольшим количеством разветвленных дендритов (рис. 7А). В VTA не было обнаружено разницы в количестве TH (+) нейронов между TAAR5-KO и WT мышами ($503,5 \pm 30$ и $558,3 \pm 31$ на срез, $p = 0,195$), однако в SN количество TH (+) нейронов у TAAR5-KO мышей значительно отличалось от дикого типа ($692,1 \pm 30$ и $518,8 \pm 26$ на срез, $p = 0,003$) (Рисунок 7В). SN состоит из трех частей: компактной (SN pars compacta, SNc), ретикулярной (SN pars reticularis, SNr) и латеральной (SN pars lateralis, SNl). Было отдельно посчитано число TH (+) нейронов в каждой из этих частей (рис. 7С). Было обнаружено, что разница между числом TH (+) нейронов в TAAR5-KO мышах по сравнению с мышами WT характерна для SNc ($470,1 \pm 26$ и $363,3 \pm 25$ на срез, $p = 0,015$) и SNl ($164,0 \pm 12$ и $108,0 \pm 6$ на срез, $p = 0,001$), в то время как достоверных различий для SNr получено не было ($58,0 \pm 6$ и $48,0 \pm 8$ на срез, $p = 0,235$) (Рисунок 7В).

Также при помощи реал-тайм ПЦР была оценена экспрессия GDNF, церебрального нейротрофического фактора дофамина (Cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF)) и BDNF, играющих важную роль в развитии и созревании дофаминергических нейронов в обонятельной луковице, стриатуме и среднем мозге TAAR5-KO и мышах WT, и показали, что для TAAR5-KO

мышей характерно повышение экспрессии GDNF в стриатуме по сравнению с мышами дикого типа (Рисунок 7Г).

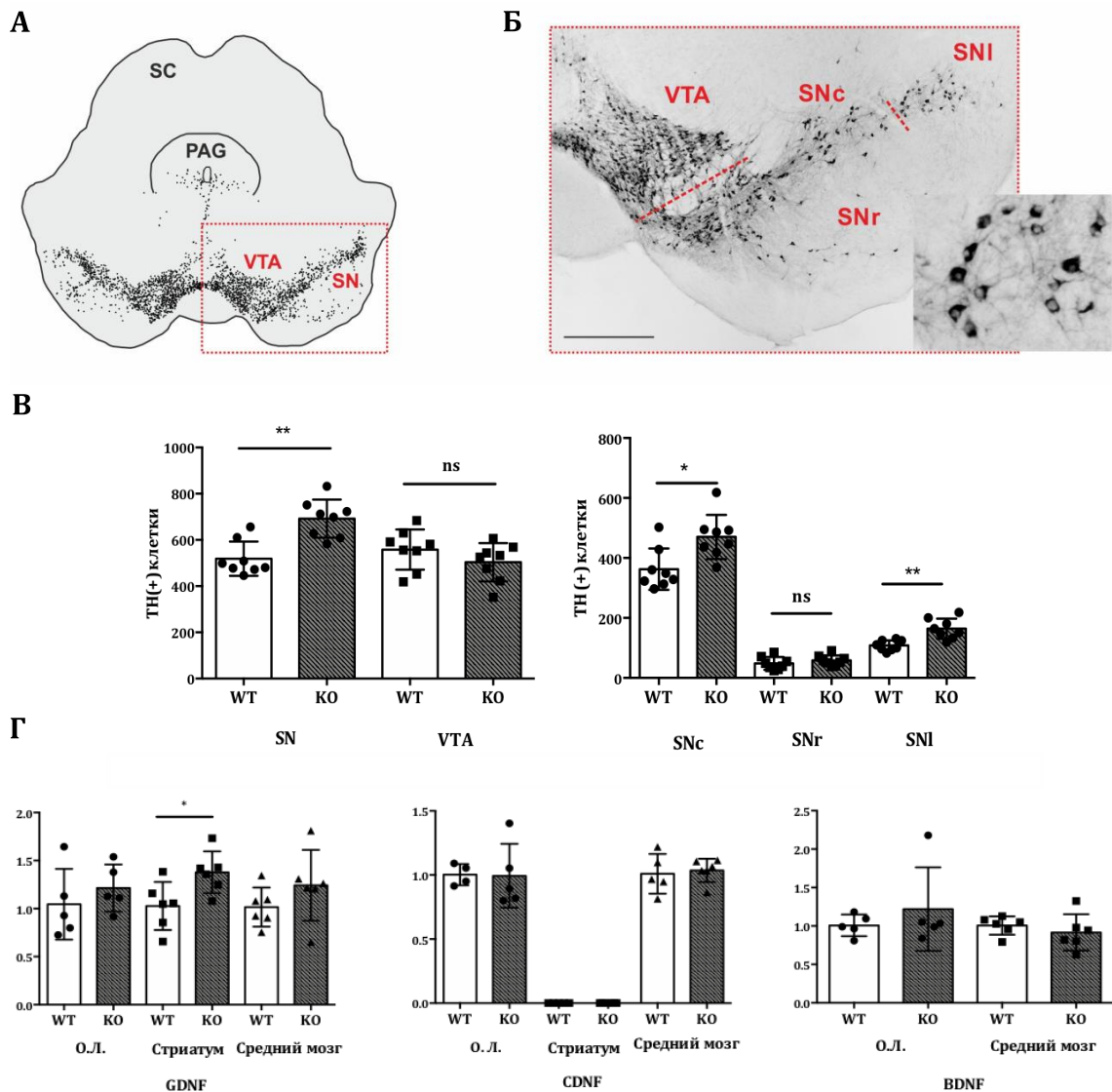


Рисунок 7. Состояние дофаминергической системы у мышей с нокаутом TAAR5 (TAAR5-KO). А-В) – распределение TH (+) нейронов в вентральной области покрышки (VTA) и черной субстанции (SN) у мышей TAAR5-KO и мышей дикого типа (WT). А). Фронтальный срез среднего мозга с иммуногистохимической окраской на TH (+) нейроны, отмечены точками. PAG – периакведуктальный серый, SC – Superior colliculi. Б).

Микроскопическое изображение увеличенной области, отмеченной красным пунктирным квадратом на фронтальном срезе. SNr- substantia nigra pars reticulata, SNc - pars compacta, SNI –et pars lateralis. Масштабная линейка 400 мкм. В). Количество TH (+) нейронов на срезах VTA и SN, сравнение TAAR5-KO и WT мышей. [11]

Г). Реал-тайм ПЦР. Относительное содержание мРНК глиального трофического фактора (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF), церебрального нейротрофического фактора дофамина (Cerebral dopamine neurotrophic factor, CDNF), нейротрофического фактора мозга (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) в обонятельной луковице (О.Л.), стриатуме, среднем мозге у TAAR5-KO (KO) и WT мышей показало достоверное увеличение у TAAR5-KO экспрессии GDNF в стриатуме, по сравнению с WT мышами. На графиках уровень экспрессии WT был установлен равным 1. Значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение (SD). ns – незначимое, *, **, *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$. [11]

3.2.2 Мыши, нокаутные по гену TAAR2, имеют повышенный уровень BDNF в стриатуме

Для оценки влияния TAAR2 на дофаминергическую систему анализировали экспрессию GDNF, CDNF, BDNF в стриатуме и среднем мозге у мышей, нокаутных по *TAAR2* гену (TAAR2 knockout (TAAR2-KO)) и мышей WT при помощи ПЦР в реальном времени, и было показано, что для TAAR2-KO мышей характерно повышение экспрессии BDNF в стриатуме по сравнению с мышами WT (Рисунок 8).

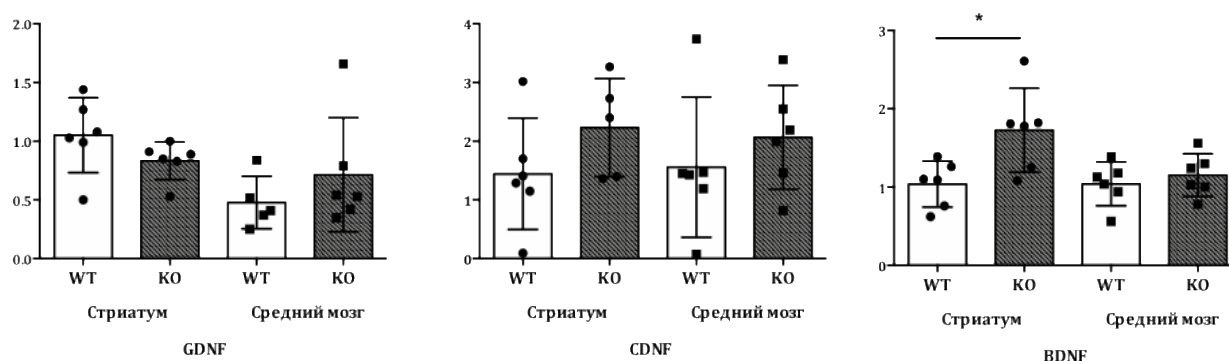


Рисунок 8. Экспрессия транскрипционных факторов GDNF, CDNF, BDNF в стриатуме и среднем мозге у мышей с нокаутом TAAR2. ПЦР в реальном времени. Относительное содержание мРНК глиального трофического фактора (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF), церебрального нейротрофического фактора дофамина (Cerebral dopamine neurotrophic factor, CDNF), нейротрофического фактора мозга (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) в стриатуме и среднем мозге у TAAR2-KO (KO) и WT мышей показало достоверное увеличение у TAAR2-KO экспрессии BDNF в стриатуме, по сравнению с WT мышами. На графиках уровень экспрессии WT был установлен равным 1. Значения представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение (SD). *, **, *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ соответственно [13]

3.2.3 Анализ экспрессии TAARs, сделанный на данных РНК секвенирования, полученных из открытых баз данных, показал, что TAARs экспрессируются в нейрогенных зонах, в частности в гиппокампе мыши, и их экспрессия обнаруживается в разных типах клеток

Данные, полученные на TAAR2-KO и TAAR5-KO мышах, вошедшие в данную работу, а также другие данные, полученные нашим коллективом [11; 13], позволили предположить, что TAARs могут играть определенную роль во взрослом нейрогенезе и в нейрогенезе дофаминергических нейронов [12].

Для оценки наличия экспрессии TAARs в зонах взрослого нейрогенеза, был выполнен анализ транскриптомных профилей клеток зубчатой извилины и гиппокампа, полученных из открытых баз данных BioGPS, NCBI Gene Expression Omnibus (GEO). Для поиска была использована база данных GEO <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. Диапазон наборов транскриптомных данных был сужен до образцов с большой глубиной прочтения, поскольку только такие данные позволяли оценить уровень экспрессии TAARs, что связано с их крайне низким уровнем экспрессии. Таким образом, для анализа были выбраны 4 набора данных, полученных при помощи РНК секвенирования, и один набор РНК секвенирования единичных клеток, содержащих информацию об экспрессионных профилях гиппокампа мыши [111–115] (Таблица 4).

Таблица 4. Наборы данных РНК секвенирования, которые были использованы в работе [116].

GSE номер	Название статьи	Количество образцов	Краткое описание дизайна эксперимента, описанного в статье
<i>Данные, в которых оценивалась ткань гиппокампа целиком</i>			
GSE84503	Activity-Dependent Regulation of Alternative Cleavage and Polyadenylation (APA) During Hippocampal Long-Term Potentiation (LTP)	6 контрольных образцов / 6 экспериментальных образцов	Срезы гиппокампа после химической активации, срезы через 1 ч и 3 ч после активации, контрольные срезы
GSE147842	Adult mouse hippocampal transcriptome changes associated with	10 контрольных образцов / 10 экспериментальных образцов	Беременные самки подвергались воздействию твердых наночастиц городского происхождения в течение периода

Продолжение таблицы 4

	long-term behavioral and metabolic effects of gestational air pollution toxicity		беременности. Эффекты изучались у взрослых. Контрольные особи.
GSE148075	Wild mice with different social network sizes vary in brain gene expression	14 особей в группе «высокой общительности» и 15 особей в группе «низкой общительности».	Набор данных из трех областей мозга (гипоталамус, префронтальная кора и гиппокамп, в обзор были включены только образцы гиппокампа) от мышей WT с большими или маленькими размерами социальной сети.
GSE166831	Altered hippocampal transcriptome dynamics following sleep deprivation	9 контрольных образцов / 9 экспериментальных образцов	Гиппокамп мышей, которых либо лишали сна в течение 5 часов, либо не беспокоили.
<i>Данные, полученные при помощи РНК секвенирования единичных клеток</i>			
SCP1	Single nucleus RNA-seq of cell diversity in the adult mouse hippocampus.	1,367 отдельных ядер	Ядра из анатомических субрегионов гиппокампа DG, CA1, CA2, CA3 и малочисленные ГАМК-ергические нейроны

Поскольку отобранные наборы данных состоят из контрольных и экспериментальных групп, в соответствии с условиями проводимых исследователями экспериментов, во всех наборах данных был проведен дифференциальный анализ экспрессии TAARs, чтобы оценить возможную разницу в экспрессии между животными контрольной и экспериментальных групп. Не было обнаружено каких-либо существенных различий в экспрессии TAAR между

контрольными и экспериментальными группами, поэтому для дальнейшего анализа группы были объединены.

Согласно полученным данным, *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4* и *Taar5* спорадически экспрессируются в ткани гиппокампа мыши. В одном образце также на очень низком уровне экспрессировался *Taar7e*. В разных наборах данных паттерны экспрессии TAARs были похожи. Экспрессия *Taar3* и *Taar4* была обнаружена во всех четырех сериях, по крайней мере, в одном образце на набор данных, а *Taar1*, *Taar2* и *Taar5* были обнаружены в трех наборах данных (Рисунок 9). Следует отметить, что, в наборе GSE84503 в отличие от трех других наборов данных, зубчатая извилина была удалена из диссекционного материала до выделения РНК для проведения секвенирования.

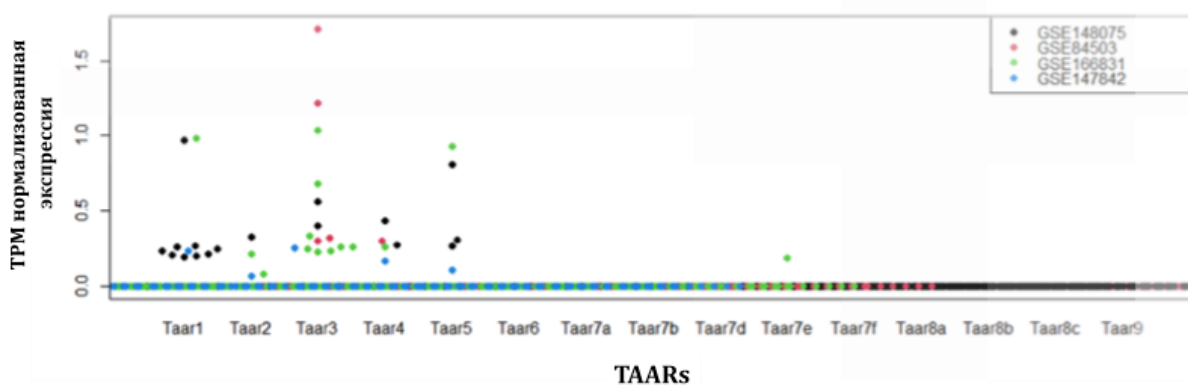


Рисунок 9. Уровни экспрессии TAARs в образцах цельного гиппокампа мыши, представленные в базе данных GEO. Анализ показал, что *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4* и *Taar5* спорадически экспрессируются в ткани гиппокампа мыши [116].

Более точный паттерн экспрессии TAARs был обнаружен в наборе данных SCP1 (Single cell portal, https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell). В этом наборе приведены данные экспрессии 1367 клеток, полученных из разных отделов гиппокампа (DG, CA1, CA2 и CA3), ГАМК-ергических нейронов, глии и эпендимы зубчатой извилины мыши [115]. Как показывает анализ данного набора, экспрессия всех TAARs может быть найдена в клетках гиппокампа, однако это спорадические обнаружения. Экспрессия *Taar6*, *Taar7f* и *Taar8* была обнаружена во всех группах клеток, аннотированных в наборе. Экспрессия *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4*, *Taar 5*, *Taar7b*, *Taar8a* и *Taar8c* была найдена только в нейрональных клетках. В то время экспрессия *Taar7a*, *Taar7d*, *Taar7e* и *Taar9* была найдена преимущественно в глиальных клетках (Рисунок 10).

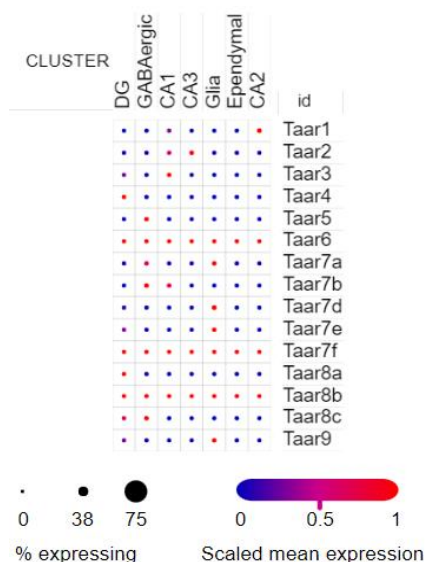


Рисунок 10. Экспрессия TAARs в популяциях клеток гиппокампа мыши, полученная при анализе набора данных SCP1 (изображение было создано с помощью интерактивного интерфейса Single Cell Portal). Уровни экспрессии отмечены цветом в соответствии с цветовой шкалой. Как показывает анализ, экспрессия всех TAARs была обнаружена в клетках гиппокампа, а частности экспрессия *Taar6*, *Taar7f* и *Taar8* была обнаружены во всех типах клеток, аннотированных в наборе, экспрессия *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4*, *Taar5*, *Taar7b*, *Taar8a* и *Taar8c* была найдена только в нейрональных клетках, экспрессия *Taar7a*, *Taar7d*, *Taar7e* и *Taar9* преимущественно обнаруживается в глиальных клетках [116].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что TAAR2 и TAAR5 имеют важное значение для нейрогенеза дофаминергических нейронов, и TAARs, экспрессируются в нейрогенных зонах, в частности в гиппокампе мыши.

3.2.4 TAARs экспрессируются на поздних этапах дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны, что было показано при помощи анализа данных РНК секвенирования, полученных из открытых баз данных, и данных TaqMan ПЦР на разных стадиях дифференцировки

В первую очередь была оценена экспрессия TAARs в недифференцированных иПСК человека. Для этого были использованы данные РНК секвенирования линий иПСК человека WTSli004-A, WTSli032-A и WTSli046-A, полученных из EBiSC. В проанализированных данных не были обнаружены даже минимальные уровни экспрессии TAARs (данные не приведены).

Далее были выбраны наборы данных из базы данных GEO, которые были получены во время дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны. Как и при анализе

данных для оценки экспрессии TAARs в гиппокампе диапазон выбора наборов транскриптомных данных был сужен до образцов с большой глубиной прочтения.

Набор данных EGAD0000100615 из European Genome-phenome Archive содержит данные, полученные при дифференцировке 215 клеточных линий иПСК человека в направлении нейронов среднего мозга, включая дофаминергические нейроны [117]. Дифференцировку проводили по протоколу Kriks et al., 2011 с небольшими изменениями [118]. Пробы собирали на 11-й, 30-й и 52-й день дифференцировки. При анализе было обнаружено, что на 11-й день дифференцировки появляются только единичные наблюдения *TAAR6* экспрессии, при этом экспрессия остальных TAARs отсутствует. На 30 день дифференцировки профиль экспрессии TAARs практически не меняется. Но к 52 дню дифференцировки появляется значимый уровень экспрессии *TAAR1* и *TAAR6*, а также единичные наблюдения экспрессии *TAAR8* и *TAAR5* (Рисунок 11).

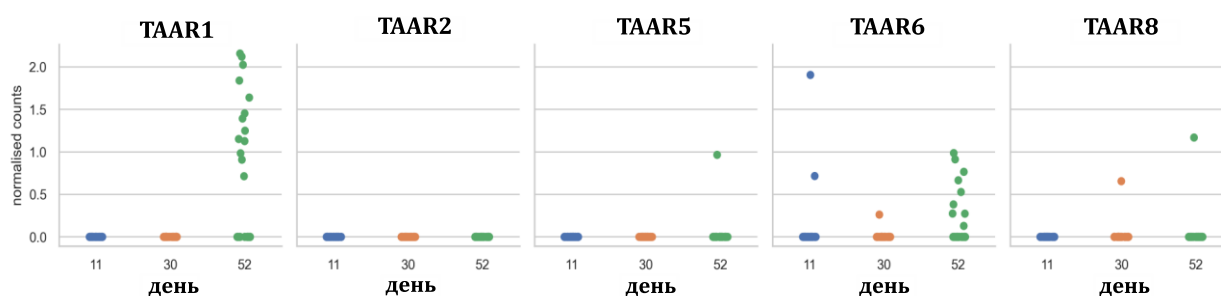


Рисунок 11. Экспрессия TAARs в образцах на 11-й, 30-й и 52-й день дифференцировки иПСК человека в нейроны среднего мозга (набор данных EGAD0000100615). Анализ данных показал, что *TAAR1* и *TAAR6*, а также единичные наблюдения экспрессии *TAAR8* и *TAAR5* появляются к 52 дню дифференцировки.

Набор GSE118412 [119] содержит данные РНК секвенирования, полученные при дифференцировке человеческих ЭСК (линия RC17, Roslin Cells) в предшественники дофаминергических нейронов, которая выполнялась по протоколу, описанному Nobrant S. et al, 2017 [17] в течение 16 дней, а также от клеток вентральной части среднего мозга эмбриона человека, выделенные на стадии 7.5 недель. И те и другие клетки были проанализированы в двух условиях: перед трансплантацией в стриатум 6-ОНДА крысиным моделям БП и через 6 мес. после трансплантации [119].

Было показано, что как эмбриональные клетки из вентральной части среднего мозга эмбриона человека, так и клетки-предшественники нейронов, полученные на 16-й день дифференцировки, имеют значимый уровень экспрессии *TAAR5* и *TAAR8*, который сохраняется в трансплантатах, выделенных через 6 мес. после трансплантации (Рисунок 12).

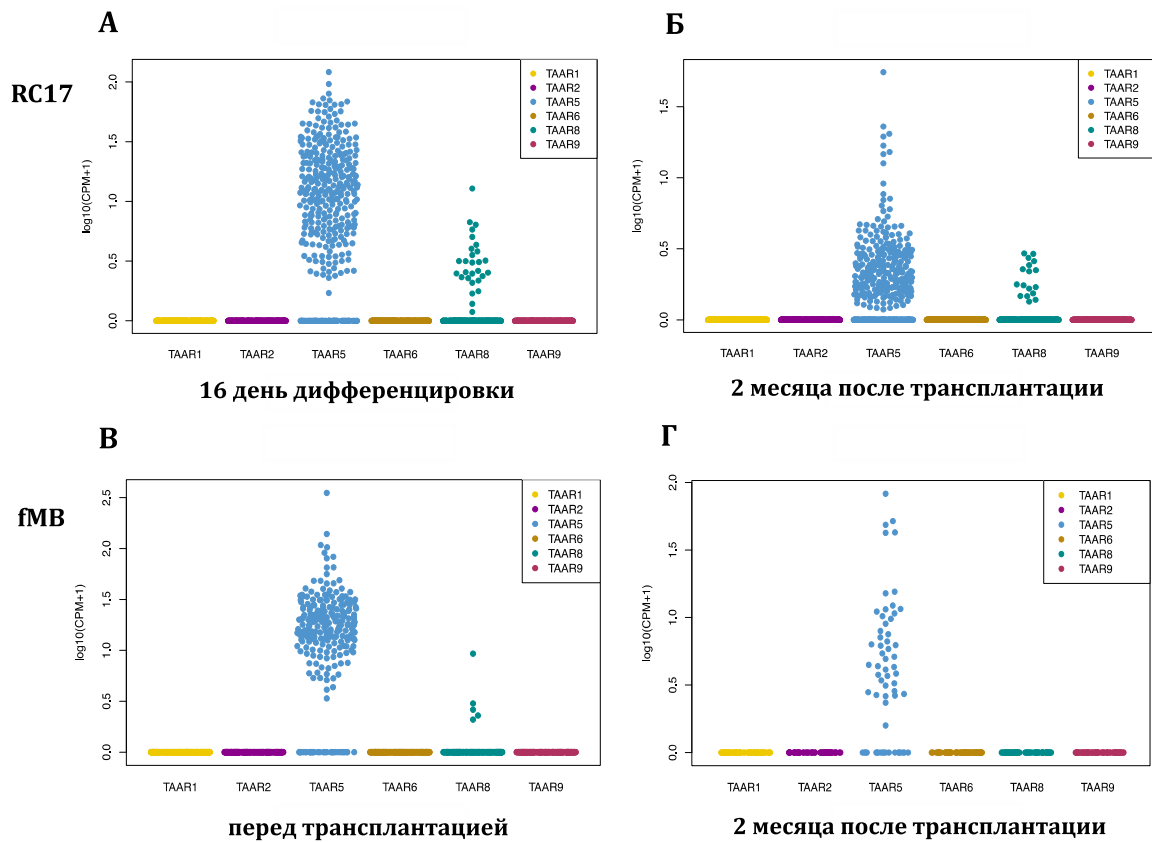


Рисунок 12. Экспрессия TAARs в клетках линии RC17 на 16-й день дифференцировки ЭСК человека в дофаминергические нейроны и в клетках вентральной части среднего мозга эмбриона человека (fetal midbrain (fMB)) до трансплантации и через 6 мес. после (набор данных GSE118412). А). Линия RC17 16 день дифференцировки. Б). Линия RC17 2 месяца после трансплантации В). fMB перед трансплантацией Г). fMB 2 месяца после трансплантации. Данные показывают, что как до так и после трансплантации клетки обеих линий имеют значимую экспрессию *TAAR5* и *TAAR8*.

Набор GSE86654 [61] содержит данные РНК секвенирования, которые были получены из клеток на 16-й день дифференцировки клеток ЭСК (линия клеток Н9) в дофаминергические нейроны по протоколу описанному Nobrant S. et al, 2017 [17]. Как и в данных набора GSE118412, анализ экспрессии TAARs показал высокий уровень экспрессии *TAAR5* (Рисунок 13).

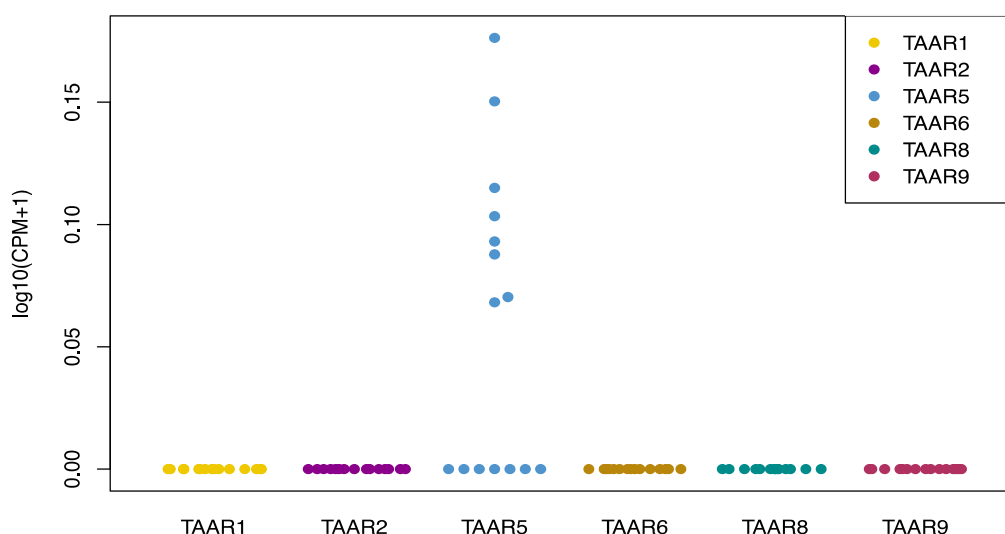


Рисунок 13. Экспрессия TAARs на 16-й день дифференцировки человеческих ЭСК (набор данных GSE86654). Данные показывают, что на данном этапе дифференцировки клетки имеют значимую экспрессию *TAAR5*.

Были проанализированы данные набора GSE162884 (GSE162883) [5], который содержит данные РНК секвенирования клеток 11-го дня дифференцировки (линии ЭСК человека H9 (WiCell) и MEL1 (Stem Cell Sciences plc)), полученные в ходе дифференцировки по протоколу, опубликованному Kim T.W. et al., 2021 [120]. Но в данном наборе не был обнаружен какого-либо определяемый уровень экспрессии TAARs ни на стадии недифференцированных ЭСК и в дифференцированных клетках (данные не приведены).

В дополнение к анализу данных, полученных из открытых источников, 3 линии iPСК человека – AD3, WTSli004-A, WTSli032-A были дифференцированы в дофаминергические нейроны. Образцы РНК были собраны на разных этапах дифференцировки: из недифференцированных клеток, на 12-й и 53-й день. Анализ экспрессии TAARs показал, что экспрессия *TAAR1*, *TAAR2*, *TAAR6*, *TAAR8* и *TAAR9* не обнаруживается ни на одном из этапов дифференцировки человеческих iPСК в дофаминергические нейроны. Однако, экспрессия *TAAR5* выявляется на низком уровне в недифференцированных клетках, особенно в клеточной линии WTSli004-A. На 12-й день дифференцировки происходило повышение экспрессии *TAAR5* в небольшом числе образцов и ее уровень возрастал к 53-й дню дифференцировки (Рисунок 14).

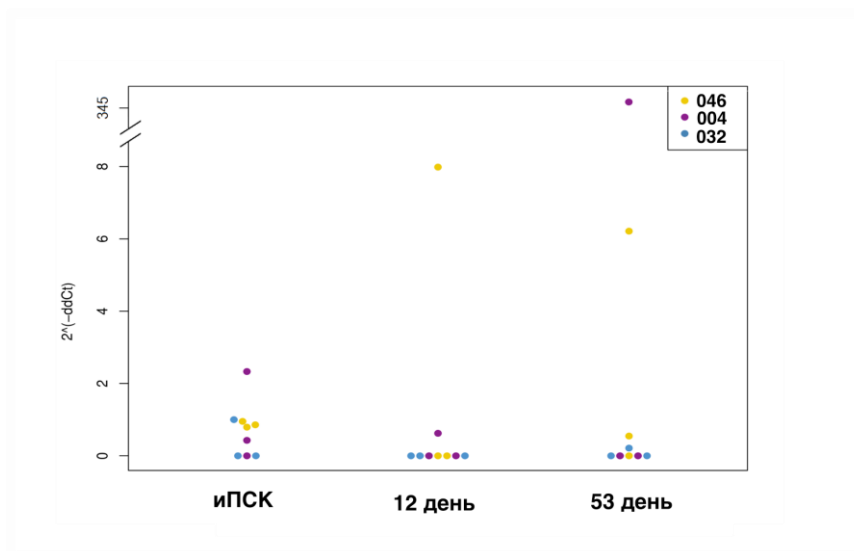


Рисунок 14. Экспрессия *TAAR5* на разных стадиях дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны, полученная с помощью TaqMan ПЦР в реальном времени.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что *TAAR2* и *TAAR5* оказывают влияние на нейрогенез и на нейрогенез дофаминергических нейронов в частности.

TAARs экспрессируются в нейрональных и глиальных клетках гиппокампа мыши и на разных этапах дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны, однако паттерны экспрессии *TAARs*, полученные при анализе разных наборов имеют определенные различия. Вероятно, данная разница связана с тем, что проанализированные клетки были получены разными протоколами дифференцировки. И хотя использованные протоколы дифференцировки основаны на общих принципах, они имеют свои особенности и приводят к формированию клеток разной степени зрелости и спецификации, что может влиять на паттерн экспрессии *TAARs*.

Полученные данные имеют важное значение для понимания роли *TAARs* в функционировании нервной системы, но для оценки конкретных механизмов и сигнальных путей, которые лежат в основе этого, необходимы дальнейшие исследования.

3.3 Влияние модуляции сигнального пути Notch на начальные этапы дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны

В данной части работы были использованы 3 линии иПСК человека: AD3, WTSi004-A (004), WTSi046-A (046).

3.3.1 Нокадаун *RBPJ* и сверхэкспрессия *NICD* эффективно ингибируют и активируют соответственно сигнальный путь Notch во время дифференцировки и ПСК человека в дофаминергические нейроны

Для оценки влияния ингибирования/активации сигнального пути Notch на ранние этапы дифференцировки и ПСК человека в дофаминергические нейроны, были выполнены:

1) Ингибирование сигнального пути Notch за счет нокадауна *RBPJ* при помощи лентивирусной трансдукции shRNA к *RBPJ* (Рисунок 15А)

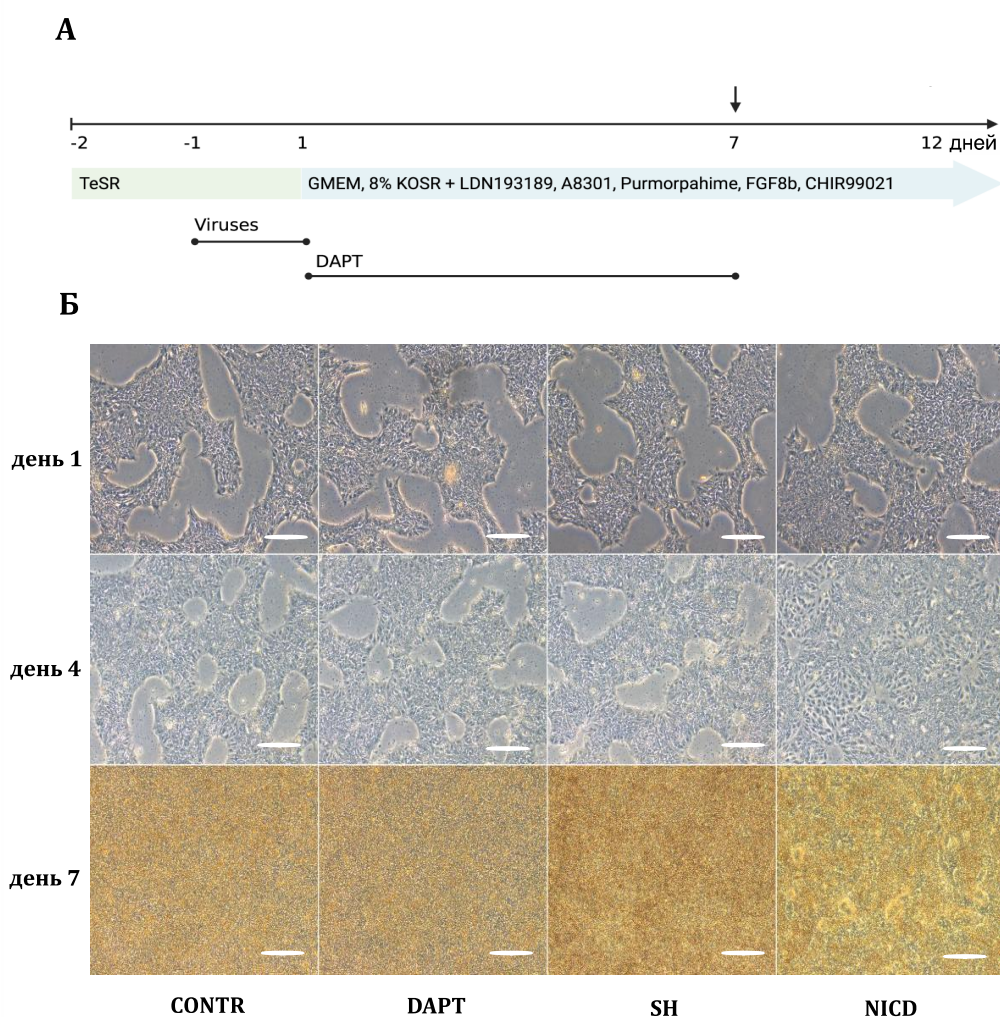


Рисунок 15. Ингибирование/активация сигнального пути Notch на ранних стадиях дифференцировки и ПСК человека в дофаминергические нейроны. А). Схема эксперимента. Вирусные частицы добавляли на следующий день после посева клеток и инкубировали в течение 24 ч. DAPT добавляли с 1-го по 7-й день дифференцировки. Для выделения РНК клетки снимали на 7-й день дифференцировки. Б). Микроскопия, проходящий свет. 4 варианта условий: CONTR, контрольная дифференцировка; DAPT, дифференцировка в условиях обработки DAPT; SH — дифференцировка в условиях нокадауна *RBPJ*; NICD, дифференцировка в условиях сверхэкспрессии *NICD*. Морфологические изменения в культуре клеток на 1, 4, 7-е сутки дифференцировки человеческих iPSC в дофаминергические нейроны на фоне модуляции сигнального пути Notch показали сходство CONTR, SH и DAPT групп и отличие от этих групп группы NICD. Для NICD группы начиная с 4ого дня характерно формирование розетко-подобных структур [110].

2) Ингибирование сигнального пути Notch при помощи ингибитора γ -секретазы DAPT, который добавляли к клеткам с 1 по 7 день дифференцировки (Рисунок 15А)

3) Активация сигнального пути Notch за счет оверэкспрессии *NICD* при помощи лентивирусной трансдукции лентивирусными частицами, несущими ген *NICD*, кодирующий внутриклеточный домен (Рисунок 15А).

Таким образом, в ходе работы были получены четыре группы: CONTR, контрольная дифференцировка; SH — дифференцировка в условиях нокдауна *RBPJ*; *NICD*, дифференцировка в условиях оверэкспрессии *NICD*; DAPT, дифференцировка в условиях обработки DAPT (Таблица 5).

Таблица 5. Экспериментальные группы, использованные в работе [110].

Название группы	Описание
CONTR	Контрольная дифференцировка
SH	Дифференцировка на фоне ингибирования сигнального пути Notch при помощи shRNA к <i>RBPJ</i> (<i>RBPJ</i> knockdown)
<i>NICD</i>	Дифференцировка на фоне активации сигнального пути Notch при помощи оверэкспрессии <i>NICD</i>
DAPT	Дифференцировка на фоне ингибирования сигнального пути Notch при помощи DAPT

Была проанализирована эффективность ингибирования и активации сигнального пути Notch за счет нокдауна *RBPJ* и оверэкспрессии *NICD* соответственно через 96 ч после трансдукции и на 7-й день дифференцировки, и было показано, что нокдаун *RBPJ* снижал экспрессию *RBPJ*, нижестоящий мишени сигнального пути Notch, на 70% (Рисунок 16). Оверэкспрессия *NICD* увеличивала экспрессию *HEY1*, нижележащей мишени сигнального пути Notch, в 36 раз по сравнению с контролем. Этот эффект наблюдался через 96 ч после трансдукции и он сохранялся на протяжении всего времени до конца эксперимента (7 дней дифференцировки) (данные не представлены).

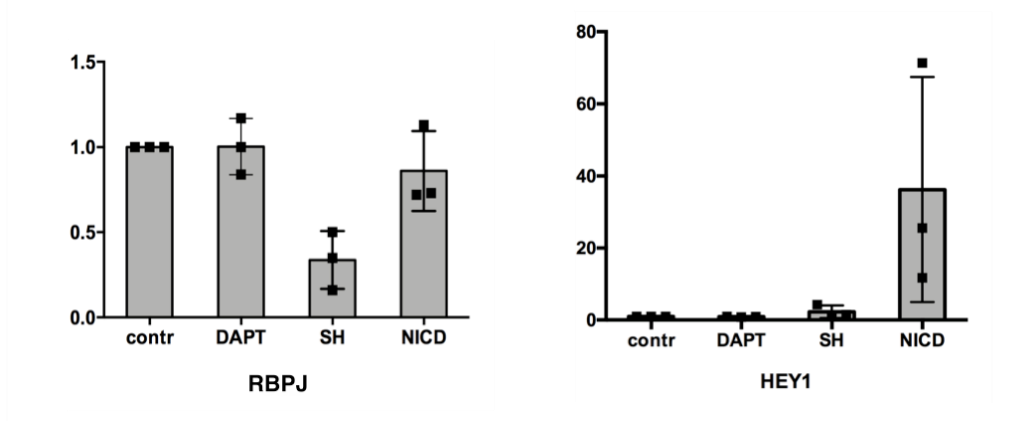


Рисунок 16. ПЦР в реальном времени на гены *RBPJ* и *HEY1*. Эффективность ингибирования/активации сигнального пути Notch при помощи shRNA к *RBPJ* и сверхэкспрессии *NICD* соответственно. ПЦР в реальном времени генов *RBPJ* и *HEY1* во время модуляции показала эффективное ингибирование и активацию передачи сигналов Notch соответственно во время дифференцировки индуцированных человеком плюрипотентных стволовых клеток в дофаминергические нейроны после 96 ч. трансдукции. Среднее \pm стандартное отклонение (SD). [110]

Морфологические изменения клеток в культуре в течение 7 дней дифференцировки были сходными в группах CONTR, SH, DAPT (Рисунок 15Б). В тоже время клетки с сверхэкспрессией *NICD* начиная с 4-х суток дифференцировки формировали розетоподобные структуры (Рисунок 15Б) и у них значительно быстрее происходило закисление среды по сравнению с другими условиями (данные не представлены).

3.3.2 Анализ данных секвенирования РНК с помощью метода главных компонент (principal component analysis (PCA)) выявил сходства и различия между группами

Для выделения РНК и проведения секвенирования клетки снимали на 7-й день дифференцировки. С помощью метода главных компонент (Рисунок 17А) были выявлены значительные различия между группами *NICD* и *CONTR*, а также группами *NICD* и *SH*. В тоже время не наблюдалось значимых различий между группами *CONTR* и *SH*, а также между группами *CONTR* и *DAPT*.

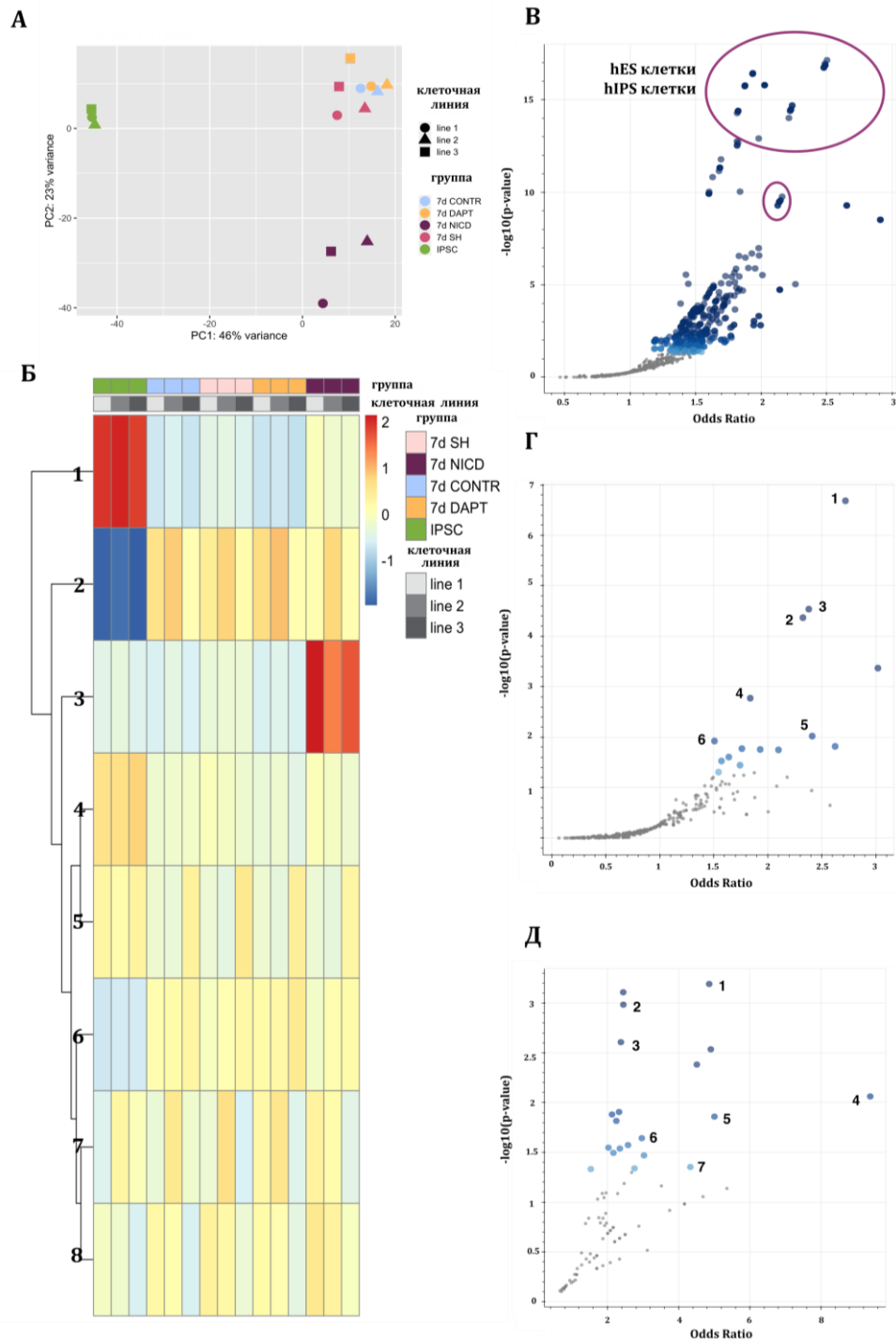


Рисунок 17. Анализ данных секвенирования РНК. А). Анализ методом главных компонент: контрольная дифференцировка (CONTR), дифференцировка в условиях нокдауна *RBPJ* (SH), дифференцировка в условиях гиперэкспрессии *NICD* (NICD), дифференцировка в условиях добавления DAPT (DAPT). Методом основных компонент было показано сходство групп CONTR, SH и DAPT и значительные отличия группы NICD. Б). Кластерный анализ групп CONTR, SH, NICD, DAPT. Было показано разделение данных на 7 кластеров. Графики С-Е Volcano, изображающие вероятность и достоверность уровней экспрессии генов в выбранных кластерах. В). Гены из кластера 1 кластерного анализа. Кластер 1 включает гены, экспрессия которых характерна для разных линий hPS и hES клеток (обведены кружками). Г). Гены из кластер 2 кластерного анализа. Кластер 2 включает гены, характерные для 1) аксонов 2) сигнального пути Wnt 3) сигнального пути Hippo 4) фокальной адгезии 5) сигнального пути Hedgehog 6) сигнального пути MAPK. Д. Гены из кластера 3 кластерного анализа. Кластер 3 включает гены, характерные для 1) сигнального пути Notch 2) интегринового сигнального пути 3) ангиогенеза 4) метаболизма пирувата 5) опиоидного проопиомеланокортинового пути 6) убикитинового протеасомного пути 7) сигналинга от ГАМК-В II рецептора [110].

3.3.3 Кластерный анализ выявил группы генов, характерные для человеческих иПСК и ЭСК, для дифференцированного состояния и отдельную группу, характерную для оверэкспрессии NICD

Для кластерного анализа были использованы данные РНК секвенирования, полученные из клеток всех экспериментальных групп на 7-й день дифференцировки и данные РНК секвенирования недифференцированных человеческих иПСК на 0-й день (Рисунок 17Б).

Экспрессия генов, специфичных для плюрипотентных стволовых клеток, снижалась к 7-му дню дифференцировки независимо от наличия или отсутствия воздействия на сигнальный путь Notch (Рисунок 17Б кластер 1; 17В; Приложение А).

Во время дифференцировки увеличивалась экспрессия генов, связанных с сигнальными каскадами SHH, Wnt и MAPK, а также генов, регулирующих рост отростков нервных клеток, в частности, образование аксонов (Рисунок 17Б кластер 2; 17Г; Приложение А).

С помощью кластерного анализа была выделена отдельная группа генов, которая отличала группу NICD от всех остальных. Эту группу образовывали гены, играющие роль в лиганд-рецепторном взаимодействии; регуляции активности киназ или белков, связывающихся с киназами; связанные с метаболизмом (Рисунок 17Б, кластер 3; 17Д; Приложение А).

3.3.4 При помощи анализа дифференциальной экспрессии было показано преобладающее сходство контрольной дифференцировки (группа CONTR) и дифференцировки с ингибированием сигнального пути Notch (группы SH и DAPT) и их значительное отличие по сравнению с дифференцировкой на фоне активации сигнального пути Notch (группа NICD)

а. Сравнение групп CONTR и NICD

Было проведено сравнение данных РНК секвенирования из групп CONTR (контрольная дифференцировка) и NICD (дифференцировка на фоне активации сигнального пути Notch при помощи оверэкспрессии *NICD*), и было показано, что оверэкспрессия *NICD* в течение первых 7 дней дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны приводила к активации генов, преобладающее большинство которых связано с регуляцией развития нервной системы и спецификацией нейронов (Рисунок 18А, Б; Приложение А).

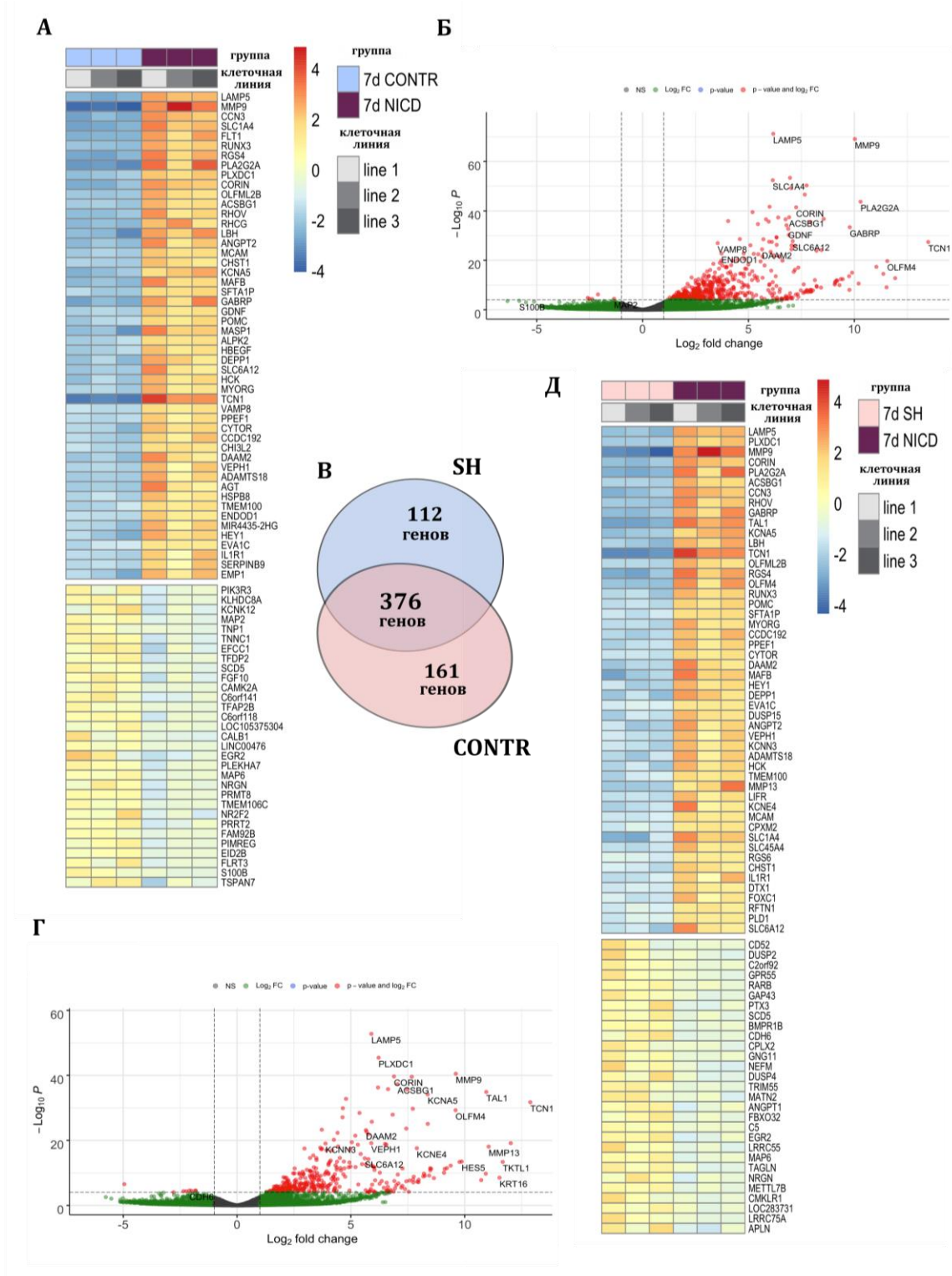


Рисунок 18. Сравнение транскриптомных профилей контрольной дифференцировки (CONTR) с дифференцировкой в условиях гиперэкспрессии NICD (*NICD*) и дифференцировки в условиях нокадауна *RBPJ* (SH) с *NICD*. А). На heat map дифференциально экспрессируемых генов в условиях CONTR и NICD показана повышенная экспрессия *DAAM2*, *ACSBG1*, *CORIN*, *GDNF*, *SLC6A12* и снижение экспрессии *CALB1*, *CAMK2A*, *NRGN*, *PIK3R3*, *MAP2*, *MAP6*, *S100B*, *TSPAN7* в группе NICD, топ 50 генов. Б). Volcano диаграмма дифференциально экспрессируемых генов между группами CONTR и NICD. В). Диаграмма Венна гиперэкспрессированных генов в группе NICD, полученных при сравнении группы NICD с группами SH и CONTR, показывает преобладающее большинство гиперэкспрессированных генов совпадает. Г). Volcano диаграмма дифференциально экспрессируемых генов в условиях SH и NICD показывает увеличение экспрессии *DAAM2*, *ACSBG1*, *VEPH1*, *CORIN* в группе NICD. Д). Heat map дифференциально экспрессируемых генов в условиях SH и NICD, топ 50 генов. [110].

В частности, в группе NICD повышена экспрессия генов, характерных для развития таламуса (*ENDOD1*, *SLC1A4*), спинного мозга (*DAAM2*, *ACSBG1*), тогда как экспрессия маркеров, характерных для пирамидных нейронов (*CALB1*, *MAP2*, *CAMK2A*, *NRGN*), ГАМКергических нейронов (*MAP2*, *CAMK2A*, *MAP6*), интернейронов (*CALB1*, *MAP2*, *CAMK2A*, *NRGN*), а также холинергических нейронов (*CAMK2A*, *PIK3R3*) была снижена.

В группе NICD было обнаружено снижение экспрессии генов *S100B* и *TSPAN7*, которые важны для роста аксонов, а также *MAP6* и *MAP2*, участвующих в стабилизации микротрубочек и специфичных для зрелых нейронов.

Кроме того, в группе NICD было показано увеличение экспрессии *CORIN*. *CORIN* используется в качестве маркера предшественников дофаминергических нейронов. И также была выявлена повышенная экспрессия *GDNF*, который важен для развития дофаминергических нейронов.

В группе NICD была обнаружена повышенная экспрессия нескольких типов ионных каналов: *KCNA5*, гена, кодирующего потенциалзависимый калиевый ионный канал, играющий роль в возбудимости нейронов, высвобождении нейротрансмиттеров и участвующего в регуляции тока калия в кардиомиоцитах предсердий; и рецептора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) типа А (*GABRP*), который является ионным каналом для хлорида и играет важную роль в ингибирующей синаптической передаче.

В NICD группе было выявлено увеличение экспрессии *DAAM2*, активатора Wnt сигнального каскада, а также *VEPH1*, который ингибирует белки SMAD, посредством взаимодействия с рецепторами TGF-бета-рецептора типа 1 (*TGFBR1*).

В группе NICD также была обнаружена повышенная экспрессия *SLC6A12*, транспортера бетаин-ГАМК, который работает в пресинаптических окончаниях, и *VAMP8*, который важен для слияния синаптических везикул с пресинаптической мембраной.

б. Сравнение групп SH и NICD

С помощью метода главных компонент на транскриптомных данных было показано, что группы SH (дифференцировка на фоне ингибирования сигнального пути Notch при помощи shRNA к *RBPJ*) и CONTR (контрольная дифференцировка) сходны (Рисунок 17А). Учитывая это, было предположение, что результаты сравнения групп SH и NICD будут аналогичны результатам сравнения групп CONTR и NICD. Действительно, среди оверэкспрессированных генов в группе NICD, оцененных полученных при сравнении с группой CONTR или при сравнении с группой SH, 376 генов были общими для обоих сравнений (Рисунок 18В). Значительное сходство также сохранялось когда аналогичное сравнение проводилось на выборке топ 50 генов (Приложение Б).

Оверэксперсия NICD характеризовалась повышением экспрессии *ACSBG1*, который играет важную роль в формировании миелиновой оболочки (Рисунок 18Г, Д; Приложение В).

Было обнаружено повышение экспрессии *VEPH1* и снижение экспрессии *CDH6*, которые играют роль в ингибировании сигнальных путей TGF бета и BMP. И повышение экспрессии *DAAM2*, который характерен для спинного мозга и может играть роль в активации сигнальных путей SHH и Wnt.

Кроме того, в группе NICD была показана повышенная экспрессию *CORIN*, который используется как маркер предшественников дофаминергических нейронов [16].

Группа NICD характеризовалась увеличением экспрессии *KCNA5*, *KCNN3* и *KCNE4*, калиевых каналов, играющих роль в высвобождении нейротрансмиттеров, и снижением экспрессии *LRRC55*, белка, который влияет на работу кальций-активируемых и потенциал-зависимых калиевых каналов.

Также в группе NICD была увеличена экспрессия транспортеров бетаина и ГАМК - *SLC1A4* и *SLC6A12*. Но экспрессия *NEFM*, кодирующего белок, ассоциированный с нейрофиламентами, и *MAP6*, кодирующего белок, ассоциированного с микротрубочками, была снижена.

в. Сравнение групп CONTR и SH

Была проанализирована разница между дифференцировкой в контрольных условиях (группа CONTR) и в условиях нокдауна *RBPJ* (группа SH) (Рисунок 19А, Б; Приложение В). В полученных данных не было обнаружено существенных различий между этими двумя группами.

г. Сравнение групп SH и DAPT

Было проведено сравнение эффектов ингибирования Notch на уровне регуляции активности транскрипционных факторов (при помощи нокдауна *RBPJ*) с ингибированием на уровне отщепления внутриклеточного домена при помощи γ -секретазы (при помощи DAPT) (Рисунок 19В, Г; Приложение В).

Было обнаружено, что ингибирование Notch с помощью DAPT характеризуется более высокой экспрессией *PTCH1*, который играет роль в активации SHH сигнального каскада. В группе DAPT также была показана активацию Wnt сигнального каскада и более активное состояние сигнального каскада KRAS. Кроме того, группа DAPT характеризовалась более высокой экспрессией *DEPTOR*, отрицательного регулятора mTOR сигнального каскада.

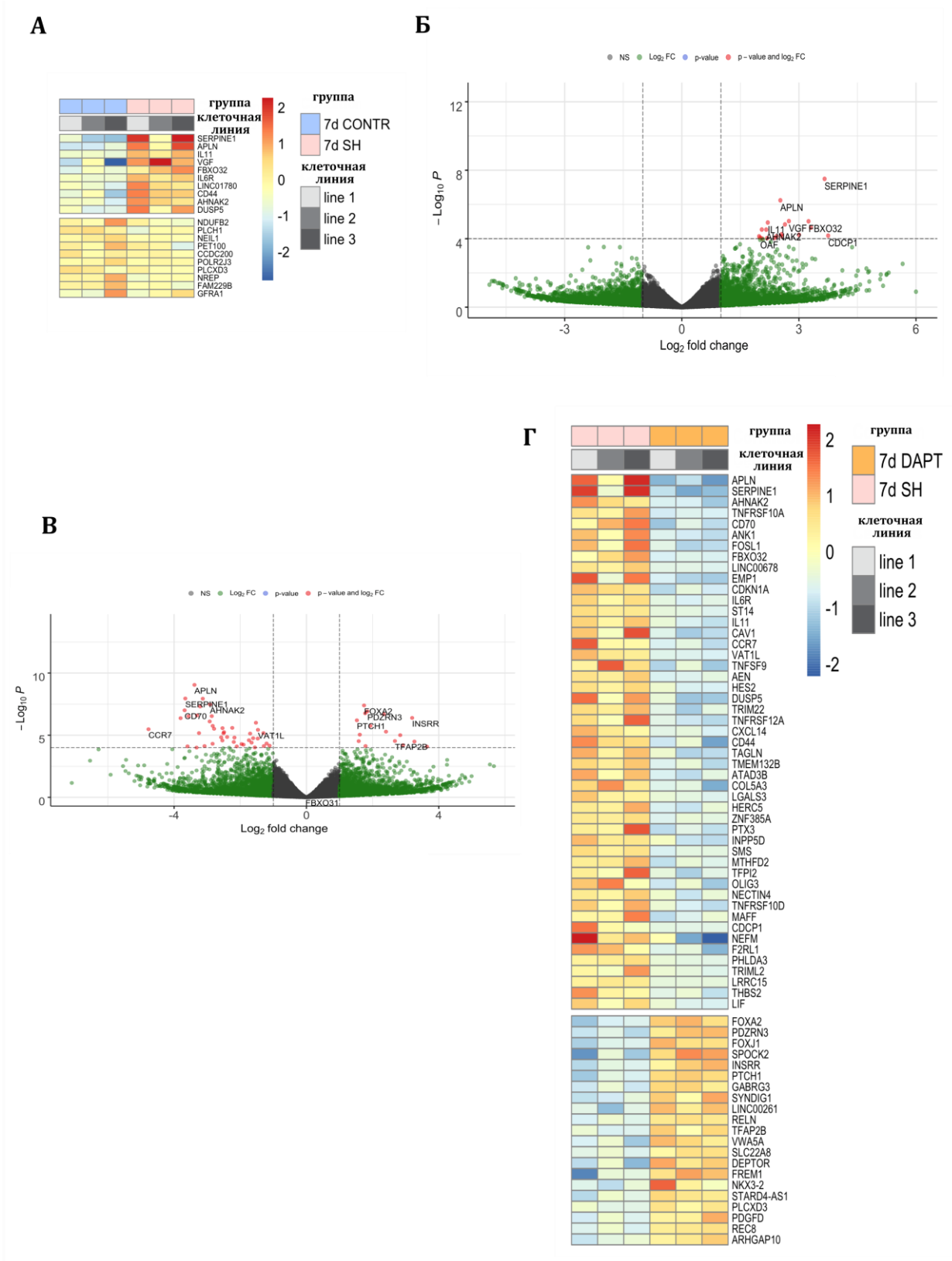


Рисунок 19. Попарное сравнение данных секвенирования РНК контрольной дифференцировки (CONTR) с дифференцировкой в условиях нокдауна *RBPJ* (SH) и группы SH с дифференцировкой в условиях обработки DAPT (DAPT). А). Heat map дифференциально экспрессируемых генов в группах CONTR и SH показывает низкий уровень различий, топ 20 генов. Б). Volcano диаграмма дифференциально экспрессируемых генов между группами CONTR и SH показывает несколько генов с повышенной экспрессией в группе SH. В). Volcano диаграмма дифференциально экспрессируемых генов между группами SH и DAPT показывает повышенную экспрессию *PTCH1*, *FOXA2*, *DEPTOR* в группе DAPT. Г). Heat map дифференциально экспрессируемых генов между группами SH и DAPT, топ 50 генов [110].

Сигнальный путь Notch необходим для развития и функционирования нервной системы, но эффекты влияния на Notch сильно зависят от окружения. Ингибирование сигнального пути Notch в течение первых 7 дней дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны, независимо от метода ингибирования, не оказывает существенного влияния на паттерн экспрессии генов получаемых клеток. В то время как активация Notch приводит к определенному сдвигу дифференцировки в более каудальном направлении из-за усиления экспрессии *ENDOD1*, *DAAM2*, *ACSBG1*, *CORIN* и снижения экспрессии *CAMK2A*, *CALB1*, *NRGN*, а также приводит к снижению экспрессии генов, важных для образования аксонов и дендритов, таких как *S100B* и *TSPAN7* и стабилизации микротрубочек, *MAP2* и *MAP6*.

Заключение

БП – это тяжелое нейродегенеративное заболевание, которое в значительной степени влияет на качество жизни больных. Существующие на данный момент способы лечения БП являются только симптоматическими и поэтому поиск новых подходов является крайне актуальной задачей [1].

Клеточная заместительная терапия, основанная на введении нейрональных прогениторов в стриатум или другие отделы системы базальных ганглиев головного мозга, является одним из новых, разрабатываемых в настоящий момент подходов в области лечения нейродегенеративных заболеваний [2–4]. Создание эффективных и специфических протоколов дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны или их предшественники, а также оптимизация способов трансплантации полученных нейрональных прогениторов являются основополагающими вопросами для разработки данного метода.

В ходе работы были использованы существующие на данном момент протоколы [16], в которые были внесены небольшие изменения, и было показано, что полученные протоколы эффективны для получения дофаминергических нейронов из iPSC человека в условиях *in vitro*. Клетки, полученные на 53 день дифференцировки, имеют характерную для нейронов морфологию, потенциал действия, характерный для нейронов, экспрессируют маркеры зрелых дофаминергических нейронов TH, Lmx1a, MAP2, вырабатывают дофамин.

Система TA была открыта давно, в то время как их рецепторы – TAARs, были впервые описаны только в 2001 году, и к настоящему моменту спектр их функций еще мало изучен [6; 7]. Было показано, что TAARs играют роль в регуляции разных процессов: внимания, питания, движения, настроения. Известно, что изменения в системе TA и TAARs являются составной частью патогенеза целого ряда психических заболеваний, таких как шизофрения, депрессия, наркотическая зависимость и ряда других [8–10]. Последнее время, появились предположения о взаимосвязи системы TA и TAARs и регуляции нейрогенеза [12].

В ходе работы было оценено число дофаминергических нейронов у TAAR5-KO и WT мышей и показано, что TAAR5-KO мыши имеют повышенное число дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга, а именно в ее компактной и латеральной частях. Была оценена экспрессия нейрональных факторов роста *GDNF*, *BDNF*, *CDNF* в различных отделах мозга TAAR2-KO, TAAR5-KO и WT мышей, и показано, что в стриатуме TAAR5-KO мышей повышен уровень экспрессии *GDNF*, фактора, необходимого для созревания дофаминергических нейронов, а у TAAR2-KO мышей повышен уровень экспрессии фактора

BDNF в стриатуме. Как и *GDNF*, *BDNF* является фактором, играющим важную роль в развитии нейронов и дофаминергических нейронов в частности.

Эти обнаружения в совокупности с другими данными, полученными коллективом Лаборатории Нейробиологии и Молекулярной Фармакологии Института Трансляционной Биомедицины Санкт-Петербургского Государственного Университета [11–13], позволили сделать вывод о том, что *TAARs*, в частности *TAAR2* и *TAAR5* имеют важное значение для нейрогенеза и нейрогенеза конкретно дофаминергических нейронов.

Используя данные РНК секвенирования, полученные из открытых баз данных [111–115], была проанализирована экспрессия различных видов *TAARs* в нейрогенных зонах, в частности в гиппокампе, и показано, что в гиппокампе мыши обнаруживается низкий уровень экспрессии *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4* и *Taar5*. Данные секвенирования РНК единичных клеток показали, что в клетках нейрональной природы, входящих в состав гиппокампа мыши, обнаруживается низкий уровень экспрессии *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4*, *Taar 5*, *Taar7b*, *Taar8a* и *Taar8c*, а экспрессия *Taar7a*, *Taar7d*, *Taar7e* и *Taar9* преимущественно обнаруживается в глиальных клетках.

Чтобы оценить вклад *TAARs* в развитие дофаминергических нейронов, была проанализирована экспрессия *TAARs* на разных стадиях дифференцировки и ПСК человека в дофаминергические нейроны [5; 61; 117–119]. Было показано, что в недифференцированных и ПСК человека экспрессия *TAARs* преимущественно не обнаруживается. Однако по ходу дифференцировки, начиная с 16 дня, появляется экспрессия некоторых *TAARs*, в частности *TAAR5*, *TAAR6*, *TAAR8* и *TAAR1*, которая становится максимальной к более поздним этапам.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что *TAARs* играют роль в нейрогенезе и нокаут *TAAR2* или *TAAR5* приводит к изменениям в дофаминергической системе, *TAARs* экспрессируются в нейрогенных зонах, в частности в гиппокаме мыши, и паттерн экспрессии *TAARs* меняется в ходе дифференцировки и ПСК человека в дофаминергические нейроны. Можно сделать вывод о том, что полученные данные являются перспективными для дальнейшего исследования, и работа в данном направлении уже идет, в первую очередь с целью оценить, насколько нокаут по *TAARs* будет влиять на выживание и эффективность интеграции дофаминергических предшественников при введении их в стриатум животных.

Сигнальный путь *Notch* играет существенную роль в эмбриональном развитии центральной нервной системы, где он принимает участие в регуляции клеточной миграции, контролирует баланс между самообновлением и дифференцировкой, важен для поддержания роста аксонов и дендритов, влияет на синаптическую пластичность и на регуляцию гибели нейронов [18–20], а также постнатально, где *Notch* важен для поддержания пула стволовых клеток, играет роль в регуляции пролиферации и дифференцировки [98], важен для

функционирования зон нейрогенеза взрослых, а также имеет решающее значение для активации латентных нейрогенных программ [21; 25].

Известно, что при нейрональной дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток белки сигнального пути Notch необходимы для роста нейронов и играют роль в спецификации и регионализации дифференцирующихся клеток [98], что потенциально может быть использовано для разработки протоколов получения клеток в рамках создания методов клеточной заместительной терапии. Но эффекты от влияния на сигнальный путь Notch не всегда однозначны, они чрезвычайно зависят от клеточного контекста и от состояния других сигнальных каскадов, с которыми взаимодействует Notch.

В работе было проанализировано, как активация и ингибирование сигнального пути Notch влияют на ранние стадии дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны. Было показано, что ингибирование сигнального пути Notch, независимо от метода ингибирования – с использованием ингибитора γ -секретазы DAPT или shRNA к *RBPJ* - не оказывает существенного влияния на ранние стадии дифференцировки иПСК человека в дофаминергические нейроны.

Наоборот, активация сигнального пути Notch за счет оверэкспрессии NICD на ранних этапах оказывает выраженное влияние на дифференцировку. Как было показано ранее, при дифференцировке сфероидов в нейроны Notch играет роль в регионализации полученных клеток, поэтому ингибирование передачи сигналов Notch с помощью DAPT способствует более высокой экспрессии маркеров, характерных для отделов переднего мозга [24]. На основании данных, полученных в ходе данной работы, можно сделать вывод о том, что активация Notch приводит к обратному эффекту. Полученные в ходе работы результаты указывают на то, что активация Notch приводит к снижению экспрессии генов *CALB1*, *CAMK2A*, *NRGN*, *PIK3R3*, характерных для пирамидных нейронов, ГАМК-интернейронов и холинергических нейронов, и в то же время приводит к повышению экспрессии таких генов, как *DAAM2*, *ACSBG1*, экспрессия которых типична для каудальных отделов мозга, в частности, для спинного мозга.

Также были получены результаты, что оверэкспрессия NICD увеличивает экспрессию гена *CORIN*, кодирующего сериновую протеазу, которая экспрессируется во время развития мозга и, как было описано ранее, при дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток может служить маркером предшественников дофаминергических нейронов [16]. Кроме того, была обнаружена повышенная экспрессия *GDNF*, который способствует выживанию и дифференцировке дофаминергических нейронов.

Известно, что Notch необходим для формирования аксонов и дендритов *in vivo* [22] и *in vitro* [23]. Полученные данные показывают, что оверэкспрессия NICD приводит к подавлению экспрессии генов *S100B* и *TSPAN7*, которые играют в этом процессе важную роль.

Было показано, что сверхэкспрессия NICD увеличивает экспрессию некоторых типов калиевых каналов, таких как *KCNA5*, а также *KCNN3* и *KCNE4*. Это было неожиданное открытие, поскольку передача сигналов Notch (через RBPJ) в кардиомиоцитах ранее была связана с подавлением калиевых каналов [121] и ослаблением токов калия в целых клетках [122; 123]. Так что эти данные могут указывать на то, что сверхэкспрессия NICD оказывает разные эффекты в кардиомиоцитах и нейронах, и это подтверждает описанную ранее контекстную специфичность сигнального пути Notch [124].

Сверхэкспрессия NICD также приводит к снижению экспрессии *NEFM*, который кодирует белок, связанный с нейрофиламентами, а также *MAP6* и *MAP2*, которые участвуют в стабилизации микротрубочек.

Таким образом, хотя сигнальный путь Notch необходим для развития и функционирования нервной системы, эффекты модуляции передачи сигналов Notch сильно зависят от клеточного окружения. На основании полученных в данной работе результатов можно сделать вывод о том, что ранние стадии дифференцировки и ПСК человека в дофаминергические нейроны не чувствительны к ингибированию сигнального пути Notch. В то время как активация Notch приводит к некоторому каудальному сдвигу дифференцировки, усилению экспрессии маркеров, специфичных для предшественников дофаминергических нейронов, и снижению экспрессии генов, которые важны для образования аксонов и дендритов, а также белков, стабилизирующих микротрубочки.

В результате проведенных исследований в соответствии с поставленными задачами были сделаны изложенные ниже выводы:

Выводы

1. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, оказывают влияние на нейрогенез у мышей: нокауты по TAAR5 имеют повышенное число дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга и повышенный уровень экспрессии GDNF в стриатуме, нокауты по TAAR2 имеют повышенный уровень BDNF в стриатуме.

2. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, экспрессируются в нейрональных и глиальных клетках гиппокампа мыши.

3. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, экспрессируются на разных этапах дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны.

4. Ингибирование сигнального пути Notch не оказывает значительного влияния на ранние этапы дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны.

5. Ингибирование сигнального пути Notch на ранних этапах дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны на уровне регуляции активности транскрипционных факторов и на уровне отщепления внутриклеточного домена при помощи γ -секретазы имеет минимальные отличия.

6. Активация сигнального пути Notch на ранних этапах дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны в значительной степени влияет на паттерн экспрессии генов, которые играют важную роль в развитии нервной системы и спецификации нейронов, важны для развития дофаминергических нейронов, принимают участие в регуляции роста аксонов и дендритов, и генов, которые влияют на стабилизацию микротрубочек.

Публикации и апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 15 работ: 6 научных статей и 1 обзор в журналах, индексируемых системами WoS и/или Scopus, 1 глава в книге и 7 тезисов в материалах международных конференций.

Основные положения и научные итоги диссертации были изложены в докладах на научных конференциях: V Национальный конгресс по регенеративной медицине, Москва, Россия, 23 – 25 ноября 2022; Nectar2022 32nd Annual meeting of the Network for European CNS Transplantation and Restoration, Афины, Греция, 24 – 26 октября 2022; ISSCR 2022 Annual Meeting, Сан-Франциско, США, 15 – 18 июня 2022 (онлайн); 33st ECNP Congress Hybrid, Лиссабон, Португалия, 2 - 5 октября 2021 (онлайн); 32st ECNP Congress, Копенгаген, Дания, 7 - 10 сентября 2019.

Список статей, опубликованных в журналах, индексируемых системами WoS и/или Scopus:

1. **Katolikova N.V.**, Khudiakov A.A., Shafranskaya D.D., Prjibelski A.D., Masharskiy A.E., Mor M.S., Golovkin A.S., Zaytseva A.K., Neganova I.E., Efimova E.V., Gainetdinov R.R., Malashicheva A.B. Modulation of Notch Signaling at Early Stages of Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Dopaminergic Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(2):1429. <https://doi.org/10.3390/ijms24021429>

2. **Katolikova N.V.**, Vaganova A.N., Efimova E.V., Gainetdinov R.R. Expression of Trace Amine-Associated Receptors in the Murine and Human Hippocampus Based on Public Transcriptomic Data. *Cells* 2022, 11, 1813. <https://doi.org/10.3390/cells11111813>

3. Efimova E.V., Kuvarzin S.R., Mor M.S., **Katolikova N.V.**, Shemiakova T.S., Razenkova V., Ptukha M., Kozlova A.A., Murtazina R.Z., Smirnova D., Veshchitskii A.A., Merkulyeva N.S., Volnova A.B., Musienko P.E., Korzhevskii D.E., Budygin E.A. and Gainetdinov R.R. (2022) Trace Amine-Associated Receptor 2 Is Expressed in the Limbic Brain Areas and Is Involved in Dopamine Regulation and Adult Neurogenesis, *Front. Behav. Neurosci.*, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.847410>

4. Efimova E.V., **Katolikova N.V.**, Kanov E.V. & Gainetdinov R.R. (2022). Trace amine-associated receptors at the cross-road between innate olfaction of amines, emotions, and adult

neurogenesis. *Neural regeneration research*, 17(6), 1257–1258. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.327338>

5. Vaganova A.N., Murtazina R.Z., Shemyakova T.S., Prjibelski A.D., **Katolikova N.V.**, Gainetdinov R.R. Pattern of TAAR5 Expression in the Human Brain Based on Transcriptome Datasets Analysis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8802. Published 2021 Aug 16. doi:10.3390/ijms22168802 DOI: 10.3390/ijms22168802 https://doi.org/10.1007/978-3-030-57401-7_51

6. Efimova E.V., Kozlova A.A., Razenkova V., **Katolikova N.V.**, Antonova K.A., Sotnikova T.D., Merkulyeva N.S., Veshchitskii A.S., Kalinina D.S., Korzhevskii D.E., Musienko P.E., Kanov E.V., Gainetdinov R.R. Increased dopamine transmission and adult neurogenesis in trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) knockout mice. *Neuropharmacology.* 2020 Oct 24;182:108373. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108373. Epub ahead of print. PMID: 33132188.

Обзор, опубликованный в журнале, индексируемых системами WoS и/или Scopus:

7. **Katolikova, N.V.**, Malashicheva, A.B. & Gainetdinov, R.R. Cell Replacement Therapy in Parkinson’s Disease—History of Development and Prospects for Use in Clinical Practice. *Mol Biol* 54, 827–839 (2020). <https://doi.org/10.1134/S0026893320060060>

Глава в книге:

8. **Katolikova N.**, Gainetdinov R.R. (2021) Dopamine System. In: Offermanns S., Rosenthal W. (eds) *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57401-7_51

Список тезисов в материалах международных конференций:

9. **Католикова Н. В.**, Шафранская Д. Д., Пржибельский А. Д., Гайнетдинов Р.Р., Малашичева А.Б. Оценка эффектов ингибирования сигнального каскада Notch на дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в предшественники дофаминергических нейронов. *Гены и Клетки.* **2022.** Т. 17. № 3. - С. 104. – EDN GXYESO.

10. **Katolikova N. V.**, Shafranskaya D. D., Prjibelski A. D., Efimova E. V., Malashicheva A. B., Gainetdinov R. R. The inhibition and activation of Notch signaling upon differentiation of

human induced pluripotent stem cells to dopaminergic precursors. Nectar meeting, 24 – 26 October **2022**, Athens, Greece

11. **Katolikova N. V.**, Shafranskaya D. D., Prjibelski A. D., Vaganova A. N., Efimova E. V., Gainetdinov R. R. Trace amine-associated receptors in human induced pluripotent stem cells and in their differentiation to dopaminergic neurons. Hydra summer school, 13-20 September **2022**, Hydra, Greece

12. **Katolikova N. V.**, Shafranskaya D. D., Prjibelski A. D., Mor M., Zaytseva A. K., Vaganova A. N., Efimova E. V., Gainetdinov R. R. The role of trace amine receptors in differentiation of human induced pluripotent stem cells to dopaminergic neurons, ISSCR Annual Meeting, 15 – 18 June **2022**, San Francisco + virtual, USA

13. **Katolikova N.**, Efimova E.V., Vaganova A.N., Malashicheva A.B., Gainetdinov R.R., P.0510 The role of trace amine receptors in the differentiation of dopaminergic neurons from human pluripotent stem cells in vitro, 33st ECNP Congress Hybrid 2-5 October **2021**, Lisbon, Portugal

14. Vaganova A.N., **Katolikova N.V.**, Gainetdinov R.R., P.0246 Transcriptomic analysis of trace amine-associated receptors (taars) mRNA expression in the neurons of olfactory bulb of model animals, 33st ECNP Congress Hybrid 2-5 October **2021**, Lisbon, Portugal

15. Efimova, E., **Katolikova, N.**, Kozlova, A., Antonova, K., Murtazina, R., Merkulyeva, N., Gainetdinov, R. (2019). P.123 The role of trace amine associated receptor 5 (TAAR5) in mouse behavior and brain neurochemistry. 32st ECNP Congress 7-10 September **2019**, Copenhagen, Denmark

Список литературы

1. Katolikova N.V., Malashicheva A.B., Gainetdinov R.R. Cell Replacement Therapy in Parkinson's Disease—History of Development and Prospects for Use in Clinical Practice//*Molecular Biology*, 2020, T. 54, N 6, C. 827-839.
2. Tomishima M., Kirkeby A. Bringing Advanced Therapies for Parkinson's Disease to the Clinic: The Scientist's Perspective//*Journal of Parkinson's Disease*, 2021, Vol. 11, Bringing Advanced Therapies for Parkinson's Disease to the Clinic, No. s2, P. S135-S140.
3. Barker R.A. Designing stem-cell-based dopamine cell replacement trials for Parkinson's disease//*Nature Medicine*, 2019, T. 25, N 7, C. 1045-1053.
4. Takahashi J., Price-Evans A. Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson's disease: An interview with Jun Takahashi//*Regenerative Medicine*, 2019, T. 14, N 2, C. 93-95.
5. Kim T.W., Piao J., Koo S.Y., Kriks S., Chung S.Y., Betel D., Socci N.D., Choi S.J., Zabierowski S., Dubose B.N., Hill E.J., Mosharov E.V., Irion S., Tomishima M.J., Tabar V., Studer L. Biphasic Activation of WNT Signaling Facilitates the Derivation of Midbrain Dopamine Neurons from hESCs for Translational Use//*Cell Stem Cell*, 2021, Vol. 28, No. 2, P. 343-355.e5.
6. Gainetdinov R.R., Hoener M.C., Berry M.D. Trace Amines and Their Receptors.//*Pharmacological reviews*, 2018, T. 70, N 3, C. 549-620.
7. Berry M.D. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators//*Journal of Neurochemistry*, 2004, Vol. 90, No. 2, P. 257-271.
8. Schwartz M.D., Canales J.J., Zucchi R., Espinoza S., Sukhanov I., Gainetdinov R.R. Trace amine-associated receptor 1: a multimodal therapeutic target for neuropsychiatric diseases//*Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2018, Vol. 22, Trace amine-associated receptor 1, No. 6, P. 513-526.
9. Rutigliano G., Zucchi R. Molecular Variants in Human Trace Amine-Associated Receptors and Their Implications in Mental and Metabolic Disorders//*Cellular and Molecular Neurobiology*, 2020, Vol. 40, No. 2, P. 239-255.
10. Revel F.G., Moreau J.-L., Pouzet B., Mory R., Bradaia A., Buchy D., Metzler V., Chaboz S., Groebke Zbinden K., Galley G., Norcross R.D., Tuerck D., Bruns A., Morairty S.R., Kilduff T.S., Wallace T.L., Risterucci C., Wettstein J.G., Hoener M.C. A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight//*Molecular Psychiatry*, 2013, Vol. 18, A new perspective for schizophrenia, No. 5, P. 543-556.
11. Efimova E.V., Kozlova A.A., Razenkova V., Katolikova N.V., Antonova K.A., Sotnikova T.D., Merkul'yeva N.S., Veshchitskii A.S., Kalinina D.S., Korzhevskii D.E., Musienko P.E., Kanov E.V., Gainetdinov R.R. Increased dopamine transmission and adult neurogenesis in trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) knockout mice//*Neuropharmacology*, 2021, T. 182, N September 2020, C. 108373.
12. Efimova E.V., Katolikova N.V., Kanov E.V., Gainetdinov R.R. Trace amine-associated receptors at the cross-road between innate olfaction of amines, emotions, and adult neurogenesis//*Neural Regen Res.*, 2022, Jun;17(6):1257-1258. doi: 10.4103/1673-5374.327338. PMID: 34782562; PMCID: PMC8643037.
13. Efimova E.V., Kuvarzin S.R., Mor M.S., Katolikova N.V., Shemiakova T.S., Razenkova V., Ptukha M., Kozlova A.A., Murtazina R.Z., Smirnova D., Veshchitskii A.A., Merkul'yeva N.S., Volnova A.B., Musienko P.E., Korzhevskii D.E., Budygin E.A., Gainetdinov R.R. Trace Amine-Associated Receptor 2 Is Expressed in the Limbic Brain Areas and Is Involved in Dopamine Regulation and Adult Neurogenesis//*Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2022, Vol. 16, P. 847410.
14. Vaganova A.N., Murtazina R.Z., Shemyakova T.S., Prjibelski A.D., Katolikova N.V., Gainetdinov

- R.R. Pattern of TAAR5 Expression in the Human Brain Based on Transcriptome Datasets Analysis//International Journal of Molecular Sciences, 2021, Vol. 22, No. 16, P. 8802.
15. Chambers S.M., Fasano C.A., Papapetrou E.P., Tomishima M., Sadelain M., Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling//Nature Biotechnology, 2009, T. 27, N 3, C. 275-280.
 16. Doi D., Samata B., Katsukawa M., Kikuchi T., Morizane A., Ono Y., Sekiguchi K., Nakagawa M., Parmar M., Takahashi J. Isolation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitors by Cell Sorting for Successful Transplantation//Stem Cell Reports, 2014, Vol. 2, No. 3, P. 337-350.
 17. Nolbrant S., Heuer A., Parmar M., Kirkeby A. Generation of high-purity human ventral midbrain dopaminergic progenitors for in vitro maturation and intracerebral transplantation//Nature Protocols, 2017, T. 12, N 9, C. 1962-1979.
 18. Son A.I., Mohammad S., Sasaki T., Ishii S., Yamashita S., Hashimoto-Torii K., Torii M. Dual Role of Rbpj in the Maintenance of Neural Progenitor Cells and Neuronal Migration in Cortical Development//Cerebral Cortex, 2020, Vol. 30, No. 12, P. 6444-6457.
 19. Stump G., Durrer A., Klein A.-L., Lütolf S., Suter U., Taylor V. Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain//Mechanisms of Development, 2002, Vol. 114, No. 1-2, P. 153-159.
 20. Zhang R., Engler A., Taylor V. Notch: an interactive player in neurogenesis and disease//Cell and Tissue Research, 2018, Vol. 371, Notch, No. 1, P. 73-89.
 21. Magnusson J.P., Goritz C., Tatarishvili J., Dias D.O., Smith E.M.K., Lindvall O., Kokaia Z., Frisen J. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse//Science, 2014, T. 346, N 6206, C. 237-241.
 22. Redmond L., Oh S.-R., Hicks C., Weinmaster G., Ghosh A. Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development//Nature Neuroscience, 2000, Vol. 3, No. 1, P. 30-40.
 23. Kang X., Zhang Z.-P., Song C.-G., Liu L., Zhao Y., Du J.-L., Lai Y.-B., Cao X.-L., Ye W.-M., Zhang Y.-F., Zheng M.-H., Zeng Y.-H., Sun X.-L., Wu S.-X., Gao F. γ -secretase inhibitor disturbs the morphological development of differentiating neurons through affecting Notch/miR-342-5p//Neuroscience Letters, 2022, Vol. 778, P. 136603.
 24. Bejoy J., Bijonowski B., Marzano M., Jeske R., Ma T., Li Y. Wnt-Notch Signaling Interactions During Neural and Astroglial Patterning of Human Stem Cells//Tissue engineering. Part A, 2020, T. 26, N 7-8, C. 419-431.
 25. Qi Y., Zhang X.-J., Renier N., Wu Z., Atkin T., Sun Z., Ozair M.Z., Tchieu J., Zimmer B., Fattahi F., Ganat Y., Azevedo R., Zeltner N., Brivanlou A.H., Karayiorgou M., Gogos J., Tomishima M., Tessier-Lavigne M., Shi S.-H., Studer L. Combined small-molecule inhibition accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells//Nature biotechnology, 2017, T. 35, N 2, C. 154-163.
 26. Katolikova N., Gainetdinov R.R. Dopamine System//Encyclopedia of Molecular Pharmacology/ ред. S. Offermanns, W. Rosenthal Citation Key: Katolikova2020. – Cham: Springer International Publishing, 2020. – C. 1-7.
 27. Olson L., Seiger A. Brain Tissue Transplanted to the Anterior Chamber of the Eye 1. Fluorescence Histochemistry of Immature Catecholamine and 5-Hydroxy-tryptamine Neurons Reinnervating the Rat Iris*//Z. Zellforsch, 1972, T. 135, C. 175-194.
 28. Das G.D., Altman J. Transplanted Precursors of Nerve Cells: Their Fate in the Cerebellums of Young Rats//Science, 1971, Vol. 173, Transplanted Precursors of Nerve Cells, No. 3997, P. 637-638.
 29. Gage FH, Björklund A, Stenevi U D.SB. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. VIII. Survival and growth of implants of nigral and septal cell suspensions in intact brains of aged rats//Acta Physiol Scand Suppl., 1983, N 522, C. 67-75.
 30. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants : /pyk. Björklund A., Stenevi U., 1979. - 555 c.
 31. Brundin P., Isacson O., Björklund A. Monitoring of cell viability in suspensions of embryonic

- CNS tissue and its use as a criterion for intracerebral graft survival//Brain Research, 1985, T. 331, N 2, C. 251-259.
32. Brundin P., Strecker R.E., Widner H., Clarke D.J., Nilsson O.G., Åstedt B., Lindvall O., Björklund A. Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release//Experimental Brain Research, 1988, T. 70, N 1, C. 192-208.
 33. Experimental Brain Research Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease* : /pyк. Brundin P., Nilsson O.G., Strecker R.E., Lindvall O., Åstedt B., Björklund A., 1986. - 235-240 c.
 34. Björklund A., Schmidt R.H., Stenevi U. Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra//Cell and Tissue Research, 1980, T. 212, N 1, C. 39-45.
 35. Human Fetal Dopamine Neurons Grafted Into the Striatum in Two Patients With Severe Parkinson's Disease A Detailed Account of Methodology and a 6-Month Follow-up : /pyк. Lindvall O., Rehnström S., Brundin P., Björklund A., Ångström B., Widner H., Lindholm T., Rehnström A., Leenders K.L., Rothwell J.C., Frackowiak R., David Marsden ; C, Johnels B., Gellera J., Rastogi A., Freedman R., Hoffer B.J., Kessler K., Bygdeman M., Strömberg L., Olson L.
 36. Urt F Reed C.R., Aul G Reene P.E., Obert B Reeze R.E., -y Ann T Sai W.E., Illiam U M Ouchel W.D., Ichard Ao R.K., Andra Illon S.D., Oward Infield H.W., Haron Ulver S.C., Ohn T Rojanowski J.Q., Avid Idelberg D.E., Tanley Ahn S.F. The New Eng land Jour nal of Medicine TRANSPLANTATION OF EMBRYONIC DOPAMINE NEURONS FOR SEVERE PARKINSON'S DISEASE A BSTRACT Background Transplantation of human embryonic//N Engl J Med, 2001, T. 344, N 10, C. 710-9.
 37. Olanow C.W., Goetz C.G., Kordower J.H., Stoessl A.J., Sossi V., Brin M.F., Shannon K.M., Nauert G.M., Perl D.P., Godbold J., Freeman T.B. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease//Annals of Neurology, 2003, T. 54, N 3, C. 403-414.
 38. Lindvall O., Björklund A. Cell therapy in Parkinson's disease//NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2004, T. 1, N 4, C. 382-93.
 39. Kefalopoulou Z., Politis M., Piccini P., Mencacci N., Bhatia K., Jahanshahi M., Widner H., Rehnström S., Brundin P., Björklund A., Lindvall O., Limousin P., Quinn N., Foltynie T. Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports//JAMA neurology, 2014, T. 71, N 1, C. 83-7.
 40. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts//Science, 1998, T. 282, N 5391, C. 1145-1147.
 41. Thomson J.A., Odorico J.S. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines//Trends in Biotechnology, 2000, Vol. 18, No. 2, P. 53-57.
 42. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors//Cell, 2006, T. 126, N 4, C. 663-676.
 43. G Bain , D Kitchens, M Yao, J E Huettner D.I.G. Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties in Vitro//Dev Biol, 1995, T. 168 (2), C. 342-57.
 44. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro : /pyк. Okabe S., Forsberg-Nilsson K., Spiro A.C., Segal M., McKay R.D.G., 1996. - 89-102 c.
 45. Reubinoff B.E., Itsykson P., Turetsky T., Pera M.F., Reinhartz E., Itzik A., Ben-Hur T. Neural progenitors from human embryonic stem cells//Nature Biotechnology, 2001, T. 19, N 12, C. 1134-1140.
 46. Zhang S.C., Wernig M., Duncan I.D., Brüstle O., Thomson J.A. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells//Nature Biotechnology, 2001, T. 19, N 12, C. 1129-1133.
 47. Qi-Long Ying, Austin G Smith Defined Conditions for Neural Commitment and

- Differentiation//Methods Enzymol, 2003, T. 365, C. 327-41.
48. Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers.//Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 2000, T. 6, N 2, C. 88-95.
 49. Hemmati-Brivanlou A., Kelly O.G., Melton D.A. Follistatin, an Antagonist of Activin, Is Expressed in the Spemann Organizer and Displays Direct Neuralizing Activity//Cell, 1994, T. 77, C. 283-295.
 50. Sasai Y., Lu B., Steinbeisser H., Geissert D., Gont L.K., De Robertis E.M. Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes.//Cell, 1994, T. 79, N 5, C. 779-90.
 51. Smith W.C., Harland R.M. Expression Cloning of noggin, a New Dorsalizing Factor Localized to the Spemann Organizer in Xenopus Embryos//Cell, 1992, T. 70 (5), C. 829-840.
 52. Smith J.R., Vallier L., Lupo G., Alexander M., Harris W.A., Pedersen R.A. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm//Developmental Biology, 2008, T. 313, N 1, C. 107-117.
 53. Ruiz i Altaba A., Nguyễn V., Palma V. The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code//Current Opinion in Genetics & Development, 2003, Vol. 13, The emergent design of the neural tube, No. 5, P. 513-521.
 54. Ribes V., Briscoe J. Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning: The Role of Negative Feedback//Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2009, Vol. 1, Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning, No. 2, P. a002014-a002014.
 55. Murdoch J.N., Copp A.J. The relationship between Sonic hedgehog signalling, cilia and neural tube defects, 2013, P. 36.
 56. Mizuseki K., Sakamoto T., Watanabe K., Muguruma K., Ikeya M., Nishiyama A., Arakawa A., Suemori H., Nakatsuji N., Kawasaki H., Murakami F., Sasai Y. Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, Vol. 100, No. 10, P. 5828-5833.
 57. Briscoe J., Ericson J. The specification of neuronal identity by graded sonic hedgehog signalling//Seminars in Cell & Developmental Biology, 1999, Vol. 10, No. 3, P. 353-362.
 58. MacDonald B.T., Tamai K., He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases//Developmental Cell, 2009, Vol. 17, Wnt/ β -Catenin Signaling, No. 1, P. 9-26.
 59. Yan W., Wu F., Morser J., Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a proatrial natriuretic peptide-converting enzyme//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 15, P. 8525-8529.
 60. Ono Y., Nakatani T., Sakamoto Y., Mizuhara E., Minaki Y., Kumai M., Hamaguchi A., Nishimura M., Inoue Y., Hayashi H., Takahashi J., Imai T. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells//Development, 2007, Vol. 134, Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location, No. 17, P. 3213-3225.
 61. Kirkeby A., Nolbrant S., Tiklova K., Heuer A., Kee N., Cardoso T., Ottosson D.R., Lelos M.J., Rifés P., Dunnett S.B., Grealish S., Perlmann T., Parmar M. Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease.//Cell stem cell, 2017, T. 20, N 1, C. 135-148.
 62. Takahashi J. Preclinical evaluation of patient-derived cells shows promise for Parkinson's disease//Journal of Clinical Investigation, 2020.
 63. Piao J., Zabierowski S., Dubose B.N., Hill E.J., Navare M., Claros N., Rosen S., Ramnarine K., Horn C., Fredrickson C., Wong K., Safford B., Kriks S., El Maarouf A., Rutishauser U., Henchcliffe C., Wang Y., Riviere I., Mann S., Bermudez V., Irion S., Studer L., Tomishima M., Tabar V. Preclinical Efficacy and Safety of a Human Embryonic Stem Cell-Derived Midbrain

- Dopamine Progenitor Product, MSK-DA01//Cell Stem Cell, 2021, Vol. 28, No. 2, P. 217-229.e7.
64. Borowsky B., Adham N., Jones K.A., Raddatz R., Artymyshyn R., Ogozalek K.L., Durkin M.M., Lakhilani P.P., Bonini J.A., Pathirana S., Boyle N., Pu X., Kouranova E., Lichtblau H., Ochoa F.Y., Branchek T.A., Gerald C. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, Vol. 98, Trace amines, No. 16, P. 8966-8971.
 65. Bunzow J.R., Sonders M.S., Arttamangkul S., Harrison L.M., Zhang G., Quigley D.I., Darland T., Suchland K.L., Pasumamula S., Kennedy J.L., Olson S.B., Magenis R.E., Amara S.G., Grandy D.K. Amphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, Lysergic Acid Diethylamide, and Metabolites of the Catecholamine Neurotransmitters Are Agonists of a Rat Trace Amine Receptor//Molecular Pharmacology, 2001, Vol. 60, No. 6, P. 1181-1188.
 66. Berry M.D., Shitut M.R., Almousa A., Alcorn J., Tomberli B. Membrane permeability of trace amines: Evidence for a regulated, activity-dependent, nonexocytotic, synaptic release: Trace Amine Membrane Permeability//Synapse, 2013, Vol. 67, Membrane permeability of trace amines, No. 10, P. 656-667.
 67. Starratt A.N., Bodnaryk R.P. Stereoisomeric identity of octopamine in the central nervous system of invertebrates//Insect Biochemistry, 1981, Vol. 11, No. 6, P. 645-648.
 68. Grandy D.K. Trace amine-associated receptor 1—Family archetype or iconoclast?//Pharmacology & Therapeutics, 2007, Vol. 116, No. 3, P. 355-390.
 69. Lindemann L., Meyer C.A., Jeanneau K., Bradaia A., Ozmen L., Bluethmann H., Bettler B., Wettstein J.G., Borroni E., Moreau J.-L., Hoener M.C. Trace Amine-Associated Receptor 1 Modulates Dopaminergic Activity//Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2008, Vol. 324, No. 3, P. 948-956.
 70. Espinoza S., Ghisi V., Emanuele M., Leo D., Sukhanov I., Sotnikova T.D., Chierigatti E., Gainetdinov R.R. Postsynaptic D2 dopamine receptor supersensitivity in the striatum of mice lacking TAAR1//Neuropharmacology, 2015, Vol. 93, P. 308-313.
 71. Bradaia A., Trube G., Stalder H., Norcross R.D., Ozmen L., Wettstein J.G., Pinard A., Buchy D., Gassmann M., Hoener M.C., Bettler B. The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, Vol. 106, No. 47, P. 20081-20086.
 72. Revel F.G., Moreau J.-L., Gainetdinov R.R., Bradaia A., Sotnikova T.D., Mory R., Durkin S., Zbinden K.G., Norcross R., Meyer C.A., Metzler V., Chaboz S., Ozmen L., Trube G., Pouzet B., Bettler B., Caron M.G., Wettstein J.G., Hoener M.C. TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, Vol. 108, No. 20, P. 8485-8490.
 73. Leo D., Targa G., Espinoza S., Villers A., Gainetdinov R.R., Ris L. Trace Amine Associate Receptor 1 (TAAR1) as a New Target for the Treatment of Cognitive Dysfunction in Alzheimer's Disease//International Journal of Molecular Sciences, 2022, Vol. 23, No. 14, P. 7811.
 74. Wu R., Liu J., Li J.-X. Trace amine-associated receptor 1 and drug abuse//Advances in Pharmacology. Elsevier, 2022. Vol. 93. P. 373-401.
 75. Dedic N., Dworak H., Zeni C., Rutigliano G., Howes O.D. Therapeutic Potential of TAAR1 Agonists in Schizophrenia: Evidence from Preclinical Models and Clinical Studies//International Journal of Molecular Sciences, 2021, Vol. 22, Therapeutic Potential of TAAR1 Agonists in Schizophrenia, No. 24, P. 13185.
 76. Sotnikova T.D., Zorina O.I., Ghisi V., Caron M.G., Gainetdinov R.R. Trace amine associated receptor 1 and movement control//Parkinsonism & Related Disorders, 2008, Vol. 14, P. S99-S102.
 77. Sotnikova T.D., Caron M.G., Gainetdinov R.R. Trace Amine-Associated Receptors as Emerging

- Therapeutic Targets//Molecular Pharmacology, 2009, Vol. 76, No. 2, P. 229-235.
78. Leo D., Mus L., Espinoza S., Hoener M.C., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R. Taar1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission: Role of D2 dopamine autoreceptors//Neuropharmacology, 2014, Vol. 81, Taar1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission, P. 283-291.
 79. Sukhanov I., Espinoza S., Yakovlev D.S., Hoener M.C., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R. TAAR1-dependent effects of apomorphine in mice//The International Journal of Neuropsychopharmacology, 2014, Vol. 17, No. 10, P. 1683-1693.
 80. Achat-Mendes C., Lynch L.J., Sullivan K.A., Vallender E.J., Miller G.M. Augmentation of methamphetamine-induced behaviors in transgenic mice lacking the trace amine-associated receptor 1//Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2012, Vol. 101, No. 2, P. 201-207.
 81. Wolinsky T.D., Swanson C.J., Smith K.E., Zhong H., Borowsky B., Seeman P., Branchek T., Gerald C.P. The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: an animal model with relevance to schizophrenia//Genes, Brain and Behavior, 2007, Vol. 6, No. 7, P. 628-639.
 82. Beaulieu J.-M., Sotnikova T.D., Marion S., Lefkowitz R.J., Gainetdinov R.R., Caron M.G. An Akt/ β -Arrestin 2/PP2A Signaling Complex Mediates Dopaminergic Neurotransmission and Behavior//Cell, 2005, Vol. 122, No. 2, P. 261-273.
 83. Lindemann L., Hoener M.C. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family//Trends in Pharmacological Sciences, 2005, Vol. 26, No. 5, P. 274-281.
 84. Sklar P., Smoller J.W., Fan J., Ferreira M.A.R., Perlis R.H., Chambert K., Nimgaonkar V.L., McQueen M.B., Faraone S.V., Kirby A., de Bakker P.I.W., Ogdie M.N., Thase M.E., Sachs G.S., Todd-Brown K., Gabriel S.B., Sougnez C., Gates C., Blumenstiel B., Defelice M., Ardlie K.G., Franklin J., Muir W.J., McGhee K.A., MacIntyre D.J., McLean A., VanBeck M., McQuillin A., Bass N.J., Robinson M., Lawrence J., Anjorin A., Curtis D., Scolnick E.M., Daly M.J., Blackwood D.H., Gurling H.M., Purcell S.M. Whole-genome association study of bipolar disorder//Molecular Psychiatry, 2008, Vol. 13, No. 6, P. 558-569.
 85. Cichero E., Espinoza S., Franchini S., Guariento S., Brasili L., Gainetdinov R.R., Fossa P. Further Insights Into the Pharmacology of the Human Trace Amine-Associated Receptors: Discovery of Novel Ligands for TAAR1 by a Virtual Screening Approach//Chemical Biology & Drug Design, 2014, Vol. 84, Further Insights Into the Pharmacology of the Human Trace Amine-Associated Receptors, No. 6, P. 712-720.
 86. Pei Y., Asif-Malik A., Canales J.J. Trace Amines and the Trace Amine-Associated Receptor 1: Pharmacology, Neurochemistry, and Clinical Implications//Frontiers in Neuroscience, 2016, Vol. 10, Trace Amines and the Trace Amine-Associated Receptor 1.
 87. Raony Í., Domith I., Lourenco M.V., Paes-de-Carvalho R., Pandolfo P. Trace amine-associated receptor 1 modulates motor hyperactivity, cognition, and anxiety-like behavior in an animal model of ADHD//Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2022, Vol. 117, P. 110555.
 88. D'Andrea G., Pizzolato G., Gucciardi A., Stocchero M., Giordano G., Baraldi E., Leon A. Different Circulating Trace Amine Profiles in De Novo and Treated Parkinson's Disease Patients//Scientific Reports, 2019, Vol. 9, No. 1, P. 6151.
 89. Thorn D.A., Jing L., Qiu Y., Gancarz-Kausch A.M., Galuska C.M., Dietz D.M., Zhang Y., Li J.-X. Effects of the Trace Amine-Associated Receptor 1 Agonist RO5263397 on Abuse-Related Effects of Cocaine in Rats//Neuropsychopharmacology, 2014, Vol. 39, No. 10, P. 2309-2316.
 90. Revel F.G., Meyer C.A., Bradaia A., Jeanneau K., Calcagno E., André C.B., Haenggi M., Miss M.-T., Galley G., Norcross R.D., Invernizzi R.W., Wettstein J.G., Moreau J.-L., Hoener M.C. Brain-Specific Overexpression of Trace Amine-Associated Receptor 1 Alters Monoaminergic Neurotransmission and Decreases Sensitivity to Amphetamine//Neuropsychopharmacology, 2012, Vol. 37, No. 12, P. 2580-2592.
 91. Dodd S., F. Carvalho A., Puri B.K., Maes M., Bortolasci C.C., Morris G., Berk M. Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1): A new drug target for psychiatry?//Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2021, Vol. 120, Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1),

- P. 537-541.
92. Koblan K.S., Kent J., Hopkins S.C., Krystal J.H., Cheng H., Goldman R., Loebel A. A Non-D2-Receptor-Binding Drug for the Treatment of Schizophrenia//*New England Journal of Medicine*, 2020, Vol. 382, No. 16, P. 1497-1506.
 93. Zhou B., Lin W., Long Y., Yang Y., Zhang H., Wu K., Chu Q. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics//*Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, Vol. 7, Notch signaling pathway, No. 1, P. 95.
 94. Grandbarbe L., Bouissac J., Rand M., Hrabé de Angelis M., Artavanis-Tsakonas S., Mohier E. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process//*Development*, 2003, T. 130, N 7, C. 1391-1402.
 95. Hashimoto-Torii K., Torii M., Sarkisian M.R., Bartley C.M., Shen J., Radtke F., Gridley T., Šestan N., Rakic P. Interaction between Reelin and Notch Signaling Regulates Neuronal Migration in the Cerebral Cortex//*Neuron*, 2008, Vol. 60, No. 2, P. 273-284.
 96. Hasel P., Dando O., Jiwaji Z., Baxter P., Todd A.C., Heron S., Márkus N.M., McQueen J., Hampton D.W., Torvell M., Tiwari S.S., McKay S., Eraso-Pichot A., Zorzano A., Masgrau R., Galea E., Chandran S., Wyllie D.J.A., Simpson T.I., Hardingham G.E. Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism//*Nature Communications*, 2017, T. 8.
 97. Borghese L., Dolezalova D., Opitz T., Haupt S., Leinhaas A., Steinfarz B., Koch P., Edenhofer F., Hampl A., Brüstle O. Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo//*Stem Cells*, 2010, T. 28, N 5, C. 955-964.
 98. Tieng V., Stoppini L., Villy S., Fathi M., Michel, Dubois-Dauphin, Krause K. Engineering of midbrain organoids containing long-lived dopaminergic neurons Vannary Tieng , Luc Stoppini , Sabrina Villy , Marc Fathi , Michel Dubois-Dauphin Heinz Krause, 2014, C. 1-32.
 99. Espinoza S., Sukhanov I., Efimova E.V., Kozlova A., Antonova K.A., Illiano P., Leo D., Merkulyeva N., Kalinina D., Musienko P., Rocchi A., Mus L., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R. Trace Amine-Associated Receptor 5 Provides Olfactory Input Into Limbic Brain Areas and Modulates Emotional Behaviors and Serotonin Transmission//*Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2020, T. 13.
 100. Neganova I., Chichagova V., Armstrong L., Lako M. A critical role for p38MAPK signalling pathway during reprogramming of human fibroblasts to iPSCs//*Scientific Reports*, 2017, Vol. 7, No. 1, P. 41693.
 101. Chichagova V., Sanchez-Vera I., Armstrong L., Steel D., Lako M. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using RNA-Based Sendai Virus System and Pluripotency Validation of the Resulting Cell Population//*Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models : Methods in Molecular Biology/* eds. A. Nagy, K. Turksen. – New York, NY: Springer New York, 2015. – Vol. 1353. – P. 285-307.
 102. Kostina A.S., Uspensky V.E., Irtyuga O.B., Ignatieva E.V., Freylikhman O., Gavriliuk N.D., Moiseeva O.M., Zhuk S., Tomilin A., Kostareva A.A., Malashicheva A.B. Notch-dependent EMT is attenuated in patients with aortic aneurysm and bicuspid aortic valve//*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2016, Vol. 1862, No. 4, P. 733-740.
 103. Malashicheva A., Kanzler B., Tolkunova E., Trono D., Tomilin A. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations//*genesis*, 2007, Vol. 45, No. 7, P. 456-459.
 104. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads, 2011, Vol. v. 17, n. 1, P. 10-12.
 105. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, P. 7.
 106. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, P. 8.
 107. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, 2014, P. 21.

108. Hervé Pagès M.C. AnnotationDbi. - Bioconductor, 2017.
109. Clarke D.J.B., Jeon M., Stein D.J., Moiseyev N., Kropiwnicki E., Dai C., Xie Z., Wojciechowicz M.L., Litz S., Hom J., Evangelista J.E., Goldman L., Zhang S., Yoon C., Ahamed T., Bhuiyan S., Cheng M., Karam J., Jagodnik K.M., Shu I., Lachmann A., Ayling S., Jenkins S.L., Ma'ayan A. Apytters: Turning Jupyter Notebooks into data-driven web apps//Patterns, 2021, Vol. 2, Apytters, No. 3, P. 100213.
110. Katolikova N.V., Khudiakov A.A., Shafranskaya D.D., Prjibelski A.D., Masharskiy A.E., Mor M.S., Golovkin A.S., Zaytseva A.K., Neganova I.E., Efimova E.V., Gainetdinov R.R., Malashicheva A.B. Modulation of Notch Signaling at Early Stages of Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Dopaminergic Neurons//International Journal of Molecular Sciences, 2023, Vol. 24, No. 2, P. 1429.
111. Fontes M.M., Guvenek A., Kawaguchi R., Zheng D., Huang A., Ho V.M., Chen P.B., Liu X., O'Dell T.J., Coppola G., Tian B., Martin K.C. Activity-Dependent Regulation of Alternative Cleavage and Polyadenylation During Hippocampal Long-Term Potentiation//Scientific Reports, 2017, Vol. 7, No. 1, P. 17377.
112. Haghani A., Johnson R.G., Woodward N.C., Feinberg J.I., Lewis K., Ladd-Acosta C., Safi N., Jaffe A.E., Sioutas C., Allayee H., Campbell D.B., Volk H.E., Finch C.E., Morgan T.E. Adult mouse hippocampal transcriptome changes associated with long-term behavioral and metabolic effects of gestational air pollution toxicity//Translational Psychiatry, 2020, Vol. 10, No. 1, P. 218.
113. Lopes P.C., König B. Wild mice with different social network sizes vary in brain gene expression//BMC Genomics, 2020, Vol. 21, No. 1, P. 506.
114. Gaine M.E., Bahl E., Chatterjee S., Michaelson J.J., Abel T., Lyons L.C. Altered hippocampal transcriptome dynamics following sleep deprivation//Molecular Brain, 2021, Vol. 14, No. 1, P. 125.
115. Habib N., Li Y., Heidenreich M., Swiech L., Avraham-Davidi I., Trombetta J.J., Hession C., Zhang F., Regev A. Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons//Science, 2016, Vol. 353, Div-Seq, No. 6302, P. 925-928.
116. Katolikova N.V., Vaganova A.N., Efimova E.V., Gainetdinov R.R. Expression of Trace Amine-Associated Receptors in the Murine and Human Hippocampus Based on Public Transcriptomic Data//Cells, 2022, Vol. 11, No. 11, P. 1813.
117. Jerber J., Seaton D.D., Cuomo A.S.E., Kumasaka N., Haldane J., Steer J., Patel M., Pearce D., Andersson M., Bonder M.J., Mountjoy E., Ghousaini M., Lancaster M.A., Marioni J.C., Merkle F.T., Gaffney D.J., Stegle O. Population-scale single-cell RNA-seq profiling across dopaminergic neuron differentiation//Nature Genetics, 2021, T. 53, N 3, C. 304-312.
118. Kriks S., Shim J.W., Piao J., Ganat Y.M., Wakeman D.R., Xie Z., Carrillo-Reid L., Auyeung G., Antonacci C., Buch A., Yang L., Beal M.F., Surmeier D.J., Kordower J.H., Tabar V., Studer L. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease//Nature, 2011, T. 480, N 7378, C. 547-551.
119. Tiklová K., Nolbrant S., Fiorenzano A., Björklund Å.K., Sharma Y., Heuer A., Gillberg L., Hoban D.B., Cardoso T., Adler A.F., Birtele M., Lundén-Miguel H., Volakakis N., Kirkeby A., Perlmann T., Parmar M. Single cell transcriptomics identifies stem cell-derived graft composition in a model of Parkinson's disease//Nature Communications, 2020, Vol. 11, No. 1, P. 2434.
120. Kim J., Lengner C.J., Kirak O., Hanna J., Cassady J.P., Lodato M.A., Wu S.U., Faddah D.A., Steine E.J., Qing G.A.O., Fu D., Dawlaty M., Jaenisch R. Reprogramming of postnatal neurons into induced pluripotent stem cells by defined factors//Stem Cells, 2011.
121. Khandekar A., Springer S., Wang W., Hicks S., Weinheimer C., Diaz-Trelles R., Nerbonne J.M., Rentschler S. Notch-Mediated Epigenetic Regulation of Voltage-Gated Potassium Currents//Circulation Research, 2016, Vol. 119, No. 12, P. 1324-1338.
122. Borghetti G., Eisenberg C.A., Signore S., Sorrentino A., Kaur K., Andrade-Vicenty A., Edwards J.G., Nerkar M., Qanud K., Sun D., Goichberg P., Leri A., Anversa P., Eisenberg L.M., Jacobson

- J.T., Hintze T.H., Rota M. Notch signaling modulates the electrical behavior of cardiomyocytes//American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2018, Vol. 314, No. 1, P. H68-H81.
123. Song S., Babicheva A., Zhao T., Ayon R.J., Rodriguez M., Rahimi S., Balistrieri F., Harrington A., Shyy J.Y.-J., Thistlethwaite P.A., Makino A., Yuan J.X.-J. Notch enhances Ca^{2+} entry by activating calcium-sensing receptors and inhibiting voltage-gated K^{+} channels//American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2020, Vol. 318, No. 5, P. C954-C968.
124. Bray S.J. Notch signalling in context//Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2016, Vol. 17, No. 11, P. 722-735.
125. Tieng V., Stoppini L., Villy S., Fathi M., Dubois-Dauphin M., Krause K.-H. Engineering of Midbrain Organoids Containing Long-Lived Dopaminergic Neurons//Stem Cells and Development, 2014, Vol. 23, No. 13, P. 1535-1547.

Список использованных сокращений

- 5-НИАА (5-hydroxyindoleacetic acid) - 5-гидроксииндолуксусная кислота
- 6-ОНДА (6-hydroxydopamine) - 6-гидроксидофамин
- БП - Болезнь Паркинсона
- ВЧС графт – графт, полученный из вентральной части среднего мозга плода
- иПСК - индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- ПД - потенциал действия
- ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография
- СОП - стандартные операционные процедуры
- ЭКС - эмбриональные плюрипотентные стволовые клетки
- ANP (atrial natriuretic peptide) - атриальный натрийуретический пептид
- BDNF (brain-derived neurotrophic factor) - нейротрофический фактор мозга
- BMP (bone morphogenetic protein) - костный морфогенетический белок
- cAMP (cyclic adenosine monophosphate) - циклический аденозинмонофосфат
- CDNF (cerebral dopamine neurotrophic factor) - церебральный нейротрофический фактор дофамина
- COMT (catechol-O-methyl transferase) - катехол-О-метилтрансфераза
- dbc AMP (dibutyl cyclic adenosine monophosphate) - дибутирил циклический аденозинмонофосфат
- DBS (deep brain stimulation) - глубокая стимуляция мозга
- DCX (doublecortin) - даблкортин
- DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid) – дигидроксифенилуксусная кислота
- EBiSC (European Bank for Induced pluripotent Stem Cells) - Европейский банк индуцированных плюрипотентных стволовых клеток
- FACS (fluorescence activated cell sorting) - клеточный сортинг
- GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) - глиальный нейротрофический фактор
- GPCR (G protein-coupled receptor) - рецептор, сопряженный с G белком
- HVA (homovanillic acid) - гомованилиновая кислота
- MAO (monoamine oxidase) – моноаминоксидаза
- MAP2 (microtubule-associated protein 2) - белок, ассоциированный с микротрубочками 2
- NECD (Notch extracellular domain) – внеклеточный домен Notch
- NGN3 (neurogenin 3) - нейрогенин 3
- NICD (Notch intracellular domain) - внутриклеточный домен Notch

PEA (β -phenylethylamine) - β -фенилэтиламин

PKA (protein kinase A) - протеинкиназа А

PKC (protein kinase C) - протеинкиназа С

pro ANP (pro-atrial natriuretic peptide) - проатриальный натрийуретический пептид

shRNA (short hairpin RNA) - короткая шпилечная РНК

SN (substantia nigra) - черная субстанция среднего мозга

SNc (substantia nigra pars compacta) – компактная часть черной субстанции среднего мозга

SNl (substantia nigra pars lateralis) - латеральная часть черной субстанции среднего мозга

SNr (substantia nigra pars reticularis) - ретикулярная часть черной субстанции среднего мозга

TA (trace amines) - следовые амины

TAAR2-KO (TAAR2 knockout) - нокаут по гену TAAR2

TAAR5-KO (TAAR5 knockout) - нокаут по гену TAAR5

TAARs (trace amine-associated receptors) - рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами

TGF- β (transforming growth factor β) - трансформирующий фактор роста β

TH (tyrosine hydroxylase) - тирозин-гидроксилаза

TM (Notch transmembrane domain) - трансмембранный домен Notch

Tuj (tubulin III) – тубулин III

VTA (ventral tegmental area) - вентральная область покрышки

WT (wild type) - дикий тип

Приложения

Приложение А. Список генов из кластеров 1, 2, 3.

Номер кластера	Список генов
1	<p><i>A2ML1, AADAACL3, ABCB1, ABCC2, ABCD1, ABCF1, ABCF2, ABCG1, ABHD12B, ABHD17C, ABLIM2, ABRACL, ABT1, ACAD8, ACAP1, ACAT2, ACBD6//LHX4-AS1, ACE, ACOT9, ACP, ACSL1, ACSL6, ACSM6, ACTB, ACTC1, ACTL6A, ACTL6B, ACTR5, ACTR8, ACTRT3, ACVR1C, ADAM20P1, ADAM28, ADAM8, ADAMTS16, ADAMTS19, ADAMTS5, ADAMTS8, ADAP1, ADARB2, ADCY1, ADCY2, ADCY5, ADGRE2, ADGRG2, ADIPOR1, ADM2, ADNP2, AEBP2, AEN, AFP, AGMAT, AGO1, AGO2, AHR, AHS1, AHS2, AHS3, AIF1, AIFM2, AIMP2, AIPL1, AK5, AK6, AKAP1, AKR1C3, ALDH18A1, ALDH1A1, ALDH1L1, ALG1L2, ALG3, ALG6, ALKAL2, ALKBH2, ALS2CL, ALYREF, AMD1, AMER1, ANAPC1, ANAPC5, ANK1, ANK3, ANKEF1, ANKH, ANKLE1, ANKRD27, ANKRD29, ANKRD34B, ANKS6, ANO4, ANO9, ANOS1, ANP32E, ANXA11, ANXA3, AOX1, AP1M2, AP1S3, APBB2, APELA, APH1B, APIP, APPL1, AQP3, AQP4-AS1, AQP5, ARFGEF1, ARHGAP1, ARHGAP12, ARHGAP22, ARHGAP23, ARHGAP31, ARHGAP8, ARHGAP16, ARHGAP5, ARID5A, ARIH2, ARL11, ARMC6, ARMT1, ARPC5, ARPC5L, ARRB1, ASB12, ASB6, ASF1B, ASH2L, ATAD3A, ATAD3B, ATF1, ATG2B, ATG3, ATG5, ATL3, ATP1A3, ATP23, ATP6V0A2, ATP6V1E2, ATP8A1, ATP8B1, ATR, AUH, AUNIP, AUP1, B3GAT1, B3GAT2, B3GNT2, B3GNT3, B3GNT4, B3GNT7, BAMBI, BANK1, BARD1, BATF3, BBC3, BCAR1, BCL11A, BCL11B, BCL2L10, BDH1, BEND3, BEST2, BFAR, BHLHA15, BHMT, BICD1, BICDL2, BID, BIK, BLVRA, BMPRIA, BMS1, BNC2, BNIPL, BOLA3, BOP1, BRAP, BRD9, BRI3BP, BRINP1, BRMS1, BSPRY, BTBD11, BUB1B, BUD23, BUD31, BYSL, C10orf82, C11orf24, C12orf43, C12orf56, C12orf66, C12orf75, C14orf119, C15orf39, C16orf54, C16orf74, C16orf91, C17orf53, C17orf58, C17orf75, C18orf21, C19orf73, C1orf112, C1orf116, C1orf127, C1orf210, C1orf216, C1orf226, C1orf61, C1orf94, C1QBP, C1QL3, C1QTNF2, C2CD2, C2orf50, C2orf80, C3orf52, C4orf19, C4orf51, C5orf47, C6orf136, C6orf223, C7orf43, C7orf57, C9orf116, C9orf135, C9orf78, CA12, CA2, CA5BP1, CA7, CABYR, CACNA2D1, CACNA2D3, CACYBP, CALCR, CALN1, CAMK2N2, CAMK4, CAMKV, CAPG, CAPN13, CAPNS1, CARD10, CARD11, CARMIL1, CARMIL3, CARS, CASP3, CASZ1, CBLN1, CBRI, CBS//CBSL, CBX7, CCDC137, CCDC17, CCDC172, CCDC186, CCDC28A, CCDC43, CCDC63, CCDC71, CCDC86, CCKBR, CCL26, CCL28, CCNA2, CCNB1, CCNC, CCNE1, CCNF, CCNI2, CCNQ, CCNYL1, CCT2, CCT5, CCT6A, CD177, CD19, CD1D, CD200, CD247, CD2AP, CD34, CD3EAP, CD8B, CDC123, CDC16, CDC25A, CDC26, CDC37L1, CDC40, CDC45, CDC6, CDCA4, CDCA5, CDCA7L, CDCP1, CDH26, CDHR1, CDHR3, CDK14, CDK15, CDK2AP1, CDK5, CDK7, CDK9, CDR2L, CDS1, CEACAM1, CEBPA, CEBPB, CEBPZ, CEBPZOS, CENPM, CENPP, CENPU, CENPW, CEP72, CER1, CGB2, CGN, CGNL1, CHAC1, CHAC2, CHAF1A, CHAF1B, CHCHD3, CHCHD4, CHCHD7, CHDH, CHEK2, CHGA, CHKA, CHML, CHMP1B, CHMP4C, CHN1, CHODL, CHP2, CHRAC1, CHRN2, CHRN4, CHST2, CHST4, CHST8,</i></p>

CHST9, CHSY1, CKMT1A, CKMT1B, CKMT2, CLCA4-AS1, CLDN1, CLDN10, CLDN6, CLDN7, CLDN9, CLINT1, CLN6, CLPTMIL, CLTA, CMAS, CMSS1, CMYA5, CNDP2, CNGA1, CNIH4, CNMD, CNN1, CNN2, CNOT11, CNST, CNTLN, CNTN1, COA3, COA4, COA6, COA7, COBL, COCH, COG2, COL28A1, COL8A2, COMMD10, COMMD4, COMMD5, COMMD7, COMTD1, COPS3, COPS5, COQ3, COQ9, CORO2A, COX16, COX17, COX6B1, CP, CPLX1, CPNE7, CPO, CPPED1, CPT1A, CR1L, CR2, CRB3, CREB3L4, CREG2, CRIP3, CRIPT, CRLF3, CRNKL1, CRTC2, CRYAB, CRYBB3, CRYBG1, CRYGD, CRYGN, CRYM, CRYZL2P, CSE1L, CSTB, CSTF2, CTBP2, CTH, CTR9, CTSC, CTU2, CUL4A, CUX2, CWF19L1, CXCL3, CXCR2, CXorf56, CYB561, CYB5A, CYCS, CYP27B1, CYP2A13, CYP2F1, CYP2J2, CYP2S1, CYP4X1, DAB1, DACT2, DAPK1, DARS2, DAXX, DCAF13, DCAF4, DCLK1, DCP2, DCTPP1, DCUN1D5, DDAH1, DDIAS, DDIT4L, DDR2, DDX11, DDX25, DDX28, DDX39A, DDX3X, DDX46, DDX51, DDX55, DEC1, DENND1C, DENND2C, DEPDC1, DEPDC1B, DEPDC7, DERL3, DESI2, DEXI, DFFB, DGKE, DGKZ, DHCR24, DHDDS, DHRS3, DHX15, DHX33, DHX34, DHX9, DIAPH3, DIDO1, DIRAS1, DIS3L, DISP2, DLGAP3, DLL3, DMKN, DNAAF2, DNAJA2, DNAJB6, DNAJC30, DNER, DNTP1, DOCK5, DPH2, DPH3, DPP4, DPPA2, DPPA3, DPY30, DPYS, DPYSL3, DSCC1, DSE, DSN1, DTD2, DTWD2, DTYMK, DUS3L, DUSP23, DUSP26, DUSP5, DUSP6, DUT, DYNLL1, E2F1, E2F4, EAF2, EBNA1BP2, ECE2//EEF1AKMT4, ECEL1P2, ECT2, EDARADD, EDIL3, EEF1AKNMT, EEF1E1, EEF2KMT, EFHD2, EFR3A, EGFL6, EHBP1, EHMT1, EIF2B1, EIF2S1, EIF2S2, EIF3K, EIF3M, EIF4E3, EIF4EBP1, EIF4G1, EIF5A, ELAC2, ELMO3, ELOVL7, EMC8, EMC9, EMG1, EMX1, ENTPD1, ENTR1, EOGT, EPB41L4A, EPCAM, EPHA1, EPHA10, EPHB6, EPHX3, EPHX4, EPPK1, EPS8L1, ERCC6L, ERICH1, ERICH5, ERRF11, ERVMER34-1, ESRG, ESRP1, ESRP2, ESYT3, ETNPPL, ETS2, ETV1, ETV5, ETV6, EWSR1, EXO1, EXOSC3, EXOSC4, EXOSC9, FA2H, FAAH, FABP5, FABP6, FAM102A, FAM102B, FAM110A, FAM110C, FAM120A, FAM124A, FAM124B, FAM129A, FAM155B, FAM174B, FAM181B, FAM19A4, FAM20A, FAM20C, FAM241A, FAM50B, FAM78B, FAM83B, FAM83D, FAM83F, FAM84A, FAM86EP, FARSB, FASTKD2, FASTKD3, FBLL1, FBXL16, FBXL21, FBXL5, FBXO25, FBXO27, FCF1, FCGR2A//FCGR2C, FCN3, FDFT1, FEN1, FERMT1, FEZF1, FGD2, FGD3, FGF13, FGF13-AS1, FGF2, FHL2, FKBP4, FLAD1, FLJ42393, FLJ45513, FLOT2, FLVCR1, FMO1, FOXD3, FOXI2, FOXL2, FOXL2NB, FOXM1, FOXN3, FOXO1, FRAT1, FRAT2, FRMD5, FTSJ1, FUS, FUT2, FXN, FXYD7, FZD5, G3BP1, GABPB1, GABRA5, GABRB3, GABRE, GABRQ, GAD2, GAL, GALM, GALNT13, GALNT14, GALNT3, GALNT6, GALNT7, GALR1, GALR3, GAREM2, GARS, GART, GATC, GATM, GCAT, GCH1, GCLM, GCNT4, GDAP1L1, GDF3, GEMIN4, GEMIN6, GEMIN7, GFOD1, GFPT2, GHRLOS, GINS4, GIPC2, GJA4, GJA5, GJB7, GLA, GLB1L3, GLDC, GLIPR1L1, GLS, GLS2, GLTP, GLYR1, GMNN, GNA12, GNA14, GNG12, GNG4, GNGT2, GNL2, GNL3, GNL3L, GNMT//CNPY3-GNMT, GNPNTA1, GNPTAB, GOLPH3, GOLPH3L, GOLT1A, GPANK1, GPAT3, GPATCH4, GPC4, GPD1L, GPD2, GPLD1, GPNMB, GPR158, GPR160, GPR176, GPR27, GPR3, GPR37, GPR39, GPR62, GPR63, GPR83, GPRC5A, GPRINI, GPRIN3, GRAMD2B, GRB7, GRHL2, GRIA4, GRID2, GRIK4, GRIN1, GRM1, GRM2, GRPEL1, GRPEL2, GRPR, GRTP1,

GRWD1, GSG1, GSKIP, GSR, GTPBP4, GUCD1, GUCY2C, GULP1, HACL1, HAPLN3, HAS3, HASPIN, HAUS8, HCCS, HCLS1, HCN1, HCN2, HCN4, HEATR5A, HECW1, HELB, HENMT1, HEPHL1, HERC5, HESX1, HGH1, HHEX, HIRA, HIST1H2AE, HIST1H2BI, HIST1H3F, HIST1H4D, HIST1H4J, HIST2H2AC, HLA-DPB1, HLA-F, HLF, HMGA1, HMGB3, HMGN5, HMOX2, HMSD, HNF4G, HNRNPAB, HNRNPD, HNRNPM, HNRNPU, HOMER2, HOOK2, HOXB13, HPGD, HPRT1, HPS6, HRASLS5, HS3ST3A1, HSD11B2, HSPA12B, HSPA14, HSPA9, HTATIP2, HTR1B, HTR6, HTR7, HUS1, HYLS1, ICA1, ICAM3, ID1, IDH1, IDO1, IER2, IFNLR1, IGFLR1, IGSF21, IGSF9B, IKBKE, IKZF5, IL15, IL17C, IL17RD, IL20RB, IL21R, IL23A, IL27RA, IL4R, IL6R, ILDR1, ILF3, ILKAP, IMP4, INAFM2, INHBA, INKA1, INO80D, INPP5A, INSR, INTS13, INTS5, IPO11//IPO11-LRRC70, IPO5, IPW, IRAK2, IRAK3, IRF2BPL, IRF5, IRX4, ISG20L2, ITGA2, ITGAM, ITGB1BP2, ITGB5, ITIH5, ITLN2, ITM2A, ITPA, ITPK1, ITPR2, ITPRIPL1, JADE1, JARID2, JAZF1, JDP2, JMY, JPH1, JPT1, JTB, KCMF1, KCNB2, KCNC4, KCND2, KCNE3, KCNG3, KCNH6, KCNJ6, KCNK1, KCNK6, KCNMA1, KCNMB1, KCNMB2-AS1, KCNMB4, KCNN2, KCNQ3, KCNS1, KCNS3, KCNV1, KCTD14, KCTD8, KDM4A, KDR, KEL, KIAA0040, KIF11, KIF14, KIF18B, KIF1BP, KIF1C, KIF23, KIF5B, KLB, KLC3, KLF15, KLHL34, KLHL7, KLK1, KLK13, KLK14, KLKB1, KLRG1, KLRG2, KNOPI, KRT18, KRTCAP3, KTI12, KYNU, LITD1, L3MBTL2, LAD1, LAMA3, LAMC2, LAMC3, LARGE2, LARPIB, LARS, LCK, LCP1, LDLRAD4, LDLR1, LEAP2, LEFTY1, LEFTY2, LEMD3, LETM1, LHFPL2, LHFPL4, LIMD1, LIMD2, LIMS2, LINC-ROR, LINC00337, LINC00449, LINC00562, LINC00605, LINC00652, LINC00678, LINC00852, LINC00882, LINC00899, LINC00937, LINC01018, LINC01108, LINC01311, LINC01359, LINC01484, LINC01487, LINC01829, LINC01844, LINC02036, LINC02166, LINC02188, LINC02362, LINC02365, LINC02436, LINGO2, LINP1, LLGL2, LMO7, LNX1, LOC100128770, LOC100130476, LOC100288748, LOC100631378, LOC101927551, LOC101928123, LOC101928254, LOC102724159, LOC102724200, LOC102724859, LOC105371730, LOC105373884, LOC105374546, LOC105374952, LOC105375431, LOC105378421, LOC283387, LOC283731, LOC286059, LOC389641, LOC441086, LOC441666, LOC645752, LOC728975, LOC729683, LPAR3, LPCAT1, LPL, LPO, LRAT, LRP8, LRR1, LRRC1, LRRC15, LRRC3B, LRRC45, LRRC47, LRRC69, LRRFIP1, LRRK1, LRRN4, LRWD1, LSG1, LSM10, LSM3, LTF, LTO1, LTV1, LUZP2, LY75, LYAR, LYPD3, LYPD6, LYPD6B, LYPLA2, LYSDM2, LZTS1, MACC1, MACC1-AS1, MAD2L1BP, MAEA, MAF1, MAFA, MAFF, MAGEB17, MAGI2, MAGOH, MAK16, MAL2, MALSU1, MAMDC2, MANF, MAP3K21, MAP3K5, MAP4K3, MAPK13, MAPK9, MAPKAP1, MARC2, MARCH3, MARCH4, MARK1, MARS, MARS2, MASTL, MATIA, MATK, MATN3, MB21D2, MBD2, MBOAT1, MBP, MCF2, MCM10, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, MCMBP, MCMDC2, MCOLN2, MDH1, MDN1, MED14OS, MED20, MED21, MED27, MEDAG, MEGF10, MELK, MET, METAP1, METTL1, METTL21A, METTL2A, METTL3, METTL5, METTL7A, MFAP3L, MFSD13A, MFSD2A, MFSD5, MFSD6, MFSD6L, MGME1, MGST1, MINDY2, MIOS, MIR17HG, MIR2052HG, MIR302C, MIR302D, MIR3671, MIR3945, MIR4455, MIS18A, MIXL1, MKLN1, MKLN1-AS, MLKL, MLYCD, MMACHC, MMP24, MNAT1, MOB4, MOCOS, MOCS3, MORC2, MOSPD1, MPL,

MPP1, MPP6, MPV17L2, MPZL2, MPZL3, MREG, MR11, MRM1, MRM3, MRO, MRPL13, MRPL15, MRPL16, MRPL17, MRPL18, MRPL19, MRPL20, MRPL24, MRPL3, MRPL32, MRPL34, MRPL35, MRPL36, MRPL39, MRPL42, MRPL44, MRPL47, MRPL48, MRPL49, MRPL51, MRPL52, MRPL55, MRPL58, MRPS10, MRPS11, MRPS12, MRPS15, MRPS16, MRPS18A, MRPS18C, MRPS21, MRPS23, MRPS28, MRPS30, MRPS34, MRPS35, MRPS36, MRPS9, MRRF, MRS2, MRTO4, MSC-AS1, MSH2, MSTO1, MT1F, MT1G, MT1H, MT1X, MTA3, MTAP, MTFR2, MTG1, MTHFD1, MTHFD1L, MTHFD2, MTHFS, MTMR12, MTMR8, MTPAP, MTX2, MUC3A, MUC4, MUC5B, MYBBP1A, MYBL2, MYC, MYCN, MYH2, MYL6, MYL7, MYLIP, MYLPF, MYO18B, MYO1D, MYO1E, MYO3A, MYOZ3, MYRFL, MYRIP, MYSM1, MYZAP, MZB1, N4BP1, N4BP2L1, N4BP3, NAA15, NAA20, NAA25, NAAA, NAF1, NAGK, NANOG, NANOGP8, NANS, NAP1L3, NASP, NAT2, NAV3, NBEAL2, NCAPG2, NCAPH, NCAPH2, NCEH1, NCLN, NDUFA7, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF7, NDUFB9, NDUFS3, NDUFS6, NDUFV3, NECAB1, NECTIN1, NEFH, NEK3, NEK8, NET1, NETO1, NF2, NFE2L3, NFIA, NFKBIB, NGDN, NHP2, NIFK, NIP7, NIPAL1, NIPAL3, NKAIN1, NKILA, NKX1-2, NLGN4X, NLN, NLRP12, NLRP2, NME1, NMI, NMNAT2, NMNAT3, NOC2L, NOC3L, NOC4L, NOCT, NOD2, NODAL, NOL11, NOL6, NOL7, NOM1, NOP10, NOP14, NOP56, NOP9, NOS1AP, NOS2, NPAP1, NPIPA1//LOC102724993, NPLOC4, NPM2, NPY2R, NR1I3, NR2E3, NR5A2, NRADDP, NRBP1, NRK, NSUN2, NSUN7, NT5DC3, NTMT1, NTS, NTSR1, NUDCD1, NUDT15, NUDT9, NUFIP1, NUP153, NUP155, NUP35, NUP37, NUP85, NUP88, NUS1, NUTF2, NUTM1, OAT, OCIAD2, OGFOD1, OGFPR1, OIP5, OLFM1, OMA1, ONECUT1, ORC1, ORC2, ORMDL2, OSBP2, OTUD6B, OTULINL, OVOL1, OVOL2, OXCT2, OXNAD1, P2RX5, P2RX5-TAX1BP3, P2RY1, PAH, PAIP2, PAK6//BUB1B-PAK6, PALM3, PAPOLG, PAPSS2, PAQR4, PARD6A, PARP12, PARPBP, PAWR, PAXIP1, PCBD2, PCDH1, PCDH12, PCDHGA6, PCID2, PCK2, PCP4L1, PCYT2, PDCD11, PDCD2, PDCD2L, PDCL3, PDE12, PDE4B, PDE5A, PDE6G, PDLIM5, PDSS1, PDZD8, PEBP1, PEX1, PEX5L, PFAS, PFDN6, PGAM5, PGM2, PGM2L1, PGRMC1, PHAX, PHC1, PHETA2, PHF5A, PHGDH, PHLPP1, PHOSPHO1, PI4K2B, PIF1, PIK3AP1, PIK3CB, PIM2, PIN4, PINX1, PIP4K2A, PIP5K1L1, PIWIL2, PKHD1L1, PKIA-AS1, PKMYT1, PKNOX1, PKP1, PKP3, PLA2G4C, PLA2G7, PLA2R1, PLAC9, PLAUR, PLBD1, PLD5, PLEKHD1, PLEKHF1, PLK4, PLPP1, PLPP2, PLPP6, PLS1, PLSCR1, PLSCR4, PMAIP1, PMEP1, PNMT, PNO1, PNP, PNPLA3, POC1A, POLA1, POLE, POLE2, POLR1B, POLR2F, POLR2L, POLR3E, POLR3G, POLR3K, POMP, PON1, POP1, POP4, POP5, POP7, POU2F3, POU5F1P3, POU5F1P4, PPARGC1B, PPIF, PPIG, PPIL1, PPM1A, PPM1B, PPM1G, PPM1H, PPP1R14B, PPP1R17, PPP1R1B, PPP1R7, PPP2R1B, PPP2R2C, PPP3CA, PPP3R1, PPP6R3, PPRC1, PPTC7, PRCC, PRDM14, PRDX1, PRDX6, PRELID1, PREX2, PRIM1, PRIM2, PRIMPOL, PRKAR1B, PRKAR2B, PRKCI, PRKD3, PRLR, PRMT3, PROCR, PROK2, PROKR1, PROKR2, PROM1, PROM2, PRPF31, PRPF4, PRPS2, PRR13, PRR15, PRRG2, PRRG4, PRSS16, PRSS8, PRTFDC1, PSAT1, PSIP1, PSMA3, PSMB3, PSMB4, PSMC1, PSMC2, PSMC4, PSMC6, PSMD1, PSMD11, PSMD12, PSMD14, PSMD6, PSMD7, PSMG1, PSMG4, PSPH, PTAFR, PTBP3, PTCHD1, PTGES3, PTMA, PTPN5, PTPRB, PTPRG, PTPRZ1, PTRH2, PUM3, PUS1,

PUS7, PUSL1, PWP1, PWWP2A, PYCARD, QRSL1, QSER1, QTRT2, RAB15, RAB17, RAB19, RAB25, RAB31, RAB5A, RABEPK, RAD1, RAD18, RAD51, RAD54L, RALA, RAMAC, RAMP1, RAMP3, RANBP1, RANGAP1, RAPGEF3, RARRES2, RARRES3, RARS, RASAL2-AS1, RASAL3, RASD1, RASEF, RASGEF1A, RASGRF2, RASGRP2, RASL11A, RASSF10, RASSF3, RASSF9, RBBP5, RBBP8NL, RBM14, RBM19, RBM28, RBM39, RBM47, RBMXL1, RBP7, RBPMS-AS1, RBPMS2, RCC2, RDH11, RDH14, REEP5, RELL2, REPS2, REXO2, RFC2, RFC3, RFLNA//ZNF664-RFLNA, RFWD3, RGL3, RGS17, RGS5, RHBDL3, RHEBL1, RHOD, RHOH, RIF1, RILP, RIMKLB, RIMS4, RINT1, RIOK1, RIOX1, RIPOR2, RMC1, RMI2, RMND5B, RNASEH1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNF114, RNF125, RNF13, RNF144B, RNF145, RNF175, RNF182, RNF25, RNF44, ROBO3, RPARP-AS1, RPF2, RPIA, RPL22L1, RPL36AL, RPL3L, RPP25, RPP30, RPP40, RPRM, RPS26, RPS6KL1, RPUSD1, RPUSD2, RRAS2, RRP1, RRP12, RRP15, RRP1B, RRP36, RRP9, RRS1, RSU1, RTCA, RTN4IP1, RTP1, RUBCNL, RUNDC3A, RUNX1T1, RUVBL1, RYR3, S100A14, SAALI, SACMIL, SAE1, SAMD3, SAP18, SAP30L, SAPCD2, SAVI, SBSPON, SCARF2, SCG3, SCIN, SCLY, SCN8A, SCNM1//TNFAIP8L2-SCNM1, SCNN1A, SCNN1G, SCO1, SDC4, SDHB, SDHD, SEC14L4, SECIP, SEH1L, SEL1L3, SELENOS, SEMA3A, SEMA6A, SEMA6A-AS1, SEPHS2, SERPINE2, SETD3, SETD4, SETD6, SF3B4, SFN, SFT2D1, SFTPD, SFXN2, SGK3//C8orf44-SGK3, SGMS1, SGO1, SH2B3, SH2D3A, SH2D4A, SH3BP5L, SH3GL2, SH3GL3, SH3YLI, SHCBP1, SHE, SHISA9, SHLD2, SHPK, SHQ1, SIRT1, SIRT7, SIVA1, SIX2, SIX4, SIX6, SKA3, SKIL, SLA, SLC10A4, SLC13A3, SLC15A1, SLC16A12, SLC19A2, SLC19A3, SLC20A1, SLC22A1, SLC22A20P, SLC22A3, SLC25A12, SLC25A17, SLC25A19, SLC25A28, SLC25A38, SLC25A4, SLC26A7, SLC26A8, SLC27A2, SLC27A4, SLC27A6, SLC29A3, SLC30A2, SLC30A3, SLC35B1, SLC35D3, SLC35F3, SLC37A1, SLC38A1, SLC38A2, SLC39A14, SLC43A3, SLC44A3, SLC45A1, SLC46A1, SLC4A4, SLC51A, SLC52A1, SLC5A6, SLC7A14, SLC7A2, SLC7A3, SLC7A6, SLCO3A1, SLCO4A1, SLCO4C1, SLCO5A1, SLED1, SLFN13, SLIRP, SLITRK3, SLMAP, SMARCA2, SMC1B, SMC4, SMCO4, SMIM10, SMIM10L2B, SMIM12, SMIM13, SMIM4, SMPDL3B, SMS, SMYD5, SNAI3, SNAP23, SNAPC5, SNHG4, SNN, SNORA3B, SNRNP25, SNRPC, SNUPN, SNURF, SNX22, SNX24, SOCS2, SOCS2-AS1, SOCS3, SOD1, SORT1, SOWAHC, SOWAHD, SOX15, SOX4, SP100, SP140, SP4, SPAAR, SPAG5, SPATA2, SPATA24, SPATS2L, SPHK2, SPIB, SPIN1, SPR, SPRY1, SPRY4, SPRYD4, SPTB, SPTBN5, SRF, SRFBP1, SRM, SRP19, SRPK1, SRPRB, SRRT, SRSF2, SRSF3, SRSF7, SS18L2, SSBP1, SSSCA1, SSTR1, SSTR2, ST14, ST6GAL1, ST7//ST7-OT3, ST8SIA5, STAB1, STAC3, STAMBPL1, STEAP1, STEAP1B//LOC401312, STEAP2, STEAP3, STK35, STMN1, STMN3, STOM, STRN, STYK1, SUCLA2, SUDS3, SUPV3L1, SURF2, SURF6, SUV39H1, SVOPL, SYK, SYN3, SYNCRIP, SYNE4, SYNJ2, SYNPO2, SYNPR, SYPL1, SYPL2, SYT1, SYT12, SYT2, SYT3, SYT6, TAC1, TACR3, TACSTD2, TAF4B, TAF5L, TANGO6, TAOK3, TARS, TASP1, TATDN2, TBC1D2, TBC1D22B, TBC1D4, TBC1D8B, TBCC, TBRG1, TC2N, TCAP, TCF24, TCP1, TDGF1, TDP1, TDP2, TDRD12, TDRD5, TEAD4, TEC, TEDC2, TEK3, TELO2, TENT5B, TERF1, TES, TESC, TEX10, TEX13B, TEX41, TFAP2A-AS2, TFAP4, TFB2M, TFCP2L1, TFPI2, TGFA, THAP1, THAP11, THBS1, THOC6, THOC7, THY1, TICRR, TIGAR, TIMM10, TIMM17A, TIMM22, TIMM23, TIMM44, TIMM8A,

Продолжение приложения А

	<p>TIMM8B, TIMMDC1, TINAGL1, TIPIN, TK1, TLCD1, TLE1, TLL2, TLR2, TLR3, TM2D2, TM4SF18, TMA16, TMC5, TMEFF2, TMEM104, TMEM11, TMEM110-MUSTN1, TMEM120B, TMEM125, TMEM139, TMEM145, TMEM151A, TMEM151B, TMEM165, TMEM177, TMEM178A, TMEM183A, TMEM200A, TMEM201, TMEM203, TMEM220, TMEM220-AS1, TMEM223, TMEM238, TMEM266, TMEM268, TMEM30B, TMEM33, TMEM37, TMEM38A, TMEM52, TMEM59L, TMEM63A, TMEM69, TMEM82, TMEM86A, TMEM86B, TMEM87A, TMEM8A, TMIE, TMPPE, TMPRSS13, TMPRSS4, TMPRSS6, TMTC1, TMTC3, TMX2, TNFRSF10A, TNFRSF11A, TNFRSF12A, TNFRSF8, TNFSF11, TNIK, TNIP2, TNMD, TNNC2, TOMM22, TOMM40, TOP1MT, TOR3A, TOX, TP53, TP73, TPM3, TPRN, TRAF3IP2, TRAI, TRAPPC13, TRAPPC8, TRDN, TRHDE-AS1, TRIAP1, TRIM14, TRIM24, TRIM35, TRIM54, TRIM6, TRIM65, TRIM72, TRIP13, TRMT10C, TRMT12, TRMT2B, TRMT44, TRMT5, TRMT61A, TRMT61B, TRNP1, TROAP, TRPA1, TRPM6, TRUB2, TSHZ3, TSKU, TSLP, TSN, TSR1, TSTA3, TTC19, TTC27, TTC39B, TTC39C, TTC9, TTI2, TTK, TLL12, TUBB6, TUFM, TULP1, TULP2, TUSC2, TWISTNB, TWNK, TXLNG, UBALD1, UBB, UBE2E1, UBE2F, UBE2J2, UBFD1, UBIAD1, UBQLN1, UBTF, UCHL1, UCHL3, UCK2, UCKL1, UCMA, UFD1, UGP2, UGT8, UHRF1BP1L, ULK1, UMPS, UNC5D, UNG, UPRT, UQCC3, UQCRQ, URB2, URGCP, URH1, USH1G, USH2A, USP12, USP18, USP2-AS1, USP28, USP32, USP43, USP44, USP48, UTF1, UTP11, UTP14A, UTP15, UTP20, UTP25, UTP3, UTP4, UTP6, VANGL1, VASP, VAV1, VCAN, VCL, VDR, VENTX, VIL1, VIPR1, VIPR2, VKORC1L1, VOPPI, VPREB3, VPS33A, VPS9D1-AS1, VSIG10//LOC101928274, VSNL1, VSTM5, WARS, WASHC5, WASL, WDR1, WDR3, WDR4, WDR43, WDR44, WDR45, WDR46, WDR72, WDR77, WDR82, WSB2, WWC1, WWC2, XG, XK, XKRX, YARS2, YJU2, YRDC, YTHDC2, YTHDF1, YWHAB, ZAN, ZAR1L, ZBTB11-AS1, ZBTB2, ZBTB3, ZBTB44, ZC3H4, ZCCHC17, ZCCHC2, ZDHHC13, ZDHHC16, ZDHHC19, ZDHHC2, ZDHHC20, ZDHHC22, ZDHHC5, ZFAND6, ZFP42, ZFYVE28, ZMAT4, ZMYND19, ZNF101, ZNF114, ZNF121, ZNF134, ZNF142, ZNF202, ZNF212, ZNF281, ZNF35, ZNF385B, ZNF385D, ZNF394, ZNF398, ZNF483, ZNF485, ZNF488, ZNF512B, ZNF525, ZNF564, ZNF572, ZNF587B, ZNF613, ZNF616, ZNF622, ZNF630, ZNF648, ZNF649, ZNF684, ZNF697, ZNF732, ZNF749, ZNF765, ZNF770, ZNF813, ZNF827, ZNF845, ZNF850, ZNF860, ZNF878, ZNF90, ZNHIT2, ZPR1, ZSCAN10, ZSCAN2, ZSWIM3, ZUP1, ZWILCH, ZXDC, ZYG11A</p>
2	<p>A2M, A2M-AS1, AATK, ABAT, ABCA1, ABCA13, ABCA17P, ABCA3, ABCA5, ABHD10, ABHD15, ABHD6, ABRAXAS1, ACADVL, ACBD5, ACCS, ACOXL-AS1, ACP2, ACRBP, ACSS1, ACSS3, ACTA2, ACTN3, ACVR1B, ADAL, ADAM17, ADAMTS13, ADAMTS6, ADAMTS9, ADAMTSL3, ADCY7, ADD3, ADGRG1, ADGRV1, ADNP, ADORA2A, ADORA2A-AS1, ADPRM, ADSSL1, AFF4, AGLB5, AGFG2, AGO3, AGPAT3, AGPAT4, AHDC1, AHNAC, AHSA2P, AJUBA, AK7, AKAP13, AKAP6, AKIP1, ALAD, ALDH1A2, ALDH5A1, ALG9, ALOX12B, AMN1, AMOTL1, AMPH, ANAPC16, ANGPTL4, ANKMY2, ANKRD13A, ANKRD34A, ANKRD42, ANKRD53, ANO3, ANP32A, ANP32B, AP1M1, AP3M1, AP3M2, APC2, APLP1, APLP2, APMAP, APOBEC3H, APOLD1, APP, ARFGAP3, ARHGAP10, ARHGAP15, ARHGAP24, ARHGAP29, ARHGAP6, ARHGEF17, ARHGEF25, ARHGEF37, ARHGEF4, ARHGEF9,</p>

ARID1B, ARID2, ARID3A, ARIH2OS, ARL10, ARL3, ARL4A, ARL4C, ARL5B, ARL6IP1, ARL6IP5, ARMC1, ARMC12, ARMC3, ARMCX1, ARMCX3, ARMCX6, ARNT, ARRDC3, ARRDC4, ARSA, ASB7, ASB8, ASGR1, ASH1L, ASIC1, ASIC3, ASPDH, ASPH, ASTN1, ATAT1, ATF7, ATG12, ATN1, ATOH8, ATP10D, ATP11B, ATP1A4, ATP2B4, ATP5MC2, ATP5MPL, ATP6AP1, ATP6V0A1, ATP7B, ATRN, ATXN1, AXL, AZI2, AZIN2, B3GAT3, B4GALNT3, B4GAT1, B9D2, BACH1//GRIK1-AS2, BAG4, BAHCC1, BAIAP2-DT, BASP1-AS1, BBS5, BBS9, BBX, BCHE, BCL2L11, BCL2L2, BCL6, BCL7A, BDKRB2, BEAN1, BEND5, BGN, BIRC3, BISPR, BLMH, BLOC1S5, BMP1, BMP3, BMP4, BMP5, BMP7, BMPER, BMPR1B, BMT2, BNIP3L, BRD7, BRD8, BRINP2, BRSK1, BRWD1, BRWD3, BTBD3, BTG1, BTG2, BTN2A1, BTN2A2, BTN3A1, BTN3A2, C10orf88, C11orf49, C11orf65, C11orf96, C12orf57, C16orf45, C16orf86, C19orf44, C19orf54, C1orf162, C1orf21, C1orf229, C1orf54, C1QTNF6, C22orf39, C2orf72, C4orf3, C5AR1, C5orf49, C5orf66, C6orf118, C6orf58, C6orf89, C7orf61, C9orf72, CA11, CA14, CA3, CAB39L, CABP7, CACFD1, CACHD1, CACNA1G, CACNA1H, CACNB1, CACNB3, CADM1, CADM3, CADM4, CAHM, CALCOCO1, CALCOCO2, CALU, CAMK1, CAMK1G, CAMK2B, CAMK2N1, CAMKK2, CANT1, CAPN14, CAPN2, CAPN7, CARF, CASC1, CASP7, CAST, CATIP, CBFA2T2, CBFA2T3, CBLB, CBL1, CBX1, CBX4, CBX5, CBX8, CCDC102A, CCDC125, CCDC130, CCDC136, CCDC148, CCDC159, CCDC167, CCDC183, CCDC184, CCDC189, CCDC33, CCDC62, CCDC74A, CCDC85A, CCDC85C, CCDC92, CCDC97, CCM2, CCNB3, CCND1, CCND2, CCNDBP1, CCNG2, CCNY, CD226, CD24, CD302, CD37, CD8B2, CD99L2, CDADC1, CDC23, CDH10, CDH13, CDH4, CDH6, CDIP1, CDK17, CDK19, CDK20, CDK5RAP3, CDK8, CDKL2, CDKN1A, CDKN2C, CDS2, CDX2, CELF2-AS1, CELF3, CELF5, CELSR2, CEP112, CEP126, CEP170, CEP250, CEP350, CEP97, CERS6, CES3, CES4A, CETN2, CFAP126, CFAP57, CFAP58, CFDP1, CFL2, CGGBP1, CHAD, CHD2, CHP1, CHR1, CHST11, CIART, CIRBP, CITED2, CKAP2, CLASP1, CLBA1, CLCF1, CLCN2, CLCN4, CLCN5, CLDN20, CLEC10A, CLEC16A, CLEC18C, CLEC19A, CLIC5, CLIP3, CLK2, CLPSL1, CLSTN1, CLSTN2, CLSTN3, CLUAP1, CMBL, CMTM1, CMTM3, CMTM5, CMTR2, CNIH1, CNKSR3, CNNM4, CNP, CNPY4, CNTFR, CNTFR-AS1, CNTNAP1, CNTNAP3B, CNTNAP3P2, CNTROB, COL11A1, COL27A1, COL2A1, COL4A1, COL5A1, COL9A2, COLGALT2, COMMMD3, COMMMD8, COPZ2, COQ10A, COQ5, COQ6, COX15, COX19, CPA1, CPA2, CPA4, CPD, CPFB4, CPED1, CPLANE2, CPM, CPNE3, CPQ, CPSF1, CPT1C, CPXM1, CRB2, CREBRF, CRK, CROCCP3, CRTAC1, CRTCI, CRY2, CRYBA1, CRYZL1, CSNK1G1, CSNK2A1, CSNK2A2, CST2, CST3, CSTF3-DT, CTBP1, CTBS, CTDSP1, CTHRC1, CTSB, CTTNBP2NL, CUBN, CUEDC1, CUEDC2, CUL9, CX3CL1, CXorf40A, CXXC4, CYB561D1, CYB5D2, CYP27A1, CYP2R1, DACHI, DACT3, DARS, DAZAP2, DBH-AS1, DCAF12, DCAF12L2, DCAF5, DCDC2, DCLK2, DCST1, DCST2, DCTN3, DCTN4, DCTN5, DDHD1, DDHD2, DDN, DDOST, DDX47, DENND2A, DENND4A, DENND6B, DET1, DGKH, DHFR2, DHX32, DHX40, DIP2A, DIRC3, DKK1, DKK2, DKKL1, DLC1, DLEC1, DLK1, DLK2, DLX3, DMI-AS, DMGDH, DMXL2, DNAAF3, DNAH6, DNAH7, DNAH9, DNAI1, DNAJ1, DNAJ18, DNAJ27, DNAL4, DNALI1, DNASE1L1, DNHD1, DNMI, DNMBP, DNMT1, DOCK1, DOCK7, DPCD, DPP7, DPYSL4,

DPYSL5, DRAM2, DRAXIN, DRC1, DRC3, DTNBP1, DTX3, DUSP10, DUSP18, DUSP3, DVL2, DYM, DYNC1L2, DYRK1A, DYRK1B, E2F6, EBF2, EBF4, ECE1, ECM1, EDAR, EDN1, EEF1AKMT3, EEF2, EFCAB1, EFCAB12, EFCAB7, EFEMP2, EFHB, EFHC1, EFNBI, EFNBI2, EFNBI3, EFR3B, EFS, EGLN3, EID2B, EIF3L, EIF4ENIF1, ELF1, ELK4, ELMOD3, ELOVL5, EMID1, EMP3, ENDOV, ENO2, ENO3, ENPEP, ENPP3, ENPP4, ENTPD5, ENTPD6, EPB41L1, EPB41L5, EPC1, EPCAM-DT, EPHA2, EPHA4, EPHB2, EPHB3, EPHX2, ERAP1, ERCC1, ERLIN1, ERLIN2, ESD, ESRRG, EVC, EVL, EXOC4, EXTL1, EYA1, EZH1, F10, F2R, FAIM2, FALEC, FAM107A, FAM13A, FAM149B1, FAM153C, FAM160B2, FAM161B, FAM168A, FAM168B, FAM171A2, FAM172A, FAM178B, FAM183A, FAM193A, FAM198B, FAM201A, FAM206A, FAM20B, FAM210B, FAM214B, FAM219B, FAM220A, FAM222A, FAM228A, FAM229B, FAM3D-AS1, FAM47E, FAM53B, FAM53C//LOC100128966, FAM81B, FAM92B, FANK1, FAT4, FAXDC2, FBLN1, FBLN7, FBN2, FBRS, FBXL14, FBXL2, FBXL20, FBXL8, FBXO15, FBXO16, FBXO24, FBXO42, FBXO6, FBXW8, FCER1G, FCHSD2, FCRLB, FEM1B, FER1L4, FEZ1//STT3A-AS1, FGF1, FGF10, FGF17, FGF3, FGFR3, FHIT, FITM2, FKBP1A, FKBP9, FKBP9P1, FLJ12825, FLJ16779, FLJ37453, FLJ46284, FLJ46906, FLNC, FNDC3A, FNDC4, FNDC5, FNTA, FOLR1, FOXA2, FOXB1, FOXD2-AS1, FOXF2, FOXJ1, FOXJ3, FOXK1, FOXO3, FOXS1, FREM1, FRG1BP, FRMD3, FRMD6, FRRS1L, FRS3, FRZB, FSD1L, FST, FSTL3, FTL, FTO, FUNDC2, FUT11, FUT8, FUT8-AS1, FXR1, FXR2, FXYD6, FYN, FYTDD1, FZD1, FZD2, FZD9, GAA, GAB2, GABARAP, GABARAPL2, GABRG3, GAD1, GALC, GALNT16, GALNT5, GALP, GAMT, GAS1, GAS8, GATD1, GBA, GBE1, GCKR, GCNT1, GDAP2, GDF10, GDF11, GDF5, GDII, GEM, GGT7, GIGYF2, GIPR, GLB1L, GLDN, GLI3, GLI4, GLIPR1, GLIS2, GLUD1P2, GLYATL2, GNAZ, GNB2, GNPDA2, GNS, GOLGA2P10, GPBP1, GPC1, GPC5, GPCPD1, GPHN, GPR132, GPR137C, GPR146, GPR153, GPR155, GPR162, GPR173, GPR182, GPR21//RABGAP1, GPRASP1, GPSM1, GPSM2, GPX7, GRAMD1C, GREB1, GRIN3B, GRINA, GRK5, GSAP, GSE1, GSK3B, GSN, GSN-AS1, GSTA4, GSTK1, GSTM2, GTF2A1, GTF2F1, GTF3C3, GTSE1-DT, GUCA1B, H2AFY2, H6PD, HABP4, HACD2, HAGLR, HAP1, HAPLN2, HCFC2, HDAC6, HEATR5B, HELZ, HEMK1, HERC4, HERPUD2, HES7, HEXIM1, HGC6.3, HGSNAT, HHAT, HHIPL2, HILPDA, HINT3, HIP1R, HIPK1, HIST1H1E, HIVEP3, HLA-DMA, HMGCL, HMGCLL1, HNRNPA1P10, HNRNPUL2, HOMER3-AS1, HOTAIRM1, HOXA-AS2, HOXA-AS3, HOXA1, HOXA2, HOXB-AS1, HOXB-AS3, HOXB1, HOXB7, HOXB8, HOXB9, HOXC4, HOXC8, HPCA, HS1BP3, HS3ST3B1, HSD11B1L, HSD17B11, HSD17B13, HSD17B14, HSD17B8, HSDL1, HSF2, HSPA13, HYDIN, HYMAI, HYPK, IAH1, IAPP, ICAM5, IDH2, IDS, IER5, IER5L, IFFO1, IFI27L2, IFT140, IFT52, IGF2-AS, IGF2R, IGFBP1, IGFBP5, IGFBP7, IGFBPL1, IGIP, IGSF11, IL1RAPL1, IL6ST, ILDR2, IMPG1, ING4, INHA, INMT, INSR, INSYN2B, INTU, INVS, IP6K2, IP6K3, IPP, IQCD, IQUB, IRX1, IRX2, IRX3, ITFG1, ITGA10, ITGA5, ITGA8, ITGB8, ITIH2, ITPRID2, IWS1, JAM3, JMJD7-PLA2G4B, KAT6A, KATNAL1, KC6, KCNC3, KCNIP2, KCTD1, KCTD13, KCTD16, KCTD18, KCTD19, KCTD21, KCTD7, KCTD9, KDEL1, KDM3A, KDM4B, KIAA0232, KIAA0895, KIAA0895L, KIAA1324, KIAA1324L, KIAA1328, KIAA1755, KIAA1958, KIAA2012, KIF19, KIF26B, KIF27,

KIF5C, KIFAP3, KLF10, KLF11, KLF3, KLHDC10, KLHDC8B, KLHL11, KLHL12, KLHL13, KLHL22, KLHL28, KLHL32, KLHL4, KLHL9, KLRF1, KMT5B, KY, KYAT3, LAMB1, LAMTOR3, LAMTOR5, LCA5, LCOR, LDB1, LEF1, LENG8, LEPR, LETMD1, LGALS8, LGALS8-AS1, LGII, LGR4, LGR5, LIFR-AS1, LIM2, LINC00294, LINC00526, LINC00535, LINC00595//LINC00856, LINC00629, LINC00634, LINC00648, LINC00683, LINC00847, LINC00853, LINC00893, LINC00963, LINC01003, LINC01124, LINC01138//LOC105371225, LINC01144, LINC01152, LINC01285, LINC01456, LINC01473, LINC01549, LINC01571, LINC01686, LINC01703, LINC01749, LINC01801, LINC01869, LINC01933, LINC01948, LINC01977, LINC02035, LINC02043, LINC02175, LINGO3, LIX1, LIX1L, LMAN2L, LMBRD2, LMF1, LMO1, LNPK, LOC100128076, LOC100128164, LOC100130691, LOC100268168, LOC100506142, LOC100506801, LOC100507071, LOC100996724, LOC100996732//LOC107985911, LOC101927521, LOC101927943, LOC101928266, LOC101928414, LOC101929240, LOC101929552, LOC101929704, LOC102723548, LOC102723566, LOC103344931, LOC105369203, LOC105369486, LOC105370526, LOC105371050, LOC105371899, LOC105371925, LOC105375614, LOC155060, LOC254896, LOC284788, LOC339803, LOC646588, LOC730098, LONRF2, LOXL1, LOXL3, LOXL4, LPIN2, LPIN3, LRIG3, LRMDA, LRP2, LRP4, LRRC23, LRRC27, LRRC28, LRRC3-DT, LRRC36, LRRC37B, LRRC43, LRRC4B, LRRC4C, LRRC7, LRRC70, LRRC73, LSAMP, LSM11, LSMEM1, LTA4H, LYPD1, LYRM4-AS1, LYSMD1, LZIC, MAEL, MAGEF1, MALRD1, MANIA2, MAN2A2, MAN2B1, MANBA, MANEA-DT, MAP1A, MAP1B, MAP1LC3B, MAP2K5, MAP2K6, MAP3K1, MAP3K12, MAP7D2, MAPK10, MAPK15, MAPK4, MAPKAPK2, MAPKBP1, MAPRE3, MARCH6, MARCH7, MARCH9, MATN1-AS1, MATR3, MBD5, MBD6, MCF2L, MCFD2, MEAK7, MECP2, MED13, MED13L, MED23, MEG3, MEG8, MEGF6, MEGF9, MEIS2, MEOX1, METRN, METTL6, MEX3A, MGAT3, MIA3, MICAL1, MICAL2, MICU3, MIR4292, MIR503HG, MLLT11, MLLT3, MMP11, MMP2, MN1, MNX1, MOB3B, MON2, MORC3, MORN1, MORN3, MORN4, MORN5, MOSPD2, MPDZ, MPI, MRC2, MRPL30, MRPL46, MRPS6, MRTFB, MS11, MS12, MSL1, MSL2, MSLN, MST1P2, MTFR1L, MTHFSD, MTMR3, MTSS1, MTX3, MUC16, MUMIL1, MUT, MVB12B, MXD1, MXD4, MXI1, MYBPC1, MYH8, MYL4, MYL9, MYOF, MYOM3, MYRF, MZF1, NAA35, NAB2, NADK2, NADSYN1, NAPB, NAPSA, NAT8L, NBPF8, NCALD, NCAM1, NCBP2, NCK1, NCOA3, NCOA6, NCS1, NCSTN, NDEL1, NDNF, NDUFB4, NDUFV2, NECAB3, NEK6, NEK9, NEO1, NEPRO, NEU1, NEXMIF, NFAT5, NFATC4, NFIL3, NFKB2, NFKBIL1, NGEF, NGFR, NIPBL, NIPSNAP2, NISCH, NKD1, NKIRAS2, NKX3-2, NKX6-2, NLGN2, NLRC3, NLRC4, NMNAT1, NMT2, NNMT, NOG, NOL3, NOTUM, NPAS2, NPEPPS, NPHP4, NPR3, NPTN-IT1, NPTX2, NR1D2, NR2F1, NR2F1-AS1, NR2F2, NR6A1, NRAP, NRBF2, NRDE2, NRGN, NRN1, NRP2, NRXN3, NSD3, NTANI, NTF3, NTN1, NUAKE2, NUDT17, NUTM2D, NXP3, OARD1, OBSCN-AS1, OCA2, OGA, OGFOD2, OGT, OLFML2A, OLIG2, OLIG3, OPRL1, OPTN, OR51E2, ORAI3, OS9, OSBPL7, OSBPL9, OSCP1, OTOF, OTUB2, OTUD3, OVGP1, OXSRI, P3H1, P3H3, P3H4, P4HTM, PAAF1, PABPC1, PAG1, PAK2, PAK5, PALLD, PALM, PAPP, PAQR6, PAQR7, PARP11, PARP16, PARP6, PARVA, PAX3, PBXIP1, PCBP4,

PCDH18, PCDH19, PCDH8, PCDHA2, PCDHA3, PCDHB10, PCDHB11, PCDHB13, PCDHB15, PCDHB2, PCDHB3, PCDHB4, PCDHGB7, PCDHGC3, PCED1A, PCNX1, PCP2, PCSK2, PCSK6, PCYOX1, PCYOX1L, PDCD4, PDE1B, PDE6B, PDE8B, PDGFC, PDGFRA, PDK1, PDLIM7, PDRG1, PDYN, PDZRN3, PEG10, PEG13, PELI2, PELI3, PER2, PES1, PEX11A, PEX11B, PEX12, PEX13, PEX19, PFKFB3, PFKFB4, PFN1P2, PGAP1, PGF, PGK1, PGM3, PHC3, PHF2, PHF24, PHF3, PHOX2A, PHPT1, PHYKPL, PI4KAP1, PIAS1, PICALM, PIFO, PIGQ, PIK3IP1, PIK3R1, PJA2, PKDCC, PKNOX2, PLA2G12B, PLA2G6, PLBD2, PLCD1, PLCXD2, PLCXD3, PLD6, PLEKHA4, PLEKHA8, PLEKHB1, PLIN2, PLOD1, PLOD2, PLTP, PLXNA2, PLXNA3, PLXNB3, PMM1, PMP22, PMS2CL, PNCK, PNMA2, PNMA8A, PNN, PNPLA7, PNRC1, POC1B, PODXL, POGK, POGZ, POLK, POLR2B, POLR3GL, POU3F2, POU4F3, POU6F2, PPFIBP1, PPIA, PPIL6, PPM1E, PPME1, PPP1R12B, PPP1R14C, PPP1R32, PPP1R3C, PPP1R3E, PPP1R3F, PPP1R9B, PPP3CB, PQLC1, PRAF2, PRAM1, PRDM12, PRDX2, PRELP, PREPL, PREX1, PRICKLE2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAR2A-AS1, PRKCA, PRKCB, PRKCE, PRKRA, PRKRIP1//LOC100630923, PRMT8, PROS1, PROX1, PRPF18, PRR14, PRR3, PRR5L, PRRT2, PRSS35, PRSS53, PRXL2A, PSAPL1, PSD2, PSME1, PSTPIP1, PTAR1, PTCH2, PTGR1, PTGS1, PTP4A2, PTPN13, PTPRM, PTPRN, PTPRVP, PTX3, PURB, PXDC1, PKX, PYGO1, PYGO2, PYROXD2, QKI, R3HCC1L, RAB11FIP4, RAB14, RAB2A, RAB2B, RAB37, RAB40B, RAB4A, RAB5B, RAB6B, RAB7B, RABGEF1, RACK1, RAD23B, RAD52, RAD9B, RALB, RAN, RANBP9, RAP1GDS1, RAP2C-AS1, RAPGEF4, RASA1, RASA4B, RASL10B, RBBP4, RBKS, RBM12B-AS1, RBM20, RBM24, RBM33, RBM43, RBM5, RBMS3//LINC00693, RC3H2, RCN1, RCOR2, RDH5, RDX, RETSAT, RFTN2, RFX2, RFX4, RGMB-AS1, RHBDD2, RHCE, RHOB, RHOJ, RHOU, RIBC1, RILPL1, RIOK3, RIPOR1, RIT1, RLF, RLIM, RMDN1, RMND5A, RND1, RNF11, RNF111, RNF122, RNF130, RNF14, RNF152, RNF157, RNF165, RNF169, RNF19A, RNF214, RNF220, RNF24, RNF38, RNF43, RNGTT, ROR2, RORA, RORA-AS1, RP2, RPA1, RPH3AL, RPL13P5, RPL22, RPL7A, RPLP0, RPRD1B, RPS14, RPS23, RPS4X, RPS6KA3, RPSAP52, RSPH14, RSPH9, RSRC2, RTL1, RTL5, RTN4RL1, RTTN, RUSC2, RXRA, RXRG, S1PR1, S1PR2, SACS-AS1, SAMD10, SAMD8, SARAF, SAT2, SAXO1, SCAF4, SCAF8, SCAMP1, SCAMP4, SCAPER, SCCPDH, SCD5, SCHIP1, SCML1, SCML2, SCN2B, SCN4B, SCN5A, SCNN1D, SCP2, SDC3, SDCBP, SDHAF4, SDK2, SEC14L1, SEC14L2, SEC31A, SEC61A2, SECISBP2L, SECTM1, SEL1L, SELENBP1, SELENOP, SEMA3B, SEMA3C, SEMA4F, SEMA4G, SEMA5A, SEMA5B, SEMA6D, SENP5, SENP7, SEPT6, SERINC1, SERPINA1, SERPING1, SERTAD2, SERTAD3, SESN3, SETBP1, SF11, SFXN1, SGCB, SGCG, SGSM2, SH3BGRL3, SH3BP5, SH3BP5-AS1, SH3D21, SH3GLB1, SH3RF1, SH3RF3, SIAE, SIDT1, SIDT2, SIK2, SIL1, SIM2, SIRPA, SIRT3, SKAP1, SKAP2, SKIDA1, SLAIN2, SLC12A6, SLC16A14, SLC16A4, SLC22A18, SLC22A8, SLC25A14, SLC25A30, SLC25A36, SLC25A37, SLC25A40, SLC26A11, SLC27A1, SLC2A13, SLC2A3, SLC35D2, SLC35E2B, SLC35F1, SLC36A4, SLC37A4, SLC38A3, SLC39A7, SLC41A3, SLC43A2, SLC4A8, SLC51B, SLC5A3, SLC6A1, SLC6A16, SLC6A8, SLC7A11, SLC7A11-AS1, SLC8A2, SLC8A3, SLC9A3-AS1, SLC9B1, SLFN5, SLIT1, SLIT2, SLIT3, SMAD2, SMAD5, SMAGP, SMAP2, SMARCA1, SMARCC2, SMARCD3,

SMG1P7, SMG6, SMG9, SMIM17, SMIM29, SMIM32, SMOC1, SMOX, SMPD1, SMPD3, SMYD2, SMYD3, SNAI2, SNAPC1, SNORD6, SNRNP48, SNWI, SNX18, SNX2, SNX29, SNX3, SNX30, SNX32, SOAT1, SOBP, SOCS5, SOGA1, SORCS2, SOX1, SOX1-OT, SOX11, SOX21, SOX5, SOX8, SP1, SP5, SPA17, SPACA9, SPAG17, SPAG6, SPAG8, SPATA7, SPATS2, SPEN, SPICE1, SPIN3, SPSB1, SPSB4, SPTY2D1, SRCIN1, SRP54, SRP72, SRPK2, SRR, SRSF12, SSC5D, SSPO, SSTR3, ST3GAL3, ST3GAL5, ST6GALNAC5, ST6GALNAC6, ST8SIA2, ST8SIA4, STARD4, STARD4-AS1, STARD9, STAT1, STAT5B, STK24, STK3, STOML3, STON1, STPG1, STRA6, STRADB, STT3B, STX12, STX17, STX1A, STX7, SUCLG2, SUCNR1, SUFU, SUGCT, SUGP2, SUMF2, SUPT3H, SUPT6H, SUPT7L, SUSDB, SVOP, SYCE3, SYNGR1, SYNJ1, SYNPO, SYNPR-AS1, SYS1, SYT11, SYT17, TAB2, TADA2B, TAGLN3, TAOK1, TAOK2, TAPBPL, TAPT1, TAS2R5, TBC1D10C, TBC1D19, TBC1D32, TBC1D9B, TBX15, TCAF1, TCEA2, TCF12, TCF4, TCP11, TCP11L1, TCTE1, TDRD3, TEAD1, TECPR1, TEF, TEKT2, TEKT5, TENM3, TENM4, TENT4A, TEPI1, TERF2IP//LOC105371348, TET1, TET2, TEX22, TF, TFAP2B, TGFB2, THAP8, THBD, THBS3, THBS4, THG1L, THPO, TIGD1, TIMP1, TIMP3, TINCR, TIPARP, TLE6, TM2D1, TM6SF2, TM9SF2, TM9SF4, TMC7, TMCC3, TMED4, TMED8, TMEM101, TMEM106A, TMEM106B, TMEM107, TMEM120A, TMEM123, TMEM128, TMEM130, TMEM132A, TMEM132E, TMEM136, TMEM167B, TMEM168, TMEM169, TMEM170B, TMEM175, TMEM179B, TMEM182, TMEM204, TMEM219, TMEM221, TMEM230, TMEM248, TMEM25, TMEM255A, TMEM263, TMEM35A, TMEM38B, TMEM42, TMEM44, TMEM45A, TMEM87B, TMEM88, TMEM8B, TMEM91, TMEM94, TMEM98, TMF1, TMLHE, TMPRSS5, TMTC2, TMUB2, TMX4, TNFAIP1, TNFRSF10B, TNFRSF19, TNIP1, TNNC1, TNP1, TNS3, TNXB, TOGARAM1, TOM1L2, TOX4, TP53BP1, TP53BP2, TP53I11, TP53INP1, TPGS2, TPI1, TPM2, TPPP3, TPT1-AS1, TRADD, TRAF5, TRAF6, TRAK1, TRAPPC11, TRAPPC5, TRIL, TRIM16, TRIM17, TRIM2, TRIM41, TRIM44, TRIM55, TRIM63, TRIM68, TRIM8, TRIP4, TRIQK, TRPM8, TRPV3, TRPV4, TSC1, TSC22D1, TSGA10IP, TSHZ1, TSHZ2, TSPAN14, TSPAN18, TSPAN3, TSPAN31, TSPAN32, TSPAN5, TSPAN6, TSPAN7, TSPOAP1, TSPYL2, TTC25, TTC37, TTC4, TTC9C, TLL1, TTYH2, TUB, TUBG2, TULP3, TULP4, TUSC3, TUT4, TVP23A, TXNIP, TYK2, TYRO3, U2AF1//U2AF1L5, UBAP2L, UBE2L6, UBE2R2, UBL3, UBQLN2, UBQLN4, UCN, UFC1, UFL1, UHMK1, UHRF2, ULK2, UNC119B, UPK2, USP11, USP20, USP3, USP3-AS1, USP30, USPL1, UVRAG, UXT, VAMP3, VAMP5, VASH1, VAX2, VEZF1, VIM, VIPAS39, VPS13C, VPS16, VPS28, VPS33B-DT, VPS9D1, VSTM2L, VTN, VWA5A, WASF3, WBP1, WDFY3-AS2, WDR13, WDR26, WDR27, WDR31, WDR54, WDR60, WDR66, WDR88, WDTC1, WDYHVI, WHRN, WIPF1, WIPF2, WLS, WNT3//LOC101929777, WNT5A, WNT8A, WRB, WSB1, WWTR1, XKR5, XKR7, XPNPEP1, XRCC1, XRNI, YAF2, YAP1, YIPF5, YIPF6, YPEL1, YPEL2, YPEL5, YWHAE, YWHAH, YY1, ZBTB10, ZBTB21, ZBTB25, ZBTB26, ZBTB41, ZBTB5, ZBTB7C, ZC3H11A//ZBED6, ZC3H6, ZC3HAV1L, ZCCHC14, ZCCHC24, ZDHHC18, ZDHHC4, ZDHHC9, ZEB2-AS1, ZFAND3, ZFAS1, ZFC3H1, ZFP1, ZFP14, ZFP2, ZFP36L2, ZFP90, ZFP91, ZFYVE1, ZIC2, ZIC3, ZKSCAN1, ZKSCAN2, ZKSCAN4, ZKSCAN8, ZMYM3, ZMYND10, ZMYND12, ZNF106, ZNF12, ZNF136, ZNF148, ZNF182, ZNF2, ZNF227, ZNF236, ZNF25, ZNF250,

Продолжение приложения А

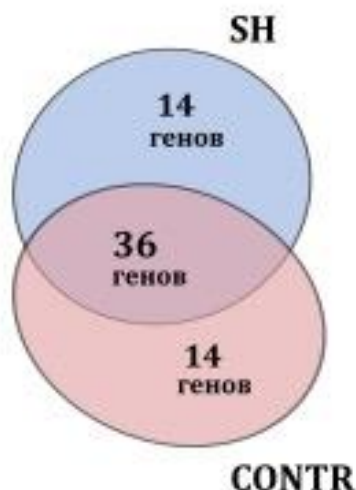
	ZNF251, ZNF264, ZNF276, ZNF316, ZNF322, ZNF324B, ZNF329, ZNF333, ZNF343, ZNF346, ZNF354C, ZNF385A, ZNF385C//C17orf113, ZNF404, ZNF423, ZNF436, ZNF438, ZNF441, ZNF460-AS1, ZNF467, ZNF474, ZNF484, ZNF497, ZNF503, ZNF503-AS2, ZNF516, ZNF521, ZNF529, ZNF548, ZNF554, ZNF555, ZNF561, ZNF571, ZNF585A, ZNF599, ZNF624, ZNF627, ZNF629, ZNF654, ZNF664, ZNF678, ZNF692, ZNF695, ZNF699, ZNF70, ZNF703, ZNF704, ZNF709, ZNF710, ZNF710-AS1, ZNF764, ZNF805, ZNF816, ZNF823, ZNF843, ZNF85, ZNF862, ZNRF3, ZRANB2-AS2, ZSCAN1, ZYG11B
3	ABCE1, ABCG2, ABCG4, ABI3BP, ACADL, ACAN, ACAP3, ACHE, ACKR3, ACP4, ACSBG1, ADAM19, ADAM9, ADAMTS1, ADAMTS12, ADAMTS17, ADAMTS18, ADAMTSL5, ADAP2, ADCY9, ADCYAP1R1, ADGRA2, ADGRD1, ADGRG6, ADGRL4, ADRA1D, ADRA2A, AFAP1L1, AGPAT5, AGRN, AHCTF1, AHNAK2, AK3, AKR1C1, ALDH1A3, ALDH1L2, ALDH8A1, ALDOA, ALK, ALOX12, ALPK2, ALPL, ANGPT2, ANGPTL2, ANKRD1, ANKRD33B, ANKRD50, ANXA1, ANXA4, ANXA5, AP5B1, APLN, APOA1, APOL6, APOO, AREG, ARHGAP11A, ARHGAP17, ARHGAP26, ARHGAP28, ARHGAP30, ARHGAP36, ARHGAP42, ARHGDIA, ARHGDIB, ARHGEF12, ARHGEF3, ARHGEF6, ARPC2, ASAHI, ASAP1, ASCC3, ATAD3C, ATF3, ATP12A, ATP2B2, ATP5F1C, ATP6V0D2, ATP6V1C1, ATRNL1, B4GALNT1, B4GALT1, B4GALT5, BAALC, BAALC-AS1, BACE2, BAG2, BAG3, BCAR3//MIG7, BCL3, BCYRN1, BHMGI, BLOC1S3, BMP1, BMP8B, BRK1, BTG3, C16orf72, C1GALT1, C1QL2, C1QTNF1, C1R, C20orf144, C22orf23, C2CD4C, C2orf72, C5orf56, C8orf34, CA8, CACNG5, CALHM2, CALHM5, CAMTA2, CAPI, CAPN9, CARD14, CARD6, CAV1, CAV2, CAVINI, CBL, CCDC102B, CCDC93, CCNO, CCSER2, CD109, CD300LG, CD59, CD81, CD82, CDC14B, CDC42BPG, CDC42EP1, CDC42EP3, CDC42EP4, CDH11, CDIPTOSP, CDK2, CDK6, CDKL5, CDKN1A, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2D, CDR2, CELP, CEMIP, CEP104, CEP85L, CHI3L2, CHPT1, CHRNA7, CHST1, CHST15, CHST3, CISH, CIT, CLDND1, CLEC2L, CLIC1, CLIC2, CLIP2, CLU, CNN3, CNTNAP2, COL15A1, COL5A2, COL5A3, COL8A1, CORIN, COTL1, COX1, COX4I2, COX7A1, CPEB2, CPNE5, CPOX, CPXM2, CREB3L1, CREB5, CRHBP, CRIM1, CRISPLD2, CRYBB1, CRYBG3, CS, CSMD3, CSPG4, CSRNP1, CTF1, CTNBNB1, CTTN, CTTNBP2, CXCL1, CXCL14, CXCL16, CXCL2, CXCL5, CYB5R1, CYGB, CYP11A1, CYTH3, DAAM2, DAZAP2, DAZL, DCAF10, DCBLD1, DCTN2, DENND2D, DENND3, DEPP1, DERL1, DGKA, DHH, DHRS7, DIO3, DIP2C, DIRAS2, DLL4, DNAH10, DNAJB1, DNAJC3, DNAJC6, DNAJC8, DNASE1L2, DOK6, DRAM1, DRD2, DSC3, DSCAM, DTX4, DUOX2, DUSP14, DUSP16, DUSP8, DYNLL2, DYNLT1, DYRK2, EBF1, EBI3, EDEM1, EDNRB, EEPD1, EFNA1, EHBP1L1, EI24, EIF4A2, ELK3, ELL2, EMC7, EMILIN2, EMP1, EMP3, EN2, ENDOD1, ENTPD2, EP400, EPAS1, EPB41L4A-DT, EPHA3, EPST11, ERAP2, ERFE, ERO1A, ESRRB, ETS1, ETV7, EVA1A, EVA1C, EXOC8, EXPH5, F2RL1, F3, F5, FABP7, FAM110D, FAM114A1, FAM160A1, FAM184B, FAM210A, FAM219A, FAM234B, FAM43A, FAM49A, FAM50A, FAM57A, FAM91A1, FAR2P2, FARP2, FAXC, FBH1, FBLIM1, FBXL7, FBXO3, FBXO45, FEM1C, FGD5, FHL3, FJX1, FKBP14, FLI1, FLOT1, FLT1, FLT4, FMN1, FNI, FNBPI, FNDC3B, FOSL1, FOSL2, FOXB2, FOXC1, FOXC2, FOXI1, FOXI3, FOXJ2, FOXL1, FOXN4, FOXQ1, FRMD4A, FRMD4B, FUBP3,

FZD6, GABBR2, GABRP, GADD45A, GADD45G, GANAB, GAS6, GAS7, GATA3, GBGT1, GBX2, GDNF, GDNF-AS1, GFMI, GFPT1, GFRA2, GIPR, GJC1, GLG1, GLP1R, GNA11, GNAL, GNAO1, GNB4, GNLY, GPR137B, GPR139, GPR150, GPR157, GPR4, GPR68, GRID1, GRIP2, GRM8, GSG1L, GUCY1A1, GUCY1A2, GUCY1B1, GXYL1, HACD3, HACD4, HBEGF, HCN3, HEBP1, HECA, HERC2, HERPUD1, HES2, HES4, HES5, HEXB, HEY1, HEYL, HIC1, HIF1A, HIGD1B, HIPK3, HIST1H2BK, HIVEP2, HKDC1, HMGB2, HOPX, HPSE2, HRH1, HS6ST1, HSD17B2, HSPA4L, HSPB8, HUNK, IBTK, ICE1, ID4, IDH3A, IER3, IFFO2, IGF1R, IGF2BP1, IGSF3, IL11, IL12A, IL13RA1, IL15RA, IL1R1, IL1RAP, IL4I1, IL7, IMPAD1, INHBB, INPP1, INPP5D, INSYN2, IPO7, IPO8, IREB2, ITCH, ITGA1, ITGA3, ITGA9, ITGB1, ITGB3, ITPKC, JAG1, JAK1, JAK2, JCAD, JMJD6, JPH2, KAZN, KCNA1, KCNA5, KCNA6//GALNT8, KCNAB1, KCNC1, KCNF1, KCNH1, KCNH8, KCNIP3, KCNJ1, KCNJ5, KCNJ8, KCNK17, KCNN3, KCNQ4, KCNT1, KCTD12, KERA, KIAA1147, KIAA1191, KIAA1549L, KIF13A, KIF13B, KIFC3, KIRRELI, KITLG, KLC2, KLF6, KLF7, KLHL29, KLHL3, KLHL6, KPNA1, KREMEN1, KRT16, KTN1, LICAM, LAMA4, LAMC1, LAMP2, LAMP3, LAMP5, LARP6, LAYN, LBH, LBX2, LEO1, LGALS3, LGALS9, LGALSL, LGI2, LHCGR, LHFPL6, LIF, LIFR, LIMCH1, LIMK2, LINC00310, LINC00475, LINC00698, LINC00857, LINC00941, LINC01198, LINC01291, LIPA, LIPG, LMCD1, LOC100505635, LOC100506885, LOC100507560, LOC101928100, LOC101929524, LOC101929798, LOC102724474, LOC102724566, LOC102724957, LOC105369201, LOC105376323, LOC105376567, LOC107986197, LOC152048, LOC283922, LOC400464, LOC729732, LONRF1, LOX, LPAL2, LPGAT1, LRCH1, LRP10, LRP1B, LRRC10B, LRRC25, LRRC32, LRRC59, LSP1, LSS, LTBP2, LTBR, LTNI, LURAP1, LURAP1L, LYN, LYSDM3, MAF, MAFB, MAFG, MAFK, MAGIX, MAL, MAML2, MAP3K8, MAPK1, MAPK11, MAPK8IP2, MARCKS, MASP1, MCAM, MCL1, MCOLN3, ME1, MECOM, MEGF8, MEST, METRNL, MGAT4B, MICAL3, MID2, MIR4435-2HG, MIR573, MIR9-3HG, MISP, MKI67, MLC1, MLF2, MLX, MMD, MMP19, MMP7, MMP9, MOCSI, MON1B, MOV10L1, MPPED1, MRGPRF, MSLN, MSMO1, MST1L, MTCP1, MTDH, MTMR10, MTRF1L, MXRA8, MYL12A, MYL12B, MYL3, MYO10, MYO16, MYO1F, MYO5B, MYOM2, MYORG, MYPOP, MYT1, NACAD, NACC2, NALCN, NAPG, NAT1, NAT8L, NCKAP1, NCOR2, NDFIPI1, NDUFS1, NECAP1, NECTIN4, NEURL1B, NFATC1, NFIC, NFKB1, NFKBIA, NFX1, NFXL1, NID1, NIPAL2, NMD3, NMUR1, NOLC1, NOMO3, NORAD, NOV, NOX1, NPC1, NR3C1, NRARP, NRP1, NRSN2, NSMAF, NT5E, NTN3, NUDT4//NUDT4B, NUP205, NXN, OAF, OLFM4, OSBPL11, OSBPL3, OSBPL6, OSGIN1, OSMR, OSR1, OSTF1, OSTM1, OTUD4, OTUD7B, P2RY11, P2RY2, PABPC4, PAEP, PAF1, PALM2-AKAP2, PAQR3, PARD6G, PARM1, PARP14, PCDH10, PCDHA8, PCDHGA11, PCDHGA12, PCNP, PCSK5, PCYT1A, PDE1C, PDE3A, PDE4C, PDE4C, PDE6C, PDGFB, PDHA1, PDIA2, PDK4, PDPI, PDZD2, PELI1, PFDN1, PFKFB2, PGM5, PHF11, PHF19, PHLDA3, PHLPP2, PHRF1, PI4KA, PIGH, PIGZ, PIK3CA, PITRM1, PLA2G2A, PLAC8, PLAU, PLB1, PLBD2, PLCD3, PLEKHA2, PLEKHH3, PLEKHM1, PLEKHN1, PLK2, PLLP, PLP2, PLVAP, PLXDC1, PLXNA2, PNMA6A, POLH, POLRIC, POM121C, POMC, PON3, POPDC2, POPDC3, PPFIA1, PPIC, PPP1CB, PPP1R12C, PPP1R16B, PPP1R3D,

Продолжение приложения А

PPP2R5B, PPP3CC, PRAG1, PRCD, PRDM16, PRKAR2A, PRR16, PRRG1, PRXL2C, PSMB10, PSME4, PSMF1, PTGDR2, PTGFRN, PTGIS, PTH1R, PTHLH, PTPN12, PTPN18, PTPN3, PTPRE, PTPRK, PTPRU, PVR, PXDN, PXDNL, PXYLP1, PYGL, PZP, RAB11FIP1, RAB32, RAB5C, RAB6A, RAB8B, RABEP1, RABGGTB, RAI14, RALGAPB, RASA3, RASGEF1C, RASL10A, RASSF4, RASSF5, RCAN1, RCL1, RELB, REM2, RFK, RFTN1, RGCC, RGS11, RGS19, RGS20, RGS4, RGS6, RHBDF2, RHCG, RHOBTB3, RHOC, RHOG, RHOQ, RHOV, RHPN2, RIN3, RIPK4, RIPOR3, RLN1, RMDN3, RNF128, RNF144A, RNF168, RNF180, RNF19A, RNF19B, RNF6, RNH1, RNPEPL1, ROPN1B, ROPN1L, RPS3A, RPS6KA2, RRAGD, RUFY3, RUNX1//LOC100506403, RUNX3, S100A3, SAMD12, SAR1B, SATL1//LOC105369163, SAYSD1, SCG2, SCGB1A1, SCGB3A2, SCTR, SDC1, SDC2, SEC23A, SEC24A, SEC61A1, SELPLG, SENP2, SEPT11, SEPT8, SERHL2, SERINC3, SERP1, SERPINB6, SERPINB9, SERPINE1, SESN2, SFRP2, SFTA1P, SGPP1, SGTB, SH3BP4, SH3KBP1, SH3PXD2B, SH3TC2, SHISA3, SLC11A1, SLC12A2, SLC13A5, SLC16A7, SLC1A4, SLC22A23, SLC23A2, SLC25A18, SLC25A20, SLC25A32, SLC25A51, SLC2A1, SLC2A6, SLC34A2, SLC35E1, SLC35F2, SLC35F6, SLC35G2, SLC36A1, SLC45A4, SLC46A3, SLC4A2, SLC50A1, SLC6A17, SLC7A1, SLC7A10, SLC7A5, SLC7A7, SLC8A1, SLC9A2, SLC9A9, SLCO2B1, SLFN12, SLITRK2, SMARCA5, SMOX, SMTNL2, SMURF2, SNORA73B, SNRK, SNTG2, SNX10, SNX13, SNX19, SNX27, SOCS7, SOST, SOWAHB, SOX18, SOX7, SOX9, SP140L, SPATA8, SPHK1, SPINK1, SPON1, SPON2//LOC100130872, SPPL3, SPTLC3, SQSTM1, SRL, SRPRA, SRPX, SSH1, SSR2, SSR3, ST3GAL1, ST5, STAM2, STARD5, STIP1, STK10, STK17B, STK26, STK32B, STK40, STMN2, STX3, SULT4A1, SYN1, SYNM, TACC1, TAF1D, TAGLN2, TBX18, TBX3, TCIRG1, TCN1, TDO2, TEK, TENT5C, TESH1, TEX14, TEX29, TFF1, TFPI, TFRC, TGFB1, TGFB111, TGM1, TGM2, THBD, THRB, TIMM21, TIMP2, TINF2, TKTL1, TM4SF1, TM4SF19, TM4SF19-AS1, TM9SF3, TMBIM1, TMC4, TMCC2, TMED5, TMED7, TMEM100, TMEM109, TMEM117, TMEM127, TMEM131L, TMEM135, TMEM144, TMEM154, TMEM171, TMEM184A, TMEM200B, TMEM229A, TMEM255B, TMEM40, TMEM43, TMEM51, TMEM51-AS1, TMEM63C, TMEM64, TMEM71, TMEM9B, TMOD1, TMOD3//LOC112268148, TMSB4X, TMX3, TNFAIP2, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF21, TNFSF10, TNFSF4, TNNT3, TNS2, TOMM70, TOR1B, TOX2, TP53INP2, TPBGL, TPCN1, TPCN2, TPPP, TPRG1, TRAPPC6B, TRH, TRIB1, TRIM22, TRIM26, TRIM45, TRIM47, TRIM69//LOC100419583, TRIM7, TRPC6, TRPS1, TSPAN1, TTF2, TTYH1, TVP23B, TXNDC11, UACA, UAP1L1, UBA2, UBASH3B, UBE2D2, UBE2I, UBE2Q2P1, UBE3C, UGGT1, UNC5B, UPB1, UPP1, URB1, USP7, VAMP8, VATIL, VAV3, VCAM1, VCIPI1, VDAC1, VEPH1, VGLL2, VPS13D, VPS18, VPS37A, VSIR, VSTM4, WFDC2, WFIKKN2, WNK4, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT9A, WWP1, XKR4, XPO5, XRN2, YBX3, ZBTB42, ZCCHC12, ZDHHC1, ZFAND5, ZFP36, ZHX2, ZNF207, ZNF750, ZYX

Приложение Б. Диаграмма Венна оверэкспрессированных генов в группе NICD, полученных при сравнении группы NICD с группами SH и CONTR, топ 50 генов. Полученные данные показывают, что преобладающее большинство оверэкспрессированных генов в этих двух сравнениях совпадает.



Приложение В. Списки генов с повышенной и пониженной экспрессией, полученные при сравнении экспериментальных групп.

Группы сравнения	Результат сравнения	Список генов
CONTR-NICD	Экспрессия повышена	<i>LAMP5, MMP9, CCN3, SLC1A4, FLT1, RUNX3, RGS4, PLA2G2A, PLXDC1, CORIN, OLFML2B, ACSBG1, RHOV, RHCG, LBH, ANGPT2, MCAM, CHST1, KCNA5, MAFB, SFTA1P, GABRP, GDNF, POMC, MASP1, ALPK2, HBEGF, DEPP1, SLC6A12, HCK, MYORG, TCN1, VAMP8, PPEF1, CYTOR, CCDC192, CHI3L2, DAAM2, VEPH1, ADAMTS18, AGT, HSPB8, TMEM100, ENDOD1, MIR4435-2HG, HEY1, EVA1C, IL1R1, SERPINB9, EMP1, CPXM2, SLC45A4, MME, OLFM4, ZNF750, LIFR, CACNA2D1, PPIC, OSMR, RGS6, IRF4, CXCL5, EMILIN2, ADAMTS15, TRPC6, ANKRD1, NRP1, FOXC1, PNPLA5, KCNN3, ENTPD2, FOXQ1, TNFAIP3, ATP6V0D2, EFHD1, IFFO2, TAL1, SMTNL2, ID4, CRISPLD2, ADGRA2, TKTL1, LPL, IRF8, JAK1, LAYN, SGK1, NGF, LGALS3, CASP17P, GPR139, DTX1, EBF1, PDE3A, EPHX1, SCGB3A2, MCHR1, CREB5, SRPX, SNAI2, KCNK17, FAM49A, MMP13, RGCC, PDZD2, TFF1, PAPSS2, OAF, KERA, PTH1R, ATP12A, ADAMTSL4, CAV2, ANKRD33B, TRIML2, HES5, PLD1, ARHGAP42, GFRA2, IL12A, EFNA1, SFXN3, NECTIN4, SORBS2, TGFB11I, GLP1R, SLC7A5, EPHA3, FURIN, HEYL, FN1, COL5A3, UAP1L1, KIAA1549L, INHBB, WFDC2, MPPED1,</i>

	<p>LAMC2, PGM5, ST14, MMP7, CDC42EP1, NRARP, SH3KBP1, MGAT4C, FHDC1, PCDH10, LRRC10B, CD82, ITGB3, TUBA4A, IGFBP3, FOXI1, MXRA8, TNNT3, IFI16, AFAP1L2, SPON1, CAV1, IRF6, PMEPA1, LRRC32, COL8A1, GUCY1B1, KCNA1, KRT16, ARHGEF28, MYOM2, CACNG5, SCGB1A1, AFAP1L1, EPAS1, VAV3, EXPH5, CDH11, STMN2, PROK1, USP43, FBLN5, KCNE4, GABBR2, ETS1, SSUH2, KRT6B, SVIL, SOX9, LOX, CYGB, F2RL1, FABP7, ALDH1A3, MMP14, ITGA1, MPP1, SOX18, GAS7, B3GNT7, ACKR3, PELI1, EOGT, SRL, CISH, GPC1, TGFB1, RFTN1, CABP1, OSTF1, PDZK1IP1, IGFL1, GLIS3, TNFSF10, COBLL1, CALHM5, ADAP2, SLC13A5, SHISA3, LAMA4, KRT6A, ADGRF2, HTR1F, NOS1, PLP2, SAT1, ITM2A, FRMD4A, ADAMTS12, IGF2, COL5A1, EEPD1, LAMC3, ITIH5, ERF2, SCG2, MTIX, JAK2, RASSF4, MCTP1, CSPG4, TNFRSF21, BHMGI, CAPN9, RASGRP1, SLC7A7, NTSR2, NOTCH1, THSD4, PLA2G5, CXCL12, NIPAL1, KRT14, LOC101929798, SLFN13, LMNA, SPINK1, DUSP15, ALDH1A2, TAGLN2, NIBAN1, TMEM63C, PPM1H, PLEKHG1, BBS5, LPGAT1, GATA3, HSD17B2, KRT5, JPH2, TM4SF19, IFIT3, ADAM19, DENND2B, SPATA8, MYC, STX3, SAMD12, CCR1, DPF3, WNT7B, CPEB2, MBP, IFIT2, TNS2, SPARCL1, HR, PAEP, NALCN, GRIP2, TEK, COL5A2, DMD, ARHGEF3, STK32B, CDKN2B, CABLES1, ELF4, LIG1, ERO1A, FAM234B, GJA4, IER3, CXCL14, FOSL2, MBOAT1, GRIN2D, TMBIM1, HRH1, KALRN, PMAIP1, ALDH1L2, PALMD, FZD1, KCNF1, DKK3, IL1RAP, JCAD, S100A3, LSP1, SOCS2, HAPLN3, CRHBP, APOA1, MECOM, KCNQ4, TRIM22, UNC5B, CDC14B, LINC00461, PLCXD3, LINC00346, CLIP2, CHST15, SYK, TMEM51, GABRB3, PLEKHA2, ITGA9, CRYBB1, AFP, ALOX12, HSD11B2, BCL11A, ANKRD50, TPPP, NR3C1, MMP25, RARRES2, HES2, SERPINB6, PTGIS, TMEM144, NEURL1B, SLC22A23, LYST, FGD5, ELL2, ADGRB3, LINC01198, MYL3, MEGF10, KIAA0040, SPON2, ROBO2, SLCO2B1, TENT5C, ITGA3, RHBDL3, ESRG, LINC00698, MMP12, F12, IL15RA, FOXS1, PLXNA2, NMNAT2, MAPK13, PCSK5, C2CD4C, SLIT3, SPATS2L, IFNGR1, LINC01278, ANXA2, PDE1C, DSC3, FYB1, CLIC2, SLC8A1, PRNP, EBF4, THRB, THBD, NUDT4, CXCL1, MYOZ3, TGM2, PEAR1, ADGRF4, SYP, IL10RA, TBX18, BNC1, SLC25A18, SNRK, TRIB3, CEMIP, XPO5, CAPG, TMEM163, JAG1, LYSMD3, VCAM1, PRDM16, MPPED2, PLXND1, MARC2, TMEM64, SORBS1, ADAM9, UPP1, ZFP36, TTYH1, TMEM268, RNF128, CSMD3, LCK, DENND2D, PHLDA2, EDNRB, CCDC102B, KRT17, IL32, PLAT, ARHGEF6, DIRAS2, KLF9, NKAPL, CD44,</p>
--	---

Продолжение приложения В

		ADGRD1, LOC101927359, PPARGC1B, ADORA2B, CDH1, MAFK, SLC12A2, KDR, SH2B2, TRIM47, ESYT3, FJX1, P2RY2, FOSL1, DOCK11, TCIRG1, NID1, CDC42EP3, GBP1, ACSL6, SLC7A10, SLC46A3, MYO3A, ASAH1, VSNL1, RNF168, ARHGAP28, PRR16, COL18A1, MYO5B, COX4I2, PHLDA1, LIPG, TES, EMX2OS, KCNAB1, TRIB1, PLAAT5, SHANK2, PLK2, IRF1, CHPF, LPAR3, MAF, TRAF3IP2, KLHL3, FAM241A, ESRP2, WNT9A, CTTN, GBX2, ANK1, CD109, SYTL3, RPS6KA2, DAAM2-AS1, OSGIN1, TEC, CD59, NFATC1, FAM114A1, DUSP5, CGNL1, RCL1, CASS4, PTGFRN, KLHL6, KRT75, EN2, LMCD1, LINC02154, SESN2, OSBPL3, FRMD4B, DHRS3, POU2AF1, LINC01168, EEF1A2, GUCY1A2, KLHL29, IDH3A, ADARB2, NXN, C15orf39, STAT5A, DIRAS1, GRID1, GSG1L, MOCOS, TP53AIP1, RHOC, PDGFRB, ESR1
	Экспрессия снижена	TNNC1, EGR2, MAP2, C6orf141, CALB1, PRMT8, KLHDC8A, S100B, NR2F2, CAMK2A, TNP1, KCNK12, NRG1, TFAP2B, PRRT2, EFCC1, TFDP2, SCD5, C6orf118, FGF10, LOC105375304, PLEKHA7, MAP6, FAM92B, PIMREG, TSPAN7, LINC00476, FLRT3, TMEM106C, PIK3R3, EID2B
SH-NICD	Экспрессия повышена	LAMP5, PLXDC1, MMP9, CORIN, PLA2G2A, ACSBG1, CCN3, RHOV, GABRP, TAL1, KCNA5, LBH, TCN1, OLFML2B, RGS4, OLFM4, RUNX3, POMC, SFTA1P, MYORG, CCDC192, PPEF1, CYTOR, DAAM2, MAFB, HEY1, DEPP1, EVA1C, DUSP15, ANGPT2, VEPH1, KCNN3, ADAMTS18, HCK, TMEM100, MMP13, LIFR, KCNE4, MCAM, CPXM2, SLC1A4, SLC45A4, RGS6, CHST1, IL1R1, DTX1, RFTN1, FOXC1, PLD1, SLC6A12, KRT17, EFNA1, LAYN, HES5, ADGRA2, IRF4, TKTL1, CASP17P, ACKR3, GADD45G, PMEPA1, CHI3L2, EFHD1, EBF1, TFF1, MYOM2, ENTPD2, IL12A, PNPLA5, PDZD2, FLT1, GDNF, PTH1R, MIR4435-2HG, GPR139, TRPC6, KCNK17, TNFAIP3, KERA, FOXQ1, ENDOD1, INHBB, RHCG, ZNF750, EMILIN2, PLCXD3, SMTNL2, EPHX1, NRP1, HBEGF, SCGB1A1, IRF8, SCGB3A2, FOXI1, NOS1, BBS5, SPON1, EBF4, MMP7, MGAT4C, MXRA8, MME, MCHR1, PCDH10, EPHA3, ITGB3, ID4, CACNG5, FABP7, FN1, HTR1F, HEYL, RASGRP1, PROK1, LRRC10B, MPPED1, ADAMTS15, CRISPLD2, ABCA4, ADAP2, FZD1, JPH2, OSMR, KRT16, VAMP8, SERPINB9, SHC2, PPIC, KRT14, GAS7, ARHGEF28, NGF, IGF2, HSPB8, LINC00461, NRARP, GLP1R, IGFL1, TNFSF10, IFFO2, HR, CISH, LAMA4, CLDN5, PGM5, CDH11, MASP1, KRT6B, SCG2, HSD17B2, DMD, PDE3A, LAMC2, NTSR2, SEMA5A, LINC01198, PLA2G5, GUCY1B1, GFRA2, SRL, HAPLN3, MTIX, COL5A1, RASSF4, JAK2, KRT6A, B3GNT7, SH3KBP1,

Продолжение приложения В

		<p> <i>PDZK1IP1, AFAP1L2, FBLN5, LRRC32, THBD, TRIM55, LAMC3, HRH1, GLIS3, TM4SF19, IFI16, SNAI2, CCR1, TNNT3, ALDH1A2, SOX18, SHISA3, BHMGI, C2CD4C, IRF6, SPARCL1, COL8A1, CGNL1, FAM107A, EXPH5, CRYBB1, ADAMTS12, PALMD, CACNA2D1, THSD4, MBP, FAM49A, FHDC1, SMOC2, NALCN, VSTM4, PELI1, JAK1, SPATA8, KRT5, ITGA9, STMN2, SVIL, NOTCH1, CEMIP, DPF3, GPC1, TTYH1, ANKRD33B, SNTG2, IFIT2, P2RY2, WNT7B, TMEM63C, LPL, KRT75, ST14, POPDC2, SLC22A5, MCTP1, SLC22A23, SH2B2, GJA4, TGFB1I1, HES4, USP43, GABBR2, UAP1L1, TENM4, PLEKHG1, ADAMTSL4, MMP14, RGCC, MYL3, IFIT3, RNF152, GATA3, KIAA1549L, LINC00346, CXCL5, SLC7A7, LMCD1, LOC101929798, SLIT3, KLHL29, SYTL3, MMP12, CXCL12, CYGB, KLHL3, TC2N, NECTIN4, ADRA2A, NMNAT2, ADGRB3, PLXNA2, FAM234B, ALPK2, COBLL1, CAPN6, CAPN9, ADGRF2, SOX9, CD82, SEMA5B, AGT, STK32B, PAPSS2, PAEP, CXCL2, XPO5, POU2AF1, ITGA1, IL10RA, PLEKHF1, BMPRI1B, C8orf34, KALRN, TMEM163, SLC13A5, ADGRD1, TMBIM1, SAT1, OSGIN1, STX3, CABP1, FURIN, MATK, TOX2, IFNGR1, MEGF10, IRF1, JCAD, NKAPL, EEPD1, DIRAS1, RPS6KA2, TMEM144, CXCL1, CALHM5, MAF, PPM1H, FAM110D, SLC46A3, DKK3, CLIP2, TNFRSF9, JAG1, KCNA1, WFDC2, KCNQ4, LPGAT1, ACSL6, FOXF1, SAMD12, C11orf88, GBP1, ADGRF4, GRIN2D, DAAM2-AS1, OSTF1, SLC25A18, DENND2B, TMOD1, WNT9A, CTTNBP2, EMP1, EMX2OS, FBXL7, ARHGAP42, KCNAB1, CDH1, GPR55, ARHGAP28, TMEM158, NFATC1, CDC42EP1, HPSE2, SLC38A8, PTGIS, LOC101927359, SERHL2, IL32, CAV2, KCTD12, SLC02B1, SPINK1, C3AR1, RNH1, NAV1, PRR16, LRRC55, ALOX12, VAV3, EPHB6, HES2, CD59, FJX1, LINC01168, ERO1A, NACAD, LOC105370969, LGALS3, DENND2D, MOCS1, NEURL1B, HS6ST1, NUDT4, VCAMI, EN2, SRPX, PRODH, NIPAL1, ESRI, MMP17, CTNND1, WFIKKN2, CASS4, LPAR3, ADCYAP1R1, CFAP65, DHH, MOCOS, LGI2, PDE1C, PEAR1, PLEKHA2, CCDC102B, DIPK1C, TGFB1, MYC, TENT5C, EDNRB, CDC14B, MYO3A, OAF, PLEKHG4B, ZDHHC1, FOXS1, LOX, BNC1, TP53AIP1, SHANK2, KCNG2, FOXC2, SPSB1, MYOSLID, C6orf223, SFXN3, SLC8A1, STAT5A, MAP3K8, MTNR1B, MYO5B, CLIC2, GSX1, FAM110B, KLF9, SLC9A9, FYB1, EPB41L1, CIT, AFAP1L1, CREB5, LRFN1, TNFSF4, EOGT, TBX18, SSUH2, PRDM16, MS4A15, LINC01278, GPR157, AFP, VWA2, TMEM37, DUSP22, LOC101929130, FRMD4A, TNFRSF21, MBOAT1, OTOP2, TDO2, MARC2, RAB32, USH1G, HOPX, OPHN1, SOCS2-AS1, TMEM51,</i> </p>
--	--	--

Продолжение приложения В

		<i>MOBP, EDNRA, ERFE, SPPL3, TSPAN18</i>
	Экспрессия снижена	<i>TRIM55, CDH6, EGR2, BMPR1B, NEFM, METTL7B, APLN, FBXO32, MAP6, GPR55, LRRC55, CMKLR1, DUSP4, TAGLN, LRRC75A, PTX3, GAP43, DUSP2, CD52, ANGPT1, NRG1, SCD5, GNG11, MATN2, CPLX2, C5, RARB, C2orf92, LOC283731</i>
CONTR-SH	Экспрессия повышена	<i>SERPINE1</i>
	Экспрессия снижена	-
SH-DAPT	Экспрессия повышена	<i>FOXA2, PDZRN3, FOXJ1, SPOCK2, INSRR, PTCH1, GABRG3, SYNDIG1, LINC00261, RELN, TFAP2B, VWA5A, SLC22A8, DEPTOR, FREM1, NKX3-2, STARD4-AS1, PLCXD3, PDGFD, REC8</i>
	Экспрессия снижена	<i>AHNAK2, TNFRSF10A, APLN, CD70, ANK1, FOSL1, FBXO32, LINC00678, SERPINE1, EMP1, CDKN1A, IL6R, ST14, IL11, CAV1, CCR7, VAT1L, TNFSF9, AEN, HES2, DUSP5, TRIM22, TNFRSF12A, CXCL14, CD44, TAGLN, TMEM132B, ATAD3B, COL5A3, LGALS3, HERC5, ZNF385A, ANXA1, PTX3, INPP5D, SMS, MTHFD2, TFPI2, OLIG3, NECTIN4, TNFRSF10D, MAFF, CDCP1, NEFM, F2RL1,</i>
		<i>PHLDA3, TRIML2, LRRC15, THBS2, LIF, HES4</i>

SAINT-PETERSBURG UNIVERSITY

Printed as manuscript

Katolikova Nataliia Victorovna

Differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons *in vitro*: the role of trace amine-associated receptors and modulation of the Notch signaling

Scientific specialty 1.5.22. Cell biology

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences

Translation from Russian

Scientific supervisors:
Candidate of Medical Sciences
Gainetdinov Raul Radikovich,
Doctor of Biological Sciences
Malashicheva Anna Borisovna

Saint-Petersburg

2023

Contents

Introduction	104
The relevance of research.....	104
Theoretical and practical significance.....	106
Goals and objectives of the study	106
Provisions for defense.....	107
Scientific novelty of the study.....	107
Personal contribution of the author.....	108
1. Literature review.....	109
1.1. Cell replacement therapy for Parkinson's disease and differentiation of human pluripotent cells into dopaminergic neurons	109
1.2 Trace amine-associated receptors	114
1.3 Notch signaling	116
2. Materials and methods	119
2.1 Animals.....	119
2.2 Histology	119
2.3 Cell lines.....	120
2.4. Differentiation of hIPSCs	121
2.5 Immunofluorescence staining	122
2.6 High performance liquid chromatography (HPLC)	123
2.7 Patch-clamp.....	124
2.8 Flow cytometry.....	124
2.9 RNA isolation and reverse transcription	125
2.10 Real-time PCR.....	125
2.11 TaqMan PCR.....	126
2.12 Criteria for selection, inclusion, normalization and analysis of RNA sequencing datasets, obtained from open sources	127
2.13 Production of lentiviruses.....	128
2.14 Evaluation of the effectiveness of viral particles to inhibit/activate the Notch signaling	128
2.15 Evaluation of the effectiveness of Notch signaling inhibition/activation during differentiation of human iPSCs into dopaminergic neurons.....	129
2.16 RNA sequencing.....	129
2.17 Data processing	129
2.18 Data access	130
3. Results.....	131
3.1 Differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons <i>in vitro</i>	131
3.1.1 hIPSCs efficiently differentiate into dopaminergic neurons <i>in vitro</i>.....	131
3.2 Interrelation of the TAARs system, neurogenesis and differentiation of dopaminergic neurons <i>in vitro</i>	137
3.2.1 TAAR5 knockout mice have an increased number of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain, as well as increased levels of GDNF in the striatum.....	137
3.2.2 TAAR2 knockout mice have elevated level of BDNF in the striatum	139
3.2.3 Analysis of the expression of TAARs made on RNA sequencing data obtained from open databases showed that TAARs are expressed in neurogenic zones, in particular in the mouse hippocampus, and their expression is found in different cell types.....	139
3.2.4 TAARs are expressed at the late stages of hIPSC differentiation into dopaminergic neurons, as it was shown by analysis of RNA sequencing data obtained from open databases and TaqMan PCR data at different stages of differentiation	143

3.3 The influence of Notch signaling modulation on the early stages of hIPSC differentiation into dopaminergic neurons.....	146
3.3.1 RBPJ knockdown and NICD overexpression effectively inhibit and activate, respectively, Notch signaling during hIPSC differentiation into dopaminergic neurons.....	147
3.3.2 Analysis of RNA sequencing data using principal component analysis (PCA) revealed similarities and differences between groups.....	149
3.3.3 Cluster analysis revealed groups of genes characteristic of hIPSCs and ESCs, for a differentiated condition and a separate group characteristic of overexpression of NICD.....	151
3.3.4 Differential expression analysis showed a predominant similarity between control differentiation (CONTR group) and differentiation with Notch signaling inhibition (SH and DAPT groups) and their significant difference compared to differentiation with activation of Notch signaling (NICD group).....	151
Conclusion	157
Principal findings.....	161
Publications and approbation of the work	162
References.....	165
Abbreviations	174
Appendixes	176

Introduction

The relevance of research

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder, which is widespread among older adults. PD is a severe disorder, it significantly reduces the quality of life of patients and in a large number of cases leads to their disability [1]. PD is characterized by the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain, and therefore the main drug for the treatment of PD at present is the precursor of dopamine, Levodopa (L-DOPA). Despite its effectiveness, this treatment has many disadvantages and is associated with development of a number of side effects. For this reason, there is an active search for new ways for treatment for PD.

Cell replacement therapy, which is based on the introduction of exogenous dopamine-producing neurons into the appropriate brain structures, is one of the methods under the study for the treatment of PD [2–4]. At present, the main source for obtaining cells for transplantation is the differentiation of human pluripotent stem cells to dopaminergic precursors *in vitro*. The effectiveness of the introduction of exogenous neurons to replenish the level of dopamine and for the treatment of PD has been confirmed by a number of studies, and this has led to launch of a number of clinical trials based on the use of this method over the past few years [2; 4; 5]. It should be noted that significant progress has been made in this area, but, despite this, the relevance of improving of methods, which are used, still remains, since a number of practical problems have not yet been solved, specifically, the reducing of duration of the protocols of differentiation, increasing the specificity of the resulting cell cultures, and creating optimized conditions for the introduction of transplant, providing maximum survival of injected cells, their final maturation and functional integration into the existing neuronal system.

Trace amines (TA) as neurotransmitters have been known for a long time, but their receptors, trace amine-associated receptors (TAARs), were discovered only in 2001 [6; 7]. It has been shown that TAARs are expressed in various brain structures and play a role in the regulation of movement, nutrition, attention, and mood [6]. Changes in the TA and TAARs system are associated with such diseases as schizophrenia, in which an increase in TA is found, major depressive disorder, attention deficit hyperactivity disorder, in which a decrease in the concentration of a certain type of TA in the brain is described, and with a number of others [8–10]. TAARs have become a new target for the creation of drugs and the development of new approaches to the therapy of a range of diseases. The search for TA and TAAR modulators as potential therapeutic agents is being conducted by global pharmaceutical giants such as Sunovion and F. Hoffman La Roche. However, the full range of functions of TAARs has not yet been studied. Recent data suggest that TA and TAARs may play a role

in the regulation of neurogenesis [11–14]. Given these data, the study of the role of the TA and TAARs system in the neurogenesis of dopaminergic neurons and in the differentiation of human pluripotent stem cells and their effect on the efficiency of transplantation of dopaminergic progenitors as a cell replacement therapy for PD is extremely important, since the data obtained in the course of the present work can significantly expand the existing understanding of the functions of TAARs, as well as contribute to the development of methods for cell replacement therapy for PD.

Most of the existing protocols for differentiation of pluripotent stem cells into dopaminergic neurons start with the so-called dual SMAD inhibition [15], which includes inhibition of the BMP (Bone Morphogenetic Protein) and TGF- β (Transforming Growth Factor β) signaling cascades, and regionalization through activation SHH (Sonic Hedgehog), Wnt, and FGF8 (Fibroblast Growth Factor 8) signaling pathways. At the later stages of differentiation, the resulting neuronal progenitors mature in the presence of neuronal growth factors [5; 16; 17]. However, there are other signaling pathways that also play an important role in neurogenesis, and their modulation could potentially increase the specificity and efficiency of differentiation protocols. One of these is the Notch signaling.

Notch plays an extremely important role both during embryonic development of the central nervous system and postnatally, taking part in the regulation of proliferation, differentiation, migration, and apoptosis [18–20]. The Notch signaling and, in particular, the RBPJ protein are required to maintain neuronal progenitors in an undifferentiated/self-renewing state, thereby maintaining the brain stem cell pool [20]. Inhibition of Notch triggers a latent neurogenic program in striatal astrocytes even in the absence of tissue damage [21]. Notch is also important for the development of axons and dendrites [22; 23]. However, the effects of Notch signaling modulation are not always unambiguous. The consequences of activation or inhibition of Notch signaling are highly dependent on the environment [24; 25]. Therefore, given the significant role that this signaling pathway plays in neurogenesis, the study of Notch modulation during differentiation of human pluripotent stem cells into dopaminergic neurons is important for the development of differentiation protocols and the development of methods of regenerative medicine.

Thus, the study of the role of TAARs and Notch signaling modulation in the differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) into dopaminergic neurons, and the impact of these systems on differentiation, survival, final maturation, or the efficiency of integration of precursors of dopaminergic neurons into the existing neuronal system, when they are introduced into the striatum in model animals, is an extremely actual task. The presented work is of fundamental importance, since it allows expanding the existing understanding of the function of TAARs and the Notch signaling and their role in neurogenesis and neurogenesis of dopaminergic neurons in particular. The applied value of work lies in the field of high-tech healthcare because obtained data can contribute to the development of new methods of treatment of PD.

Theoretical and practical significance

The development of effective and time-optimal protocols for the differentiation of hIPSCs into dopaminergic precursors, as well as protocols for transplantation of the obtained cells, are the most important tasks at the stage of developing methods of cell replacement therapy for the treatment of PD.

The TAARs system was discovered relatively recently, and at the moment TAARs are an extremely promising target for the development of new drugs, however, only a part of the functions of TAARs have been studied. The data obtained in the course of the study make a significant contribution to the development of ideas about the role of TAARs in neurogenesis and neurogenesis of dopaminergic neurons, in particular, as well as the dynamics of changes in TAARs expression during IPSCs differentiation into dopaminergic neurons *in vitro*.

The Notch signaling plays an important role in the development of the nervous system during the embryonic period and in the regulation of functioning of zones of adult neurogenesis after birth. The study of the role of the Notch signaling during differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons is of fundamental importance, since the final effects of Notch modulation largely depend on the environment, and the influence on the Notch signaling pathway may be important for optimizing protocols for the production of dopaminergic precursors *in vitro*.

Thus, the obtained results are of both fundamental and applied importance, since they contribute to the expansion of existing ideas about the functions of TAAR, their role in neurogenesis and in the neurogenesis of dopaminergic neurons, in particular, the role of the Notch signaling at the early stages of hIPSC differentiation, and can also potentially contribute to the development of cell replacement therapy for PD.

Goals and objectives of the study

Goal:

The aim of this study was to explore the role of trace amine-associated receptors in the regulation of neurogenesis of dopaminergic neurons and to analyze the effects of modulating the Notch signaling at early stages of differentiation as potential targets for optimizing protocols for obtaining dopaminergic neurons and their precursors from human induced pluripotent stem cells.

Objectives:

1. Optimization of the protocol for the *in vitro* differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons.
2. Evaluation of the role of trace amine-associated receptors in the regulation of neurogenesis of dopaminergic neurons on the example of TAAR2 and TAAR5 receptors.
3. Evaluation of the effect of inhibition and activation of the Notch signaling at early stages of differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons.

Provisions for defense

1. TAAR2 and TAAR5 trace amine-associated receptors affect the regulation of neurogenesis and neurogenesis of dopaminergic neurons in particular.
2. Trace amine-associated receptors are expressed in zones of adult neurogenesis, in particular in the hippocampus, and at different stages of differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons.
3. Inhibition of the Notch signaling at early stages of differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons, regardless of its level of application, has minimal effects.
4. Activation of the Notch signaling at early stages of differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons significantly affects the pattern of genes expression that affect the neurons specification and their morphological formation.

Scientific novelty of the study

In the course of the work, an effective protocol for *in vitro* obtaining dopaminergic neurons from hiPSCs was developed. New data on the effect of knockout of two different types of TAARs on the expression of neurogenic factors and the neurogenesis of dopaminergic neurons have been obtained. The TAARs expression in zones of adult neurogenesis, in particular in the hippocampus, has been

described. The presence and dynamics of TAARs expression at different stages of hPSC differentiation into dopaminergic neurons were analyzed, which was done for the first time.

The study assesses the effects of modulating the Notch signaling at the early stages of differentiation of hPSCs into dopaminergic neurons: the effects of inhibition of the Notch signaling by γ -secretase inhibitor DAPT (N-[N-(3,5 -difluorophenacetyl)-l-alanyl]-s-phenylglycinetbutyl ester), the most commonly used Notch inhibitor, and more specific with short hairpin RNA (shRNA) to the *RBPJ* gene, as well as the effects of Notch activation due to Notch intracellular domain (NICD) overexpression, which was not previously performed and described in the literature.

Personal contribution of the author

The author analyzed the literature, actively participated in the development of the main ideas, carried out the planning of experiments, the analysis of the obtained data and the writing of articles.

All procedures related to the work with cell cultures (maintenance of hPSCs lines, differentiation of hPSCs into dopaminergic neurons, maintenance of the HEK293 cell line), and production of viral constructs, transduction, testing of the effectiveness of viruses were performed by the author.

Molecular biological methods, such as RNA isolation, real-time PCR, as well as imaging methods, such as material fixation, immunofluorescence, were also performed by the author of the study.

In the course of RNA sequencing, the author made the isolation of the RNA, library preparation and launch of next-generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing were carried out on the basis of the resource center of St. Petersburg State University with the participation of Alexey Elvinovich Masharsky, processing of raw data was performed by Daria Dmitrievna Shafranskaya and Andrey Dmitrievich Przhibelsky, employees of the Center for Algorithmic Biotechnology ITBM St. Petersburg State University, the analysis of the obtained data was carried out by the author of the study.

The author also made a significant part of the work in selection and analysis of data obtained from open databases. Bioinformatics analysis of the selected sets was performed by Daria Dmitrievna Shafranskaya and Anastasia Nikolaevna Vaganova, an employee of the Laboratory of Neurobiology and Molecular Pharmacology of the Institute of Biomedical Medicine, St. Petersburg State University.

1. Literature review

1.1. Cell replacement therapy for Parkinson's disease and differentiation of human pluripotent cells into dopaminergic neurons

PD is a neurodegenerative disorder, which is widespread in the older adults. According to the data from American Parkinson Disease Association (<https://www.apdaparkinson.org>), PD affects 1-2% of people over 60 years of age and 3-5% of the population over 85 years. Clinical manifestations of the disease can be grouped into two: motor, which include tremor, rigidity, bradykinesia, postural instability, and non-motor, which include cognitive impairment, depression, lowering blood pressure, hypo- or anosmia, dysfunction of the gastrointestinal tract, sexual problems, problems with urination and others [1].

The disease is based on the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain, which leads to a significant decrease of the level of dopamine in the striatum. Therefore, Levodopa (L-DOPA), a precursor of dopamine, has been the main drug for the treatment of PD for more than 50 years [26]. Despite the proven efficacy, this variant of treatment has many disadvantages: the gradual development of drug insensitivity, which requires an increase of the administered dose, as well as the occurrence of side effects, one of the most severe of which is Levodopa-induced dyskinesia [1]. Other drug therapy for PD include drugs from the groups of dopaminergic receptor agonists, catechol-O-methyltransferase (COMT) and monoamine oxidase (MAO) inhibitors, anticholinergic drugs, adenosine receptor antagonists and other groups, but all currently existing therapeutic options are only symptomatic. The surgical method of treatment - deep brain stimulation (DBS) - is indicated only for severe motor disorders and has many contraindications and limitations. Therefore, the search for new approaches to the treatment of PD is one of the most important areas for research in the field of neurodegenerative diseases.

One of the new approaches that are being actively developed at the present and in the future can be used for the treatment of degenerative diseases is cell replacement therapy [1].

The idea of the possibility of neuronal transplantation for the treatment of PD appeared in the late 1970s. Initially, it was shown that neurons could, in principle, be transplanted into the brain of an adult animal [27; 28]. In further studies, material from the fetal ventral mesencephalon (fVM) grafts was used as a source of dopaminergic neurons [29; 30]. Initially, fVM grafts were implanted as they are, but later a technique for formation and injection of a cell suspension was developed [29; 31]. fVM grafts in the form of a cell suspension were made from human abortive material at age of 6–9 weeks [32; 33]. Studies performed on 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat models showed that fVM grafts

transplanted into the rat striatum survive, grow, and reduce amphetamine-induced motor asymmetry [34].

Based on the studies [33], in March 1986 the Swedish Society of Medicine approved a clinical trial protocol using human fVM grafts for the treatment of PD. During that trial, suspensions of human fVM grafts isolated from 4 embryos each were administered to four patients. Cells were introduced unilaterally into two zones in the shell and into one zone in the region of the head of the nucleus caudatus [32]. Data, obtained during the study, confirmed that human fVM graft cells been injected into the adult brain survive and reduce the clinical manifestations of the disease [35]. For one of the patients the effect of the operation was so pronounced that he completely canceled L-DOPA therapy and the need to return to maintenance doses of L-DOPA because of progression of symptoms appeared only 6 years after the transplantation [1].

The conducted clinical trial was regarded as successful and subsequently 18 more patients were operated at the University of Lund according to the protocol of the study. However, the results of the operations were ambiguous - some patients got a considerable decrease in the clinical manifestations of the disease, but for the rest the operations did not give a significant effect.

In the mid-90s, the US National Institute of Health (NIH) conducted two more clinical trials based on the transplantation of human fVM grafts. One of them was performed at the University of Colorado Hospital (UCH, Colorado), the another was multicenter and included Mount Sinai School of Medicine (New York), Rush Presbyterian Medical Center (Chicago), the University of South Florida (Tampa, Florida) and the Pacific Parkinson's Research Center, University of British Columbia (Vancouver) [36; 37]. The studies involved 40 and 34 patients, respectively. The clinical trials were designed as double-blind placebo-controlled trials with scarring as a negative control. Despite expectations, both studies failed to show a significant improvement and reduction of the clinical manifestations of the disease. In addition, some of the patients who were part of the group where fVM grafts transplantation was performed developed negative consequences in the form of pronounced dyskinesias, which were later called "graft-induced dyskinesia". The obtained results significantly reduced the speed and interest of the development of cell replacement therapy, however, today, when the results of studies made in later years are already known, the reasons for the failure of these trials can presumably be reduced to the following: protocols of the studies contained many technical flaws; studies includes patients with an extremely severe course of the disease, some of whom had already undergone another option for surgical treatment of PD in the form of DBS, protocols for isolating and culturing injected cells had not yet been well developed, immunosuppressive therapy administered after surgery was not long enough, and the time for conducting control studies were not adequately elaborated [1].

Despite the failure and declining interest for the development of cell replacement therapy for PD, in 2000 new clinical trial called TRANSEURO was developed and started [3; 38]. The study used human fVM grafts as a source of dopaminergic neurons. By the time of this review was written, this clinical trial have been completed already and its results are going to be provided in the near future, but based on the already published reports and researchers presentations, it can already be concluded that human fVM grafts will not be further used as a source of dopaminergic neurons and their precursors for cellular replacement therapy for PD. Despite the seemingly negative results of this study, it can be concluded that TRANSEURO has become an extremely important step in the development of cell replacement therapy for PD. Data from TRANSEURO [3] and previous studies [39] have confirmed that exogenous dopaminergic neurons, been injected into the striatum of patients, can survive, integrate into the existing neuronal network, and can release dopamine, which leads to a decrease of the clinical manifestations of PD. In the course of this study, clear criteria for selecting patients for this type of operation were developed and prescribed; standard operating procedures (SOPs) for the collection of abortive material, dissection and preparation of cell suspension, allowing to maintain the maximum survival of cells during transplantation, were worked out; recommendations on the number of cells to be injected were calculated and verified, the optimal injection sites were selected; and the optimal terms and composition of immunosuppressive therapy required after transplantation were formulated. In addition, based on data from the TRANSEURO study, positron emission tomography (PET) scans with ^{11}C -PE2I have been shown to have greater sensitivity and prognostic value for detecting motor disorders than scans with ^{18}F -DOPA [3]. Thus, the protocols and results of TRANSEURO have become one of the important components for the development of subsequent clinical trials [1].

The current stage in the development of cell replacement therapy for PD became possible due to the derivation of embryonic pluripotent stem cells (ESCs) lines, which were first described in 1998 [40; 41] as well as the discovery of cell reprogramming and the creation of iPSCs, which were first described in 2006 [42]. Pluripotent stem cells, both ESCs and iPSCs, can become a source for obtaining any type of cells.

The first protocols for neuronal differentiation of pluripotent stem cells were performed on mouse lines [43; 44]. It has been shown that, pluripotent stem cells can be differentiated into glial cells and mature neurons *in vitro*. Human pluripotent stem cells can also be differentiated in the neuronal direction, as it was shown later [45; 46].

One of the early protocols of ESCs differentiation in the neuronal direction, which has now become a “classic”, was described in 2003 and named Smith protocol [47]. Differentiation of mouse ESCs according to this protocol is carried out under adhesive conditions in a monolayer. Another quite often used approach for differentiation of ESCs is based on cell growth in non-adhesive conditions,

which leads to the embryonic bodies formation [43]. Embryonic bodies can give rise to derivatives of all 3 germ layers [48], however, by adding certain factors, it is possible to shift the differentiation of embryonic bodies in the neuronal direction.

In 2009, a new and extremely effective protocol of neuronal induction based on BMP and TGF- β inhibition was published [15]. This protocol is based on so called dual SMAD inhibition, since both signaling cascades from both BMP and TGF-beta are related to the SMAD proteins system. Initially, the importance of the BMP signaling pathway in the development of the neuronal system was shown in experiments on frogs [49–51]. A little later, it was shown that inhibition of TGF-beta is extremely important for the specification of neurons and plays an important role in the control of early neuronal development of pluripotent cells [52]. However, the combination of inhibition of these two signaling cascades proved to be the most effective [15]. Most modern protocols for obtaining neurons are based precisely on the double SMAD inhibition.

Currently, there are different protocols for obtaining dopaminergic progenitors and dopaminergic neurons from pluripotent stem cells, but all of them are based on common principles. Summarizing, several stages can be distinguished in them: 1) initial neuronal differentiation based on inhibition of the BMP and TGF/Activin/Nodal signaling cascades with specification in the ventral direction due to the activation of the SHH signaling cascade and in the caudal direction due to the modulation of the Wnt signaling cascade and FGF activation, and 2) subsequent maturation of the resulting neuronal progenitors in the presence of neuronal growth factors: brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mature neurons.

The most well-known of the existing protocols are those on the basis of which clinical trials have been started [5; 16; 17].

The protocol described in Doi D. et al. [16] is used in clinical trials for the treatment of PD initiated at the Center for iPSCs Research and Application (CiRA), Kyoto, Japan in 2018. This protocol includes three stages.

At the first stage, neuronal induction, is performed due to the double SMAD inhibition, described above. A83-01 and LDN193189 are used as inhibitors of TGF and BMP signaling cascades, respectively. In addition, at the first stage, differentiation is regionalized towards dopaminergic neurons due to SHH activation, modulation of Wnt signaling cascade, and FGF activation with Puromorphamine, CHIR99021, and FGF8b, respectively.

The SHH signaling cascade plays an important role in patterning the dorsoventral axis of the neural tube [53; 54]. During embryonic development, SHH is expressed first by the notochord and then by the chord. An increase in SHH concentration induces expression of the transcription factor FOXA2 in the ventral midline, which, in a positive feedback manner, further enhances SHH expression in the ventral neural tube, which then becomes the basal lamina. The concentration and

time of SHH expression directly affect the specification and distribution of dorsoventral markers; in particular, high concentrations of SHH stimulate the expression of such markers as Nkx2.2 and the differentiation of progenitor cells into ventral neuron types, in particular, into dopaminergic neurons [55]. *In vitro* ESCs also showed that SHH serves as a key ventralizing factor [56; 57].

The Wnt/ β -catenin signaling cascade plays an important role in the regulation of cell proliferation, determining the direction of cell differentiation during embryonic development, forming cell polarity, and maintaining tissue homeostasis [58].

Before the second stage of differentiation according to the protocol of Doi D. et al. [16] cells are selected by CORIN marker using cell sorting (Fluorescence activated cell sorting (FACS)). CORIN is a serine protease that was originally found in the heart. CORIN converts pro-atrial natriuretic peptide (pro ANP) into atrial natriuretic peptide (ANP) [59]. During brain development, CORIN is expressed in the basal lamina of the neural tube, where progenitor cells of dopaminergic neurons are located. It has been shown that the number of dopaminergic neurons derived from rodent ESCs can be increased by cell sorting using an anti-CORIN antibody [60]. Cell cultures derived from differentiation of human ESCs and iPSCs, which were sorted by CORIN at the stage of neuronal progenitors, contained more cells positive for tyrosine hydroxylase (TH) (a marker of dopamine neurons), compared with cultures obtained from unsorted cells. In addition, cells that were sorted for CORIN at the stage of precursors of dopaminergic neurons had a smaller volume and contained a significantly lower number of cells positive for KI67 (a marker of proliferating cells) compared to unsorted cells [16]. Thus, CORIN can be used as a selection marker during differentiation to increase the percentage of dopaminergic neurons in an end-differentiated cell culture.

The second stage of differentiation involves the formation of embryonic bodies in the presence of neuronal growth factors BDNF and GDNF, retinoic acid, and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dbc AMP).

The third stage of differentiation can be carried out in two ways: 1) by transplantation of the obtained neuronal progenitors into the striatum of model animals; 2) by further cultivation of neuronal progenitors in the presence of neuronal growth factors BDNF and GDNF, retinoic acid and dbc AMP, under adhesive conditions.

In the course of our work, we used the protocol described above with minor modifications.

Existing protocols for obtaining dopaminergic neurons make it possible to obtain a high percentage of TH (+) cells after their transplantation into model animals [5; 61] and clinical trials, based on the use of cells obtained according to these protocols, have already been carried out in Japan [4; 16; 62], started in the USA [5; 63] and Europe [17; 61]. However, a number of questions on the specification of the obtained neurons and neuronal progenitors, as well as on the optimization of

survival conditions and their integration into the neuronal network during transplantation, remain open and are the subject of further research.

1.2 Trace amine-associated receptors

TA is a group of biogenic amines that are found in mammals in extremely low, i.e., “trace” amounts, their concentration is about 100 ng/g of tissue [6; 7]. This group includes compounds such as β -phenylethylamine (PEA), tyramine, tryptamine, octopamine. In terms of their structure, TAs are related to monoamines and are close to such psychotropic molecules as amphetamines and the classical monoamines dopamine and serotonin [6; 64; 65], but in the central nervous system of mammals they are represented to a much lesser extent. An important difference between TAs and classical neurotransmitters is that they do not accumulate in axon vesicles but diffuse into the synaptic cleft [66]. In the synaptic cleft, TAs are rapidly degraded by MAO types A and B, which play a major role in the degradation of many endogenous monoamines, and therefore TAs have a very short half-life of no more than 15 seconds. Their functions in physiology of invertebrates have been described long ago and it is known that they play an important role as neurotransmitters. For example, this is typical for insects, in which tyramine and octopamine are key neurotransmitters [67]. It is believed that TAs in mammals have neuromodulatory functions of classical neurotransmitters such as dopamine, serotonin, and norepinephrine [6], but the functions of TAs in mammals are still poorly understood.

TAARs were discovered only in 2001 [64; 65]. 9 functional types of TAARs have been described in rodents, while humans have 6 functional receptors: TAAR1, TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8, and TAAR9 [6]. TAARs belong to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs). At the moment TAAR1 is the most studied [68].

TAAR1 expression has been described in brain structures associated with the dopaminergic system [69; 70], in the limbic system, dorsal raphe nucleus [8; 71; 72], prefrontal cortex, hippocampus [73], spinal cord [74]. Outside the central nervous system, TAAR1 is expressed in pancreatic β -cells, stomach, intestines, and leukocytes [75]. Expression of all TAARs except TAAR1 is found in the olfactory epithelium [69].

The signaling cascades triggered by TAARs have been best studied using TAAR1 [68; 76]. TAAR1 is associated with a Gs protein, which after activation activates adenylate cyclase, followed by increase of the content of intracellular cyclic AMP (cAMP), modulates signaling through protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC). In parallel, the response involves β -arrestin, which leads

to receptor desensitization and at the same time to dephosphorylation of the Akt kinase - and thereby activation of the GSK-3 β kinase [6].

Initially it was considered, that TAARs are the olfactory receptors [6]. Later it was shown that TAARs act as modulators of the dopaminergic system [69; 77–79]. TAAR1 knockout mice have an increased response to dopaminergic stimuli, such as, for example, amphetamine administration [69]. Activation of TAAR1 with selective agonists reduces the increased locomotor activity induced by dopaminergic agonists [10; 72]. TAAR1 knockout mice show reduced results in cognitive tests [80], have impaired sensorimotor activity [81], increased frequency of spontaneous excitation of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area (VTA) and serotonergic neurons in the raphe nucleus [69; 71; 72].

Changes in the TA and TAARs systems have been found in a number of neuropsychiatric diseases [8; 9]. An increase of PEA level in the urine, as well as changes in the metabolism of tryptamine and p-tyramine, and changes in the enzymes involved in the synthesis and catabolic pathways of these amines has been described in schizophrenia [10]. Patients suffering from schizophrenia are characterized by an increased reaction to dopamine releasing agents such as amphetamine and methylphenidate and the development of extrapyramidal side effects in response to the administration of antipsychotics that act on D2 dopamine receptors. The same manifestations were also observed in TAAR1 knockout animals [76]. In addition, dysregulation of the β -arrestin/Akt/GSK-3 β signaling cascade has been described in schizophrenia, and one of the mechanisms of antipsychotics action is associated with D2 receptor-mediated β -arrestin signaling and inhibition of GSK-3 β activity [82]. It should be noted that all human TAARs genes are densely clustered in a narrow region of 109 Kb of chromosome 6q23.1 [64; 65; 83], which is extremely close to the loci, mutations in which are described in schizophrenia and bipolar affective disorder [84].

PEA deficiency has been shown to be associated with endogenous depression: pilot studies have shown that the use of this amine or its precursor reduces the symptoms of this disease [85].

In addition, changes in the TA system and TAAR are associated with such diseases as attention deficit hyperactivity disorder [86], it was shown that TAAR1 expression in the prefrontal cortex, striatum, and hippocampus is reduced in spontaneously hypertensive rats, and TAAR activation in such animals reduces their locomotor activity [87]; PD [76], it was shown that the content of tyramine, tyrosine, and PEA in the plasma of patients with PD significantly differs from healthy patients [88]; psychosis [70], given the TAAR1-mediated regulation of the activity of the dopaminergic system [75]; drug addiction [72], in particular, the neuromodulatory role of TAAR1 agosts on the severity of behavioral sensitization to cocaine was shown [89]; affective disorders [10; 90] and others.

TAARs have become a promising target for the new drugs development [90; 91]. Since TAAR1 is the most studied, TAAR1 activity modulators are the first modulators of TAAR activity that have

reached the stage of clinical trials. There is an ongoing clinical trial to investigate the efficacy of the TAAR1 agonist SEP-363856 (Sunovion and PsychoGenics) as an antipsychotic agent [92]. And SEP-363856 has received Breakthrough Therapy Designation from the U.S. Food and Drug Administration (FDA). Preliminary data show that the use of SEP-363856 in patients with schizophrenia in the acute stage leads to a significant decrease in the total scores on the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) compared with baseline and placebo [92].

The TA system and TAARs, as a newly discovered system of neurotransmitters, is being actively investigated and new information is constantly emerging on the role of TA and TAARs in the regulation of various processes. In particular, we have found that TAAR5 is expressed in the in limbic structures such as the amygdala, nucleus accumbens, thalamus, hypothalamic nucleus, enterorhinal cortex, piriformis cortex [11; 12]. Behavioral tests have shown that TAAR5 knockout animals have reduced anxiety and depression-like behavior in learned helplessness tests, as well as increased exploratory behavior in open field experiments [12]. Later, we showed that TAAR2 is also expressed in the piriformis cortex, hypothalamus, lateral habenula, as well as in the midbrain and raphe nuclei [13]. These data allowed us to suggest a possible relationship between the TA system and TAARs and neurogenesis both at the stage of embryonic development and in adulthood.

In the course of this work, we evaluated the relationship of TAARs with neurogenesis and neurogenesis of dopaminergic neurons in particular, and took the first step in studying the role of this system in the differentiation of hPSCs towards dopaminergic neurons, which may be important for optimizing methods for obtaining and transplanting neurons in the development of methods for cell replacement therapy for the treatment of PD.

1.3 Notch signaling

The Notch signaling is an evolutionarily conserved pathway that plays an important role in regulating cell fate during development and also maintains tissue homeostasis in adulthood.

Notch receptors are transmembrane proteins that consist of 3 domains: extracellular (Notch extracellular domain (NECD)), transmembrane (Notch transmembrane domain (TM)) and intracellular (Notch intracellular domain (NICD)). Ligands for Notch receptors are the members of the Delta-like (DLL1, DLL3, DLL4) and Jagged (JAG1, JAG2) families. After binding of a ligand, the NECD is cleaved from the TM-NICD domains (S2 cleavage) by TACE (an enzyme that converts the TNF- α ADAM metalloprotease). The NECD remains bound to the ligand and the complex undergoes

endocytosis/recycled within the cell that sends the signal. How this process is carried out depends on Mib ubiquitination. γ -secretase cleaves the NICD from the TM (S3 cleavage) in cells that receive the signal, allowing nuclear translocation of the NICD. In the nucleus, NICD binds to a complex of CSL transcription factors (CBF1/Su(H)/Lag-1), which leads to subsequent activation of Notch target genes: Myc, p21, members of the HES family, and a number of others [93].

The Notch signaling plays an extremely important role during the embryonic development of the central nervous system, as well as in the postnatal period, being involved in the maintenance of the stem cell pool, proliferation, differentiation, migration, and apoptosis [18–20]. Mice knockout for Dll1, the Notch ligand, die on the 12th day of embryonic development [94]. Non-lethal mutations in genes encoding Notch receptors and ligands can lead to disruption of cell migration during embryonic development. These mutations, as well as non-lethal mutations of the RBPJ protein, which provides signaling from all four Notch receptors, lead to a violation of the survival of neuronal progenitors, which, in turn, leads to a sharp decrease in their number. In the adult organism this leads to loss, premature differentiation, and thus to the depletion of the pool of neuronal stem cells [20].

Notch also plays an important role in the regulation of cell migration into the cortex [95]. An increase in the activity of the Notch signaling leads to bipolarization of the cells, which promotes migration, and vice versa, inhibition of the Notch signaling leads to the formation of multiform cells, which stops migration. It has been hypothesized that Notch influences migration through a reelin-DAB1 signaling cascade that inhibits NICD degradation [95]. It is also believed that the RBPJ protein also plays an important role in the formation of the cortex, since it is necessary for the correct positioning of cortical neurons through the regulation of neuronal migration and the preservation of radial glial scaffolds [18].

High activity of the Notch signaling has been described in the subventricular and subgranular zones, where formation of the neurons continues in the adult brain. Notch is important for maintaining the process of cell self-renewal [20]. The RBPJ protein is known to control neurogenesis by maintaining neuronal progenitor cells and inhibiting their premature differentiation into neurons [18].

The importance of Notch signaling has also been described for development of dendrites. Notch activation leads to the formation of a "weak" dendritic tree. It has been noted that granular neurons in the dentate gyrus of Notch1 induced knockout mice have smaller dendritic trees. It is believed that the growth of dendrites is regulated by the interaction of two signaling pathways, Notch and neurogenin 3 (NGN3). NGN3 promotes neuronal growth, while Notch activation leads to activation of HES genes that inhibit NGN3. However, turning off the Notch signaling in already mature neurons did not affect the state of their dendritic tree, suggesting that there is some critical time during which Notch signaling modulation has an impact on neuronal development [22].

Notch affects not only neurons, but also astroglia and oligodendrocytes. Notch ligands, particularly Jag2 and the non-canonical Dlk2, which are expressed by neurons, trigger and regulate Notch signaling activity in astrocytes. It was shown that under the influence of the γ -secretase inhibitor DAPT, the glutamate transporter on the surface of astrocytes changes its activity. Moreover, the addition of neurons to the culture of astrocytes led to the activation of the Hes2 and Hes5 genes [96].

In vitro studies have shown that ESC-derived neuronal progenitors express all components of the Notch pathway: Notch ligands, receptors, and targets. The Notch signaling pathway is required to maintain neuronal progenitors in an undifferentiated state [97].

During differentiation of spheroids derived from hIPSCs in the neuronal direction, inhibition of Notch by DAPT contributed to a decrease in the expression of markers, in particular, the HOXB4 gene, characteristic for the hindbrain [24]. At the same time, Tieng et al., 2014 showed that compound E (γ -secretase inhibitor) increases the number of TH (+) neurons upon differentiation in 3D format of spheroids derived from human pluripotent stem cells into dopaminergic neurons [125].

The effects of influence on Notch are extremely dependent on the type of cells and tissue, the state of other signaling cascades. Thus, Notch activity is very closely related to the state of the Wnt signaling cascade. Inhibition of Notch by DAPT against the background of inhibition of the Wnt cascade promotes an increase in the number of Tuj (+) (neuronal marker) cells during the differentiation of pluripotent stem cells into cortical neurons. Under the same conditions, but upon activation of transmission of the Wnt signaling cascade, the number of Tuj (+) neurons becomes significantly smaller [25]. The Wnt activator CHIR99021 increases the expression of the downstream target of the Notch signaling pathway the Hes1 gene independently of Notch inhibition by DAPT, suggesting that Wnt signaling may in certain cases prevail over Notch [24].

Summarizing the above, Notch plays a crucial role in the development and differentiation of neurons, but the effects of Notch modulation largely depend on the activity of other signaling cascades. Therefore, it is extremely important to study the effects of Notch modulation in specific conditions and processes. In this study, effect of inhibition and activation of the Notch signaling during the first 7 days of hIPSC differentiation into dopaminergic neurons was assessed, which can help to understand the role that Notch signaling plays in the early stages of differentiation of pluripotent cells towards dopaminergic precursors and dopaminergic neurons *in vitro* and whether Notch signaling modulation can be used to optimize cell generation protocols to create cell replacement therapy for PD.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Animal care and all procedures were carried out in accordance with international recommendations for experimental work with laboratory animals. The studies were approved by the Bioethics Committee of Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia. Mice were kept 3–5 per cage under standard conditions (12 h light/dark cycle), $21 \pm 1^\circ\text{C}$, humidity 40–70%, with free access to food and water.

The study used mice knockout for the TAAR5 gene (TAAR5-KO) [99] and mice knockout for the TAAR2 gene (TAAR2-KO) [13]. Wild-type animals from each of the lines obtained from the same litters as the knockout animals were used as control groups. Mice aged 3-5 months, both sexes were used in the experiments.

2.2 Histology

Perfusion was made under deep anesthesia (a mixture of 200 mg/kg Zoletil and 16 mg/kg Xylazine). Each experimental group consisted form 4 animals ($n = 4$ for each group). Animals were transcardially perfused with 0.9% NaCl in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) pH =7.4, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS at pH = 7.4. After perfusion, brains were removed from the cranium and sequentially rinsed in 20% and 30% sucrose. The brain was cut using a Leica CM-3050S cryostat microtome, sections were made in the frontal plane with a the section thickness 50 μm . Slices were processed as free-floating; between all procedures, they were washed 3×10 min in 0.01 M PBS. To unmask antigens, sections were processed in 1% NaBH_4 for 30 min; endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the sections in 0.3% H_2O_2 for 15 min. To block non-specific staining – incubated for 1 h in 1% normal goat serum (NGS, Vector Labs, UK) in PBS. As the first antibodies polyclonal rabbit antibodies to TH (Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-14007) were used, diluted with 1% NGS and 0.1% NaN_3 , dilution 1:6000, incubation was carried out for 70 h. Thereafter slices were incubated with secondary antibodies (biotinylated goat anti-rabbit IgG, Vector Laboratories, Cat# BA-1000, 1:600 dilution) with 1% NGS and 0.1% NaN_3 , for 1 day, followed by incubation in avidin-biotin horseradish peroxidase complex (ABC Elite system, Vector Labs) for 1 h.

The peroxidase reaction was visualized with a mixture of diaminobenzidine (DAB), NaCl, and 0.03% H₂O₂ (Vectastain DAB kit, Vector Labs). After washing in distilled H₂O, sections were mounted, dehydrated in alcohol, cleared in Xylene, and placed under coverslips in Bio Mount (Bio-Optica). Images of slices were acquired with an Olympus microscope CX31 (Olympus Corporation, a 10x objective) using a Nikon photo camera (D3200, Nikon Corporation). All images were then processed with Fiji ImageJ software.

2.3 Cell lines

hiPSC lines were cultivated under standard conditions (CO₂ 5%, O₂ 20%, temperature 37 °C). Cells were maintained under feeder-free conditions using Geltrex (Thermo Fisher Scientific, A1413202) at a dilution of 1:100. Essential 8 Medium (Gibco, A1517001) with the addition of Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific) 1×. ReLeSR (STEMCELL Technologies, Catalog #05872) was used for cell dissociation.

hiPSC lines:

(1) hiPSC line (AD3) was generated from HNFs using the lentiviral, nonintegrating Sendai reprogramming kit (CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming kit (Invitrogen)) according to the manufacturer's instructions. HNFs were purchased from Lonza and were cultured as described [100]. Generated hiPSCs were cultured under feeder-free conditions and maintained on plates coated with Matrigel (growth factor reduced; BD) with mTeSR1 (STEMCELL) at 37 °C, 5% CO₂, and 21% O₂ according to WiCell Inc. protocols. Cells were passaged every 4–5 d at ~80% confluence by using 0.02% EDTA (Versene). Generated AD3 Sendai-derived hiPSC line was characterized according to protocol published before [101] and fulfilled all pluripotency criteria [100]

2) WTSIi004-A (HPSI1113i-qolg_3) from the European Bank for Induced pluripotent Stem Cells (EBiSC), Biosample ID SAMEA2464810

3) WTSIi032-A (HPSI1113i-bima_1) from EBiSC, Biosamples ID SAMEA2399246

4) WTSIi046-A (HPSI0214i-wibj_2) from EBiSC, Biosamples ID SAMEA2627567

The EBiSC Bank acknowledges the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) as the source of the human induced pluripotent cell lines WTSIi046-A (HPSI0214i-wibj_2) and WTSIi004-A (HPSI1113i-qolg_3), which were generated with support from EFPIA companies and the European Union (IMI-JU').

2.4. Differentiation of hIPSCs

A modified protocol described in Doi D. et al., 2014 [16] was used for differentiation of hIPSCs.

hIPSCs were cultured on Geltrex (Thermo)/Knockout DMEM (Gibco) 1:100 on TeSR-E8 Basal Medium (STEMCELL). For differentiation, cells were harvested with TrypLE Select Enzyme (Gibco) and seeded into 6-well plates coated with Geltrex/Knockout DMEM at a density of 4×10^5 cells per well. During seeding, 5 μ M Y27632 was added to the medium. On the third day after seeding, cells were transferred to GMEM medium (Gibco) containing 8% Knockout serum replacement (Thermo), 0.1 mM NEAA (Gibco), 0.1 mM beta-mercaptoethanol, 1 mM Pyruvate (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin, and 2 mM L-Glutamine supplemented with 500 nM A83-01 (STEMCELL), 2 μ M Purmorphamine (Sigma), 100 ng/ml FGF8b (STEMCELL) from days 1 to 7, 100 nM LDN193189 (STEMCELL) from days 1 to 12, and 3 μ M CHIR99021 from days 3 to 12. The medium was changed daily.

On differentiation day 12, cells were harvested with Accumax (STEMCELL) and plated on 24-well AggreWell-800 plates (STEMCELL) at a density of 1.2 million cells per well according to the manufacturer's protocol in a medium containing Neurobasal medium (Gibco), 1% Penicillin - Streptomycin, 0.1 mM beta-mercaptoethanol, 200 μ M ascorbic acid (Sigma), 2 mM L-glutamine (Gibco), 400 μ M dbc AMP (STEMCELL), B-27 supplement 1x (Gibco), supplemented with 10 ng/ml GDNF (STEMCELL), 20 ng/ml BDNF (STEMCELL) for the formation of embryonic bodies. During seeding, Y27632 5 μ M was added to the medium. The medium was changed the next day after sieving and then once every 3 days.

On the day 28 of differentiation, the embryonic bodies were dissociated using Accumax (STEMCELL). The resulting cell suspension was used for final differentiation and maturation under in vitro conditions. Cells were seeded into 96 well plates coated with Geltrex/Neurobasal medium (Gibco) at a density of 7.5×10^4 cells per well in Neurobasal medium (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin, 0.1 mM beta-mercaptoethanol, 200 μ M ascorbic acid (Sigma), 2 mM L-glutamine (Gibco), 400 μ M dbc AMP (STEMCELL), B-27 supplement 1x (Gibco), supplemented with 10 ng/ml GDNF (STEMCELL) and 20 ng/ml BDNF (STEMCELL). During seeding, Y27632 5 μ M was added to the medium. The medium was changed the next day after passage and then once every 3 days. Cell cultivation was carried out up to 53 days.

2.5 Immunofluorescence staining

All stages of immunofluorescence staining were carried out at room temperature. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde solution (Sigma) for 12.5 min, after which the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) 3 times for 5 min. Permeabilization was carried out with 0.5% Triton X-100 for 5 min, followed by washing with PBS 3 times for 5 min. To block non-specific binding, samples were incubated with 5% normal horse serum (NHS), diluted in PBS, for 1 h at room temperature. Incubation with 1 antibody was carried out for 60 min, the antibodies were diluted in 5% NHS/PBS at a ratio of 1:200 (Table 1). Secondary antibodies were diluted in 5% NHS/PBS at a ratio of 1:1000. Incubation with secondary antibodies was performed for 1 h, after which the samples were stained with an aqueous solution of DAPI at a concentration of 0.1 µg/ml.

The obtained results were evaluated and recorded using a Zeiss Axio Observer Z1 fluorescent microscope and an Olympus FV3000 laser scanning confocal microscope.

Table 1. Antibodies, that were used in the study.

Antigen	Manufacturer, Name, Cat. Number	Host	Dilution
Oct 4	Santa Cruz Biotechnology, Oct-3/4 Antibody (N-19), sc-8628	goat	1:200
Nanog	Sigma-Aldrich, Anti-NANOG Antibody, clone 7F7.1, MABD24	mouse	1:200
Doublecortin	Abcam, Anti-Doublecortin antibody, ab18723	rabbit	1:200
Sox1	Abcam, Recombinant Anti-SOX1 antibody, ab109290	rabbit	1:200
Brachyury	RandD Systems, Human/Mouse Brachyury Antibody, AF2085	goat	1:200
Foxa2	Santa Cruz Biotechnology, Anti-HNF-3β Antibody (A-12), sc-374375	mouse	1:200
TH	Santa Cruz Biotechnology, TH Antibody (H-196), sc-14007	rabbit	1:200

Continuation of table 1

PitX3	Invitrogen PITX3 Polyclonal Antibody, Cat#38-2850	rabbit	1:200
Nestin	Sigma-Aldrich, Anti-Nestin (C-terminal) antibody produced in rabbit, SAB4200394	rabbit	1:200
MAP2	Sigma-Aldrich, Monoclonal Anti-MAP2 antibody produced in mouse, M4403	mouse	1:200
DAT	Sigma-Aldrich, Anti-Dopamine Transporter Antibody, NT, clone DAT-Nt, MAB369	rat	1:200
β -Tubulin	Sigma-Aldrich, Anti- β -Tubulin III antibody produced in rabbit, T2200	rabbit	1:200
β -Tubulin	Abcam, Anti-beta Tubulin antibody - Loading Control, Ab6046	rabbit	1:200
GFAP	DAKO, Polyclonal Rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (Concentrate), Z0334	rabbit	1:200

2.6 High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC was performed on cell lysates. Samples were stabilized with HClO₄ (final concentration 0.1 M) and stored at -80°C until measurements were taken.

The samples were thawed and homogenized using ultrasound before measurement, after which they were filtered using centrifuge filters (PVDF, Millipore) by centrifugation 14000 g 1 min, 4 °C

The concentrations of dopamine (DA), serotonin (5HT), norepinephrine (NA) and their metabolites: homovanillic acid (HVA), 3,4-dioxyphenylacetic acid (DOPAC), and 5-indolousus acid (5-HIAA) were measured in the supernatant using the reverse phase HPLC with electrochemical detection. The measurement was carried out on an Eicom HTEC-500 chromatograph with a WE-3G carbon electrode (Eicom, Japan) at a potential of +650 mV. Separation was carried out on a reverse phase column CA-50DS (150*2.1 mm, Eicom) at a flow rate of 200 μ l/min. The composition of the

mobile phase: per 1 liter of solution: NaH_2PO_4 - 14.9 g, Na_2HPO_4 - 1.376 g, EDTA - 50 mg, sodium octylsulfonate - 400 mg, methanol - 19.5%, pH - 4.26.

2.7 Patch-clamp

For the patch clamp, 2–3 days prior to the study, neurons were plated on coverslips coated with Geltrex at a dilution of 1:100 at unit density. Glass microelectrodes for recording action potentials were made using a puller (P-1000, Sutter Instrument). Action potentials were recorded using an Axopatch 200B amplifier and Clampex 10.3 software (Molecular Devices Corporation).

Potentials were recorded at 20-50 kHz using a 5 kHz low pass filter with an ADC (Digidata1440A acquisition system, Molecular Devices Corporation). Action potentials were recorded using the local potential clamping method (patch-clamp) in the “whole-cell” configuration in the current clamping mode at room temperature. The composition of the extracellular solution included 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5.5 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4 (NaOH). The composition of the intracellular solution included 105 mM potassium gluconate, 20 mM KCl, 5 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 1.5 mM MgATP, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.2 (NaOH). The potentials were registered in the I=0 mode.

2.8 Flow cytometry

For flow cytometry cells were grown in wells of 96-well plates. Conditioned medium was removed from each well, cells were washed with PBS and dissociated with TrypLE Select enzyme (Gibco) and then dissolved in Neurobasal medium (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin (Thermo), 0.1 mM beta-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine (Gibco) containing Y27632 5 μM . For intracellular staining of cells with Alexa Fluor® 594 anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (BioLegend), a PerFix-nc-Kit (no-spin assay kit) (Beckman Coulter, cat. no. B10825) was used. Samples were analyzed on a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter). Evaluation was performed by counting of 5000 cells.

2.9 RNA isolation and reverse transcription

RNA isolation was performed using TRIZOL (Invitrogen). 1 µg of RNA was used for reverse transcription. Reverse transcription was performed using the MMLV RT kit (Evrogen). All procedures were performed in accordance with the manufacturer's recommendations.

2.10 Real-time PCR

Real-time PCR was performed using the qPCRmix-HS kit (Evrogen) using the following primers (Table 2). Data, obtained during quantitative real-time PCR, were analyzed using the comparative Ct method (2- $\Delta\Delta$ Ct method) in the modification "relative quantification", as a method for representing the relative expression of the gene, in which the expression of the gene of interest was evaluated relative to the expression of the housekeeping gene. During the analysis, the following parameters were calculated for each reaction: Ct value (Δ Ct), Δ Ct value ($\Delta\Delta$ Ct) for replicates, 2 $\Delta\Delta$ Ct value, fold ratio of expression levels in samples (in comparison of individual experimental groups with the average value for an internal control sample). The level of expression of the studied gene was normalized according to the level of expression of the housekeeping gene GAPDH. A series of experiments was repeated three times (biological replicates), for each experiment, the level of expression of the corresponding gene was repeated twice (technical replicates).

Table 2. Primers used in the study.

Primer	Subsequence
hGAPDH-F	AATGAAGGGGTCATTGATGG
hGAPDH-R	AAGGTGAAGGTCCGAGTCAA
hRBPJ-F	CAGTTCACAGCAGTGGGGAG
hRBPJ-R	GCGGTCTGCTTATCAACTTCC
hHey1-F	TGAGCTGAGAAGGCTGGTAC
hHey1-R	ATCCCAAACCTCCGATAGTCC
mGAPDH-F	TCAATGAAGGGGTCGTTGAT

Continuation of table 2

mGAPDH-R	CGTCCCGTAGACAAAATGGT
mGDNF F	TCTTTCGATATTGCAGCGGTT
mGDNF R	GTCACTTGTTAGCCTTCTACTCC
mCDNF-F	AAGAAAACCGCCTGTGCTATT
mCDNF-R	TCTTCACGGCAGGTATGTGTA
mBDNF-F	TCATACTTCGGTTGCATGAAGG
mBDNF-R	AGACCTCTCGAACCTGCCC

2.11 TaqMan PCR

RNA isolation was performed as described above. cDNA was synthesized from 1 µg of RNA using RevertAid reverse transcriptase (EP0442, ThermoFisher Scientific). TaqMan real-time PCR was performed using the qPCRmix-HS SYBR+low Rox kit (PK156L, Eurogen) using the following primers and probes (Table 3). The obtained data were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method as described above. S18 was used as the housekeeping gene.

Table 3. Primers and probes used for TaqMan real-time PCR.

Primer, probe	Subsequence
TAAR1_Taq_F	TGACCACACTCGTTGGCAATCTG
TAAR1_Taq_Probe	JOE-GGCCACTGTGGACTTTCTTCTGGGGT-BHQ1
TAAR1_Taq_R	ACAGTGCTCAGCAGATCTCACCA
hTAAR2 Taq F	GGTCCCTGGAGCATTTCCTTC
hTAAR2 Taq R	GCCATAAACAAGGTGGTCCCCC
hTAAR2 Taq Pr	FAM-TGGTTGCTTGTTCCAGTTCCTGCCCA-BHQ6
TAAR5-1 -F	AGCACCATTTCGCTCAGTGGAGA
TAAR5-1-R	GTGAGGCAGAAGAGGGTGTCCA

Continuation of table 3

TAAR5-1-Pr	FAM-TTCCTCTGCCGCCTGCACACCT-BHQ6
hTAAR6 Taq F	AGGAGGTTGTCAGACCGTTG
hTAAR6 Taq R	CTGGCCACTCTGGCTTTGTA
hTAAR6 Taq Pr	FAM-CTTGTGGCTAGACGACAGGCG-BHQ6
hTAAR8 Taq F	ACACAGGTGTCAATGATGATGGG
hTAAR8 Taq R	ATTTGACAGCCACCTACGCA
hTAAR8 Taq Pr	FAM-CTGGAGGAATTAGTAAGTGCTCTC-BHQ6
hTAAR9 Taq F	GCCAGGCTCCACTGAATCAA
hTAAR9 Taq R	AGCTTGGCTGGCTGTACTTT
hTAAR9 Taq PR	FAM-GGTGGCCAAGCATCAGGCTAGGAA-BHQ6
hHPRT Taq F	GGCTCCGTTATGGCGACC
hHPRT Taq R	TCGAGCAAGACGTTTCAGTCC
hHPRT Taq Pr	FAM-CAGCCCTGGCGTCGTGATTAGTG-BHQ6
hS18 Taq F	TCAACACCAACATCGATGGGCG
hS18 Taq R	GCTTTCCTCAACACCACATGAGCA
hS18 Taq Pr	FAM-ACTGCCATTAAGGGTGTGGGCCGA-BHQ6
hGAPDH Taq F	CACCACCAACTGCTTAGCACCC
hGAPDH Taq R	AGGGGCCATCCACAGTCTTCTG
hGAPDH Taq Pr	FAM-ACCACAGTCCATGCCATCACTGCCA-BHQ6

2.12 Criteria for selection, inclusion, normalization and analysis of RNA sequencing datasets, obtained from open sources

RNA sequencing data was obtained from the open database of the National Center of Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO). Data search was carried out on the terms "hippocampus", "hippocampal", "CA1", "CA2", "CA3", "gyrus dentatus", "dentate gyrus" in

the period up to February 01, 2022. Those data that met the following criteria were selected: (1) had access to raw data; (2) there was a clear description of the conditions for obtaining samples and the selected zone of the hippocampus; (3) the data had a minimum number of reads in SRA files > 50 million reads.

To assess levels of expression, all data were normalized by TPM (Transcripts Per Million). TPM values above a threshold level of 0.5 were considered positive. The distribution of TPM-normalized expression levels was analyzed and visualized using the beeswarm R package.

The SCP1 single cell RNA sequencing dataset (Single cell portal, https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell) was initially normalized to TPM. This set was analyzed using the interactive Single Cell Portal interface.

2.13 Production of lentiviruses

To activate the Notch pathway, a plasmid carrying a portion of the mouse Notch 1 gene corresponding to the *NICD* was used [102]. To inhibit the Notch pathway a plasmid carrying short hairpin RNA (shRNA) to *RBPJ* was used.

The lentivirus packaging plasmids were a kind gift from Professor Didier Trono (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland). Lentiviruses packaging was carried out in HEK293 cells as described previously [103] using the calcium phosphate method, for which 100 mm dishes of subconfluent 293T cells were cotransfected with 15 µg pLVTHM-T7-NICD, 5.27 µg pMD2.G and 9.73 µg pCMV-dR8.74psPAX2. The next day, the medium was changed to fresh and the cells were incubated for 24 h. The supernatant with the resulting lentiviral particles was concentrated by ultracentrifugation, resuspended in 1% BSA/PBS, and aliquots were frozen at -80 °C. The virus titer was determined by the GFP expressing virus. The transduction efficiency of hIPSCs was 80–85% as calculated by GFP.

2.14 Evaluation of the effectiveness of viral particles to inhibit/activate the Notch signaling

To test the effectiveness of inhibition/activation of the Notch pathway, viral particles were added to hIPSCs the day after passaging and incubated for 24 h. Then the medium was changed every day.

Cells were harvested for RNA isolation 96 h after transduction. Efficiency was tested by evaluating the expression level of the *HEY1* and *RBPJ* genes by real-time PCR with primers HEY1 - F/R, RBPJ - F/R (Table 2).

2.15 Evaluation of the effectiveness of Notch signaling inhibition/activation during differentiation of human iPSCs into dopaminergic neurons

To inhibit/activate the Notch pathway, viral particles were added to the cultures the next day after cell passaging, incubated for 24 h, and then the medium was changed to differentiation medium. 10 μ M DAPT (Sigma) was added to the appropriate well from days 1 to 7 of differentiation. The medium was changed daily. For RNA isolation, cells were removed on the day 7 of differentiation. The efficiency of inhibition/activation of the Notch signaling was tested by evaluating the level of expression of the *HEY1* and *RBPJ* genes by real-time PCR.

2.16 RNA sequencing

RNA quality was checked by fluorimetric analysis with Quantus and capillary electrophoresis with QIAxel. PolyA-RNA was purified using the Dynabeads mRNA Purification Kit (Ambion). Libraries were prepared from polyA RNA using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) according to the instructions. Single stranded read sequencing was performed on an Illumina HiSeq2500 with a 140 bp read length, with at least 30 million reads per sample.

2.17 Data processing

Reads were checked for quality using the FastQC tool (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The fastq sequences were then truncated using Cutadapt v4.1 [104] using the parameters for single stranded reads. To quantify transcript

expression, preprocessed reads were aligned with the reference genome using STAR [105], and gene expression was calculated using feature Counts from the Subread package [106]. Further analysis of gene expression was performed using the DeSeq2 R package [107]. Transcript variants were annotated using the AnnotationDbi R package [108].

Further data analysis was performed using modEnrichr and Appyters [109].

2.18 Data access

The RNA sequencing data was uploaded to the GEO database, data set number GSE218635.

3. Results

3.1 Differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons *in vitro*

3.1.1 hIPSCs efficiently differentiate into dopaminergic neurons *in vitro*

hIPSCs were differentiated into dopaminergic neurons *in vitro* by the protocol described in Doi et al., 2014 [16], with modification, which include the use of reagents manufactured by STEMCELL Technologies instead of reagents manufactured by Wako and STEMGENT, the absence of sorting after 12 days of differentiation and using AggreWell™800 (STEMCELL) for culturing at the stage of embryonic bodies, which made it possible to obtain uniform embryonic bodies (Figure 1A).

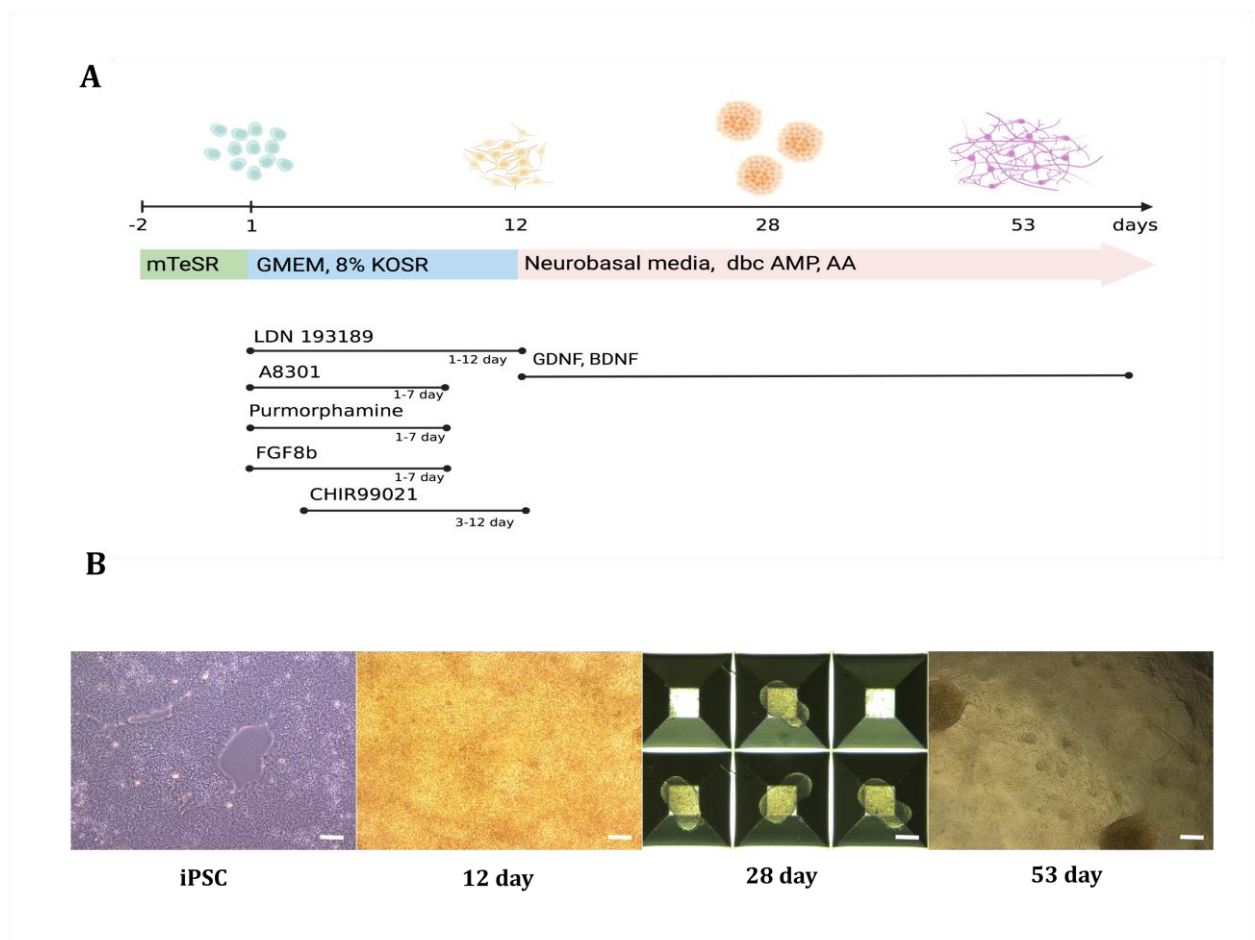


Figure 1. Differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons. A) Differentiation protocol B) Light microscopy (using the AD3 line as an example). Scale bars 200 μ m. hIPSCs before differentiation, differentiation day 12, differentiation day 28 (embryonic bodies), differentiation day 53 [110].

Four hPSC lines AD3, WTSli004-A, WTSli032-A, WTSli046-A were differentiated into dopaminergic neurons *in vitro* and it was shown that the cells obtained on the day 53 of differentiation have morphology characteristic for neurons (Figure 1B).

It was shown that, before differentiation, the cells of all four hPSC lines used in the study expressed pluripotency markers Oct4 and Nanog (Figure 2).

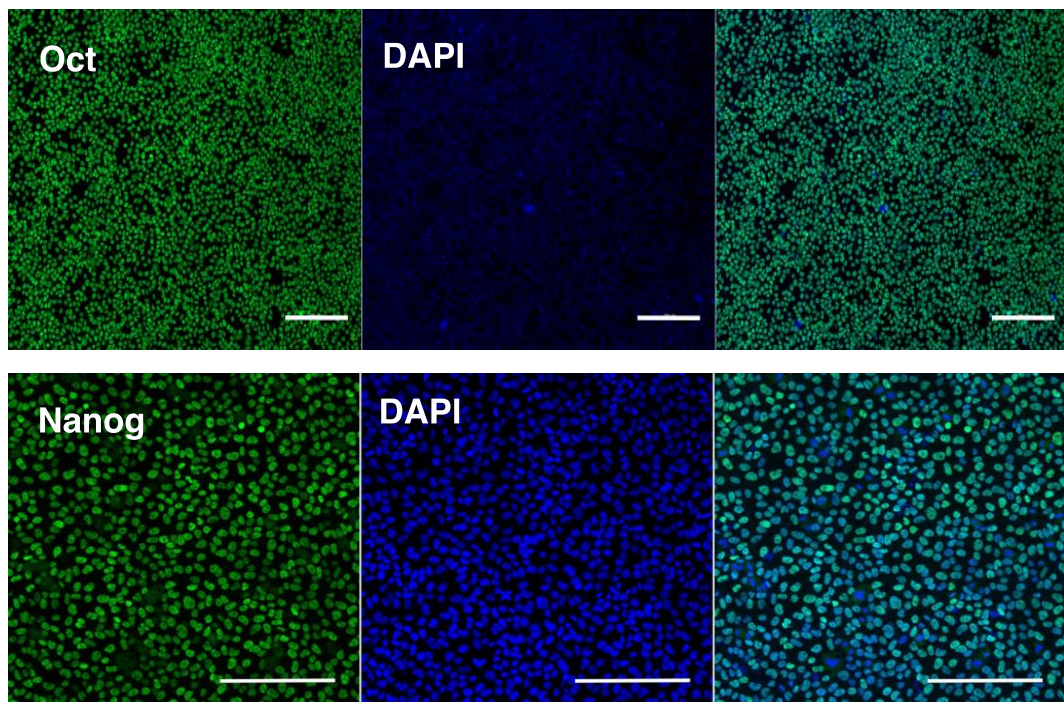
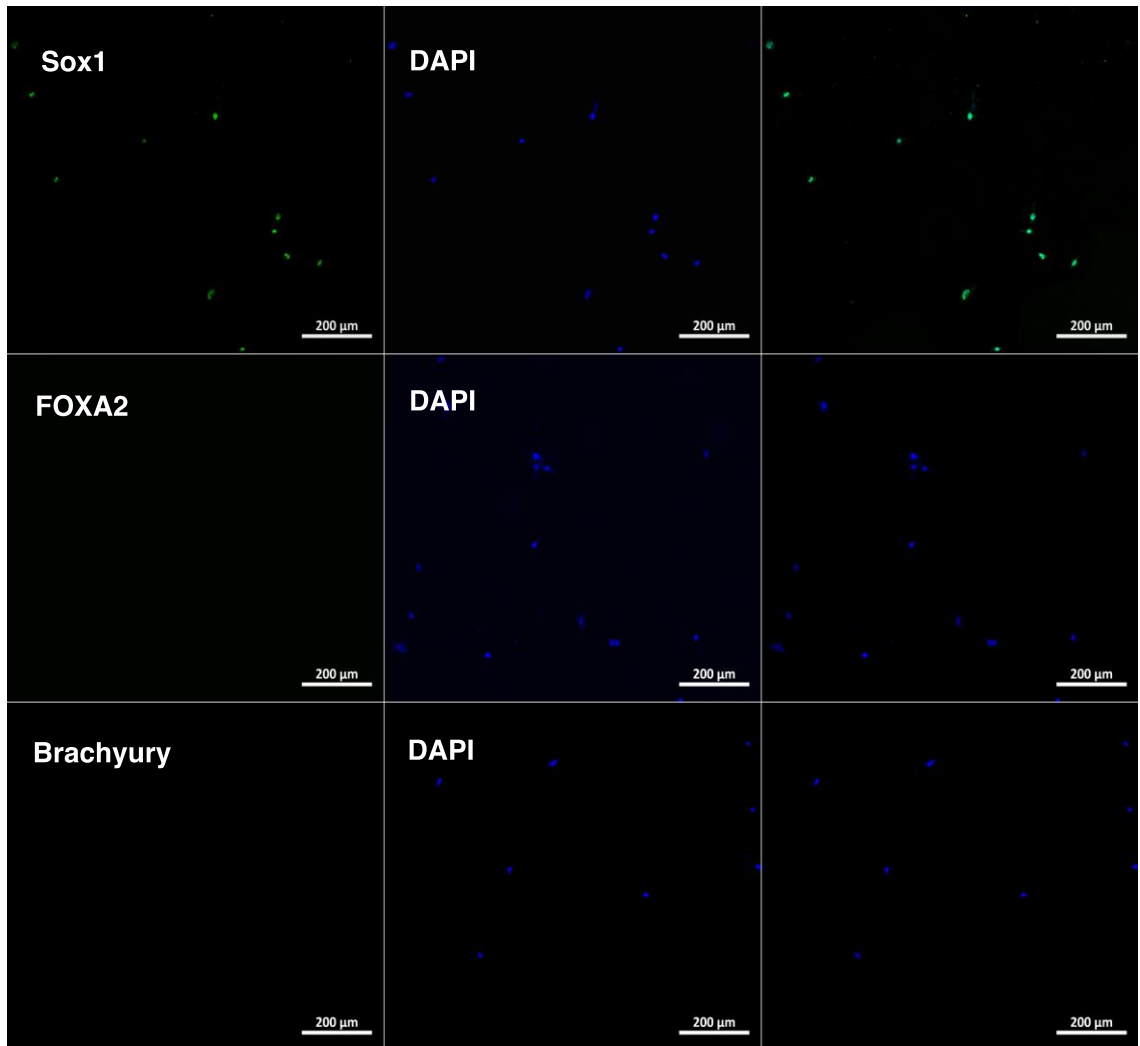


Figure 2. Immunofluorescence staining of hPSCs for pluripotency markers Oct4 and Nanog (using the WTSli046-A line as an example). Scale bars 100 μm [110].

On day 12 of differentiation, the obtained cells were a polylayers culture (Figure 1B); after passage they acquired a polygonal shape and expressed the ectoderm marker Sox1 (Figure 3A, B), and did not express pluripotency markers Oct4 and Nanog, as well as meso- and endoderm markers Brachyury and FOXA2, respectively (Figure 4, 3A).

A



B

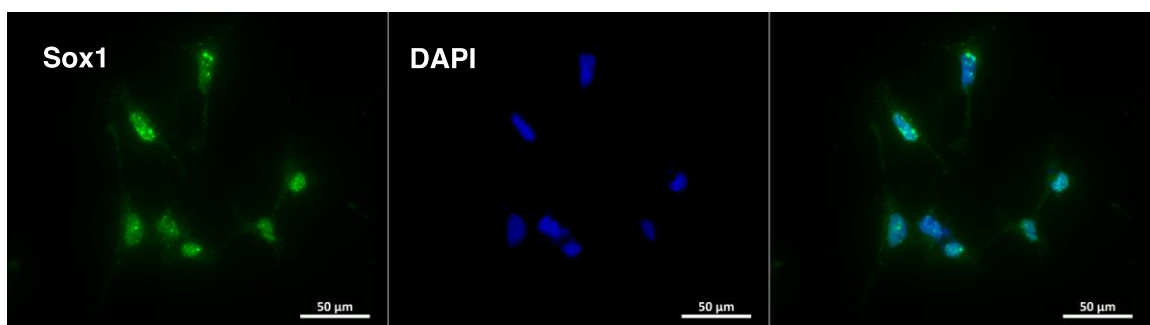


Figure 3. Immunofluorescence staining on day 12 of differentiation of hiPSCs into dopaminergic neurons. A) Staining for ectoderm, mesoderm and endoderm markers, Sox1, Brachyury and FOXA2, respectively (using the WTSli046-A line as an example). Scale bars 200 μm. B) Staining for Sox 1. Scale bar 50 μm. Immunofluorescence staining showed that on day 12 cells express the ectodermal marker Sox1 and do not express the mesoderm and endoderm markers Brachyury and FOXA2, respectively.

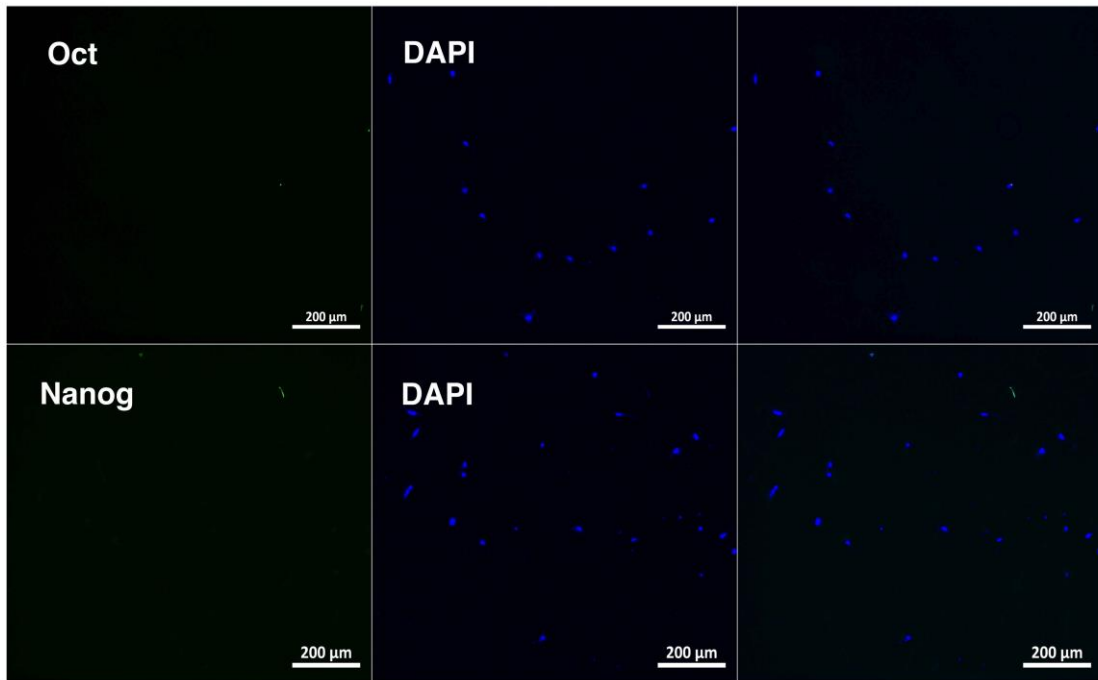


Figure 4. Immunofluorescence staining on day 12 of differentiation of hiPSCs into dopaminergic neurons. Staining for pluripotency markers Oct4 and Nanog (using the WTSli046-A line as an example). Scale bars 200 μm . Immunofluorescence staining showed that on day 12 the cells did not express Oct4 and Nanog pluripotency markers.

On the day 28, by the end of the second stage of differentiation, the cells expressed the marker of neuronal progenitors Doublecortin (DCX), the neuronal markers Nestin and Tubuline III (Tuj), the marker of dopaminergic neurons TH at a low level, and the marker of mature neurons Microtubule-associated protein 2 (MAP2) at an extremely low level (Figure 5).

On the day 53 of differentiation, the resulting cells acquired morphology typical of neurons (Figure 1B). Immunofluorescence analysis showed that at this stage, the vast majority of cells expressed markers of mature dopaminergic neurons: TH, MAP2, Lmx1a (Figure 6A, B). Using the flow cytometry method, it was shown that the percentage of TH (+) cells was more than 85% (Figure 6C). HPLC showed that the cells contained dopamine and its metabolites DOPAC and HVA (Figure 6E). However, it should be noted that a small amount of serotonin and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) was detected, which indicates that the resulting cell culture consisted not only of dopaminergic neurons, but probably contained a small number of serotonergic neurons. The electrophysiological parameters of the resulting cell culture were assessed by the patch-clamp method in the “whole cell” configuration (Figure 6D). The resulting neurons were able to spontaneously generate action potentials (AP) with a typical of neuronal cells shape with pronounced phases of depolarization and repolarization.

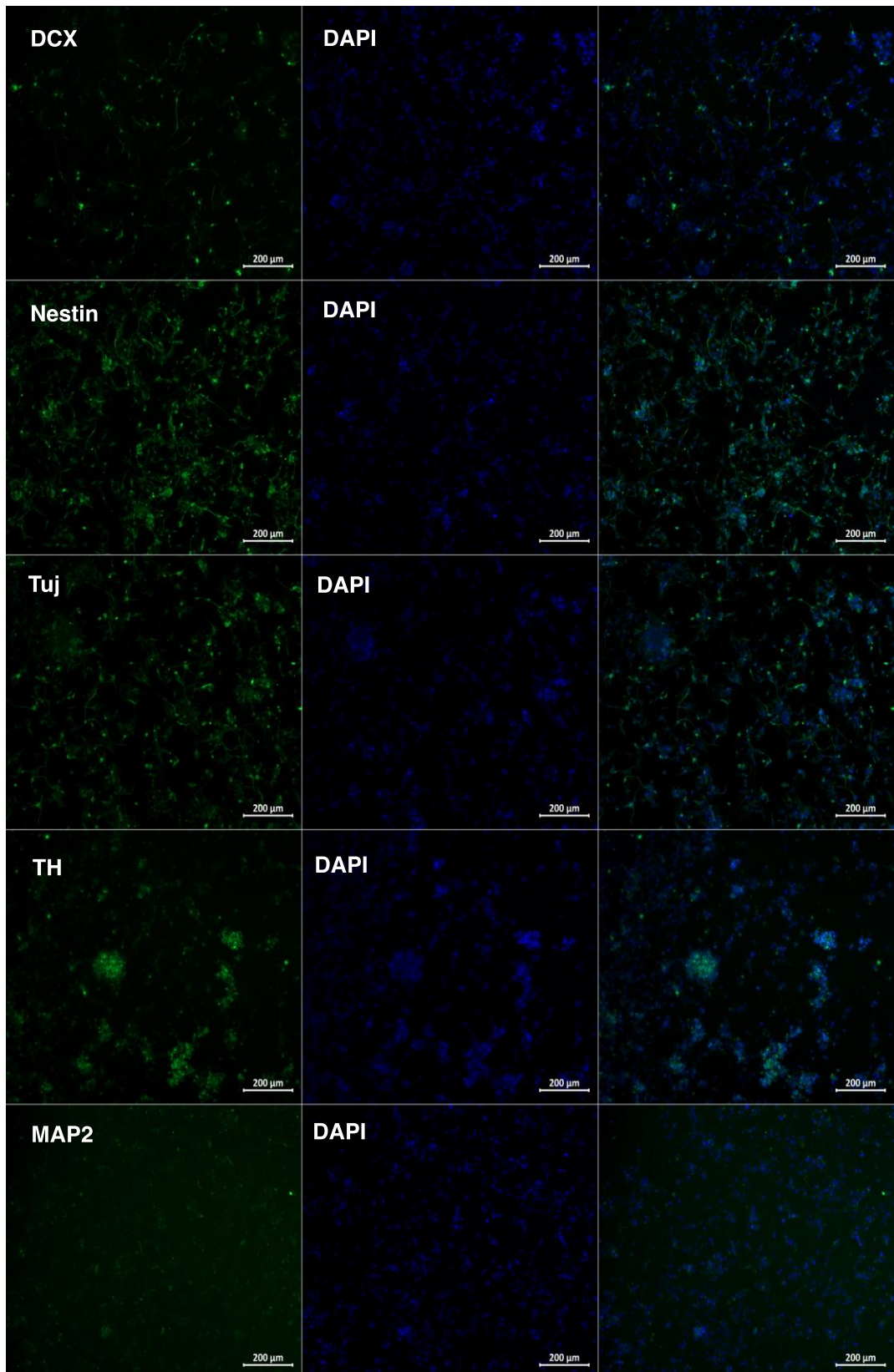


Figure 5. Immunofluorescence staining on day 28 of differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons. Staining for the marker of neuronal progenitors Doublecortin (DCX), neuronal markers Nestin and Tubuline III (Tuj), marker of dopaminergic neurons tyrosine hydroxylase (TH), and marker of mature neurons Microtubule-associated protein 2 (MAP2) (using the WTSli046-A line as an example). Scale bars 200 μm . Immunofluorescence staining showed that on day 28 of differentiation, cells expressed DCX, Nestin and Tuj, as well as TH at a low level and MAP2 at an extremely low level.

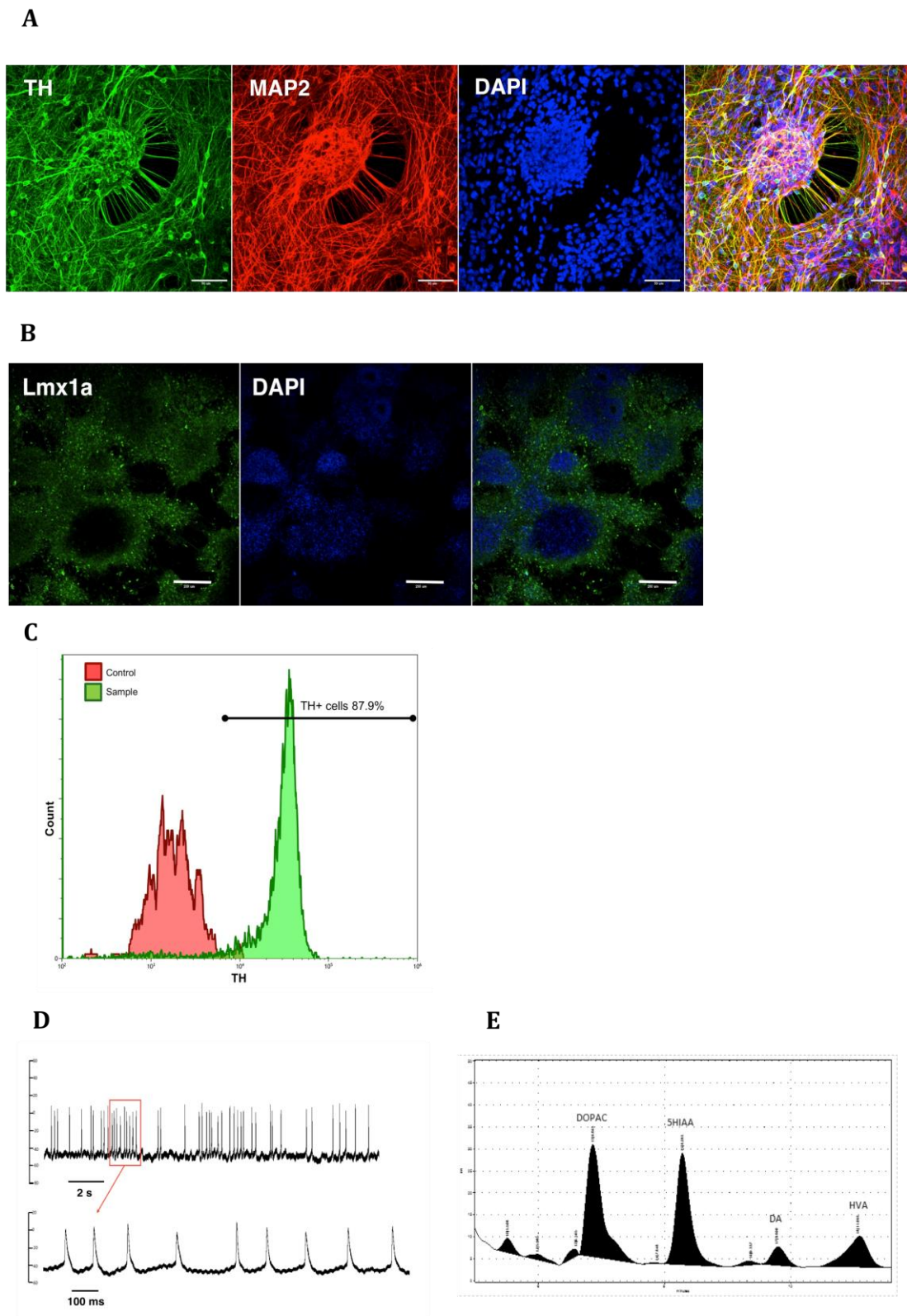


Figure 6. Differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons (using the AD3 line as an example). A-B) Immunofluorescence staining of differentiated cells, day 53, for markers of dopaminergic neurons TH, MAP2, Lmx1a. Scale bars 50 μm . B) Flow cytometry of cells on day 53 of differentiation. Staining for TH. The analysis showed that the percentage of TH-positive cells was 87%. D) Whole-cell patch-clamp analysis showed the ability of differentiated cells to spontaneously generate action potentials on day 53. E) High performance liquid chromatography. HPLC showed the presence of dopamine and its metabolites (DOPAC and homovanillic acid (HVA)) on day 53 [110].

Obtained data indicate that the protocol of differentiation is effective and can be used to obtain dopaminergic neurons from hIPSCs *in vitro*.

3.2 Interrelation of the TAARs system, neurogenesis and differentiation of dopaminergic neurons *in vitro*.

3.2.1 TAAR5 knockout mice have an increased number of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain, as well as increased levels of GDNF in the striatum

To assess the effect of TAAR5 on the dopaminergic system and neurogenesis of dopaminergic neurons, we compared the number of TH (+) neurons in the substantia nigra (SN) in TAAR5-knockout (TAAR5-KO) mice [99] and wild-type (WT) mice.

On sections of the midbrain in all animals, both TAAR5-KO and WT, TH (+) neurons were visualized throughout the VTA and SN (Figure 7 A, B). The internuclear border between VTA and SN was determined by lightly stained reticular tissue (Fig. 7A, red dotted line). TH (+) neurons were oval to triangular in shape with few branched dendrites (Fig. 7A). In VTA, no difference was found in the number of TH (+) neurons between TAAR5-KO and WT mice (503.5 ± 30 and 558.3 ± 31 per section, $p = 0.195$), however, in SN, the number of TH (+) neurons in TAAR5-KO mice was significantly different from wild type (692.1 ± 30 and 518.8 ± 26 per section, $p = 0.003$) (Figure 7C). SN consists of three parts: compact (SN pars compacta, (SNc)), reticular (SN pars reticularis (SNr)) and lateral (SN pars lateralis (SNl)). The number of TH (+) neurons in each of these parts was counted separately (Fig. 7C). The difference between the number of TH (+) neurons in TAAR5-KO mice compared to WT mice was found to be characteristic of SNc (470.1 ± 26 and 363.3 ± 25 per section, $p = 0.015$) and SNl (164.0 ± 12 and 108.0 ± 6 per section, $p = 0.001$), while there were no significant differences for SNr (58.0 ± 6 and 48.0 ± 8 per section, $p = 0.235$) (Figure 7C).

Also, using real-time PCR, the expression of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF), GDNF and BDNF, which play an important role in the development and maturation of dopaminergic neurons in the olfactory bulb, striatum and midbrain TAAR5-KO and mice, was evaluated. TAAR5-KO mice showed an increase in GDNF expression in the striatum compared to WT mice (Figure 7D).

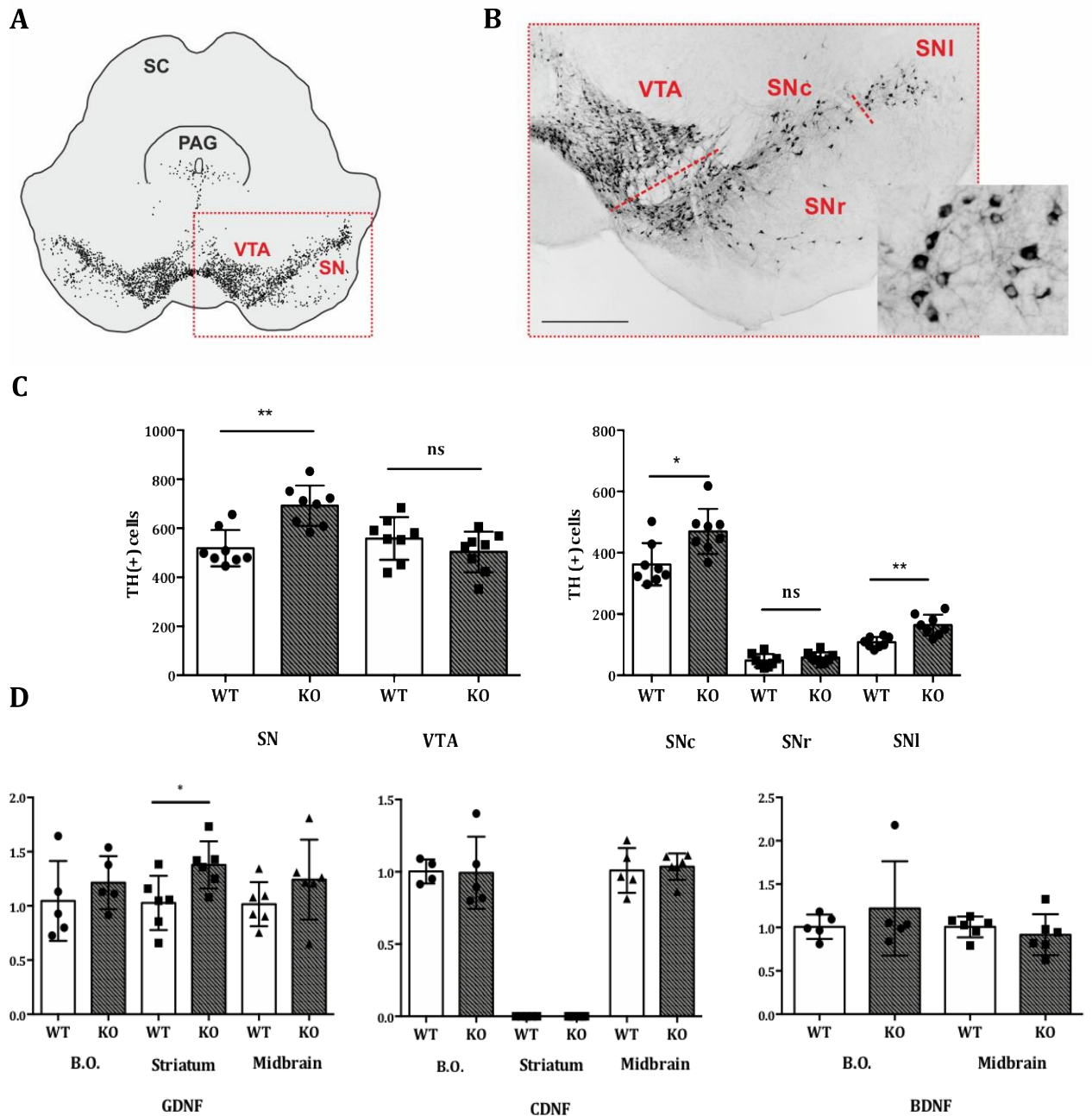


Figure 7. Dopaminergic system in TAAR5 (TAAR5-KO) knockout mice. A-B) Distribution of TH (+) neurons in the ventral tegmental region (VTA) and substantia nigra (SN) in TAAR5-KO mice and wild-type (WT) mice. A) Frontal section of the midbrain with immunohistochemical staining for TH (+) neurons, marked with dots. PAG - periaqueductal gray, SC - Superior colliculi. B) Microscopic image of the enlarged area marked with a red dotted square on the frontal section. SNr - substantia nigra pars reticulata, SNc - substantia nigra pars compacta, SNI - substantia nigra pars lateralis. Scale bar 400 μ m. C) Number of TH (+) neurons in VTA and SN sections, comparison of TAAR5-KO and WT mice. Number of TH (+) neurons in SNc, SNr, SNI, comparison of TAAR5-KO and WT mice [11]. D) Real-time PCR. The relative content of mRNA of Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the olfactory bulb (B.O.), striatum, midbrain in TAAR5-KO (KO) and WT mice showed a significant increase in TAAR5-KO GDNF expression in the striatum compared to WT mice. In the graphs, the WT expression level was set to 1. Values are the mean \pm SD. ns - insignificant, *, **, *** - $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ [11].

3.2.2 TAAR2 knockout mice have elevated level of BDNF in the striatum

To assess the effect of TAAR2 on the dopaminergic system, the expression of GDNF, CDNF, BDNF in the striatum and midbrain of TAAR2 knockout (TAAR2-KO) mice and WT mice was analyzed using real-time PCR, and it was shown that TAAR2-KO mice are characterized by increased expression of BDNF in the striatum compared to WT mice (Figure 8).

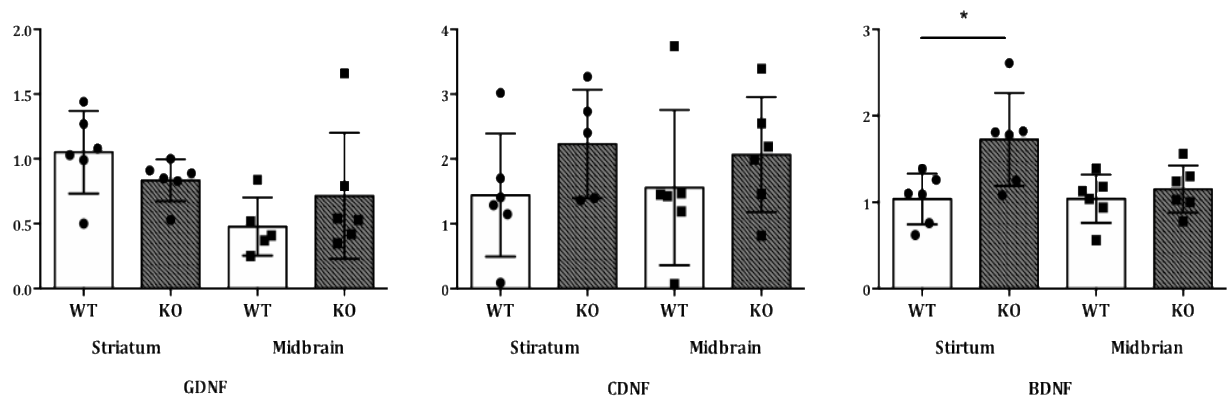


Figure 8. Expression of GDNF, CDNF, BDNF transcription factors in striatum and midbrain of TAAR2 knockout mice.

Real time PCR. Relative content of mRNA of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the striatum and midbrain in TAAR2 -KO (KO) and WT mice showed a significant increase in TAAR2-KO BDNF expression in the striatum compared to WT mice. In the graphs, the WT expression level was set to 1. Values are the mean \pm SD. *, **, *** – $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively [13].

3.2.3 Analysis of the expression of TAARs made on RNA sequencing data obtained from open databases showed that TAARs are expressed in neurogenic zones, in particular in the mouse hippocampus, and their expression is found in different cell types.

The data obtained on TAAR2-KO and TAAR5-KO mice included in this study, as well as other data obtained by our group [11; 13], suggested that TAARs may play a role in adult neurogenesis and in the neurogenesis of dopaminergic neurons [12].

To assess the presence of TAARs expression in the zones of adult neurogenesis, an analysis of transcriptomic profiles of dentate gyrus and hippocampus cells obtained from the open databases BioGPS, GEO was performed. The GEO database <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> was used for the search. The range of transcriptomic datasets was narrowed down to samples with a large number of

reads, since only such data made it possible to assess the expression level of TAARs, which is associated with their extremely low expression level. Thus, four sets of data obtained using RNA sequencing and one set of RNA sequencing of single cells containing information on the expression profiles of the mouse hippocampus were selected for analysis [111–115] (Table 4).

Table 4. RNA sequencing data sets used in the study [116].

GSE number	Title	Number of samples	Experiment design
<i>Whole-tissue data</i>			
GSE84503	Activity-Dependent Regulation of Alternative Cleavage and Polyadenylation (APA) During Hippocampal Long-Term Potentiation (LTP)	6 control samples / 6 experimental samples	Acute hippocampal slices after chemically induced long-term potentiation induction, potentiated slices and time-matched control slices were studied after 1 hr and 3 hr after the intervention.
GSE147842	Adult mouse hippocampal transcriptome changes associated with long-term behavioral and metabolic effects of gestational air pollution toxicity	10 control samples / 10 experimental samples	Pregnant dams were exposed to urban derived nanosized particulate matter during the gestational period. The effects were studied in adults.
GSE148075	Wild mice with different social network sizes vary in brain gene expression	14 in the "high gregariousness" group and 15 in "low gregariousness" group	Dataset from three brain regions (hypothalamus, prefrontal cortex, and hippocampus, only hippocampal samples were included in the review) from

Continuation of table 4

			wild mice presenting large or small social network sizes.
GSE166831	Altered hippocampal transcriptome dynamics following sleep deprivation	9 control samples / 9 experimental samples	Whole hippocampus RNA profiles of mice who were either sleep deprived for 5 hours or left undisturbed.
<i>Single-cell data</i>			
SCP1	Single nucleus RNA-seq of cell diversity in the adult mouse hippocampus.	1,367 single nuclei	Nuclei from hippocampal anatomical sub-regions DG, CA1, CA2, CA3, and lowly abundant GABAergic neurons were analysed.

Since the selected datasets consist of control and experimental groups, in accordance with the conditions of the experiments conducted by the researchers, differential analysis of the expression of TAARs was performed in all datasets in order to assess the possible difference in expression between the animals of the control and experimental groups. No significant differences in TAAR expression were found between control and experimental groups, so the groups were pooled for further analysis.

According to the obtained data, *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4* and *Taar5* are sporadically expressed in mouse hippocampal tissue. *Taar7e* was also expressed at a very low level in one sample. In different datasets, the expression patterns of TAARs were similar. Expression of *Taar3* and *Taar4* was found in all four series in at least one sample per data set, and *Taar1*, *Taar2* and *Taar5* were found in three data sets (Figure 9). It should be noted that in the GSE84503 set, unlike the other three datasets, the dentate gyrus was removed from the dissection material prior to RNA isolation for sequencing.

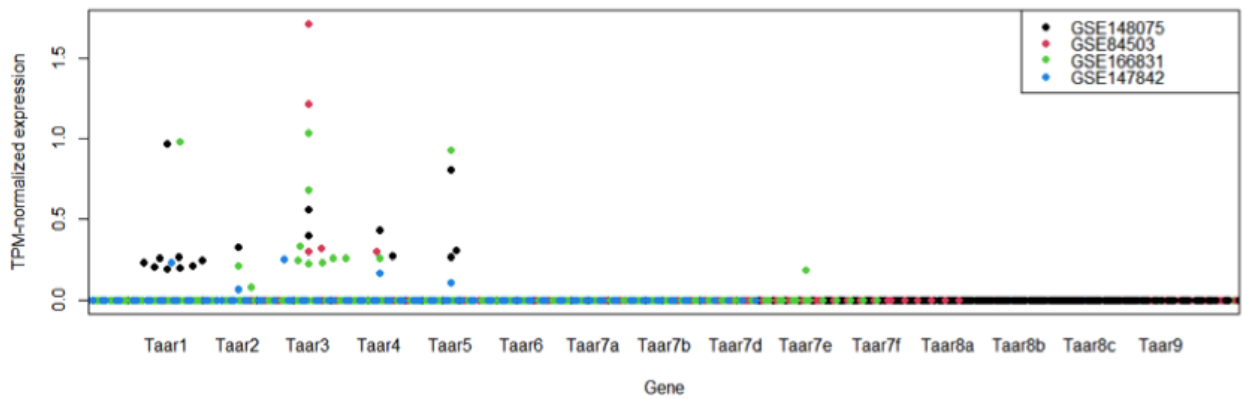


Figure 9. Expression levels of TAARs in whole mouse hippocampus samples presented in the GEO database. Analysis showed that *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4*, and *Taar5* are sporadically expressed in mouse hippocampal tissue [116].

A more precise expression pattern of TAARs was found in the SCP1 dataset (Single cell portal, https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell). This set contains expression data from 1367 cells obtained from different parts of the hippocampus (DG, CA1, CA2, and CA3), GABAergic neurons, glia, and ependyma of the mouse dentate gyrus [115]. As the analysis of this dataset shows, the expression of all TAARs can be found in hippocampal cells, however, these are sporadic detections. Expression of *Taar6*, *Taar7f*, and *Taar8* was found in all cell groups annotated in the set. The expression of *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4*, *Taar5*, *Taar7b*, *Taar8a* and *Taar8c* was found only in neuronal cells. At that time, the expression of *Taar7a*, *Taar7d*, *Taar7e* and *Taar9* is predominantly found in glial cells (Figure 10).

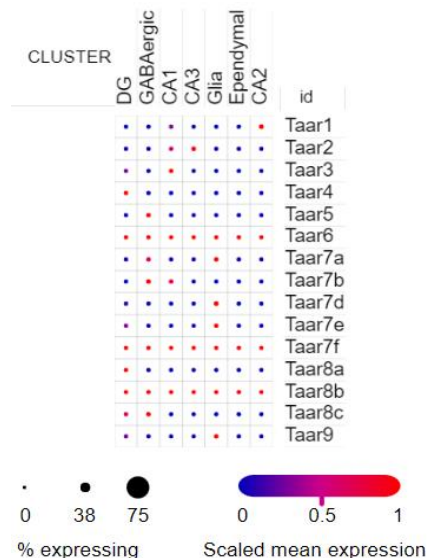


Figure 10. Expression of TAARs in mouse hippocampal cell populations obtained from analysis of the SCP1 dataset (image generated using the Single Cell Portal interactive interface). Expression levels are color-coded according to the color scale. As the analysis shows, the expression of all TAARs was found in hippocampal cells, and in particular the expression of *Taar6*, *Taar7f* and *Taar8* was found in all cell types annotated in the set, the expression of *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4*, *Taar5*, *Taar7b*, *Taar8a* and *Taar8c* was found only in neuronal cells, *Taar7a*, *Taar7d*, *Taar7e*, and *Taar9* expression is predominantly found in glial cells [116].

Obtained results indicate that TAAR2 and TAAR5 are important for the neurogenesis of dopaminergic neurons, and TAARs are expressed in neurogenic areas, in particular in the mouse hippocampus.

3.2.4 TAARs are expressed at the late stages of hPSC differentiation into dopaminergic neurons, as it was shown by analysis of RNA sequencing data obtained from open databases and TaqMan PCR data at different stages of differentiation

The expression of TAARs in undifferentiated hPSCs was evaluated primarily. RNA sequencing data of hPSC lines WTSli004-A, WTSli032-A, and WTSli046-A obtained from EBiSC were used. Even minimal levels of TAARs expression were not found in the analyzed data (data not shown).

Data sets, which were obtained during the differentiation of hPSCs into dopaminergic neurons, were selected from the GEO database. The range of choice of transcriptome data sets was narrowed down to samples with a large number of reads per sample, as it was done during data analysis of the TAARs expression in the hippocampus.

The EGAD0000100615 data set from the European Genome-phenome Archive contains data obtained from the differentiation of 215 hPSC lines towards midbrain neurons, including dopaminergic neurons [117]. Differentiation was performed according to the protocol published by Kriks et al., 2011 with minor modifications [118]. Samples were collected on the day 11, 30 and 52 of differentiation. It was found that on the day 11 of differentiation, only single observations of *TAAR6* expression appeared, while the expression of other TAARs was absent. On the day 30 of differentiation, the expression profile of TAARs remained virtually unchanged. But by the day 52 of differentiation, a significant level of *TAAR1* and *TAAR6* expression appeared, as well as single observations of expression of *TAAR8* and *TAAR5* (Figure 11).

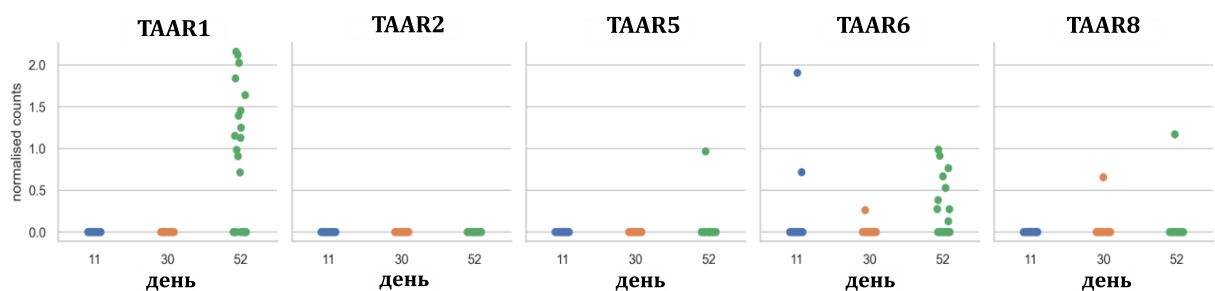


Figure 11. Expression of TAARs in samples on days 11, 30, and 52 of hPSC differentiation into midbrain neurons (data set EGAD0000100615). Data analysis showed that *TAAR1* and *TAAR6*, as well as single observations of *TAAR8* and *TAAR5* expression, appeared by the day 52 of differentiation.

The GSE118412 data set [119] contains RNA sequencing data obtained by differentiation of human ESCs (RC17 line, Roslin Cells) into precursors of dopaminergic neurons, which was performed according to the protocol described by Nobrant S. et al, 2017 [17] for 16 days, and from cells of the ventral midbrain of the human fMB grafts. Both cells were analyzed under two conditions: before transplantation into the striatum of 6-OHDA rat PD models and after 6 months after transplantation [119].

It was shown that both human fMB grafts and neuronal progenitor cells obtained on the 16th day of differentiation have a significant level of expression of *TAAR5* and *TAAR8*, which is retained in transplants isolated after 6 months after transplantation (Figure 12).

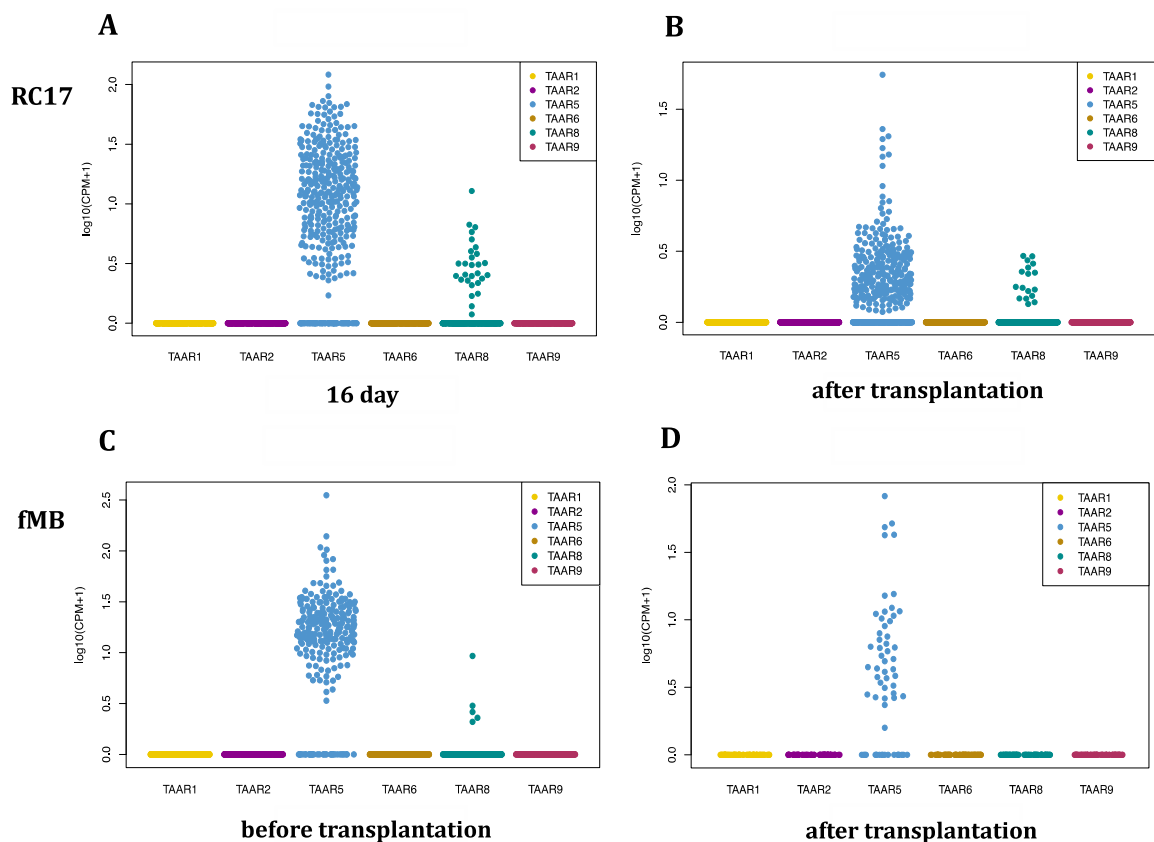


Figure 12. Expression of TAARs in RC17 cells on the 16th day of differentiation of human ESC into dopaminergic neurons and in cells of fMB before transplantation and 6 months later after (dataset GSE118412). A) RC17 cell line day 16 of differentiation. B) RC17cell line 2 months after transplantation C) fMB before transplantation D) fMB 2 months after transplantation. The data show that both before and after transplantation, both cell lines have significant expression of *TAAR5* and *TAAR8*.

The GSE86654 set [61] contains RNA sequencing data that were obtained from cells on the day 16 of differentiation of ESC cells (H9 cell line) into dopaminergic neurons according to the protocol described by Nobrant S. et al, 2017 [17]. Analysis of the expression of TAARs showed a high level of expression of *TAAR5*, as well as in the data set GSE118412, (Figure 13).

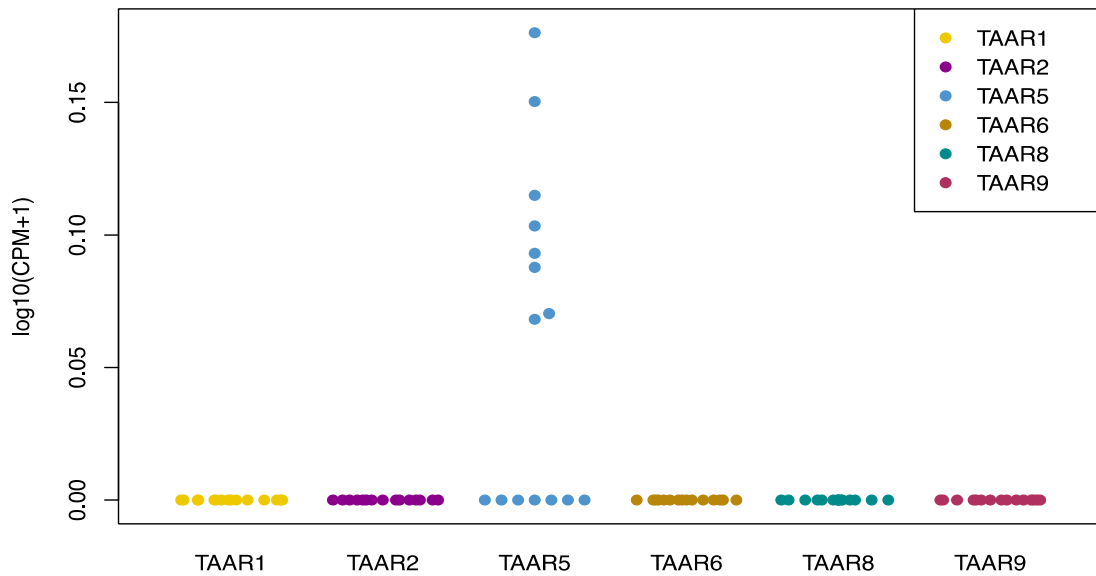


Figure 13. Expression of TAARs at day 16 of human ESC differentiation (data set GSE86654). The data show that at this stage of differentiation, cells have a significant expression of *TAAR5*.

Data from the GSE162884 data set (GSE162883) [5], which contains RNA sequencing data for cells on the day 11 of differentiation (human ESC lines H9 (WiCell) and MEL1 (Stem Cell Sciences plc)) obtained during differentiation according to the protocol published by Kim T.W. et al., 2021 [120] were analyzed. In this set, no detectable level of TAARs expression was found either at the stage of undifferentiated ESCs or in differentiated cells (data not shown).

In addition to the analysis of data obtained from open sources, three hPSC lines AD3, WTSli004-A, WTSli032-A were differentiated into dopaminergic neurons. RNA samples were collected at different stages of differentiation: from undifferentiated cells, on the day 12 and 53. An analysis of the expression of TAARs showed that the expression of *TAAR1*, *TAAR2*, *TAAR6*, *TAAR8*, and *TAAR9* was not detected at any of the stages of differentiation of hPSCs into dopaminergic neurons. However, *TAAR5* expression was found at a low level in undifferentiated cells, especially in the WTSli004-A cell line. On the day 12 of differentiation, there was an increase in the expression of *TAAR5* in a small number of samples, and its level increased by the 53 day of differentiation (Figure 14).

The obtained results indicate that *TAAR2* and *TAAR5* influence on neurogenesis and the neurogenesis of dopaminergic neurons in particular.

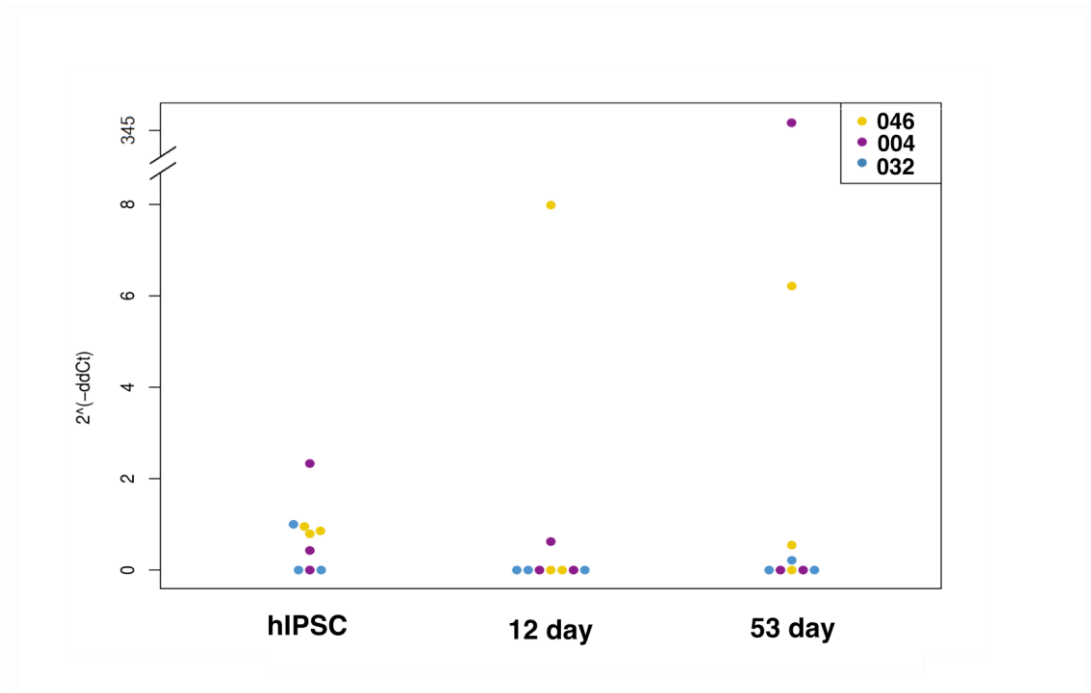


Figure 14. *TAAR5* expression at different stages of differentiation of hIPSC to dopaminergic neurons obtained by TaqMan real-time PCR.

TAARs are expressed in neuronal and glial cells of the mouse hippocampus and at different stages of differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons, however, the expression patterns of TAARs obtained from the analysis of different data sets have certain differences. Probably, this difference is due to the fact that the analyzed cells were obtained by different differentiation protocols. The used differentiation protocols are based on common principles, but they have their own characteristics and lead to the formation of cells of varying degrees of maturity and specification, which can affect the expression pattern of TAARs.

The obtained data are important for understanding the role of TAARs in the functioning of the nervous system, but further studies are needed to evaluate the specific mechanisms and signaling pathways that underlie this.

3.3 The influence of Notch signaling modulation on the early stages of hIPSC differentiation into dopaminergic neurons

Three hIPSCs lines were used in this part of the study: AD3, WTSLi004-A (004), WTSLi046-A (046).

3.3.1 RBPJ knockdown and NICD overexpression effectively inhibit and activate, respectively, Notch signaling during hPSC differentiation into dopaminergic neurons

To assess the effect of inhibition/activation of the Notch signaling on the early stages of differentiation of hPSCs into dopaminergic neurons, the following were made:

1) Inhibition of Notch signaling by knockdown of *RBPJ* by lentiviral transduction of shRNA to *RBPJ* (Figure 15A)

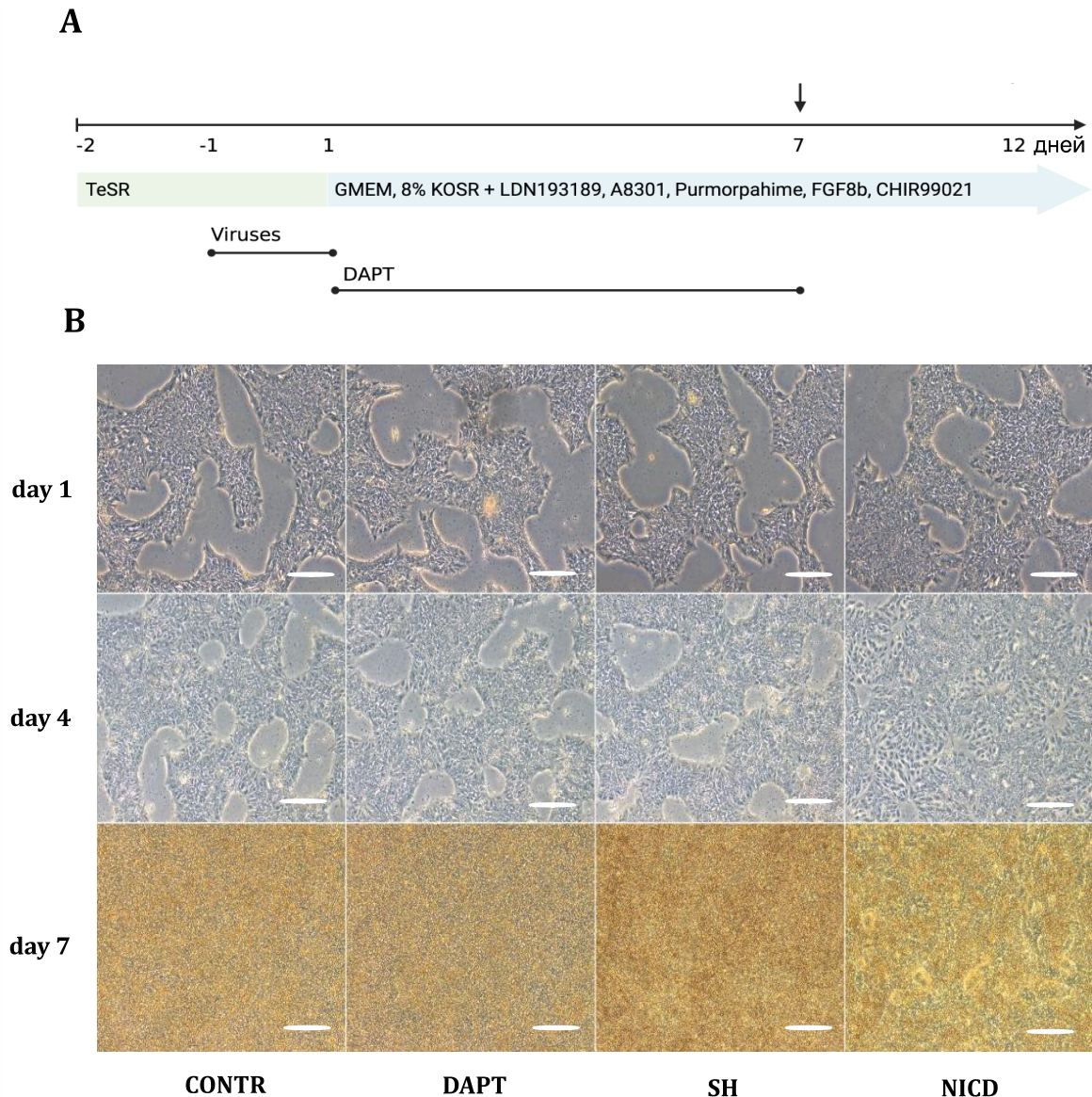


Figure 15. Inhibition/activation of the Notch signaling at early stages of hPSC differentiation into dopaminergic neurons. A) Scheme of the experiment. Virus particles were added the next day after cell passage and incubated for 24 h. DAPT was added from the day 1 to the 7 of differentiation. For RNA isolation, cells were removed on the day 7 of differentiation. B) Microscopy, transmitted light. 4 conditions: CONTR, control differentiation; DAPT, differentiation with DAPT treatment; SH, differentiation under conditions of *RBPJ* knockdown; NICD, differentiation with *NICD* overexpression. Morphological changes in cell culture on days 1, 4, and 7 of differentiation of hPSCs into dopaminergic neurons with a modulation of the Notch signaling showed the similarity of the CONTR, SH, and DAPT groups and the differences from these groups of the NICD group. The NICD group is characterized by the formation of rosette-like structures starting from the day 4 [110].

2) Inhibition of Notch signaling by the γ -secretase inhibitor DAPT, which was added to cells from day 1 to 7 of differentiation (Figure 15A)

3) Activation of the Notch signaling by overexpression of NICD by lentiviral transduction of gene encoding an NICD (Figure 15A).

Thus, four groups were formed in the course of the work: CONTR, control differentiation; SH, differentiation under conditions of *RBPJ* knockdown; NICD, differentiation with *NICD* overexpression; DAPT, differentiation with DAPT treatment (Table 5).

Table 5. Experimental groups used in the study [110].

Name of group	Description
CONTR	Control differentiation
SH	Differentiation with inhibition of Notch signaling by shRNA to <i>RBPJ</i> (<i>RBPJ</i> knockdown)
NICD	Differentiation with activation of Notch signaling by overexpression of <i>NICD</i>
DAPT	Differentiation with inhibition of Notch signaling by DAPT

The efficacy of inhibition and activation of the Notch signaling pathway by *RBPJ* knockdown and *NICD* overexpression, respectively, was analyzed 96 h after transduction and on differentiation day 7, and it was shown that *RBPJ* knockdown reduced the expression of *RBPJ*, a downstream target of the Notch signaling, by 70% (Figure 16). Overexpression of *NICD* increased the expression of *HEY1*, the downstream target of the Notch signaling, 36-fold compared to control. This effect was observed 96 h after transduction and persisted throughout the entire time until the end of the experiment (7 days of differentiation) (data not shown).

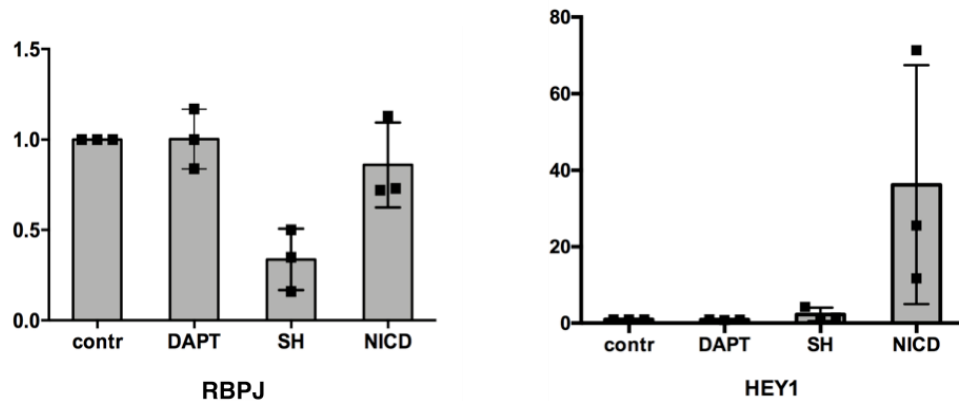


Figure 16. Real-time PCR for *RBPJ* and *HEY1*. Efficacy of Notch signaling inhibition/activation by shRNA to *RBPJ* and NICD overexpression, respectively. Real-time PCR of the *RBPJ* and *HEY1* showed effective inhibition and activation of Notch signaling, respectively, during the differentiation of hPSCs into dopaminergic neurons after 96 h of transduction. Mean \pm SD [110].

Morphological changes in cells in culture during 7 days of differentiation were similar in groups CONTR, SH, DAPT (Figure 15B). At the same time, cells with *NICD* overexpression, starting from the day 4 of differentiation, formed rosette-like structures (Figure 15B) and acidification of the medium in this group occurred much faster compared to other conditions (data not shown).

3.3.2 Analysis of RNA sequencing data using principal component analysis (PCA) revealed similarities and differences between groups

For RNA isolation and sequencing, cells were removed on the day 7 of differentiation. Significant differences were found between the NICD and CONTR groups, and between the NICD and SH groups using the principal component analysis (Figure 17A). At the same time, there were no significant differences between the CONTR and SH groups, as well as between the CONTR and DAPT groups.

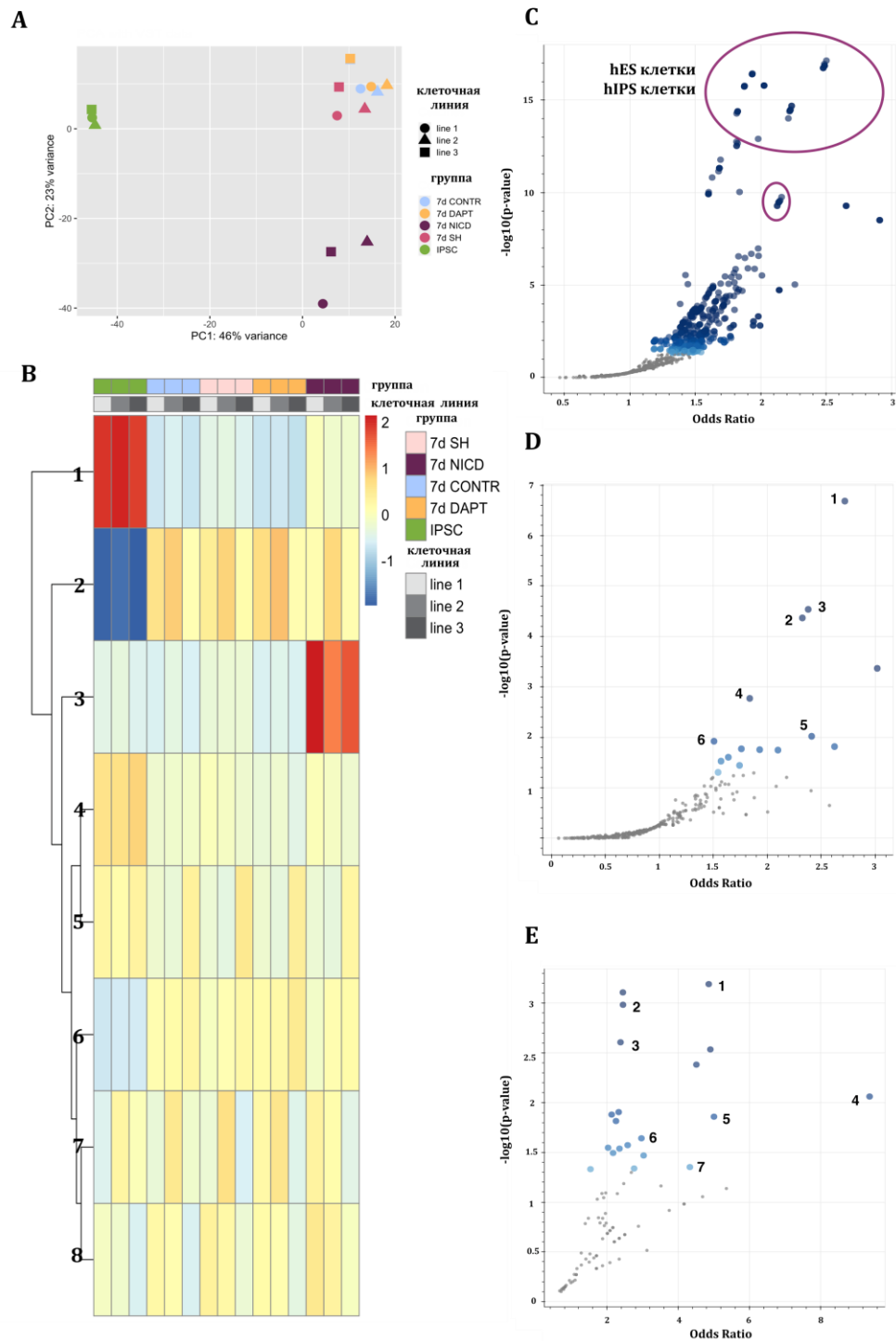


Figure 17. Analysis of RNA sequencing data. A) Principal component analysis of non-treated cells (CONTR), cells with *RBPJ* knockdown (SH), cells with *NICD* overexpression (NICD), cells treated with DAPT (DAPT) showed similarities of CONTR, SH and DAPT condition, and significant differences in NICD condition. B) Cluster analysis of CONTR, SH, NICD, DAPT conditions showed division into 7 clusters. C-E) Volcano plots depicting odds ratios and p-values of gene expression levels within selected clusters. C) Group of genes from cluster 1 of cluster analysis showed the presence of genes, characteristic for different lines of hIPS cells and hES cells (in circles). D) Group of genes from cluster 2 of cluster analysis showed the presence of genes, characteristic for 1) axon guidance 2) Wnt signaling pathway 3) Hippo signaling pathway 4) focal adhesion 5) Hedgehog signaling pathway 6) MAPK signaling pathway E) Group of genes from cluster 3 of cluster analysis showed the presence of genes, characteristic for 1) Notch signaling pathway 2) Integrin signaling pathway 3) angiogenesis 4) pyruvate metabolism 5) opioid proopiomelanocortin pathway 6) ubiquitin proteasome pathway 7) GABA-B receptor II signaling [110].

3.3.3 Cluster analysis revealed groups of genes characteristic of hIPSCs and ESCs, for a differentiated condition and a separate group characteristic of overexpression of NICD

RNA sequencing data obtained from cells of all experimental groups on day 7 of differentiation and RNA sequencing data of undifferentiated hIPSCs on day 0 were used for cluster analysis (Figure 17B).

The expression of genes specific for pluripotent stem cells decreased by the day 7 of differentiation, regardless of the presence or absence of influence on the Notch signaling (Figure 17B cluster 1; 17C; Appendix A).

During differentiation, the expression of genes associated with the SHH, Wnt, and MAPK signaling cascades, as well as genes that regulate the growth of nerve cell outgrowths, in particular, the formation of axons, increased (Figure 17B cluster 2; 17D; Appendix A).

A separate group of genes distinguished the NICD group from all the others was identified using cluster analysis. This group was formed by genes that play a role in ligand-receptor interaction; regulation of the activity of kinases or proteins that bind to kinases; and genes associated with metabolism (Figure 17B, cluster 3; 17E; Appendix A).

3.3.4 Differential expression analysis showed a predominant similarity between control differentiation (CONTR group) and differentiation with Notch signaling inhibition (SH and DAPT groups) and their significant difference compared to differentiation with activation of Notch signaling (NICD group)

a. Comparison of CONTR and NICD groups

RNA sequencing data from the CONTR (control differentiation) and NICD (differentiation with activation of the Notch signaling by NICD overexpression) groups were compared, and it was shown that overexpression of NICD during the first 7 days of differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons led to activation of genes, the vast majority of which are associated with the regulation of the development of the nervous system and the specification of neurons (Figure 18A, B; Appendix A). In particular, in the NICD group, the expression of genes characteristic of the development of the thalamus (ENDOD1, SLC1A4), spinal cord (DAAM2, ACSBG1) was increased, while the expression of markers characteristic of pyramidal neurons (CALB1, MAP2, CAMK2A, NRG1), GABAergic

neurons (MAP2, CAMK2A, MAP6), interneurons (CALB1, MAP2, CAMK2A, NRGN), and cholinergic neurons (CAMK2A, PIK3R3) was reduced.

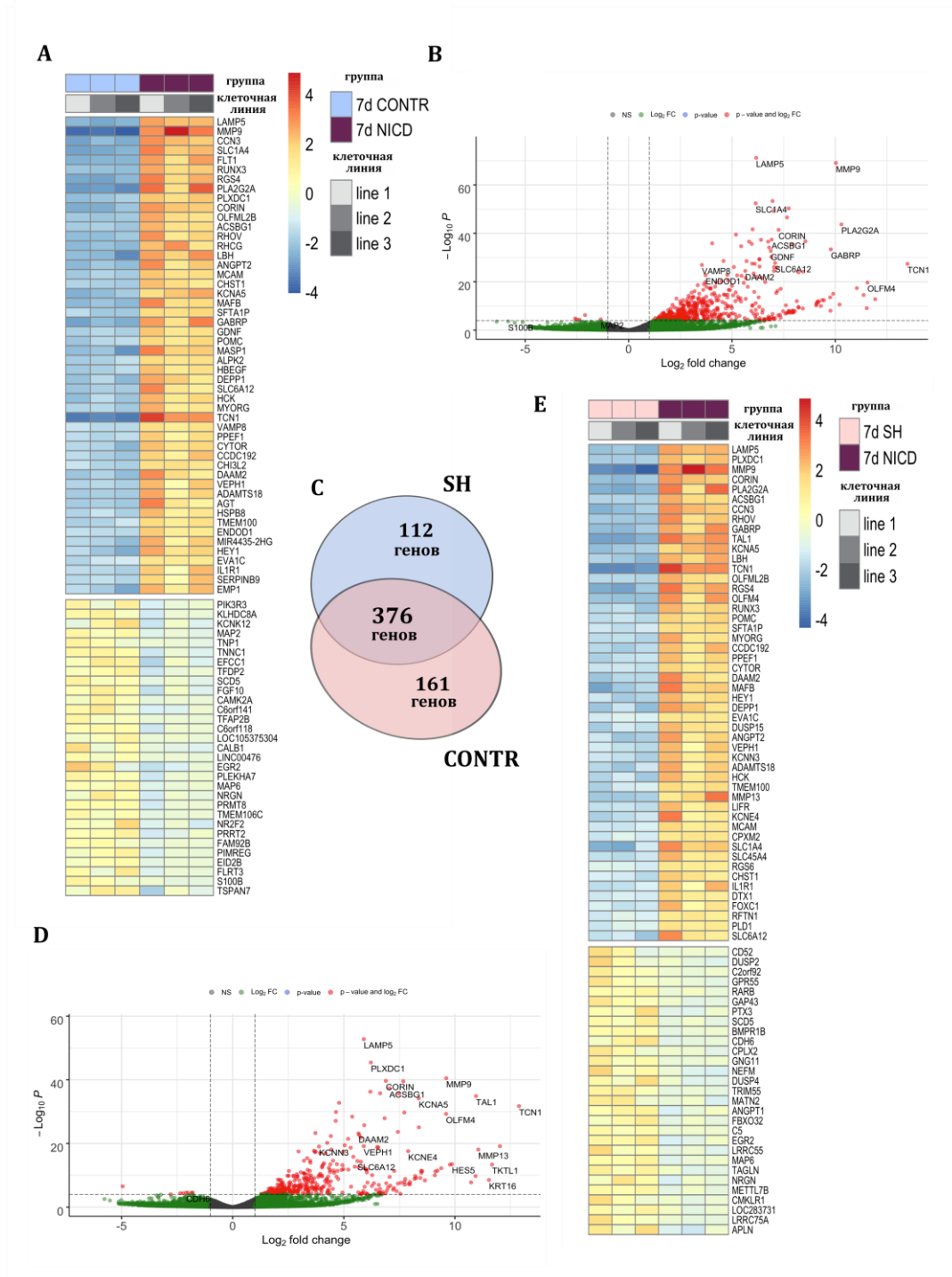


Figure 18. Comparison of transcriptomic profiles of non-treated cells (CONTR) with cells with *NICD* overexpression (NICD), and cells with *RBPJ* knockdown (SH) with NICD condition. A) Heat map of differentially expressed genes between CONTR and NICD conditions showed an increased expression of *DAAM2*, *ACSBG1*, *CORIN*, *GDNF*, *SLC6A12* genes, and decrease of *CALB1*, *CAMK2A*, *NRGN*, *PIK3R3*, *MAP2*, *MAP6*, *S100B*, *TSPAN7* genes in NICD condition, top 50 genes. B) Volcano plot of differentially expressed genes between groups CONTR and NICD conditions. C) Venn diagram of overexpressed genes in NICD group relative to SH and CONTR groups showed the dominant overlap between these two groups. D) Volcano plot of differentially expressed genes between SH and NICD conditions showed an increase of expression of *DAAM2*, *ACSBG1*, *VEPH1*, *CORIN* in NICD condition. E) Heat map of differentially expressed genes between SH and NICD conditions, top 50 genes [110].

A decrease in the expression of the *S100B* and *TSPAN7* genes, which are important for axon growth, as well as *MAP6* and *MAP2*, which are involved in microtubule stabilization and are specific for mature neurons, was found in the NICD group.

In addition, an increase in *CORIN* expression was shown in the NICD group. *CORIN* is used as a precursor marker for dopaminergic neurons. And there was also an increased expression of *GDNF*, which is important for the development of dopaminergic neurons.

In the NICD group, increased expression of several types of ion channels was found: *KCNA5*, a gene encoding a voltage-gated potassium ion channel that plays a role in neuronal excitability, neurotransmitter release, and is involved in the regulation of potassium current in atrial cardiomyocytes; and the gamma-aminobutyric acid (GABA) type A receptor (*GABRP*), which is an ion channel for chloride and plays an important role in inhibitory synaptic transmission.

NICD group showed an increase in the expression of *DAAM2*, an activator of the Wnt signaling cascade, as well as *VEPH1*, which inhibits SMAD proteins, through interaction with the TGF-beta type 1 receptor (*TGFBR1*).

The NICD group also showed increased expression of *SLC6A12*, a betaine-GABA transporter that works in presynaptic terminals, and *VAMP8*, which is important for synaptic vesicle fusion with the presynaptic membrane.

b. Comparison of SH and NICD groups

Principal component analysis on transcriptome data showed that the SH (differentiation with inhibition of the Notch signaling by shRNA to *RBPJ*) and CONTR (control differentiation) groups are similar (Figure 17A). Given this, it was expected that the results of comparing the SH and NICD groups would be similar to the results of comparing the CONTR and NICD groups. Indeed, among the overexpressed genes in the NICD group assessed by comparison with the CONTR group or by comparison with the SH group, 376 genes were common for both comparisons (Figure 18C). Significant similarity also persisted when a similar comparison was made on a sample of the top 50 genes (Appendix B).

Overexpression of NICD was characterized by increased expression of *ACSBG1*, which plays an important role in the formation of the myelin sheath (Figure 18D, E; Appendix C).

An increase in *VEPH1* expression and a decrease in *CDH6* expression were found, which play a role in the inhibition of TGF beta and BMP signaling pathways. And increased expression of *DAAM2*, which is characteristic of the spinal cord and may play a role in the activation of SHH and Wnt signaling pathways, was found.

NICD group showed increased expression of CORIN, which is used as a marker of precursors of dopaminergic neurons [16].

The NICD group was characterized by an increase in the expression of *KCNA5*, *KCNN3* and *KCNE4*, potassium channels that play a role in the release of neurotransmitters, and a decrease in the expression of *LRRC55*, a protein that influences the operation of calcium-activated and voltage-gated potassium channels.

Also NICD group showed the increase of expression of betaine and GABA transporters *SLC1A4* and *SLC6A12*. But the expression of *NEFM* encoding a neurofilament associated protein and *MAP6* encoding a microtubule associated protein were reduced.

c. Comparison of CONTR and SH groups

The difference between differentiation under control conditions (CONTR group) and RBPJ knockdown conditions (SH group) was analyzed (Figure 19A, B; Appendix C). In the obtained data no significant differences were found between the two groups.

d. Comparison of SH and DAPT groups

The effects of Notch inhibition at the level of regulation of transcription factor activity (by RBPJ knockdown) were compared with inhibition at the level of intracellular domain cleavage by γ -secretase (by DAPT) (Figure 19C, D; Appendix C).

Notch inhibition by DAPT has been found to be characterized by higher expression of *PTCH1*, which plays a role in the activation of the SHH signaling cascade. The DAPT group also showed activation of the Wnt signaling cascade and a more active state of the KRAS signaling cascade. In addition, the DAPT group was characterized by higher expression of *DEPTOR*, a negative regulator of the mTOR signaling cascade.

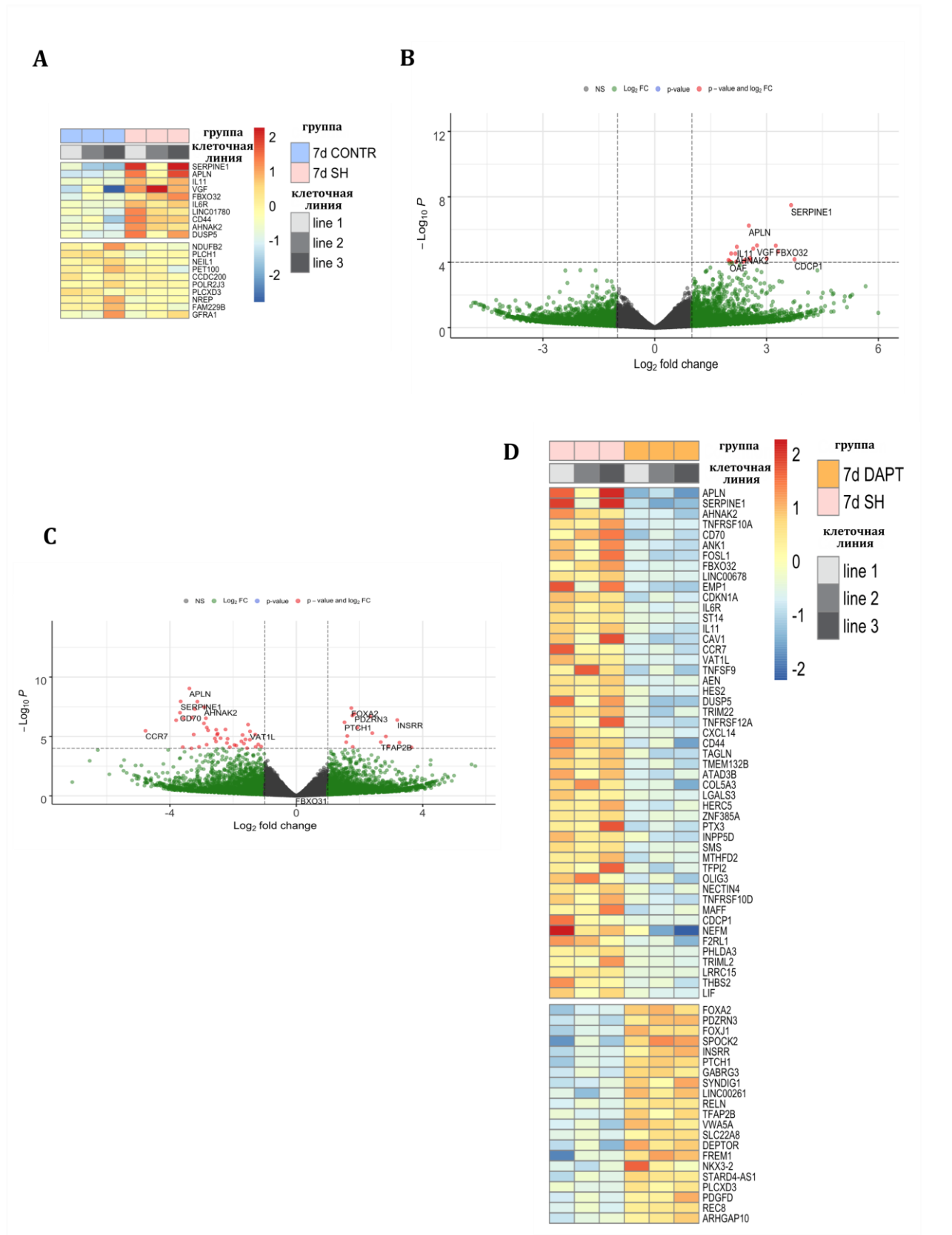


Figure 19. Pairwise comparison of RNA sequencing data of non-treated cells (CONTR) to cells with *RBPJ* knockdown (SH), and SH cells to cells treated with DAPT (DAPT). A) Heat map of differentially expressed genes between CONTR and SH conditions showed low number of genes with different expression, top 20 genes. B) Volcano plot of differentially expressed genes between CONTR and SH conditions showed only few genes with increased expression in SH group. C) Volcano plot of differentially expressed genes between SH and DAPT conditions showed increased expression of *PTCH1*, *FOXA2*, *DEPTOR* genes in DAPT condition. D) Heat map of differentially expressed genes between groups SH and DAPT conditions, top 50 genes [110].

The Notch signaling pathway is essential for the development and functioning of the nervous system, but the effects on Notch are highly environmentally dependent. Inhibition of the Notch signaling during the first 7 days of hPSC differentiation into dopaminergic neurons, regardless of the method of inhibition, does not significantly affect the gene expression pattern of the resulting cells. While Notch activation leads to a certain shift of differentiation in a more caudal direction due to an increase in the expression of *ENDOD1*, *DAAM2*, *ACSBG1*, *CORIN* and a decrease in the expression of *CAMK2A*, *CALB1*, *NRGN*, and also leads to a decrease in the expression of genes important for the formation of axons and dendrites such as *S100B* and *TSPAN7* and microtubule stabilization, *MAP2* and *MAP6*.

Conclusion

PD is a severe neurodegenerative disorder that significantly affects the quality of life of patients. Currently existing methods of treating PD are only symptomatic, and therefore the search for new approaches is an extremely actual task [1].

Cell replacement therapy, based on the transplantation of neuronal progenitors into the striatum or other parts of the basal ganglia system of the brain, is one of the new approaches currently being developed in the field of treatment of neurodegenerative diseases [2–4]. The creation of effective and specific protocols for the differentiation of human pluripotent stem cells into dopaminergic neurons or their precursors, as well as the optimization of transplantation methods of the obtained neuronal progenitors, are fundamental issues for the development of this method.

In the course of the study, the currently existing protocols [16] with modifications were used, and it was shown that the obtained protocols are effective for obtaining dopaminergic neurons from hIPSCs *in vitro*. Cells obtained on the day 53 of differentiation have a morphology and action potential characteristic of neurons, express markers of mature dopaminergic neurons TH, Lmx1a, MAP2, and produce dopamine.

The TA system was discovered long ago, while their receptors, TAARs, were first described only in 2001, and to date the spectrum of their functions is still poorly known [6; 7]. It has been shown that TAARs play a role in the regulation of various processes: attention, nutrition, movement, and mood. It is known that changes in the TA and TAARs system are an integral part of the pathogenesis of a number of mental diseases, such as schizophrenia, depression, drug addiction, and a number of others [8–10]. Recently, there have been suggestions about the relationship between the TA system and TAARs and the regulation of neurogenesis [12].

In the course of the study, the number of dopaminergic neurons in TAAR5-KO and WT mice was estimated and it was shown that TAAR5-KO mice have an increased number of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain, specifically, in its compacta and lateralis. The expression of neuronal growth factors *GDNF*, *BDNF*, *CDNF* was evaluated in different parts of the brain of TAAR2-KO, TAAR5-KO and WT mice, and it was shown that in the striatum of TAAR5-KO mice the expression level of *GDNF*, a factor necessary for the maturation of dopaminergic neurons, was increased, and in TAAR2-KO mice, the expression level of the *BDNF* factor in the striatum was increased. Like GDNF, BDNF is a factor that plays an important role in the development of neurons and dopaminergic neurons in particular.

These findings, together with other data obtained by the team of the Laboratory of Neurobiology and Molecular Pharmacology of the Institute of Translational Biomedicine of Saint-Petersburg State

University [11–13], led to the conclusion that TAARs, in particular TAAR2 and TAAR5, are important for neurogenesis and neurogenesis dopaminergic neurons specifically.

Using RNA sequencing data obtained from open databases [111–115], the expression of various types of TAARs in neurogenic zones, in particular in the hippocampus, was analyzed, and it was shown that there is a low level of expression of *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4* and *Taar5* in the mouse hippocampus. The data of single cell RNA sequencing showed that neuronal cells of the mouse hippocampus show a low expression level of *Taar1*, *Taar2*, *Taar3*, *Taar4*, *Taar 5*, *Taar7b*, *Taar8a*, and *Taar8c*, while the expression of *Taar7a*, *Taar7d*, *Taar7e*, and *Taar9* was predominantly found in glial cells.

To assess the contribution of TAARs to the development of dopaminergic neurons, the expression of TAARs was analyzed at different stages of differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons [5; 61; 117–119]. It has been shown that in undifferentiated hIPSCs, TAARs expression is predominantly not detected. However, in the course of differentiation, starting from day 16, the expression of some TAARs appears, in particular *TAAR5*, *TAAR6*, *TAAR8*, and *TAAR1*, which became maximal at later stages.

The obtained data allow to conclude that TAARs play a role in neurogenesis and knockout of TAAR2 or TAAR5 leads to changes in the dopaminergic system. TAARs are expressed in neurogenic zones, in particular in the mouse hippocampus, and the expression pattern of TAARs changes during differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons. It can be concluded that the obtained data are promising for further research, and work in this direction is already underway, foremost to assess how TAAR knockout affect the survival and integration efficiency of dopaminergic progenitors when they are introduced into the striatum of model animals.

The Notch signaling plays a significant role in the embryonic development of the central nervous system, where it is involved in the regulation of cell migration, controls the balance between self-renewal and differentiation, is important for maintaining the growth of axons and dendrites, affects synaptic plasticity and regulates neuron death [18–20], as well as postnatally, where Notch is important for maintaining the stem cell pool, plays a role in the regulation of proliferation and differentiation [125], is important for the functioning of adult neurogenesis zones, and is also crucial for the activation of latent neurogenic programs [21; 25].

It is known that during neuronal differentiation of pluripotent stem cells, proteins of Notch pathway are required for neuron growth and play a role in the specification and regionalization of differentiating cells [125], which can potentially be used to develop protocols for obtaining cells as part of the development of cell replacement therapy methods. But the effects of influencing the Notch signaling pathway are not always clear-cut, they are highly dependent on the cellular context and on the state of other signaling cascades with which Notch interacts.

In this work, we analyzed how activation and inhibition of the Notch signaling affect the early stages of differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons. It has been shown that inhibition of the Notch signaling, regardless of the method of inhibition, using the γ -secretase inhibitor DAPT or shRNA to *RBPJ*, does not significantly affect the early stages of differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons.

Conversely, activation of the Notch signaling by the *NICD* overexpression during early stages had a pronounced effect on differentiation. As it was shown earlier, during the differentiation of spheroids into neurons, Notch plays a role in the regionalization of the resulting cells, therefore, inhibition of Notch signaling by DAPT promotes a higher expression of markers characteristic of forebrain regions [24]. Based on the data obtained in the course of this work, it can be concluded that the opposite effect can be obtained with Notch activation. The results obtained in the course of the study indicate that Notch activation leads to a decrease of the expression of the *CALB1*, *CAMK2A*, *NRGN*, *PIK3R3* genes characteristic of pyramidal neurons, GABA interneurons and cholinergic neurons, and at the same time leads to an increase of the expression of such genes as *DAAM2*, *ACSBG1*, the expression of which is typical for the caudal parts of the brain, in particular, for the spinal cord.

It was also found that *NICD* overexpression increases the expression of the *CORIN* gene, which encodes a serine protease that is expressed during brain development and, as previously described, can serve as a marker of precursors of dopaminergic neurons during differentiation of pluripotent stem cells [16]. In addition, an increased expression of *GDNF*, which promotes the survival and differentiation of dopaminergic neurons, was found.

Notch is known to be required for the formation of axons and dendrites *in vivo* [22] and *in vitro* [23]. The obtained data show that *NICD* overexpression leads to suppression of the expression of the *S100B* and *TSPAN7* genes, which play an important role in this process.

Overexpression of *NICD* has been shown to increase the expression of several types of potassium channels such as *KCNA5* as well as *KCNN3* and *KCNE4*. This was an unexpected finding, since Notch signaling (via *RBPJ*) in cardiomyocytes has previously been associated with suppression of potassium channels [121] and attenuation of potassium currents in whole cells [122; 123]. Thus, these data may indicate that *NICD* overexpression has different effects in cardiomyocytes and neurons, and this confirms the previously described context specificity of the Notch signaling [124].

Overexpression of *NICD* also resulted in decreased expression of *NEFM*, which encodes a protein associated with neurofilaments, as well as *MAP6* and *MAP2*, which are involved in microtubule stabilization.

Thus, although the Notch signaling pathway is necessary for the development and functioning of the nervous system, the effects of modulating Notch signaling are highly dependent on the cellular

environment. Based on the results obtained in this work, it can be concluded that the early stages of differentiation of hIPSCs into dopaminergic neurons are not sensitive to inhibition of the Notch signaling. While Notch activation leads to some caudal shift in differentiation, increased expression of markers specific for dopaminergic neuron progenitors, and reduced expression of genes that are important for axonal and dendritic formation, as well as microtubule stabilizing proteins.

As a result of this study, in accordance with the set tasks, the following Principal findings were made:

Principal findings

1. Trace amine-associated receptors affect neurogenesis in mice: TAAR5 knockouts have an increased number of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain and an increased level of GDNF expression in the striatum, TAAR2 knockouts have an increased level of BDNF in the striatum.

2. Trace amine-associated receptors are expressed in neuronal and glial cells of the mouse hippocampus.

3. Trace amine-associated receptors are expressed at different stages of differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons.

4. Inhibition of the Notch signaling does not significantly affect the early stages of differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons.

5. Inhibition of the Notch signaling at the early stages of differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons either at the level of regulation of the transcription factors activity or at the level of the intracellular domain cleavage by γ -secretase has minimal differences.

6. Activation of the Notch signaling at the early stages of differentiation of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons significantly affects the expression pattern of genes that play an important role in the development of the nervous system and specification of neurons, are important for the development of dopaminergic neurons, and are involved in growth regulation axons and dendrites, and genes that affect microtubule stabilization.

Publications and approbation of the work

15 published works were made based on the materials of the study: 6 scientific articles and 1 review in journals indexed by WoS and/or Scopus systems, 1 chapter in a book and 7 abstracts in international conference.

The main provisions and scientific results of the study were presented in reports at scientific conferences: V National Congress on Regenerative Medicine, Moscow, Russia, November 23 - 25, 2022; Nectar2022 32nd Annual meeting of the Network for European CNS Transplantation and Restoration, Athens, Greece, 24 – 26 October 2022; ISSCR 2022 Annual Meeting, San Francisco, USA, June 15 – 18, 2022 (online); 33st ECNP Congress Hybrid, Lisbon, Portugal, October 2 - 5, 2021 (online); 32st ECNP Congress, Copenhagen, Denmark, 7 - 10 September 2019.

List of articles published in journals indexed by WoS and/or Scopus:

1. **Katolikova N.V.**, Khudiakov A.A., Shafranskaya D.D., Prjibelski A.D., Masharskiy A.E., Mor M.S., Golovkin A.S., Zaytseva A.K., Neganova I.E., Efimova E.V., Gainetdinov R.R., Malashicheva A.B. Modulation of Notch Signaling at Early Stages of Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Dopaminergic Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(2):1429. <https://doi.org/10.3390/ijms24021429>

2. **Katolikova N.V.**, Vaganova A.N., Efimova E.V., Gainetdinov R.R. Expression of Trace Amine-Associated Receptors in the Murine and Human Hippocampus Based on Public Transcriptomic Data. *Cells* 2022, 11, 1813. <https://doi.org/10.3390/cells11111813>

3. Efimova E.V., Kuvarzin S.R., Mor M.S., **Katolikova N.V.**, Shemiakova T.S., Razenkova V., Ptukha M., Kozlova A.A., Murtazina R.Z., Smirnova D., Veshchitskii A.A., Merkulyeva N.S., Volnova A.B., Musienko P.E., Korzhevskii D.E., Budygin E.A. and Gainetdinov R.R. (2022) Trace Amine-Associated Receptor 2 Is Expressed in the Limbic Brain Areas and Is Involved in Dopamine Regulation and Adult Neurogenesis, *Front. Behav. Neurosci.*, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.847410>

4. Efimova E.V., **Katolikova N.V.**, Kanov E.V. & Gainetdinov R.R. (2022). Trace amine-associated receptors at the cross-road between innate olfaction of amines, emotions, and adult neurogenesis. *Neural regeneration research*, 17(6), 1257–1258. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.327338>

5. Vaganova A.N., Murtazina R.Z., Shemyakova T.S., Prjibelski A.D., **Katolikova N.V.**, Gainetdinov RR. Pattern of TAAR5 Expression in the Human Brain Based on Transcriptome Datasets

Analysis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8802. Published 2021 Aug 16. doi:10.3390/ijms22168802 DOI: 10.3390/ijms22168802 https://doi.org/10.1007/978-3-030-57401-7_51

6. Efimova E.V., Kozlova A.A., Razenkova V., **Katolikova N.V.**, Antonova K.A., Sotnikova T.D., Merkul'yeva N.S., Veshchitskii A.S., Kalinina D.S., Korzhevskii D.E., Musienko P.E., Kanov E.V., Gainetdinov R.R. Increased dopamine transmission and adult neurogenesis in trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) knockout mice. *Neuropharmacology.* 2020 Oct 24;182:108373. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108373. Epub ahead of print. PMID: 33132188.

Overview published in a journal indexed by WoS and/or Scopus:

7. **Katolikova, N.V.**, Malashicheva, A.B. & Gainetdinov, R.R. Cell Replacement Therapy in Parkinson's Disease—History of Development and Prospects for Use in Clinical Practice. *Mol Biol* 54, 827–839 (2020). <https://doi.org/10.1134/S0026893320060060>

Book's chapter:

8. **Katolikova N.**, Gainetdinov R.R. (2021) Dopamine System. In: Offermanns S., Rosenthal W. (eds) *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57401-7_51

List of abstracts in the proceedings of international conferences:

9. **Католикова Н. В.**, Шафранская Д. Д., Пржибельский А. Д., Гайнетдинов Р.Р., Малашичева А.Б. Оценка эффектов ингибирования сигнального каскада Notch на дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в предшественники дофаминергических нейронов. *Гены и Клетки.* **2022.** Т. 17. № 3. - С. 104. – EDN GXYESO.

10. **Katolikova N. V.**, Shafranskaya D. D., Prjibelski A. D., Efimova E. V., Malashicheva A. B., Gainetdinov R. R. The inhibition and activation of Notch signaling upon differentiation of human induced pluripotent stem cells to dopaminergic precursors. Nectar meeting, 24 – 26 October **2022**, Athens, Greece

11. **Katolikova N. V.**, Shafranskaya D. D., Prjibelski A. D., Vaganova A. N., Efimova E. V., Gainetdinov R. R. Trace amine-associated receptors in human induced pluripotent stem cells and in their differentiation to dopaminergic neurons. Hydra summer school, 13-20 September **2022**, Hydra, Greece

12. Katolikova N. V., Shafranskaya D. D., Prjibelski A. D., Mor M., Zaytseva A. K., Vaganova A. N., Efimova E. V., Gainetdinov R. R. The role of trace amine receptors in differentiation of human induced pluripotent stem cells to dopaminergic neurons, ISSCR Annual Meeting, 15 – 18 June **2022**, San Francisco + virtual, USA

13. Katolikova N., Efimova E.V., Vaganova A.N., Malashicheva A.B., Gainetdinov R.R., P.0510 The role of trace amine receptors in the differentiation of dopaminergic neurons from human pluripotent stem cells in vitro, 33st ECNP Congress Hybrid 2-5 October **2021**, Lisbon, Portugal

14. Vaganova A.N., Katolikova N.V., Gainetdinov R.R., P.0246 Transcriptomic analysis of trace amine-associated receptors (taars) mRNA expression in the neurons of olfactory bulb of model animals, 33st ECNP Congress Hybrid 2-5 October **2021**, Lisbon, Portugal

15. Efimova, E., Katolikova, N., Kozlova, A., Antonova, K., Murtazina, R., Merkulyeva, N., Gainetdinov, R. (2019). P.123 The role of trace amine associated receptor 5 (TAAR5) in mouse behavior and brain neurochemistry. 32st ECNP Congress 7-10 September **2019**, Copenhagen, Denmark

References

1. Katolikova N.V., Malashicheva A.B., Gainetdinov R.R. Cell Replacement Therapy in Parkinson's Disease—History of Development and Prospects for Use in Clinical Practice//*Molecular Biology*, 2020, T. 54, N 6, C. 827-839.
2. Tomishima M., Kirkeby A. Bringing Advanced Therapies for Parkinson's Disease to the Clinic: The Scientist's Perspective//*Journal of Parkinson's Disease*, 2021, Vol. 11, Bringing Advanced Therapies for Parkinson's Disease to the Clinic, No. s2, P. S135-S140.
3. Barker R.A. Designing stem-cell-based dopamine cell replacement trials for Parkinson's disease//*Nature Medicine*, 2019, T. 25, N 7, C. 1045-1053.
4. Takahashi J., Price-Evans A. Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson's disease: An interview with Jun Takahashi//*Regenerative Medicine*, 2019, T. 14, N 2, C. 93-95.
5. Kim T.W., Piao J., Koo S.Y., Kriks S., Chung S.Y., Betel D., Socci N.D., Choi S.J., Zabierowski S., Dubose B.N., Hill E.J., Mosharov E.V., Irion S., Tomishima M.J., Tabar V., Studer L. Biphasic Activation of WNT Signaling Facilitates the Derivation of Midbrain Dopamine Neurons from hESCs for Translational Use//*Cell Stem Cell*, 2021, Vol. 28, No. 2, P. 343-355.e5.
6. Gainetdinov R.R., Hoener M.C., Berry M.D. Trace Amines and Their Receptors.//*Pharmacological reviews*, 2018, T. 70, N 3, C. 549-620.
7. Berry M.D. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators//*Journal of Neurochemistry*, 2004, Vol. 90, No. 2, P. 257-271.
8. Schwartz M.D., Canales J.J., Zucchi R., Espinoza S., Sukhanov I., Gainetdinov R.R. Trace amine-associated receptor 1: a multimodal therapeutic target for neuropsychiatric diseases//*Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2018, Vol. 22, Trace amine-associated receptor 1, No. 6, P. 513-526.
9. Rutigliano G., Zucchi R. Molecular Variants in Human Trace Amine-Associated Receptors and Their Implications in Mental and Metabolic Disorders//*Cellular and Molecular Neurobiology*, 2020, Vol. 40, No. 2, P. 239-255.
10. Revel F.G., Moreau J.-L., Pouzet B., Mory R., Bradaia A., Buchy D., Metzler V., Chaboz S., Groebke Zbinden K., Galley G., Norcross R.D., Tuerck D., Bruns A., Morairty S.R., Kilduff T.S., Wallace T.L., Risterucci C., Wettstein J.G., Hoener M.C. A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight//*Molecular Psychiatry*, 2013, Vol. 18, A new perspective for schizophrenia, No. 5, P. 543-556.
11. Efimova E.V., Kozlova A.A., Razenkova V., Katolikova N.V., Antonova K.A., Sotnikova T.D., Merkulyeva N.S., Veshchitskii A.S., Kalinina D.S., Korzhevskii D.E., Musienko P.E., Kanov E.V., Gainetdinov R.R. Increased dopamine transmission and adult neurogenesis in trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) knockout mice//*Neuropharmacology*, 2021, T. 182, N September 2020, C. 108373.
12. Efimova E.V., Katolikova N.V., Kanov E.V., Gainetdinov R.R. Trace amine-associated receptors at the cross-road between innate olfaction of amines, emotions, and adult neurogenesis//*Neural Regen Res.*, 2022, Jun;17(6):1257-1258. doi: 10.4103/1673-5374.327338. PMID: 34782562; PMCID: PMC8643037.
13. Efimova E.V., Kuvarzin S.R., Mor M.S., Katolikova N.V., Shemiakova T.S., Razenkova V., Ptukha M., Kozlova A.A., Murtazina R.Z., Smirnova D., Veshchitskii A.A., Merkulyeva N.S., Volnova A.B., Musienko P.E., Korzhevskii D.E., Budygin E.A., Gainetdinov R.R. Trace Amine-Associated Receptor 2 Is Expressed in the Limbic Brain Areas and Is Involved in Dopamine Regulation and Adult Neurogenesis//*Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2022, Vol. 16, P. 847410.

14. Vaganova A.N., Murtazina R.Z., Shemyakova T.S., Prjibelski A.D., Katolikova N.V., Gainetdinov R.R. Pattern of TAAR5 Expression in the Human Brain Based on Transcriptome Datasets Analysis//International Journal of Molecular Sciences, 2021, Vol. 22, No. 16, P. 8802.
15. Chambers S.M., Fasano C.A., Papapetrou E.P., Tomishima M., Sadelain M., Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling//Nature Biotechnology, 2009, T. 27, N 3, C. 275-280.
16. Doi D., Samata B., Katsukawa M., Kikuchi T., Morizane A., Ono Y., Sekiguchi K., Nakagawa M., Parmar M., Takahashi J. Isolation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitors by Cell Sorting for Successful Transplantation//Stem Cell Reports, 2014, Vol. 2, No. 3, P. 337-350.
17. Nolbrant S., Heuer A., Parmar M., Kirkeby A. Generation of high-purity human ventral midbrain dopaminergic progenitors for in vitro maturation and intracerebral transplantation//Nature Protocols, 2017, T. 12, N 9, C. 1962-1979.
18. Son A.I., Mohammad S., Sasaki T., Ishii S., Yamashita S., Hashimoto-Torii K., Torii M. Dual Role of Rbpj in the Maintenance of Neural Progenitor Cells and Neuronal Migration in Cortical Development//Cerebral Cortex, 2020, Vol. 30, No. 12, P. 6444-6457.
19. Stump G., Durrer A., Klein A.-L., Lütolf S., Suter U., Taylor V. Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain//Mechanisms of Development, 2002, Vol. 114, No. 1-2, P. 153-159.
20. Zhang R., Engler A., Taylor V. Notch: an interactive player in neurogenesis and disease//Cell and Tissue Research, 2018, Vol. 371, Notch, No. 1, P. 73-89.
21. Magnusson J.P., Goritz C., Tatarishvili J., Dias D.O., Smith E.M.K., Lindvall O., Kokaia Z., Frisen J. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse//Science, 2014, T. 346, N 6206, C. 237-241.
22. Redmond L., Oh S.-R., Hicks C., Weinmaster G., Ghosh A. Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development//Nature Neuroscience, 2000, Vol. 3, No. 1, P. 30-40.
23. Kang X., Zhang Z.-P., Song C.-G., Liu L., Zhao Y., Du J.-L., Lai Y.-B., Cao X.-L., Ye W.-M., Zhang Y.-F., Zheng M.-H., Zeng Y.-H., Sun X.-L., Wu S.-X., Gao F. γ -secretase inhibitor disturbs the morphological development of differentiating neurons through affecting Notch/miR-342-5p//Neuroscience Letters, 2022, Vol. 778, P. 136603.
24. Bejoy J., Bijonowski B., Marzano M., Jeske R., Ma T., Li Y. Wnt-Notch Signaling Interactions During Neural and Astroglial Patterning of Human Stem Cells//Tissue engineering. Part A, 2020, T. 26, N 7-8, C. 419-431.
25. Qi Y., Zhang X.-J., Renier N., Wu Z., Atkin T., Sun Z., Ozair M.Z., Tchieu J., Zimmer B., Fattahi F., Ganat Y., Azevedo R., Zeltner N., Brivanlou A.H., Karayiorgou M., Gogos J., Tomishima M., Tessier-Lavigne M., Shi S.-H., Studer L. Combined small-molecule inhibition accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells//Nature biotechnology, 2017, T. 35, N 2, C. 154-163.
26. Katolikova N., Gainetdinov R.R. Dopamine System//Encyclopedia of Molecular Pharmacology/ ред. S. Offermanns, W. Rosenthal Citation Key: Katolikova2020. – Cham: Springer International Publishing, 2020. – C. 1-7.
27. Olson L., Seiger A. Brain Tissue Transplanted to the Anterior Chamber of the Eye 1. Fluorescence Histochemistry of Immature Catecholamine and 5-Hydroxy-tryptamine Neurons Reinnervating the Rat Iris*//Z. Zellforsch, 1972, T. 135, C. 175-194.
28. Das G.D., Altman J. Transplanted Precursors of Nerve Cells: Their Fate in the Cerebellums of Young Rats//Science, 1971, Vol. 173, Transplanted Precursors of Nerve Cells, No. 3997, P. 637-638.
29. Gage FH, Björklund A, Stenevi U D.SB. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. VIII. Survival and growth of implants of nigral and septal cell suspensions in intact brains of aged rats//Acta Physiol Scand Suppl., 1983, N 522, C. 67-75.
30. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants : /pyk. Björklund A., Stenevi U., 1979. - 555 c.

31. Brundin P., Isacson O., Björklund A. Monitoring of cell viability in suspensions of embryonic CNS tissue and its use as a criterion for intracerebral graft survival//Brain Research, 1985, T. 331, N 2, C. 251-259.
32. Brundin P., Strecker R.E., Widner H., Clarke D.J., Nilsson O.G., Åstedt B., Lindvall O., Björklund A. Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release//Experimental Brain Research, 1988, T. 70, N 1, C. 192-208.
33. Experimental Brain Research Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease* : /pyk. Brundin P., Nilsson O.G., Strecker R.E., Lindvall O., Åstedt B., Björklund A., 1986. - 235-240 c.
34. Björklund A., Schmidt R.H., Stenevi U. Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra//Cell and Tissue Research, 1980, T. 212, N 1, C. 39-45.
35. Human Fetal Dopamine Neurons Grafted Into the Striatum in Two Patients With Severe Parkinson's Disease A Detailed Account of Methodology and a 6-Month Follow-up : /pyk. Lindvall O., Rehnström S., Brundin P., Björklund A., Widner H., Lindholm T., Björklund A., Leenders K.L., Rothwell J.C., Frackowiak R., David Marsden ; C, Johnels B., Gärnberg ", \ransteg ", Freedman R., Hoffer B.J., Kessinger =a, Bygdeman M., Ström I., \mberg ", Olson L.
36. Urt F Reed C.R., Aul G Reese P.E., Obert B Reeze R.E., -y Ann T Sai W.E., Iliam U M Ouchel W.D., Ichard Ao R.K., Andra Illon S.D., Oward Infield H.W., Haron Ulver S.C., Ohn T Rojanowski J.Q., Avid Idelberg D.E., Tanley Ahn S.F. The New Eng land Jour nal of Medicine TRANSPLANTATION OF EMBRYONIC DOPAMINE NEURONS FOR SEVERE PARKINSON'S DISEASE A BSTRACT Background Transplantation of human embryonic//N Engl J Med, 2001, T. 344, N 10, C. 710-9.
37. Olanow C.W., Goetz C.G., Kordower J.H., Stoessl A.J., Sossi V., Brin M.F., Shannon K.M., Nauert G.M., Perl D.P., Godbold J., Freeman T.B. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease//Annals of Neurology, 2003, T. 54, N 3, C. 403-414.
38. Lindvall O., Björklund A. Cell therapy in Parkinson's disease//NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2004, T. 1, N 4, C. 382-93.
39. Kefalopoulou Z., Politis M., Piccini P., Mencacci N., Bhatia K., Jahanshahi M., Widner H., Rehnström S., Brundin P., Björklund A., Lindvall O., Limousin P., Quinn N., Foltynie T. Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports//JAMA neurology, 2014, T. 71, N 1, C. 83-7.
40. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts//Science, 1998, T. 282, N 5391, C. 1145-1147.
41. Thomson J.A., Odorico J.S. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines//Trends in Biotechnology, 2000, Vol. 18, No. 2, P. 53-57.
42. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors//Cell, 2006, T. 126, N 4, C. 663-676.
43. G Bain , D Kitchens, M Yao, J E Huettner D.I.G. Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties in Vitro//Dev Biol, 1995, T. 168 (2), C. 342-57.
44. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro : /pyk. Okabe S., Forsberg-Nilsson K., Spiro A.C., Segal M., McKay R.D.G., 1996. - 89-102 c.
45. Reubinoff B.E., Itsykson P., Turetsky T., Pera M.F., Reinhartz E., Itzik A., Ben-Hur T. Neural progenitors from human embryonic stem cells//Nature Biotechnology, 2001, T. 19, N 12, C. 1134-1140.
46. Zhang S.C., Wernig M., Duncan I.D., Brüstle O., Thomson J.A. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells//Nature Biotechnology, 2001, T. 19, N 12, C. 1129-1133.

47. Qi-Long Ying, Austin G Smith Defined Conditions for Neural Commitment and Differentiation//Methods Enzymol, 2003, T. 365, C. 327-41.
48. Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers.//Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 2000, T. 6, N 2, C. 88-95.
49. Hemmati-Brivanlou A., Kelly O.G., Melton D.A. Follistatin, an Antagonist of Activin, Is Expressed in the Spemann Organizer and Displays Direct Neuralizing Activity//Cell, 1994, T. 77, C. 283-295.
50. Sasai Y., Lu B., Steinbeisser H., Geissert D., Gont L.K., De Robertis E.M. Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes.//Cell, 1994, T. 79, N 5, C. 779-90.
51. Smith W.C., Harland R.M. Expression Cloning of noggin, a New Dorsalizing Factor Localized to the Spemann Organizer in Xenopus Embryos//Cell, 1992, T. 70 (5), C. 829-840.
52. Smith J.R., Vallier L., Lupo G., Alexander M., Harris W.A., Pedersen R.A. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm//Developmental Biology, 2008, T. 313, N 1, C. 107-117.
53. Ruiz i Altaba A., Nguyễn V., Palma V. The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code//Current Opinion in Genetics & Development, 2003, Vol. 13, The emergent design of the neural tube, No. 5, P. 513-521.
54. Ribes V., Briscoe J. Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning: The Role of Negative Feedback//Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2009, Vol. 1, Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning, No. 2, P. a002014-a002014.
55. Murdoch J.N., Copp A.J. The relationship between Sonic hedgehog signalling, cilia and neural tube defects, 2013, P. 36.
56. Mizuseki K., Sakamoto T., Watanabe K., Muguruma K., Ikeya M., Nishiyama A., Arakawa A., Suemori H., Nakatsuji N., Kawasaki H., Murakami F., Sasai Y. Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, Vol. 100, No. 10, P. 5828-5833.
57. Briscoe J., Ericson J. The specification of neuronal identity by graded sonic hedgehog signalling//Seminars in Cell & Developmental Biology, 1999, Vol. 10, No. 3, P. 353-362.
58. MacDonald B.T., Tamai K., He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases//Developmental Cell, 2009, Vol. 17, Wnt/ β -Catenin Signaling, No. 1, P. 9-26.
59. Yan W., Wu F., Morser J., Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 15, P. 8525-8529.
60. Ono Y., Nakatani T., Sakamoto Y., Mizuhara E., Minaki Y., Kumai M., Hamaguchi A., Nishimura M., Inoue Y., Hayashi H., Takahashi J., Imai T. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells//Development, 2007, Vol. 134, Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location, No. 17, P. 3213-3225.
61. Kirkeby A., Nolbrant S., Tiklova K., Heuer A., Kee N., Cardoso T., Ottosson D.R., Lelos M.J., Rifes P., Dunnett S.B., Grealish S., Perlmann T., Parmar M. Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease.//Cell stem cell, 2017, T. 20, N 1, C. 135-148.
62. Takahashi J. Preclinical evaluation of patient-derived cells shows promise for Parkinson's disease//Journal of Clinical Investigation, 2020.
63. Piao J., Zabierowski S., Dubose B.N., Hill E.J., Navare M., Claros N., Rosen S., Ramnarine K., Horn C., Fredrickson C., Wong K., Safford B., Kriks S., El Maarouf A., Rutishauser U., Henchcliffe C., Wang Y., Riviere I., Mann S., Bermudez V., Irion S., Studer L., Tomishima M.,

- Tabar V. Preclinical Efficacy and Safety of a Human Embryonic Stem Cell-Derived Midbrain Dopamine Progenitor Product, MSK-DA01//Cell Stem Cell, 2021, Vol. 28, No. 2, P. 217-229.e7.
64. Borowsky B., Adham N., Jones K.A., Raddatz R., Artymyshyn R., Ogozalek K.L., Durkin M.M., Lakhani P.P., Bonini J.A., Pathirana S., Boyle N., Pu X., Kouranova E., Lichtblau H., Ochoa F.Y., Branchek T.A., Gerald C. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, Vol. 98, Trace amines, No. 16, P. 8966-8971.
 65. Bunzow J.R., Sonders M.S., Arttamangkul S., Harrison L.M., Zhang G., Quigley D.I., Darland T., Suchland K.L., Pasumamula S., Kennedy J.L., Olson S.B., Magenis R.E., Amara S.G., Grandy D.K. Amphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, Lysergic Acid Diethylamide, and Metabolites of the Catecholamine Neurotransmitters Are Agonists of a Rat Trace Amine Receptor//Molecular Pharmacology, 2001, Vol. 60, No. 6, P. 1181-1188.
 66. Berry M.D., Shitut M.R., Almousa A., Alcorn J., Tomberli B. Membrane permeability of trace amines: Evidence for a regulated, activity-dependent, nonexocytotic, synaptic release: Trace Amine Membrane Permeability//Synapse, 2013, Vol. 67, Membrane permeability of trace amines, No. 10, P. 656-667.
 67. Starratt A.N., Bodnaryk R.P. Stereoisomeric identity of octopamine in the central nervous system of invertebrates//Insect Biochemistry, 1981, Vol. 11, No. 6, P. 645-648.
 68. Grandy D.K. Trace amine-associated receptor 1—Family archetype or iconoclast?//Pharmacology & Therapeutics, 2007, Vol. 116, No. 3, P. 355-390.
 69. Lindemann L., Meyer C.A., Jeanneau K., Bradaia A., Ozmen L., Bluethmann H., Bettler B., Wettstein J.G., Borroni E., Moreau J.-L., Hoener M.C. Trace Amine-Associated Receptor 1 Modulates Dopaminergic Activity//Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2008, Vol. 324, No. 3, P. 948-956.
 70. Espinoza S., Ghisi V., Emanuele M., Leo D., Sukhanov I., Sotnikova T.D., Chiergatti E., Gainetdinov R.R. Postsynaptic D2 dopamine receptor supersensitivity in the striatum of mice lacking TAAR1//Neuropharmacology, 2015, Vol. 93, P. 308-313.
 71. Bradaia A., Trube G., Stalder H., Norcross R.D., Ozmen L., Wettstein J.G., Pinard A., Buchy D., Gassmann M., Hoener M.C., Bettler B. The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, Vol. 106, No. 47, P. 20081-20086.
 72. Revel F.G., Moreau J.-L., Gainetdinov R.R., Bradaia A., Sotnikova T.D., Mory R., Durkin S., Zbinden K.G., Norcross R., Meyer C.A., Metzler V., Chaboz S., Ozmen L., Trube G., Pouzet B., Bettler B., Caron M.G., Wettstein J.G., Hoener M.C. TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, Vol. 108, No. 20, P. 8485-8490.
 73. Leo D., Targa G., Espinoza S., Villers A., Gainetdinov R.R., Ris L. Trace Amine Associate Receptor 1 (TAAR1) as a New Target for the Treatment of Cognitive Dysfunction in Alzheimer's Disease//International Journal of Molecular Sciences, 2022, Vol. 23, No. 14, P. 7811.
 74. Wu R., Liu J., Li J.-X. Trace amine-associated receptor 1 and drug abuse//Advances in Pharmacology. Elsevier, 2022. Vol. 93. P. 373-401.
 75. Dedic N., Dworak H., Zeni C., Rutigliano G., Howes O.D. Therapeutic Potential of TAAR1 Agonists in Schizophrenia: Evidence from Preclinical Models and Clinical Studies//International Journal of Molecular Sciences, 2021, Vol. 22, Therapeutic Potential of TAAR1 Agonists in Schizophrenia, No. 24, P. 13185.
 76. Sotnikova T.D., Zorina O.I., Ghisi V., Caron M.G., Gainetdinov R.R. Trace amine associated receptor 1 and movement control//Parkinsonism & Related Disorders, 2008, Vol. 14, P. S99-S102.

77. Sotnikova T.D., Caron M.G., Gainetdinov R.R. Trace Amine-Associated Receptors as Emerging Therapeutic Targets//*Molecular Pharmacology*, 2009, Vol. 76, No. 2, P. 229-235.
78. Leo D., Mus L., Espinoza S., Hoener M.C., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R. Taar1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission: Role of D2 dopamine autoreceptors//*Neuropharmacology*, 2014, Vol. 81, Taar1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission, P. 283-291.
79. Sukhanov I., Espinoza S., Yakovlev D.S., Hoener M.C., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R. TAAR1-dependent effects of apomorphine in mice//*The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2014, Vol. 17, No. 10, P. 1683-1693.
80. Achat-Mendes C., Lynch L.J., Sullivan K.A., Vallender E.J., Miller G.M. Augmentation of methamphetamine-induced behaviors in transgenic mice lacking the trace amine-associated receptor 1//*Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2012, Vol. 101, No. 2, P. 201-207.
81. Wolinsky T.D., Swanson C.J., Smith K.E., Zhong H., Borowsky B., Seeman P., Branchek T., Gerald C.P. The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: an animal model with relevance to schizophrenia//*Genes, Brain and Behavior*, 2007, Vol. 6, No. 7, P. 628-639.
82. Beaulieu J.-M., Sotnikova T.D., Marion S., Lefkowitz R.J., Gainetdinov R.R., Caron M.G. An Akt/ β -Arrestin 2/PP2A Signaling Complex Mediates Dopaminergic Neurotransmission and Behavior//*Cell*, 2005, Vol. 122, No. 2, P. 261-273.
83. Lindemann L., Hoener M.C. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family//*Trends in Pharmacological Sciences*, 2005, Vol. 26, No. 5, P. 274-281.
84. Sklar P., Smoller J.W., Fan J., Ferreira M.A.R., Perlis R.H., Chambert K., Nimgaonkar V.L., McQueen M.B., Faraone S.V., Kirby A., de Bakker P.I.W., Ogdie M.N., Thase M.E., Sachs G.S., Todd-Brown K., Gabriel S.B., Sougnez C., Gates C., Blumenstiel B., Defelice M., Ardlie K.G., Franklin J., Muir W.J., McGhee K.A., MacIntyre D.J., McLean A., VanBeck M., McQuillin A., Bass N.J., Robinson M., Lawrence J., Anjorin A., Curtis D., Scolnick E.M., Daly M.J., Blackwood D.H., Gurling H.M., Purcell S.M. Whole-genome association study of bipolar disorder//*Molecular Psychiatry*, 2008, Vol. 13, No. 6, P. 558-569.
85. Cichero E., Espinoza S., Franchini S., Guariento S., Brasili L., Gainetdinov R.R., Fossa P. Further Insights Into the Pharmacology of the Human Trace Amine-Associated Receptors: Discovery of Novel Ligands for TAAR1 by a Virtual Screening Approach//*Chemical Biology & Drug Design*, 2014, Vol. 84, Further Insights Into the Pharmacology of the Human Trace Amine-Associated Receptors, No. 6, P. 712-720.
86. Pei Y., Asif-Malik A., Canales J.J. Trace Amines and the Trace Amine-Associated Receptor 1: Pharmacology, Neurochemistry, and Clinical Implications//*Frontiers in Neuroscience*, 2016, Vol. 10, Trace Amines and the Trace Amine-Associated Receptor 1.
87. Raony Í., Domith I., Lourenco M.V., Paes-de-Carvalho R., Pandolfo P. Trace amine-associated receptor 1 modulates motor hyperactivity, cognition, and anxiety-like behavior in an animal model of ADHD//*Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2022, Vol. 117, P. 110555.
88. D'Andrea G., Pizzolato G., Gucciardi A., Stocchero M., Giordano G., Baraldi E., Leon A. Different Circulating Trace Amine Profiles in De Novo and Treated Parkinson's Disease Patients//*Scientific Reports*, 2019, Vol. 9, No. 1, P. 6151.
89. Thorn D.A., Jing L., Qiu Y., Gancarz-Kausch A.M., Galuska C.M., Dietz D.M., Zhang Y., Li J.-X. Effects of the Trace Amine-Associated Receptor 1 Agonist RO5263397 on Abuse-Related Effects of Cocaine in Rats//*Neuropsychopharmacology*, 2014, Vol. 39, No. 10, P. 2309-2316.
90. Revel F.G., Meyer C.A., Bradaia A., Jeanneau K., Calcagno E., André C.B., Haenggi M., Miss M.-T., Galley G., Norcross R.D., Invernizzi R.W., Wettstein J.G., Moreau J.-L., Hoener M.C. Brain-Specific Overexpression of Trace Amine-Associated Receptor 1 Alters Monoaminergic Neurotransmission and Decreases Sensitivity to Amphetamine//*Neuropsychopharmacology*, 2012, Vol. 37, No. 12, P. 2580-2592.
91. Dodd S., F. Carvalho A., Puri B.K., Maes M., Bortolasci C.C., Morris G., Berk M. Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1): A new drug target for psychiatry?//*Neuroscience &*

- Biobehavioral Reviews, 2021, Vol. 120, Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1), P. 537-541.
92. Koblan K.S., Kent J., Hopkins S.C., Krystal J.H., Cheng H., Goldman R., Loebel A. A Non-D2-Receptor-Binding Drug for the Treatment of Schizophrenia//New England Journal of Medicine, 2020, Vol. 382, No. 16, P. 1497-1506.
 93. Zhou B., Lin W., Long Y., Yang Y., Zhang H., Wu K., Chu Q. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics//Signal Transduction and Targeted Therapy, 2022, Vol. 7, Notch signaling pathway, No. 1, P. 95.
 94. Grandbarbe L., Bouissac J., Rand M., Hrabé de Angelis M., Artavanis-Tsakonas S., Mohier E. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process//Development, 2003, T. 130, N 7, C. 1391-1402.
 95. Hashimoto-Torii K., Torii M., Sarkisian M.R., Bartley C.M., Shen J., Radtke F., Gridley T., Šestan N., Rakic P. Interaction between Reelin and Notch Signaling Regulates Neuronal Migration in the Cerebral Cortex//Neuron, 2008, Vol. 60, No. 2, P. 273-284.
 96. Hasel P., Dando O., Jiwaji Z., Baxter P., Todd A.C., Heron S., Márkus N.M., McQueen J., Hampton D.W., Torvell M., Tiwari S.S., McKay S., Eraso-Pichot A., Zorzano A., Masgrau R., Galea E., Chandran S., Wyllie D.J.A., Simpson T.I., Hardingham G.E. Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism//Nature Communications, 2017, T. 8.
 97. Borghese L., Dolezalova D., Opitz T., Haupt S., Leinhaas A., Steinfarz B., Koch P., Edenhofer F., Hampl A., Brüstle O. Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo//Stem Cells, 2010, T. 28, N 5, C. 955-964.
 98. Tieng V., Stoppini L., Villy S., Fathi M., Michel, Dubois-Dauphin, Krause K. Engineering of midbrain organoids containing long-lived dopaminergic neurons Vannary Tieng , Luc Stoppini , Sabrina Villy , Marc Fathi , Michel Dubois-Dauphin Heinz Krause, 2014, C. 1-32.
 99. Espinoza S., Sukhanov I., Efimova E.V., Kozlova A., Antonova K.A., Illiano P., Leo D., Merkulyeva N., Kalinina D., Musienko P., Rocchi A., Mus L., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R. Trace Amine-Associated Receptor 5 Provides Olfactory Input Into Limbic Brain Areas and Modulates Emotional Behaviors and Serotonin Transmission//Frontiers in Molecular Neuroscience, 2020, T. 13.
 100. Neganova I., Chichagova V., Armstrong L., Lako M. A critical role for p38MAPK signalling pathway during reprogramming of human fibroblasts to iPSCs//Scientific Reports, 2017, Vol. 7, No. 1, P. 41693.
 101. Chichagova V., Sanchez-Vera I., Armstrong L., Steel D., Lako M. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using RNA-Based Sendai Virus System and Pluripotency Validation of the Resulting Cell Population//Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models : Methods in Molecular Biology/ eds. A. Nagy, K. Turksen. – New York, NY: Springer New York, 2015. – Vol. 1353. – P. 285-307.
 102. Kostina A.S., Uspensky V.E., Irtyuga O.B., Ignatieva E.V., Freylikhman O., Gavriliuk N.D., Moiseeva O.M., Zhuk S., Tomilin A., Kostareva A.A., Malashicheva A.B. Notch-dependent EMT is attenuated in patients with aortic aneurysm and bicuspid aortic valve//Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2016, Vol. 1862, No. 4, P. 733-740.
 103. Malashicheva A., Kanzler B., Tolkunova E., Trono D., Tomilin A. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations//genesis, 2007, Vol. 45, No. 7, P. 456-459.
 104. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads, 2011, Vol. v. 17, n. 1, P. 10-12.
 105. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, P. 7.
 106. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, P. 8.
 107. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-

- seq data with DESeq2, 2014, P. 21.
108. Hervé Pagès M.C. AnnotationDbi. - Bioconductor, 2017.
 109. Clarke D.J.B., Jeon M., Stein D.J., Moiseyev N., Kropiwnicki E., Dai C., Xie Z., Wojciechowicz M.L., Litz S., Hom J., Evangelista J.E., Goldman L., Zhang S., Yoon C., Ahamed T., Bhuiyan S., Cheng M., Karam J., Jagodnik K.M., Shu I., Lachmann A., Ayling S., Jenkins S.L., Ma'ayan A. Appyters: Turning Jupyter Notebooks into data-driven web apps//Patterns, 2021, Vol. 2, Appyters, No. 3, P. 100213.
 110. Katolikova N.V., Khudiakov A.A., Shafranskaya D.D., Prjibelski A.D., Masharskiy A.E., Mor M.S., Golovkin A.S., Zaytseva A.K., Neganova I.E., Efimova E.V., Gainetdinov R.R., Malashicheva A.B. Modulation of Notch Signaling at Early Stages of Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Dopaminergic Neurons//International Journal of Molecular Sciences, 2023, Vol. 24, No. 2, P. 1429.
 111. Fontes M.M., Guvenek A., Kawaguchi R., Zheng D., Huang A., Ho V.M., Chen P.B., Liu X., O'Dell T.J., Coppola G., Tian B., Martin K.C. Activity-Dependent Regulation of Alternative Cleavage and Polyadenylation During Hippocampal Long-Term Potentiation//Scientific Reports, 2017, Vol. 7, No. 1, P. 17377.
 112. Haghani A., Johnson R.G., Woodward N.C., Feinberg J.I., Lewis K., Ladd-Acosta C., Safi N., Jaffe A.E., Sioutas C., Allayee H., Campbell D.B., Volk H.E., Finch C.E., Morgan T.E. Adult mouse hippocampal transcriptome changes associated with long-term behavioral and metabolic effects of gestational air pollution toxicity//Translational Psychiatry, 2020, Vol. 10, No. 1, P. 218.
 113. Lopes P.C., König B. Wild mice with different social network sizes vary in brain gene expression//BMC Genomics, 2020, Vol. 21, No. 1, P. 506.
 114. Gaine M.E., Bahl E., Chatterjee S., Michaelson J.J., Abel T., Lyons L.C. Altered hippocampal transcriptome dynamics following sleep deprivation//Molecular Brain, 2021, Vol. 14, No. 1, P. 125.
 115. Habib N., Li Y., Heidenreich M., Swiech L., Avraham-Davidi I., Trombetta J.J., Hession C., Zhang F., Regev A. Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons//Science, 2016, Vol. 353, Div-Seq, No. 6302, P. 925-928.
 116. Katolikova N.V., Vaganova A.N., Efimova E.V., Gainetdinov R.R. Expression of Trace Amine-Associated Receptors in the Murine and Human Hippocampus Based on Public Transcriptomic Data//Cells, 2022, Vol. 11, No. 11, P. 1813.
 117. Jerber J., Seaton D.D., Cuomo A.S.E., Kumasaka N., Haldane J., Steer J., Patel M., Pearce D., Andersson M., Bonder M.J., Mountjoy E., Ghousaini M., Lancaster M.A., Marioni J.C., Merkle F.T., Gaffney D.J., Stegle O. Population-scale single-cell RNA-seq profiling across dopaminergic neuron differentiation//Nature Genetics, 2021, T. 53, N 3, C. 304-312.
 118. Kriks S., Shim J.W., Piao J., Ganat Y.M., Wakeman D.R., Xie Z., Carrillo-Reid L., Auyeung G., Antonacci C., Buch A., Yang L., Beal M.F., Surmeier D.J., Kordower J.H., Tabar V., Studer L. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease//Nature, 2011, T. 480, N 7378, C. 547-551.
 119. Tiklová K., Nolbrant S., Fiorenzano A., Björklund Å.K., Sharma Y., Heuer A., Gillberg L., Hoban D.B., Cardoso T., Adler A.F., Birtele M., Lundén-Miguel H., Volakakis N., Kirkeby A., Perlmann T., Parmar M. Single cell transcriptomics identifies stem cell-derived graft composition in a model of Parkinson's disease//Nature Communications, 2020, Vol. 11, No. 1, P. 2434.
 120. Kim J., Lengner C.J., Kirak O., Hanna J., Cassady J.P., Lodato M.A., Wu S.U., Faddah D.A., Steine E.J., Qing G.A.O., Fu D., Dawlaty M., Jaenisch R. Reprogramming of postnatal neurons into induced pluripotent stem cells by defined factors//Stem Cells, 2011.
 121. Khandekar A., Springer S., Wang W., Hicks S., Weinheimer C., Diaz-Trelles R., Nerbonne J.M., Rentschler S. Notch-Mediated Epigenetic Regulation of Voltage-Gated Potassium Currents//Circulation Research, 2016, Vol. 119, No. 12, P. 1324-1338.
 122. Borghetti G., Eisenberg C.A., Signore S., Sorrentino A., Kaur K., Andrade-Vicenty A., Edwards

- J.G., Nerkar M., Qanud K., Sun D., Goichberg P., Leri A., Anversa P., Eisenberg L.M., Jacobson J.T., Hintze T.H., Rota M. Notch signaling modulates the electrical behavior of cardiomyocytes//American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2018, Vol. 314, No. 1, P. H68-H81.
123. Song S., Babicheva A., Zhao T., Ayon R.J., Rodriguez M., Rahimi S., Balistrieri F., Harrington A., Shyy J.Y.-J., Thistlethwaite P.A., Makino A., Yuan J.X.-J. Notch enhances Ca²⁺ entry by activating calcium-sensing receptors and inhibiting voltage-gated K⁺ channels//American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2020, Vol. 318, No. 5, P. C954-C968.
124. Bray S.J. Notch signalling in context//Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2016, Vol. 17, No. 11, P. 722-735.
125. Tieng V., Stoppini L., Villy S., Fathi M., Dubois-Dauphin M., Krause K.-H. Engineering of Midbrain Organoids Containing Long-Lived Dopaminergic Neurons//Stem Cells and Development, 2014, Vol. 23, No. 13, P. 1535-1547.

Abbreviations

5-HIAA - 5-indolousus acid
5HT - Serotonin
6-OHDA - 6-hydroxydopamine
ANP - Atrial natriuretic peptide
AP - Action potential
BDNF - Brain-derived neurotrophic factor
BMP - Bone Morphogenetic Protein
cAMP - Cyclic AMP
COMT - Catechol-O-methyltransferase
DA - Dopamine
DAB - Diaminobenzidine
DAPT - N-[N-(3,5 -difluorophenacetyl)-l-alanyl]-s-phenylglycinebutyl ester
dbc AMP - Dibutyryl cyclic adenosine monophosphate
DBS - Deep brain stimulation
DOPAC - 3,4-dioxyphenylacetic acid
EBiSC - European Bank for Induced pluripotent Stem Cells
ESCs - Embryonic pluripotent stem cells
FACS - Fluorescence activated cell sorting
FACS - Fluorescence activated cell sorting
FGF8 - Fibroblast Growth Factor 8
fVM graft - Fetal ventral mesencephalon graft
GABA - Gamma-aminobutyric acid
GABRP - Gamma-aminobutyric acid type A receptor
GDNF - Glial cell line-derived neurotrophic factor
GEO - Gene Expression Omnibus
GPCRs - G protein-coupled receptors
hiPSCs - Human induced pluripotent stem cells
HPLC - High performance liquid chromatography
HVA- Homovanillic acid
IPSCs - Induced pluripotent stem cells
L-DOPA - Levodopa
MAO - Monoamine oxidase

MAP2- Microtubule-associated protein 2
NA - norepinephrine
NCBI - National Center of Biotechnology Information
NECD - Notch extracellular domain
NGS - Next-generation sequencing sequencing
NHS - normal horse serum
NICD - Notch intracellular domain
NICD - Notch intracellular domain
NIH - National Institute of Health
PBS - phosphate-buffered saline
PD - Parkinson's disease
PEA – β -phenylethylamine
PET - positron emission tomography
PKA - protein kinase A
PKC - protein kinase C
pro ANP - pro-atrial natriuretic peptide
SHH - Sonic Hedgehog
SOPs - standard operating procedures
TA - Trace amines
TAARs - Trace amine-associated receptors
TGF-beta type 1 receptor (TGFBFR1)
TGF- β - Transforming Growth Tactor β
TH - Tyrosine hydroxylase
TM - Notch transmembrane domain
TPM - Transcripts Per Million
Tuj - Tubuline III
WTSI - Wellcome Trust Sanger Institute

Appendixes

Appendix A.

List of genes from clusters 1, 2, 3.

Number of the cluster	List of genes
1	<p>A2ML1, AADACL3, ABCB1, ABCC2, ABCD1, ABCF1, ABCF2, ABCG1, ABHD12B, ABHD17C, ABLIM2, ABRACL, ABT1, ACAD8, ACAP1, ACAT2, ACBD6//LHX4-AS1, ACE, ACOT9, ACPP, ACSL1, ACSL6, ACSM6, ACTB, ACTC1, ACTL6A, ACTL6B, ACTR5, ACTR8, ACTRT3, ACVR1C, ADAM20P1, ADAM28, ADAM8, ADAMTS16, ADAMTS19, ADAMTS5, ADAMTS8, ADAP1, ADARB2, ADCY1, ADCY2, ADCY5, ADGRE2, ADGRG2, ADIPOR1, ADM2, ADNP2, AEBP2, AEN, AFP, AGMAT, AGO1, AGO2, AHR, AHS1, AHSG, AIF1, AIFM2, AIMP2, AIPL1, AK5, AK6, AKAP1, AKR1C3, ALDH18A1, ALDH1A1, ALDH1L1, ALG1L2, ALG3, ALG6, ALKAL2, ALKBH2, ALS2CL, ALYREF, AMD1, AMER1, ANAPC1, ANAPC5, ANK1, ANK3, ANKEF1, ANKH, ANKLE1, ANKRD27, ANKRD29, ANKRD34B, ANKS6, ANO4, ANO9, ANOS1, ANP32E, ANXA11, ANXA3, AOX1, AP1M2, AP1S3, APBB2, APELA, APH1B, APIP, APPL1, AQP3, AQP4-AS1, AQP5, ARFGEF1, ARHGAP1, ARHGAP12, ARHGAP22, ARHGAP23, ARHGAP31, ARHGAP8, ARHGEF16, ARHGEF5, ARID5A, ARIH2, ARL11, ARMC6, ARMT1, ARPC5, ARPC5L, ARRB1, ASB12, ASB6, ASF1B, ASH2L, ATAD3A, ATAD3B, ATF1, ATG2B, ATG3, ATG5, ATL3, ATP1A3, ATP23, ATP6V0A2, ATP6V1E2, ATP8A1, ATP8B1, ATR, AUH, AUNIP, AUP1, B3GAT1, B3GAT2, B3GNT2, B3GNT3, B3GNT4, B3GNT7, BAMBI, BANK1, BARD1, BATF3, BBC3, BCAR1, BCL11A, BCL11B, BCL2L10, BDH1, BEND3, BEST2, BFAR, BHLHA15, BHMT, BICD1, BICDL2, BID, BIK, BLVRA, BMP1A, BMS1, BNC2, BNIPL, BOLA3, BOP1, BRAP, BRD9, BRI3BP, BRINP1, BRMS1, BSPRY, BTBD11, BUB1B, BUD23, BUD31, BYSL, C10orf82, C11orf24, C12orf43, C12orf56, C12orf66, C12orf75, C14orf119, C15orf39, C16orf54, C16orf74, C16orf91, C17orf53, C17orf58, C17orf75, C18orf21, C19orf73, C1orf112, C1orf116, C1orf127, C1orf210, C1orf216, C1orf226, C1orf61, C1orf94, C1QBP, C1QL3, C1QTNF2, C2CD2, C2orf50, C2orf80, C3orf52, C4orf19, C4orf51, C5orf47, C6orf136, C6orf223, C7orf43, C7orf57, C9orf116, C9orf135, C9orf78, CA12, CA2, CA5BP1, CA7, CABYR, CACNA2D1, CACNA2D3, CACYBP, CALCR, CALN1, CAMK2N2, CAMK4, CAMKV, CAPG, CAPN13, CAPNS1, CARD10, CARD11, CARMIL1, CARMIL3, CARS, CASP3, CASZ1, CBLN1, CBR1, CBS//CBSL, CBX7, CCDC137, CCDC17, CCDC172, CCDC186, CCDC28A, CCDC43, CCDC63, CCDC71, CCDC86, CCKBR, CCL26, CCL28, CCNA2, CCNB1, CCNC, CCNE1, CCNF, CCN2, CCNQ, CCNYL1, CCT2, CCT5, CCT6A, CD177, CD19, CD1D, CD200, CD247, CD2AP, CD34, CD3EAP, CD8B, CDC123, CDC16, CDC25A, CDC26, CDC37L1, CDC40, CDC45, CDC6, CDCA4, CDCA5, CDCA7L, CDCP1, CDH26, CDH1, CDHR3, CDK14, CDK15, CDK2AP1, CDK5, CDK7, CDK9, CDR2L, CDS1, CEACAM1, CEBPA, CEBPB, CEBPZ, CEBPZOS, CENPM, CENPP, CENPU, CENPW, CEP72, CER1, CGB2, CGN, CGNL1, CHAC1, CHAC2, CHAF1A, CHAF1B, CHCHD3, CHCHD4, CHCHD7, CHDH, CHEK2, CHGA, CHKA,</p>

Continuation of appendix A

<p> CHML, CHMP1B, CHMP4C, CHN1, CHODL, CHP2, CHRAC1, CHRN2, CHRN4, CHST2, CHST4, CHST8, CHST9, CHSY1, CKMT1A, CKMT1B, CKMT2, CLCA4-AS1, CLDN1, CLDN10, CLDN6, CLDN7, CLDN9, CLINT1, CLN6, CLPTM1L, CLTA, CMAS, CMSS1, CMYA5, CNDP2, CNGA1, CNIH4, CNMD, CNN1, CNN2, CNOT11, CNST, CNTLN, CNTN1, COA3, COA4, COA6, COA7, COBL, COCH, COG2, COL28A1, COL8A2, COMMD10, COMMD4, COMMD5, COMMD7, COMTD1, COPS3, COPS5, COQ3, COQ9, CORO2A, COX16, COX17, COX6B1, CP, CPLX1, CPNE7, CPO, CPPED1, CPT1A, CR1L, CR2, CRB3, CREB3L4, CREG2, CRIP3, CRIPT, CRLF3, CRNKL1, CRTC2, CRYAB, CRYBB3, CRYBG1, CRYGD, CRYGN, CRYM, CRYZL2P, CSE1L, CSTB, CSTF2, CTBP2, CTH, CTR9, CTSC, CTU2, CUL4A, CUX2, CWF19L1, CXCL3, CXCR2, CXorf56, CYB561, CYB5A, CYCS, CYP27B1, CYP2A13, CYP2F1, CYP2J2, CYP2S1, CYP4X1, DAB1, DACT2, DAPK1, DARS2, DAXX, DCAF13, DCAF4, DCLK1, DCP2, DCTPP1, DCUN1D5, DDAH1, DDIAS, DDIT4L, DDR2, DDX11, DDX25, DDX28, DDX39A, DDX3X, DDX46, DDX51, DDX55, DEC1, DENND1C, DENND2C, DEPDC1, DEPDC1B, DEPDC7, DERL3, DESI2, DEXI, DFFB, DGKE, DGKZ, DHCR24, DHDDS, DHRS3, DHX15, DHX33, DHX34, DHX9, DIAPH3, DIDO1, DIRAS1, DIS3L, DISP2, DLGAP3, DLL3, DMKN, DNAAF2, DNAJA2, DNAJB6, DNAJC30, DNER, DNTTIP1, DOCK5, DPH2, DPH3, DPP4, DPPA2, DPPA3, DPY30, DPYS, DPYSL3, DSCC1, DSE, DSN1, DTD2, DTWD2, DTYMK, DUS3L, DUSP23, DUSP26, DUSP5, DUSP6, DUT, DYNLL1, E2F1, E2F4, EAF2, EBNA1BP2, ECE2//EEF1AKMT4, ECEL1P2, ECT2, EDARADD, EDIL3, EEF1AKNMT, EEF1E1, EEF2KMT, EFHD2, EFR3A, EGFL6, EHBPI, EHMT1, EIF2B1, EIF2S1, EIF2S2, EIF3K, EIF3M, EIF4E3, EIF4EBP1, EIF4G1, EIF5A, ELAC2, ELMO3, ELOVL7, EMC8, EMC9, EMG1, EMX1, ENTPD1, ENTR1, EOGT, EPB41L4A, EPCAM, EPHA1, EPHA10, EPHB6, EPHX3, EPHX4, EPPK1, EPS8L1, ERCC6L, ERICH1, ERICH5, ERRF11, ERVMER34-1, ESRG, ESRP1, ESRP2, ESYT3, ETNPPL, ETS2, ETV1, ETV5, ETV6, EWSR1, EXO1, EXOSC3, EXOSC4, EXOSC9, FA2H, FAAH, FABP5, FABP6, FAM102A, FAM102B, FAM110A, FAM110C, FAM120A, FAM124A, FAM124B, FAM129A, FAM155B, FAM174B, FAM181B, FAM19A4, FAM20A, FAM20C, FAM241A, FAM50B, FAM78B, FAM83B, FAM83D, FAM83F, FAM84A, FAM86EP, FARSB, FASTKD2, FASTKD3, FBLL1, FBXL16, FBXL21, FBXL5, FBXO25, FBXO27, FCF1, FCGR2A//FCGR2C, FCN3, FDFT1, FEN1, FERMT1, FEZF1, FGD2, FGD3, FGF13, FGF13-AS1, FGF2, FHL2, FKBP4, FLAD1, FLJ42393, FLJ45513, FLOT2, FLVCR1, FMO1, FOXD3, FOXI2, FOXL2, FOXL2NB, FOXM1, FOXN3, FOXO1, FRAT1, FRAT2, FRMD5, FTSJ1, FUS, FUT2, FXN, FXYD7, FZD5, G3BP1, GABBP1, GABRA5, GABRB3, GABRE, GABRQ, GAD2, GAL, GALM, GALNT13, GALNT14, GALNT3, GALNT6, GALNT7, GALR1, GALR3, GAREM2, GARS, GART, GATC, GATM, GCAT, GCH1, GCLM, GCNT4, GDAP1L1, GDF3, GEMIN4, GEMIN6, GEMIN7, GFOD1, GFPT2, GHRLOS, GINS4, GIPC2, GJA4, GJA5, GJB7, GLA, GLB1L3, GLDC, GLIPR1L1, GLS, GLS2, GLTP, GLYR1, GMNN, GNA12, GNA14, GNG12, GNG4, GNGT2, GNL2, GNL3, GNL3L, GNMT//CNPY3-GNMT, GNPAT1, GNPTAB, GOLPH3, GOLPH3L, GOLT1A, GPANK1, GPAT3, GPATCH4, GPC4, GPD1L, GPD2, GPLD1, GPNMB, GPR158, GPR160, GPR176, GPR27, GPR3, GPR37, GPR39, GPR62, GPR63, GPR83, GPRC5A, GPRIN1, GPRIN3, GRAMD2B, GRB7, GRHL2, GRIA4, GRID2, GRIK4, GRIN1, GRM1, GRM2, GRPEL1, GRPEL2, GRPR, GRTP1, GRWD1, GSG1, GSKIP, GSR, </p>
--

Continuation of appendix A

<p> <i>GTPBP4, GUCD1, GUCY2C, GULP1, HACL1, HAPLN3, HAS3, HASPIN, HAUS8, HCCS, HCLS1, HCN1, HCN2, HCN4, HEATR5A, HECW1, HELB, HENMT1, HEPHL1, HERC5, HESX1, HGH1, HHEX, HIRA, HIST1H2AE, HIST1H2BI, HIST1H3F, HIST1H4D, HIST1H4J, HIST2H2AC, HLA-DPB1, HLA-F, HLF, HMGA1, HMGB3, HMGNS5, HMOX2, HMSD, HNF4G, HNRNPAB, HNRNPD, HNRNPM, HNRNPU, HOMER2, HOOK2, HOXB13, HPGD, HPRT1, HPS6, HRASLS5, HS3ST3A1, HSD11B2, HSPA12B, HSPA14, HSPA9, HTATIP2, HTR1B, HTR6, HTR7, HUS1, HYLS1, ICA1, ICAM3, ID1, IDH1, IDO1, IER2, IFNLR1, IGFLR1, IGSF21, IGSF9B, IKBKE, IKZF5, IL15, IL17C, IL17RD, IL20RB, IL21R, IL23A, IL27RA, IL4R, IL6R, ILDR1, ILF3, ILKAP, IMP4, INAFM2, INHBA, INKA1, INO80D, INPP5A, INSR, INTS13, INTS5, IPO11//IPO11-LRRC70, IPO5, IPW, IRAK2, IRAK3, IRF2BPL, IRF5, IRX4, ISG20L2, ITGA2, ITGAM, ITGB1BP2, ITGB5, ITIH5, ITLN2, ITM2A, ITPA, ITPK1, ITPR2, ITPRIPL1, JADE1, JARID2, JAZF1, JDP2, JMY, JPH1, JPT1, JTB, KCMF1, KCNB2, KCNC4, KCND2, KCNE3, KCNG3, KCNH6, KCNJ6, KCNK1, KCNK6, KCNMA1, KCNMB1, KCNMB2-AS1, KCNMB4, KCNN2, KCNQ3, KCNS1, KCNS3, KCNVI, KCTD14, KCTD8, KDM4A, KDR, KEL, KIAA0040, KIF11, KIF14, KIF18B, KIF1BP, KIF1C, KIF23, KIF5B, KLB, KLC3, KLF15, KLHL34, KLHL7, KLK1, KLK13, KLK14, KLKB1, KLRG1, KLRG2, KNOPI, KRT18, KRTCAP3, KTI12, KYNU, LITD1, L3MBTL2, LAD1, LAMA3, LAMC2, LAMC3, LARGE2, LARP1B, LARS, LCK, LCP1, LDLRAD4, LDLRAP1, LEAP2, LEFTY1, LEFTY2, LEMD3, LETM1, LHFPL2, LHFPL4, LIMD1, LIMD2, LIMS2, LINC-ROR, LINC00337, LINC00449, LINC00562, LINC00605, LINC00652, LINC00678, LINC00852, LINC00882, LINC00899, LINC00937, LINC01018, LINC01108, LINC01311, LINC01359, LINC01484, LINC01487, LINC01829, LINC01844, LINC02036, LINC02166, LINC02188, LINC02362, LINC02365, LINC02436, LINGO2, LINP1, LLGL2, LMO7, LNX1, LOC100128770, LOC100130476, LOC100288748, LOC100631378, LOC101927551, LOC101928123, LOC101928254, LOC102724159, LOC102724200, LOC102724859, LOC105371730, LOC105373884, LOC105374546, LOC105374952, LOC105375431, LOC105378421, LOC283387, LOC283731, LOC286059, LOC389641, LOC441086, LOC441666, LOC645752, LOC728975, LOC729683, LPAR3, LPCAT1, LPL, LPO, LRAT, LRP8, LRR1, LRRC1, LRRC15, LRRC3B, LRRC45, LRRC47, LRRC69, LRRFIP1, LRRK1, LRRN4, LRWD1, LSG1, LSM10, LSM3, LTF, LTO1, LTV1, LUZP2, LY75, LYAR, LYPD3, LYPD6, LYPD6B, LYPLA2, LYSMD2, LZTS1, MACC1, MACC1-AS1, MAD2L1BP, MAEA, MAF1, MAFA, MAFF, MAGEB17, MAGI2, MAGOH, MAK16, MAL2, MALSU1, MAMDC2, MANF, MAP3K21, MAP3K5, MAP4K3, MAPK13, MAPK9, MAPKAP1, MARC2, MARCH3, MARCH4, MARK1, MARS, MARS2, MASTL, MAT1A, MATK, MATN3, MB21D2, MBD2, MBOAT1, MBP, MCF2, MCM10, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, MCMBP, MCMDC2, MCOLN2, MDH1, MDN1, MED14OS, MED20, MED21, MED27, MEDAG, MEGF10, MELK, MET, METAP1, METTL1, METTL21A, METTL2A, METTL3, METTL5, METTL7A, MFAP3L, MFSD13A, MFSD2A, MFSD5, MFSD6, MFSD6L, MGME1, MGST1, MINDY2, MIOS, MIR17HG, MIR2052HG, MIR302C, MIR302D, MIR3671, MIR3945, MIR4455, MIS18A, MIXL1, MKLN1, MKLN1-AS, MLKL, MLYCD, MMACHC, MMP24, MNAT1, MOB4, MOCOS, MOCS3, MORC2, MOSPD1, MPL, MPP1, MPP6, MPV17L2, MPZL2, MPZL3, MREG, MR11, MRM1, MRM3, MRO, MRPL13, MRPL15, MRPL16, MRPL17, MRPL18, MRPL19, MRPL20, MRPL24, MRPL3, MRPL32,</i> </p>
--

Continuation of appendix A

<p>MRPL34, MRPL35, MRPL36, MRPL39, MRPL42, MRPL44, MRPL47, MRPL48, MRPL49, MRPL51, MRPL52, MRPL55, MRPL58, MRPS10, MRPS11, MRPS12, MRPS15, MRPS16, MRPS18A, MRPS18C, MRPS21, MRPS23, MRPS28, MRPS30, MRPS34, MRPS35, MRPS36, MRPS9, MRRF, MRS2, MRTO4, MSC-AS1, MSH2, MSTO1, MT1F, MT1G, MT1H, MT1X, MTA3, MTAP, MTFR2, MTG1, MTHFD1, MTHFD1L, MTHFD2, MTHFS, MTMR12, MTMR8, MTPAP, MTX2, MUC3A, MUC4, MUC5B, MYBBP1A, MYBL2, MYC, MYCN, MYH2, MYL6, MYL7, MYLIP, MYLPF, MYO18B, MYO1D, MYO1E, MYO3A, MYOZ3, MYRFL, MYRIP, MYSM1, MYZAP, MZB1, N4BP1, N4BP2L1, N4BP3, NAA15, NAA20, NAA25, NAAA, NAF1, NAGK, NANOG, NANOGP8, NANS, NAP1L3, NASP, NAT2, NAV3, NBEAL2, NCAPG2, NCAPH, NCAPH2, NCEH1, NCLN, NDUFA7, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF7, NDUFB9, NDUFS3, NDUFS6, NDUFV3, NECAB1, NECTIN1, NEFH, NEK3, NEK8, NET1, NETO1, NF2, NFE2L3, NFIA, NFKBIB, NGDN, NHP2, NIFK, NIP7, NIPAL1, NIPAL3, NKAIN1, NKILA, NKX1-2, NLGN4X, NLN, NLRP12, NLRP2, NME1, NMI, NMNAT2, NMNAT3, NOC2L, NOC3L, NOC4L, NOCT, NOD2, NODAL, NOL11, NOL6, NOL7, NOM1, NOP10, NOP14, NOP56, NOP9, NOS1AP, NOS2, NPAP1, NPIPA1//LOC102724993, NPLOC4, NPM2, NPY2R, NR1I3, NR2E3, NR5A2, NRADDP, NRBP1, NRK, NSUN2, NSUN7, NT5DC3, NTMT1, NTS, NTSR1, NUDCD1, NUDT15, NUDT9, NUFIP1, NUP153, NUP155, NUP35, NUP37, NUP85, NUP88, NUS1, NUTF2, NUTM1, OAT, OCIAD2, OGFOD1, OGFPR1, OIP5, OLFM1, OMA1, ONECUT1, ORC1, ORC2, ORMDL2, OSBP2, OTUD6B, OTULINL, OVOL1, OVOL2, OXCT2, OXNAD1, P2RX5, P2RX5-TAX1BP3, P2RY1, PAH, PAIP2, PAK6//BUB1B-PAK6, PALM3, PAPOLG, PAPSS2, PAQR4, PARD6A, PARP12, PARBP, PAWR, PAXIP1, PCBD2, PCDH1, PCDH12, PCDHGA6, PCID2, PCK2, PCP4L1, PCYT2, PDCD11, PDCD2, PDCD2L, PDCL3, PDE12, PDE4B, PDE5A, PDE6G, PDLIM5, PDSS1, PDZD8, PEBP1, PEX1, PEX5L, PFAS, PFDN6, PGAM5, PGM2, PGM2L1, PGRMC1, PHAX, PHC1, PHETA2, PHF5A, PHGDH, PHLPP1, PHOSPHO1, PI4K2B, PIF1, PIK3AP1, PIK3CB, PIM2, PIN4, PINX1, PIP4K2A, PIP5KL1, PIWIL2, PKHD1L1, PKIA-AS1, PKMYT1, PKNOX1, PKPI, PKP3, PLA2G4C, PLA2G7, PLA2R1, PLAC9, PLaur, PLBD1, PLD5, PLEKHD1, PLEKHF1, PLK4, PLPP1, PLPP2, PLPP6, PLS1, PLSCR1, PLSCR4, PMAIP1, PMEPA1, PNMT, PNO1, PNP, PNPLA3, POC1A, POLA1, POLE, POLE2, POLR1B, POLR2F, POLR2L, POLR3E, POLR3G, POLR3K, POMP, PON1, POP1, POP4, POP5, POP7, POU2F3, POU5F1P3, POU5F1P4, PPARGC1B, PPIF, PPIG, PPIL1, PPM1A, PPM1B, PPM1G, PPM1H, PPP1R14B, PPP1R17, PPP1R1B, PPP1R7, PPP2R1B, PPP2R2C, PPP3CA, PPP3R1, PPP6R3, PPRC1, PPTC7, PRCC, PRDM14, PRDX1, PRDX6, PRELID1, PREX2, PRIM1, PRIM2, PRIMPOL, PRKAR1B, PRKAR2B, PRKCI, PRKD3, PRLR, PRMT3, PROCR, PROK2, PROKR1, PROKR2, PROM1, PROM2, PRPF31, PRPF4, PRPS2, PRR13, PRR15, PRRG2, PRRG4, PRSS16, PRSS8, PRTFDC1, PSAT1, PSIP1, PSMA3, PSMB3, PSMB4, PSMC1, PSMC2, PSMC4, PSMC6, PSMD1, PSMD11, PSMD12, PSMD14, PSMD6, PSMD7, PSMG1, PSMG4, PSPH, PTAFR, PTBP3, PTCHD1, PTGES3, PTMA, PTPN5, PTPRB, PTPRG, PTPRZ1, PTRH2, PUM3, PUS1, PUS7, PUSL1, PWP1, PWWP2A, PYCARD, QRSL1, QSER1, QTRT2, RAB15, RAB17, RAB19, RAB25, RAB31, RAB5A, RABEPK, RAD1, RAD18, RAD51, RAD54L, RALA, RAMAC, RAMP1, RAMP3, RANBP1, RANGAP1, RAPGEF3, RARRES2, RARRES3, RARS, RASAL2-AS1, RASAL3,</p>
--

Continuation of appendix A

RASD1, RASEF, RASGEF1A, RASGRF2, RASGRP2, RASL11A, RASSF10, RASSF3, RASSF9, RBBP5, RBBP8NL, RBM14, RBM19, RBM28, RBM39, RBM47, RBMXL1, RBP7, RBPMS-AS1, RBPMS2, RCC2, RDH11, RDH14, REEP5, RELL2, REPS2, REXO2, RFC2, RFC3, RFLNA//ZNF664-RFLNA, RFWD3, RGL3, RGS17, RGS5, RHBDL3, RHEBL1, RHOD, RHOH, RIF1, RILP, RIMKLB, RIMS4, RINT1, RIOK1, RIOX1, RIPOR2, RMC1, RMI2, RMND5B, RNASEH1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNF114, RNF125, RNF13, RNF144B, RNF145, RNF175, RNF182, RNF25, RNF44, ROBO3, RPARP-AS1, RPF2, RPIA, RPL22L1, RPL36AL, RPL3L, RPP25, RPP30, RPP40, RPRM, RPS26, RPS6KL1, RPUSD1, RPUSD2, RRAS2, RRP1, RRP12, RRP15, RRP1B, RRP36, RRP9, RRS1, RSU1, RTCA, RTN4IP1, RTP1, RUBCNL, RUNDC3A, RUNX1T1, RUVBL1, RYR3, S100A14, SAALI, SACMIL, SAE1, SAMD3, SAP18, SAP30L, SAPCD2, SAV1, SBSPON, SCARF2, SCG3, SCIN, SCLY, SCN8A, SCNM1//TNFAIP8L2-SCNM1, SCNN1A, SCNN1G, SCO1, SDC4, SDHB, SDHD, SEC14L4, SEC1P, SEH1L, SEL1L3, SELENOS, SEMA3A, SEMA6A, SEMA6A-AS1, SEPHS2, SERPINE2, SETD3, SETD4, SETD6, SF3B4, SFN, SFT2D1, SFTPD, SFXN2, SGK3//C8orf44-SGK3, SGMS1, SGO1, SH2B3, SH2D3A, SH2D4A, SH3BP5L, SH3GL2, SH3GL3, SH3YL1, SHCBP1, SHE, SHISA9, SHLD2, SHPK, SHQ1, SIRT1, SIRT7, SIVA1, SIX2, SIX4, SIX6, SKA3, SKIL, SLA, SLC10A4, SLC13A3, SLC15A1, SLC16A12, SLC19A2, SLC19A3, SLC20A1, SLC22A1, SLC22A20P, SLC22A3, SLC25A12, SLC25A17, SLC25A19, SLC25A28, SLC25A38, SLC25A4, SLC26A7, SLC26A8, SLC27A2, SLC27A4, SLC27A6, SLC29A3, SLC30A2, SLC30A3, SLC35B1, SLC35D3, SLC35F3, SLC37A1, SLC38A1, SLC38A2, SLC39A14, SLC43A3, SLC44A3, SLC45A1, SLC46A1, SLC4A4, SLC51A, SLC52A1, SLC5A6, SLC7A14, SLC7A2, SLC7A3, SLC7A6, SLCO3A1, SLCO4A1, SLCO4C1, SLCO5A1, SLED1, SLFN13, SLIRP, SLITRK3, SLMAP, SMARCA2, SMC1B, SMC4, SMCO4, SMIM10, SMIM10L2B, SMIM12, SMIM13, SMIM4, SMPDL3B, SMS, SMYD5, SNAI3, SNAP23, SNAPC5, SNHG4, SNN, SNORA3B, SNRNP25, SNRPC, SNUPN, SNURF, SNX22, SNX24, SOCS2, SOCS2-AS1, SOCS3, SOD1, SORT1, SOWAHC, SOWAHD, SOX15, SOX4, SP100, SP140, SP4, SPAAR, SPAG5, SPATA2, SPATA24, SPATS2L, SPHK2, SPIB, SPIN1, SPR, SPRY1, SPRY4, SPRYD4, SPTB, SPTBN5, SRF, SRFBP1, SRM, SRP19, SRPK1, SRPRB, SRRT, SRSF2, SRSF3, SRSF7, SS18L2, SSBP1, SSSCA1, SSTR1, SSTR2, ST14, ST6GAL1, ST7//ST7-OT3, ST8SIA5, STAB1, STAC3, STAMBPL1, STEAP1, STEAP1B//LOC401312, STEAP2, STEAP3, STK35, STMN1, STMN3, STOM, STRN, STYK1, SUCLA2, SUDS3, SUPV3L1, SURF2, SURF6, SUV39H1, SVOPL, SYK, SYN3, SYNCRIP, SYNE4, SYNJ2, SYNPO2, SYNPR, SYPL1, SYPL2, SYT1, SYT12, SYT2, SYT3, SYT6, TAC1, TACR3, TACSTD2, TAF4B, TAF5L, TANGO6, TAOK3, TARS, TASP1, TATDN2, TBC1D2, TBC1D22B, TBC1D4, TBC1D8B, TBCC, TBGR1, TC2N, TCAP, TCF24, TCP1, TDGF1, TDP1, TDP2, TDRD12, TDRD5, TEAD4, TEC, TEDC2, TEK3, TELO2, TENT5B, TERF1, TES, TESC, TEX10, TEX13B, TEX41, TFAP2A-AS2, TFAP4, TFB2M, TFCP2L1, TFPI2, TGFA, THAP1, THAP11, THBS1, THOC6, THOC7, THY1, TICRR, TIGAR, TIMM10, TIMM17A, TIMM22, TIMM23, TIMM44, TIMM8A, TIMM8B, TIMMDC1, TINAGL1, TIPIN, TK1, TLCD1, TLE1, TLL2, TLR2, TLR3, TM2D2, TM4SF18, TMA16, TMC5, TMEFF2, TMEM104, TMEM11, TMEM110-MUSTN1, TMEM120B, TMEM125, TMEM139, TMEM145, TMEM151A, TMEM151B, TMEM165, TMEM177, TMEM178A, TMEM183A, TMEM200A, TMEM201, TMEM203, TMEM220, TMEM220-AS1, TMEM223, TMEM238, TMEM266,

Continuation of appendix A

	<p>TMEM268, TMEM30B, TMEM33, TMEM37, TMEM38A, TMEM52, TMEM59L, TMEM63A, TMEM69, TMEM82, TMEM86A, TMEM86B, TMEM87A, TMEM8A, TMIE, TMPPE, TMPRSS13, TMPRSS4, TMPRSS6, TMTC1, TMTC3, TMX2, TNFRSF10A, TNFRSF11A, TNFRSF12A, TNFRSF8, TNFSF11, TNIK, TNIP2, TNMD, TNNC2, TOMM22, TOMM40, TOP1MT, TOR3A, TOX, TP53, TP73, TPM3, TPRN, TRAF3IP2, TRAIIP, TRAPPC13, TRAPPC8, TRDN, TRHDE-AS1, TRIAP1, TRIM14, TRIM24, TRIM35, TRIM54, TRIM6, TRIM65, TRIM72, TRIP13, TRMT10C, TRMT12, TRMT2B, TRMT44, TRMT5, TRMT61A, TRMT61B, TRNP1, TROAP, TRPA1, TRPM6, TRUB2, TSHZ3, TSKU, TSLP, TSN, TSR1, TSTA3, TTC19, TTC27, TTC39B, TTC39C, TTC9, TTI2, TTK, TLLI2, TUBB6, TUFM, TULP1, TULP2, TUSC2, TWISTNB, TWNK, TXLNG, UBALD1, UBB, UBE2E1, UBE2F, UBE2J2, UBF1, UBIAD1, UBQLN1, UBTf, UCHL1, UCHL3, UCK2, UCKL1, UCMA, UFD1, UGP2, UGT8, UHRF1BP1L, ULK1, UMPS, UNC5D, UNG, UPRT, UQCC3, UQCRQ, URB2, URGCP, URH1, USH1G, USH2A, USP12, USP18, USP2-AS1, USP28, USP32, USP43, USP44, USP48, UTF1, UTP11, UTP14A, UTP15, UTP20, UTP25, UTP3, UTP4, UTP6, VANGL1, VASP, VAV1, VCAN, VCL, VDR, VENTX, VIL1, VIPR1, VIPR2, VKORC1L1, VOPP1, VPREB3, VPS33A, VPS9D1-AS1, VSIG10//LOC101928274, VSNL1, VSTM5, WARS, WASHC5, WASL, WDR1, WDR3, WDR4, WDR43, WDR44, WDR45, WDR46, WDR72, WDR77, WDR82, WSB2, WWC1, WWC2, XG, XK, XKRX, YARS2, YJU2, YRDC, YTHDC2, YTHDF1, YWHAB, ZAN, ZAR1L, ZBTB11-AS1, ZBTB2, ZBTB3, ZBTB44, ZC3H4, ZCCHC17, ZCCHC2, ZDHHC13, ZDHHC16, ZDHHC19, ZDHHC2, ZDHHC20, ZDHHC22, ZDHHC5, ZFAND6, ZFP42, ZFYVE28, ZMAT4, ZMYND19, ZNF101, ZNF114, ZNF121, ZNF134, ZNF142, ZNF202, ZNF212, ZNF281, ZNF35, ZNF385B, ZNF385D, ZNF394, ZNF398, ZNF483, ZNF485, ZNF488, ZNF512B, ZNF525, ZNF564, ZNF572, ZNF587B, ZNF613, ZNF616, ZNF622, ZNF630, ZNF648, ZNF649, ZNF684, ZNF697, ZNF732, ZNF749, ZNF765, ZNF770, ZNF813, ZNF827, ZNF845, ZNF850, ZNF860, ZNF878, ZNF90, ZNHIT2, ZPR1, ZSCAN10, ZSCAN2, ZSWIM3, ZUP1, ZWILCH, ZXDC, ZYG11A</p>
2	<p>A2M, A2M-AS1, AATK, ABAT, ABCA1, ABCA13, ABCA17P, ABCA3, ABCA5, ABHD10, ABHD15, ABHD6, ABRAXAS1, ACADVL, ACBD5, ACCS, ACOXL-AS1, ACP2, ACRBP, ACSS1, ACSS3, ACTA2, ACTN3, ACVR1B, ADAL, ADAM17, ADAMTS13, ADAMTS6, ADAMTS9, ADAMTSL3, ADCY7, ADD3, ADGRG1, ADGRV1, ADNP, ADORA2A, ADORA2A-AS1, ADPRM, ADSSL1, AFF4, AGL5, AGFG2, AGO3, AGPAT3, AGPAT4, AHDC1, AHNK, AHS2P, AJUBA, AK7, AKAP13, AKAP6, AKIP1, ALAD, ALDH1A2, ALDH5A1, ALG9, ALOX12B, AMN1, AMOTL1, AMPH, ANAPC16, ANGPTL4, ANKMY2, ANKRD13A, ANKRD34A, ANKRD42, ANKRD53, ANO3, ANP32A, ANP32B, AP1M1, AP3M1, AP3M2, APC2, APLP1, APLP2, APMAP, APOBEC3H, APOLD1, APP, ARFGAP3, ARHGAP10, ARHGAP15, ARHGAP24, ARHGAP29, ARHGAP6, ARHGEF17, ARHGEF25, ARHGEF37, ARHGEF4, ARHGEF9, ARID1B, ARID2, ARID3A, ARIH2OS, ARL10, ARL3, ARL4A, ARL4C, ARL5B, ARL6IP1, ARL6IP5, ARMC1, ARMC12, ARMC3, ARMCX1, ARMCX3, ARMCX6, ARNT, ARRDC3, ARRDC4, ARSA, ASB7, ASB8, ASGR1, ASH1L, ASIC1, ASIC3, ASPDH, ASPH, ASTN1, ATAT1, ATF7, ATG12, ATN1, ATOH8, ATP10D, ATP11B, ATP1A4, ATP2B4, ATP5MC2, ATP5MPL, ATP6AP1, ATP6V0A1, ATP7B, ATRN, ATXN1, AXL, AZI2, AZIN2, B3GAT3, B4GALNT3, B4GAT1, B9D2, BACH1//GRIK1-AS2, BAG4, BAHCC1, BAIAP2-DT, BASP1-AS1, BBS5, BBS9, BBX, BCHE, BCL2L11,</p>

Continuation of appendix A

<p> <i>BCL2L2, BCL6, BCL7A, BDKRB2, BEAN1, BEND5, BGN, BIRC3, BISPR, BLMH, BLOC1S5, BMP1, BMP3, BMP4, BMP5, BMP7, BMPER, BMPR1B, BMT2, BNIP3L, BRD7, BRD8, BRINP2, BRSK1, BRWD1, BRWD3, BTBD3, BTG1, BTG2, BTN2A1, BTN2A2, BTN3A1, BTN3A2, C10orf88, C11orf49, C11orf65, C11orf96, C12orf57, C16orf45, C16orf86, C19orf44, C19orf54, C1orf162, C1orf21, C1orf229, C1orf54, C1QTNF6, C22orf39, C2orf72, C4orf3, C5AR1, C5orf49, C5orf66, C6orf118, C6orf58, C6orf89, C7orf61, C9orf72, CA11, CA14, CA3, CAB39L, CABP7, CACFD1, CACHD1, CACNA1G, CACNA1H, CACNB1, CACNB3, CADM1, CADM3, CADM4, CAHM, CALCOCO1, CALCOCO2, CALU, CAMK1, CAMK1G, CAMK2B, CAMK2N1, CAMKK2, CANT1, CAPN14, CAPN2, CAPN7, CARF, CASCI, CASP7, CAST, CATIP, CBFA2T2, CBFA2T3, CBLB, CBLI, CBX1, CBX4, CBX5, CBX8, CCDC102A, CCDC125, CCDC130, CCDC136, CCDC148, CCDC159, CCDC167, CCDC183, CCDC184, CCDC189, CCDC33, CCDC62, CCDC74A, CCDC85A, CCDC85C, CCDC92, CCDC97, CCM2, CCNB3, CCND1, CCND2, CCNDBP1, CCNG2, CCNY, CD226, CD24, CD302, CD37, CD8B2, CD99L2, CDADC1, CDC23, CDH10, CDH13, CDH4, CDH6, CDIP1, CDK17, CDK19, CDK20, CDK5RAP3, CDK8, CDKL2, CDKN1A, CDKN2C, CDS2, CDX2, CELF2-AS1, CELF3, CELF5, CELSR2, CEP112, CEP126, CEP170, CEP250, CEP350, CEP97, CERS6, CES3, CES4A, CETN2, CFAP126, CFAP57, CFAP58, CFDP1, CFL2, CGGBP1, CHAD, CHD2, CHP1, CHR1, CHST11, CIART, CIRBP, CITED2, CKAP2, CLASP1, CLBA1, CLCF1, CLCN2, CLCN4, CLCN5, CLDN20, CLEC10A, CLEC16A, CLEC18C, CLEC19A, CLIC5, CLIP3, CLK2, CLPSL1, CLSTN1, CLSTN2, CLSTN3, CLUAP1, CMBL, CMTM1, CMTM3, CMTM5, CMTR2, CNIH1, CNKSR3, CNNM4, CNP, CNPY4, CNTFR, CNTFR-AS1, CNTNAP1, CNTNAP3B, CNTNAP3P2, CNTROB, COL11A1, COL27A1, COL2A1, COL4A1, COL5A1, COL9A2, COLGALT2, COMMMD3, COMMMD8, COPZ2, COQ10A, COQ5, COQ6, COX15, COX19, CPA1, CPA2, CPA4, CPD, CPEB4, CPED1, CPLANE2, CPM, CPNE3, CPQ, CPSF1, CPTIC, CPXM1, CRB2, CREBRF, CRK, CROCCP3, CRTAC1, CRTCI, CRY2, CRYBA1, CRYZLI, CSNK1G1, CSNK2A1, CSNK2A2, CST2, CST3, CSTF3-DT, CTBP1, CTBS, CTDSP1, CTHRC1, CTSB, CTTNBP2NL, CUBN, CUEDC1, CUEDC2, CUL9, CX3CLI, CXorf40A, CXXC4, CYB561D1, CYB5D2, CYP27A1, CYP2R1, DACH1, DACT3, DARS, DAZAP2, DBH-AS1, DCAF12, DCAF12L2, DCAF5, DCDC2, DCLK2, DCST1, DCST2, DCTN3, DCTN4, DCTN5, DDHD1, DDHD2, DDN, DDOST, DDX47, DENND2A, DENND4A, DENND6B, DET1, DGKH, DHFR2, DHX32, DHX40, DIP2A, DIRC3, DKK1, DKK2, DKKL1, DLC1, DLEC1, DLK1, DLK2, DLX3, DM1-AS, DMGDH, DMXL2, DNAAF3, DNAH6, DNAH7, DNAH9, DNAIL, DNAJC1, DNAJC18, DNAJC27, DNAL4, DNALII, DNASE1L1, DNHD1, DNMI, DNMBP, DNMT1, DOCK1, DOCK7, DPCD, DPP7, DPYSL4, DPYSL5, DRAM2, DRAXIN, DRC1, DRC3, DTNBP1, DTX3, DUSP10, DUSP18, DUSP3, DVL2, DYM, DYNC1LI2, DYRK1A, DYRK1B, E2F6, EBF2, EBF4, ECE1, ECM1, EDAR, EDN1, EEFIKMT3, EEF2, EFCAB1, EFCAB12, EFCAB7, EFEMP2, EFHB, EFHC1, EFNBI, EFN2, EFN3, EFR3B, EFS, EGLN3, EID2B, EIF3L, EIF4ENIF1, ELF1, ELK4, ELMOD3, ELOVL5, EMID1, EMP3, ENDOV, ENO2, ENO3, ENPEP, ENPP3, ENPP4, ENTPD5, ENTPD6, EPB41L1, EPB41L5, EPC1, EPCAM-DT, EPHA2, EPHA4, EPHB2, EPHB3, EPHX2, ERAP1, ERCC1, ERLIN1, ERLIN2, ESD, ESRRG, EVC, EVL, EXOC4, EXTL1, EYA1, EZH1, F10, F2R, FAIM2, FALEC, FAM107A, FAM13A, FAM149B1, FAM153C, FAM160B2, FAM161B,</i> </p>
--

Continuation of appendix A

FAM168A, FAM168B, FAM171A2, FAM172A, FAM178B, FAM183A, FAM193A, FAM198B, FAM201A, FAM206A, FAM20B, FAM210B, FAM214B, FAM219B, FAM220A, FAM222A, FAM228A, FAM229B, FAM3D-AS1, FAM47E, FAM53B, FAM53C//LOC100128966, FAM81B, FAM92B, FANK1, FAT4, FAXDC2, FBLN1, FBLN7, FBN2, FBR5, FBXL14, FBXL2, FBXL20, FBXL8, FBXO15, FBXO16, FBXO24, FBXO42, FBXO6, FBXW8, FCER1G, FCHSD2, FCRLB, FEM1B, FER1L4, FEZ1//STT3A-AS1, FGF1, FGF10, FGF17, FGF3, FGFR3, FHIT, FITM2, FKBP1A, FKBP9, FKBP9P1, FLJ12825, FLJ16779, FLJ37453, FLJ46284, FLJ46906, FLNC, FNDC3A, FNDC4, FNDC5, FNTA, FOLR1, FOXA2, FOXB1, FOXD2-AS1, FOXF2, FOXJ1, FOXJ3, FOXK1, FOXO3, FOXS1, FREM1, FRG1BP, FRMD3, FRMD6, FRRS1L, FRS3, FRZB, FSD1L, FST, FSTL3, FTL, FTO, FUNDC2, FUT11, FUT8, FUT8-AS1, FXR1, FXR2, FXYD6, FYN, FYTTD1, FZD1, FZD2, FZD9, GAA, GAB2, GABARAP, GABARAPL2, GABRG3, GAD1, GALC, GALNT16, GALNT5, GALP, GAMT, GAS1, GAS8, GATD1, GBA, GBE1, GCKR, GCNT1, GDAP2, GDF10, GDF11, GDF5, GDII, GEM, GGT7, GIGYF2, GIPR, GLB1L, GLDN, GLI3, GLI4, GLIPR1, GLIS2, GLUD1P2, GLYATL2, GNAZ, GNB2, GNPDA2, GNS, GOLGA2P10, GPBP1, GPC1, GPC5, GPCPD1, GPHN, GPR132, GPR137C, GPR146, GPR153, GPR155, GPR162, GPR173, GPR182, GPR21//RABGAP1, GPRASP1, GPSM1, GPSM2, GPX7, GRAMD1C, GREB1, GRIN3B, GRINA, GRK5, GSAP, GSE1, GSK3B, GSN, GSN-AS1, GSTA4, GSTK1, GSTM2, GTF2A1, GTF2F1, GTF3C3, GTSE1-DT, GUCA1B, H2AFY2, H6PD, HABP4, HACD2, HAGLR, HAP1, HAPLN2, HCFC2, HDAC6, HEATR5B, HELZ, HEMK1, HERC4, HERPUD2, HES7, HEXIM1, HGC6.3, HGSNAT, HHAT, HHIPL2, HILPDA, HINT3, HIP1R, HIPK1, HIST1H1E, HIVEP3, HLA-DMA, HMGCL, HMGCLL1, HNRNPA1P10, HNRNPUL2, HOMER3-AS1, HOTAIRM1, HOXA-AS2, HOXA-AS3, HOXA1, HOXA2, HOXB-AS1, HOXB-AS3, HOXB1, HOXB7, HOXB8, HOXB9, HOXC4, HOXC8, HPCA, HS1BP3, HS3ST3B1, HSD11B1L, HSD17B11, HSD17B13, HSD17B14, HSD17B8, HSDL1, HSF2, HSPA13, HYDIN, HYMAI, HYPK, IAH1, IAPP, ICAM5, IDH2, IDS, IER5, IER5L, IFFO1, IFI27L2, IFT140, IFT52, IGF2-AS, IGF2R, IGFBP1, IGFBP5, IGFBP7, IGFBPL1, IGIP, IGSF11, IL1RAPL1, IL6ST, ILDR2, IMPG1, ING4, INHA, INMT, INSRR, INSYN2B, INTU, INVS, IP6K2, IP6K3, IPP, IQCD, IQUB, IRX1, IRX2, IRX3, ITFG1, ITGA10, ITGA5, ITGA8, ITGB8, ITIH2, ITPRID2, IWS1, JAM3, JMJD7-PLA2G4B, KAT6A, KATNAL1, KC6, KCNC3, KCNIP2, KCTD1, KCTD13, KCTD16, KCTD18, KCTD19, KCTD21, KCTD7, KCTD9, KDELC1, KDM3A, KDM4B, KIAA0232, KIAA0895, KIAA0895L, KIAA1324, KIAA1324L, KIAA1328, KIAA1755, KIAA1958, KIAA2012, KIF19, KIF26B, KIF27, KIF5C, KIFAP3, KLF10, KLF11, KLF3, KLHDC10, KLHDC8B, KLHL11, KLHL12, KLHL13, KLHL22, KLHL28, KLHL32, KLHL4, KLHL9, KLRF1, KMT5B, KY, KYAT3, LAMB1, LAMTOR3, LAMTOR5, LCA5, LCOR, LDB1, LEF1, LENG8, LEPR, LETMD1, LGALS8, LGALS8-AS1, LGII, LGR4, LGR5, LIFR-AS1, LIM2, LINC00294, LINC00526, LINC00535, LINC00595//LINC00856, LINC00629, LINC00634, LINC00648, LINC00683, LINC00847, LINC00853, LINC00893, LINC00963, LINC01003, LINC01124, LINC01138//LOC105371225, LINC01144, LINC01152, LINC01285, LINC01456, LINC01473, LINC01549, LINC01571, LINC01686, LINC01703, LINC01749, LINC01801, LINC01869, LINC01933, LINC01948, LINC01977, LINC02035, LINC02043, LINC02175, LINGO3, LIX1, LIX1L, LMAN2L, LMBRD2, LMF1, LMO1, LNPK, LOC100128076, LOC100128164,

Continuation of appendix A

<p> LOC100130691, LOC100268168, LOC100506142, LOC100506801, LOC100507071, LOC100996724, LOC100996732//LOC107985911, LOC101927521, LOC101927943, LOC101928266, LOC101928414, LOC101929240, LOC101929552, LOC101929704, LOC102723548, LOC102723566, LOC103344931, LOC105369203, LOC105369486, LOC105370526, LOC105371050, LOC105371899, LOC105371925, LOC105375614, LOC155060, LOC254896, LOC284788, LOC339803, LOC646588, LOC730098, LONRF2, LOXL1, LOXL3, LOXL4, LPIN2, LPIN3, LRIG3, LRMDA, LRP2, LRP4, LRRC23, LRRC27, LRRC28, LRRC3-DT, LRRC36, LRRC37B, LRRC43, LRRC4B, LRRC4C, LRRC7, LRRC70, LRRC73, LSAMP, LSM11, LSMEM1, LTA4H, LYPD1, LYRM4-AS1, LYSMD1, LZIC, MAEL, MAGEF1, MALRD1, MANIA2, MAN2A2, MAN2B1, MANBA, MANEA- DT, MAP1A, MAP1B, MAP1LC3B, MAP2K5, MAP2K6, MAP3K1, MAP3K12, MAP7D2, MAPK10, MAPK15, MAPK4, MAPKAPK2, MAPKBP1, MAPRE3, MARCH6, MARCH7, MARCH9, MATN1-AS1, MATR3, MBD5, MBD6, MCF2L, MCFD2, MEAK7, MECP2, MED13, MED13L, MED23, MEG3, MEG8, MEGF6, MEGF9, MEIS2, MEOX1, METRN, METTL6, MEX3A, MGAT3, MIA3, MICAL1, MICALL2, MICU3, MIR4292, MIR503HG, MLLT11, MLLT3, MMP11, MMP2, MN1, MNX1, MOB3B, MON2, MORC3, MORN1, MORN3, MORN4, MORN5, MOSPD2, MPDZ, MPI, MRC2, MRPL30, MRPL46, MRPS6, MRTFB, MS11, MS12, MSL1, MSL2, MSLN, MST1P2, MTFR1L, MTHFSD, MTMR3, MTSS1, MTX3, MUC16, MUM1L1, MUT, MVB12B, MXD1, MXD4, MXI1, MYBPC1, MYH8, MYL4, MYL9, MYOF, MYOM3, MYRF, MZF1, NAA35, NAB2, NADK2, NADSYN1, NAPB, NAPSA, NAT8L, NBPF8, NCALD, NCAM1, NCBP2, NCK1, NCOA3, NCOA6, NCS1, NCSTN, NDEL1, NDNF, NDUFB4, NDUFV2, NECAB3, NEK6, NEK9, NEO1, NEPRO, NEU1, NEXMIF, NFAT5, NFATC4, NFIL3, NFKB2, NFKBIL1, NGEF, NGFR, NIPBL, NIPSNAP2, NISCH, NKD1, NKIRAS2, NKX3-2, NKX6- 2, NLGN2, NLRC3, NLRC4, NMNAT1, NMT2, NNMT, NOG, NOL3, NOTUM, NPAS2, NPEPPS, NPHP4, NPR3, NPTN-IT1, NPTX2, NR1D2, NR2F1, NR2F1-AS1, NR2F2, NR6A1, NRAP, NRBF2, NRDE2, NRGN, NRN1, NRP2, NRXN3, NSD3, NTAN1, NTF3, NTN1, NUAKE2, NUDT17, NUTM2D, NXP3, OARD1, OBSCN-AS1, OCA2, OGA, OGFOD2, OGT, OLFML2A, OLIG2, OLIG3, OPRL1, OPTN, OR51E2, ORAI3, OS9, OSBPL7, OSBPL9, OSCP1, OTOF, OTUB2, OTUD3, OVGP1, OXSRI, P3H1, P3H3, P3H4, P4HTM, PAAF1, PABPC1, PAG1, PAK2, PAK5, PALLD, PALM, PAPP, PAQR6, PAQR7, PARP11, PARP16, PARP6, PARVA, PAX3, PBXIPI, PCBP4, PCDH18, PCDH19, PCDH8, PCDHA2, PCDHA3, PCDHB10, PCDHB11, PCDHB13, PCDHB15, PCDHB2, PCDHB3, PCDHB4, PCDHGB7, PCDHGC3, PCED1A, PCNX1, PCP2, PCSK2, PCSK6, PCYOX1, PCYOX1L, PDCD4, PDE1B, PDE6B, PDE8B, PDGFC, PDGFRA, PDK1, PDLIM7, PDRG1, PDYN, PDZRN3, PEG10, PEG13, PELI2, PELI3, PER2, PES1, PEX11A, PEX11B, PEX12, PEX13, PEX19, PFKFB3, PFKFB4, PFNIP2, PGAP1, PGF, PGK1, PGM3, PHC3, PHF2, PHF24, PHF3, PHOX2A, PHPT1, PHYKPL, PI4KAP1, PIAS1, PICALM, PIFO, PIGQ, PIK3IP1, PIK3R1, PJA2, PKDCC, PKNOX2, PLA2G12B, PLA2G6, PLBD2, PLCD1, PLCXD2, PLCXD3, PLD6, PLEKHA4, PLEKHA8, PLEKHB1, PLIN2, PLOD1, PLOD2, PLTP, PLXNA2, PLXNA3, PLXNB3, PMM1, PMP22, PMS2CL, PNCK, PNMA2, PNMA8A, PNN, PNPLA7, PNRC1, POC1B, PODXL, POGK, POGZ, POLK, POLR2B, POLR3GL, POU3F2, POU4F3, POU6F2, PPFIBP1, PPIA, PPIL6, PPM1E, PPME1, PPP1R12B, PPP1R14C, PPP1R32, PPP1R3C, </p>

Continuation of appendix A

PPP1R3E, PPP1R3F, PPP1R9B, PPP3CB, PQLC1, PRAF2, PRAM1, PRDM12, PRDX2, PRELP, PREPL, PREX1, PRICKLE2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAR2A-AS1, PRKCA, PRKCB, PRKCE, PRKRA, PRKRIP1//LOC100630923, PRMT8, PROS1, PROX1, PRPF18, PRR14, PRR3, PRR5L, PRRT2, PRSS35, PRSS53, PRXL2A, PSAPL1, PSD2, PSME1, PSTPIP1, PTAR1, PTCH2, PTGR1, PTGS1, PTP4A2, PTPN13, PTPRM, PTPRN, PTPRVP, PTX3, PURB, PXDC1, PXK, PYGO1, PYGO2, PYROXD2, QKI, R3HCC1L, RAB11FIP4, RAB14, RAB2A, RAB2B, RAB37, RAB40B, RAB4A, RAB5B, RAB6B, RAB7B, RABGEF1, RACK1, RAD23B, RAD52, RAD9B, RALB, RAN, RANBP9, RAP1GDS1, RAP2C-AS1, RAPGEF4, RASA1, RASA4B, RASL10B, RBBP4, RBKS, RBM12B-AS1, RBM20, RBM24, RBM33, RBM43, RBM5, RBMS3//LINC00693, RC3H2, RCN1, RCOR2, RDH5, RDX, RETSAT, RFTN2, RFX2, RFX4, RGMB-AS1, RHBDD2, RHCE, RHOB, RHOJ, RHOU, RIBC1, RILPL1, RIOK3, RIPOR1, RIT1, RLF, RLIM, RMDN1, RMND5A, RND1, RNF11, RNF111, RNF122, RNF130, RNF14, RNF152, RNF157, RNF165, RNF169, RNF19A, RNF214, RNF220, RNF24, RNF38, RNF43, RNGTH, ROR2, RORA, RORA-AS1, RP2, RPA1, RPH3AL, RPL13P5, RPL22, RPL7A, RPLP0, RPRD1B, RPS14, RPS23, RPS4X, RPS6KA3, RPSAP52, RSPH14, RSPH9, RSRC2, RTL1, RTL5, RTN4RL1, RTTN, RUSC2, RXRA, RXRG, S1PR1, S1PR2, SACS-AS1, SAMD10, SAMD8, SARAF, SAT2, SAXO1, SCAF4, SCAF8, SCAMP1, SCAMP4, SCAPER, SCCPDH, SCD5, SCHIP1, SCML1, SCML2, SCN2B, SCN4B, SCN5A, SCNN1D, SCP2, SDC3, SDCBP, SDHAF4, SDK2, SEC14L1, SEC14L2, SEC31A, SEC61A2, SECISBP2L, SECTM1, SEL1L, SELENBP1, SELENOP, SEMA3B, SEMA3C, SEMA4F, SEMA4G, SEMA5A, SEMA5B, SEMA6D, SENP5, SENP7, SEPT6, SERINC1, SERPINA1, SERPING1, SERTAD2, SERTAD3, SESN3, SETBP1, SF11, SFXN1, SGCB, SGCG, SGSM2, SH3BGRL3, SH3BP5, SH3BP5-AS1, SH3D21, SH3GLB1, SH3RF1, SH3RF3, SIAE, SIDT1, SIDT2, SIK2, SIL1, SIM2, SIRPA, SIRT3, SKAP1, SKAP2, SKIDA1, SLAIN2, SLC12A6, SLC16A14, SLC16A4, SLC22A18, SLC22A8, SLC25A14, SLC25A30, SLC25A36, SLC25A37, SLC25A40, SLC26A11, SLC27A1, SLC2A13, SLC2A3, SLC35D2, SLC35E2B, SLC35F1, SLC36A4, SLC37A4, SLC38A3, SLC39A7, SLC41A3, SLC43A2, SLC4A8, SLC51B, SLC5A3, SLC6A1, SLC6A16, SLC6A8, SLC7A11, SLC7A11-AS1, SLC8A2, SLC8A3, SLC9A3-AS1, SLC9B1, SLFN5, SLIT1, SLIT2, SLIT3, SMAD2, SMAD5, SMAGP, SMAP2, SMARCA1, SMARCC2, SMARCD3, SMG1P7, SMG6, SMG9, SMIM17, SMIM29, SMIM32, SMOCI, SMOX, SMPD1, SMPD3, SMYD2, SMYD3, SNAI2, SNAPC1, SNORD6, SNRNP48, SNW1, SNX18, SNX2, SNX29, SNX3, SNX30, SNX32, SOAT1, SOBP, SOCS5, SOGA1, SORCS2, SOX1, SOX1-OT, SOX11, SOX21, SOX5, SOX8, SP1, SP5, SPA17, SPACA9, SPAG17, SPAG6, SPAG8, SPATA7, SPATS2, SPEN, SPICE1, SPIN3, SPSB1, SPSB4, SPTY2D1, SRCIN1, SRP54, SRP72, SRPK2, SRR, SRSF12, SSC5D, SSPO, SSTR3, ST3GAL3, ST3GAL5, ST6GALNAC5, ST6GALNAC6, ST8SIA2, ST8SIA4, STARD4, STARD4-AS1, STARD9, STAT1, STAT5B, STK24, STK3, STOML3, STON1, STPG1, STRA6, STRADB, STT3B, STX12, STX17, STX1A, STX7, SUCLG2, SUCNR1, SUFU, SUGCT, SUGP2, SUMF2, SUPT3H, SUPT6H, SUPT7L, SUSD6, SVOP, SYCE3, SYNGR1, SYNJ1, SYNPO, SYNPR-AS1, SYS1, SYT11, SYT17, TAB2, TADA2B, TAGLN3, TAOK1, TAOK2, TAPBPL, TAPT1, TAS2R5, TBC1D10C, TBC1D19, TBC1D32, TBC1D9B, TBX15, TCAF1, TCEA2, TCF12, TCF4, TCP11, TCP11L1, TCTE1, TDRD3, TEAD1, TECPR1, TEF, TEKT2, TEKT5, TENM3, TENM4, TENT4A, TEPI, TERF2IP//LOC105371348, TET1, TET2,

Continuation of appendix A

	<p>TEX22, TF, TFAP2B, TGFB2, THAP8, THBD, THBS3, THBS4, THG1L, THPO, TIGD1, TIMP1, TIMP3, TINCR, TIPARP, TLE6, TM2D1, TM6SF2, TM9SF2, TM9SF4, TMC7, TMCC3, TMED4, TMED8, TMEM101, TMEM106A, TMEM106B, TMEM107, TMEM120A, TMEM123, TMEM128, TMEM130, TMEM132A, TMEM132E, TMEM136, TMEM167B, TMEM168, TMEM169, TMEM170B, TMEM175, TMEM179B, TMEM182, TMEM204, TMEM219, TMEM221, TMEM230, TMEM248, TMEM25, TMEM255A, TMEM263, TMEM35A, TMEM38B, TMEM42, TMEM44, TMEM45A, TMEM87B, TMEM88, TMEM8B, TMEM91, TMEM94, TMEM98, TMF1, TMLHE, TMPRSS5, TMTC2, TMUB2, TMX4, TNFAIP1, TNFRSF10B, TNFRSF19, TNIP1, TNNC1, TNPI, TNS3, TNXB, TOGARAM1, TOM1L2, TOX4, TP53BP1, TP53BP2, TP53I11, TP53INP1, TPGS2, TPII, TPM2, TPPP3, TPT1-AS1, TRADD, TRAF5, TRAF6, TRAK1, TRAPPC11, TRAPPC5, TRIL, TRIM16, TRIM17, TRIM2, TRIM41, TRIM44, TRIM55, TRIM63, TRIM68, TRIM8, TRIP4, TRIQK, TRPM8, TRPV3, TRPV4, TSC1, TSC22D1, TSGA10IP, TSHZ1, TSHZ2, TSPAN14, TSPAN18, TSPAN3, TSPAN31, TSPAN32, TSPAN5, TSPAN6, TSPAN7, TSPOAP1, TSPYL2, TTC25, TTC37, TTC4, TTC9C, TLL1, TTYH2, TUB, TUBG2, TULP3, TULP4, TUSC3, TUT4, TVP23A, TXNIP, TYK2, TYRO3, U2AF1//U2AF1L5, UBAP2L, UBE2L6, UBE2R2, UBL3, UBQLN2, UBQLN4, UCN, UFC1, UFL1, UHMK1, UHRF2, ULK2, UNC119B, UPK2, USP11, USP20, USP3, USP3-AS1, USP30, USPL1, UVRAG, UXT, VAMP3, VAMP5, VASH1, VAX2, VEZF1, VIM, VIPAS39, VPS13C, VPS16, VPS28, VPS33B-DT, VPS9D1, VSTM2L, VTN, VWA5A, WASF3, WBP1, WDFY3-AS2, WDR13, WDR26, WDR27, WDR31, WDR54, WDR60, WDR66, WDR88, WDTC1, WDYHVI, WHRN, WIPF1, WIPF2, WLS, WNT3//LOC101929777, WNT5A, WNT8A, WRB, WSB1, WWTR1, XKR5, XKR7, XPNPEP1, XRCC1, XRN1, YAF2, YAP1, YIPF5, YIPF6, YPEL1, YPEL2, YPEL5, YWHA, YWHAH, YY1, ZBTB10, ZBTB21, ZBTB25, ZBTB26, ZBTB41, ZBTB5, ZBTB7C, ZC3H11A//ZBED6, ZC3H6, ZC3HAV1L, ZCCHC14, ZCCHC24, ZDHHC18, ZDHHC4, ZDHHC9, ZEB2-AS1, ZFAND3, ZFAS1, ZFC3H1, ZFP1, ZFP14, ZFP2, ZFP36L2, ZFP90, ZFP91, ZFYVE1, ZIC2, ZIC3, ZKSCAN1, ZKSCAN2, ZKSCAN4, ZKSCAN8, ZMYM3, ZMYND10, ZMYND12, ZNF106, ZNF12, ZNF136, ZNF148, ZNF182, ZNF2, ZNF227, ZNF236, ZNF25, ZNF250, ZNF251, ZNF264, ZNF276, ZNF316, ZNF322, ZNF324B, ZNF329, ZNF333, ZNF343, ZNF346, ZNF354C, ZNF385A, ZNF385C//C17orf113, ZNF404, ZNF423, ZNF436, ZNF438, ZNF441, ZNF460-AS1, ZNF467, ZNF474, ZNF484, ZNF497, ZNF503, ZNF503-AS2, ZNF516, ZNF521, ZNF529, ZNF548, ZNF554, ZNF555, ZNF561, ZNF571, ZNF585A, ZNF599, ZNF624, ZNF627, ZNF629, ZNF654, ZNF664, ZNF678, ZNF692, ZNF695, ZNF699, ZNF70, ZNF703, ZNF704, ZNF709, ZNF710, ZNF710-AS1, ZNF764, ZNF805, ZNF816, ZNF823, ZNF843, ZNF85, ZNF862, ZNRF3, ZRANB2-AS2, ZSCAN1, ZYG11B</p>
3	<p>ABCE1, ABCG2, ABCG4, ABI3BP, ACADL, ACAN, ACAP3, ACHE, ACKR3, ACP4, ACSBG1, ADAM19, ADAM9, ADAMTS1, ADAMTS12, ADAMTS17, ADAMTS18, ADAMTSL5, ADAP2, ADCY9, ADCYAP1R1, ADGRA2, ADGRD1, ADGRG6, ADGRL4, ADRA1D, ADRA2A, AFAP1L1, AGPAT5, AGRN, AHCTF1, AHNK2, AK3, AKR1C1, ALDH1A3, ALDH1L2, ALDH8A1, ALDOA, ALK, ALOX12, ALPK2, ALPL, ANGPT2, ANGPTL2, ANKRD1, ANKRD33B, ANKRD50, ANXA1, ANXA4, ANXA5, AP5B1, APLN, APOA1, APOL6, APOO, AREG, ARHGAP11A, ARHGAP17, ARHGAP26, ARHGAP28, ARHGAP30, ARHGAP36, ARHGAP42, ARHGDI, ARHGDIB,</p>

Continuation of appendix A

ARHGEF12, ARHGEF3, ARHGEF6, ARPC2, ASAH1, ASAP1, ASCC3, ATAD3C, ATF3, ATP12A, ATP2B2, ATP5F1C, ATP6V0D2, ATP6VIC1, ATRNL1, B4GALNT1, B4GALT1, B4GALT5, BAALC, BAALC-AS1, BACE2, BAG2, BAG3, BCAR3//MIG7, BCL3, BCYRN1, BHMGI, BLOC1S3, BMP1, BMP8B, BRK1, BTG3, C16orf72, C1GALT1, C1QL2, C1QTNF1, CIR, C20orf144, C22orf23, C2CD4C, C2orf72, C5orf56, C8orf34, CA8, CACNG5, CALHM2, CALHM5, CAMTA2, CAP1, CAPN9, CARD14, CARD6, CAV1, CAV2, CAVIN1, CBL, CCDC102B, CCDC93, CCNO, CCSER2, CD109, CD300LG, CD59, CD81, CD82, CDC14B, CDC42BPG, CDC42EP1, CDC42EP3, CDC42EP4, CDH11, CDIPTOSP, CDK2, CDK6, CDKL5, CDKN1A, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2D, CDR2, CELP, CEMIP, CEP104, CEP85L, CHI3L2, CHPT1, CHRNA7, CHST1, CHST15, CHST3, CISH, CIT, CLDND1, CLEC2L, CLIC1, CLIC2, CLIP2, CLU, CNN3, CNTNAP2, COL15A1, COL5A2, COL5A3, COL8A1, CORIN, COTL1, COX1, COX4I2, COX7A1, CPEB2, CPNE5, CPOX, CPXM2, CREB3L1, CREB5, CRHBP, CRIM1, CRISPLD2, CRYBB1, CRYBG3, CS, CSMD3, CSPG4, CSRNPI, CTF1, CTNNB1, CTTN, CTTNBP2, CXCL1, CXCL14, CXCL16, CXCL2, CXCL5, CYB5R1, CYGB, CYP11A1, CYTH3, DAAM2, DAZAP2, DAZL, DCAF10, DCBLD1, DCTN2, DENND2D, DENND3, DEPP1, DERL1, DGKA, DHH, DHRS7, DIO3, DIP2C, DIRAS2, DLL4, DNAH10, DNAJB1, DNAJC3, DNAJC6, DNAJC8, DNASE1L2, DOK6, DRAM1, DRD2, DSC3, DSCAM, DTX4, DUOX2, DUSP14, DUSP16, DUSP8, DYNLL2, DYNLT1, DYRK2, EBF1, EBI3, EDEM1, EDNRB, EEPD1, EFNA1, EHBP1L1, EI24, EIF4A2, ELK3, ELL2, EMC7, EMILIN2, EMP1, EMP3, EN2, ENDOD1, ENTPD2, EP400, EPAS1, EPB41L4A-DT, EPHA3, EPSTI1, ERAP2, ERFE, ERO1A, ESRRB, ETS1, ETV7, EVA1A, EVA1C, EXOC8, EXPH5, F2RL1, F3, F5, FABP7, FAM110D, FAM114A1, FAM160A1, FAM184B, FAM210A, FAM219A, FAM234B, FAM43A, FAM49A, FAM50A, FAM57A, FAM91A1, FAR2P2, FARP2, FAXC, FBH1, FBLIM1, FBXL7, FBXO3, FBXO45, FEM1C, FGD5, FHL3, FJX1, FKBP14, FLII, FLOT1, FLT1, FLT4, FMN1, FN1, FNBP1, FNDC3B, FOSL1, FOSL2, FOXB2, FOXC1, FOXC2, FOXI1, FOXI3, FOXJ2, FOXL1, FOXN4, FOXQ1, FRMD4A, FRMD4B, FUBP3, FZD6, GABBR2, GABRP, GADD45A, GADD45G, GANAB, GAS6, GAS7, GATA3, GBGT1, GBX2, GDNF, GDNF-AS1, GFM1, GFPT1, GFRA2, GIPR, GJC1, GLG1, GLP1R, GNA11, GNAL, GNAO1, GNB4, GNLY, GPR137B, GPR139, GPR150, GPR157, GPR4, GPR68, GRID1, GRIP2, GRM8, GSGIL, GUCY1A1, GUCY1A2, GUCY1B1, GXYLT1, HACD3, HACD4, HBEGF, HCN3, HEBP1, HECA, HERC2, HERPUD1, HES2, HES4, HES5, HEXB, HEY1, HEYL, HIC1, HIF1A, HIGD1B, HIPK3, HIST1H2BK, HIVEP2, HKDC1, HMGB2, HOPX, HPSE2, HRH1, HS6ST1, HSD17B2, HSPA4L, HSPB8, HUNK, IBTK, ICE1, ID4, IDH3A, IER3, IFFO2, IGF1R, IGF2BP1, IGSF3, IL11, IL12A, IL13RA1, IL15RA, IL1R1, IL1RAP, IL4I1, IL7, IMPAD1, INHBB, INPP1, INPP5D, INSYN2, IPO7, IPO8, IREB2, ITCH, ITGA1, ITGA3, ITGA9, ITGB1, ITGB3, ITPKC, JAG1, JAK1, JAK2, JCAD, JMJD6, JPH2, KAZN, KCNA1, KCNA5, KCNA6//GALNT8, KCNAB1, KCNC1, KCNF1, KCNH1, KCNH8, KCNIP3, KCNJ1, KCNJ5, KCNJ8, KCNK17, KCNN3, KCNQ4, KCNT1, KCTD12, KERA, KIAA1147, KIAA1191, KIAA1549L, KIF13A, KIF13B, KIFC3, KIRRELI, KITLG, KLC2, KLF6, KLF7, KLHL29, KLHL3, KLHL6, KPNA1, KREMEN1, KRT16, KTN1, LICAM, LAMA4, LAMC1, LAMP2, LAMP3, LAMP5, LARP6, LAYN, LBH, LBX2, LEO1, LGALS3, LGALS9, LGALSL, LGI2, LHCGR, LHFPL6, LIF, LIFR, LIMCH1, LIMK2, LINC00310,

Continuation of appendix A

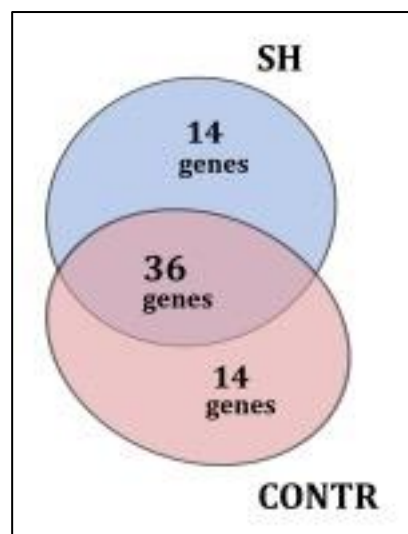
<p>LINC00475, LINC00698, LINC00857, LINC00941, LINC01198, LINC01291, LIPA, LIPG, LMCD1, LOC100505635, LOC100506885, LOC100507560, LOC101928100, LOC101929524, LOC101929798, LOC102724474, LOC102724566, LOC102724957, LOC105369201, LOC105376323, LOC105376567, LOC107986197, LOC152048, LOC283922, LOC400464, LOC729732, LONRF1, LOX, LPAL2, LPGAT1, LRCH1, LRP10, LRP1B, LRRC10B, LRRC25, LRRC32, LRRC59, LSP1, LSS, LTBP2, LTBR, LTNI, LURAP1, LURAP1L, LYN, LYSMD3, MAF, MAFB, MAFG, MAFK, MAGIX, MAL, MAML2, MAP3K8, MAPK1, MAPK11, MAPK8IP2, MARCKS, MASP1, MCAM, MCL1, MCOLN3, ME1, MECOM, MEGF8, MEST, METRNL, MGAT4B, MICAL3, MID2, MIR4435-2HG, MIR573, MIR9-3HG, MISP, MKI67, MLC1, MLF2, MLX, MMD, MMP19, MMP7, MMP9, MOCS1, MON1B, MOV10L1, MPPED1, MRGPRF, MSLN, MSMO1, MST1L, MTCPI, MTDH, MTMR10, MTRF1L, MXRA8, MYL12A, MYL12B, MYL3, MYO10, MYO16, MYO1F, MYO5B, MYOM2, MYORG, MYPOP, MYT1, NACAD, NACC2, NALCN, NAPG, NAT1, NAT8L, NCKAP1, NCOR2, NDFIPI1, NDUFS1, NECAP1, NECTIN4, NEURL1B, NFATC1, NFIC, NFKB1, NFKBIA, NFX1, NFXL1, NID1, NIPAL2, NMD3, NMUR1, NOLC1, NOMO3, NORAD, NOV, NOX1, NPC1, NR3C1, NRARP, NRP1, NRSN2, NSMAF, NT5E, NTN3, NUDT4//NUDT4B, NUP205, NXN, OAF, OLFM4, OSBPL11, OSBPL3, OSBPL6, OSGIN1, OSMR, OSRI, OSTF1, OSTM1, OTUD4, OTUD7B, P2RY11, P2RY2, PABPC4, PAEP, PAF1, PALM2-AKAP2, PAQR3, PARD6G, PARM1, PARP14, PCDH10, PCDHA8, PCDHGA11, PCDHGA12, PCNP, PCSK5, PCYT1A, PDE1C, PDE3A, PDE4C, PDE4C, PDE6C, PDGFB, PDHA1, PDIA2, PDK4, PDP1, PDZD2, PELI1, PFDN1, PFKFB2, PGM5, PHF11, PHF19, PHLDA3, PHLPP2, PHRF1, PI4KA, PIGH, PIGZ, PIK3CA, PITRM1, PLA2G2A, PLAC8, PLAU, PLB1, PLBD2, PLCD3, PLEKHA2, PLEKHH3, PLEKHM1, PLEKHN1, PLK2, PLLP, PLP2, PLVAP, PLXDC1, PLXNA2, PNMA6A, POLH, POLR1C, POM121C, POMC, PON3, POPDC2, POPDC3, PPFIA1, PPIC, PPP1CB, PPP1R12C, PPP1R16B, PPP1R3D, PPP2R5B, PPP3CC, PRAG1, PRCD, PRDM16, PRKAR2A, PRR16, PRRG1, PRXL2C, PSMB10, PSME4, PSMF1, PTGDR2, PTGFRN, PTGIS, PTH1R, PTHLH, PTPN12, PTPN18, PTPN3, PTPRE, PTPRK, PTPRU, PVR, PXDN, PXDNL, PXYLP1, PYGL, PZP, RAB11FIP1, RAB32, RAB5C, RAB6A, RAB8B, RABEP1, RABGGTB, RAI14, RALGAPB, RASA3, RASGEF1C, RASL10A, RASSF4, RASSF5, RCAN1, RCL1, RELB, REM2, RFK, RFTN1, RGCC, RGS11, RGS19, RGS20, RGS4, RGS6, RHBDF2, RHCG, RHOBTB3, RHOC, RHOG, RHOQ, RHOV, RHPN2, RIN3, RIPK4, RIPOR3, RLN1, RMDN3, RNF128, RNF144A, RNF168, RNF180, RNF19A, RNF19B, RNF6, RNH1, RNPEPL1, ROPN1B, ROPN1L, RPS3A, RPS6KA2, RRAGD, RUFY3, RUNX1//LOC100506403, RUNX3, S100A3, SAMD12, SAR1B, SATL1//LOC105369163, SAYSD1, SCG2, SCGB1A1, SCGB3A2, SCTR, SDC1, SDC2, SEC23A, SEC24A, SEC61A1, SELPLG, SENP2, SEPT11, SEPT8, SERHL2, SERINC3, SERP1, SERPINB6, SERPINB9, SERPINE1, SESN2, SFRP2, SFTA1P, SGPP1, SGTB, SH3BP4, SH3KBP1, SH3PXD2B, SH3TC2, SHISA3, SLC11A1, SLC12A2, SLC13A5, SLC16A7, SLC1A4, SLC22A23, SLC23A2, SLC25A18, SLC25A20, SLC25A32, SLC25A51, SLC2A1, SLC2A6, SLC34A2, SLC35E1, SLC35F2, SLC35F6, SLC35G2, SLC36A1, SLC45A4, SLC46A3, SLC4A2, SLC50A1, SLC6A17, SLC7A1, SLC7A10, SLC7A5, SLC7A7, SLC8A1, SLC9A2, SLC9A9, SLCO2B1, SLFN12, SLITRK2, SMARCA5, SMOX, SMTNL2, SMURF2, SNORA73B, SNRK, SNTG2, SNX10,</p>
--

Continuation of appendix A

<p>SNX13, SNX19, SNX27, SOCS7, SOST, SOWAHB, SOX18, SOX7, SOX9, SP140L, SPATA8, SPHK1, SPINK1, SPON1, SPON2//LOC100130872, SPPL3, SPTLC3, SQSTM1, SRL, SRPRA, SRPX, SSH1, SSR2, SSR3, ST3GAL1, ST5, STAM2, STARD5, STIP1, STK10, STK17B, STK26, STK32B, STK40, STMN2, STX3, SULT4A1, SYN1, SYNM, TACC1, TAF1D, TAGLN2, TBX18, TBX3, TCIRG1, TCN1, TDO2, TEK, TENT5C, TESK1, TEX14, TEX29, TFF1, TFPI, TFRC, TGFB1, TGFB111, TGM1, TGM2, THBD, THRB, TIMM21, TIMP2, TINF2, TKTL1, TM4SF1, TM4SF19, TM4SF19-AS1, TM9SF3, TMBIM1, TMC4, TMCC2, TMED5, TMED7, TMEM100, TMEM109, TMEM117, TMEM127, TMEM131L, TMEM135, TMEM144, TMEM154, TMEM171, TMEM184A, TMEM200B, TMEM229A, TMEM255B, TMEM40, TMEM43, TMEM51, TMEM51-AS1, TMEM63C, TMEM64, TMEM71, TMEM9B, TMOD1, TMOD3//LOC112268148, TMSB4X, TMX3, TNFAIP2, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF21, TNFSF10, TNFSF4, TNNT3, TNS2, TOMM70, TOR1B, TOX2, TP53INP2, TPBGL, TPCN1, TPCN2, TPPP, TPRG1, TRAPPC6B, TRH, TRIB1, TRIM22, TRIM26, TRIM45, TRIM47, TRIM69//LOC100419583, TRIM7, TRPC6, TRPS1, TSPAN1, TTF2, TTYH1, TVP23B, TXNDC11, UACA, UAP1L1, UBA2, UBASH3B, UBE2D2, UBE2I, UBE2Q2P1, UBE3C, UGGT1, UNC5B, UPB1, UPP1, URB1, USP7, VAMP8, VAT1L, VAV3, VCAM1, VCPIP1, VDAC1, VEPH1, VGLL2, VPS13D, VPS18, VPS37A, VSIR, VSTM4, WFDC2, WFIKKN2, WNK4, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT9A, WWP1, XKR4, XPO5, XRN2, YBX3, ZBTB42, ZCCHC12, ZDHHC1, ZFAND5, ZFP36, ZHX2, ZNF207, ZNF750, ZYX</p>

Appendix B.

Venn diagram of overexpressed genes in the NICD group, obtained by comparing the NICD group with the SH and CONTR groups, top 50 genes. The data obtained show that the prevailing majority of overexpressed genes in these two comparisons coincide.



Appendix C.

Lists of overexpressed and down-regulated genes from comparison groups.

Comparison group	Condition	List of genes
CONTR-NICD	Up-regulated	<p><i>LAMP5, MMP9, CCN3, SLC1A4, FLT1, RUNX3, RGS4, PLA2G2A, PLXDC1, CORIN, OLFML2B, ACSBG1, RHOV, RHCG, LBH, ANGPT2, MCAM, CHST1, KCNA5, MAFB, SFTA1P, GABRP, GDNF, POMC, MASP1, ALPK2, HBEGF, DEPP1, SLC6A12, HCK, MYORG, TCN1, VAMP8, PPEF1, CYTOR, CCDC192, CHI3L2, DAAM2, VEPH1, ADAMTS18, AGT, HSPB8, TMEM100, ENDOD1, MIR4435-2HG, HEY1, EVA1C, IL1R1, SERPINB9, EMP1, CPXM2, SLC45A4, MME, OLFM4, ZNF750, LIFR, CACNA2D1, PPIC, OSMR, RGS6, IRF4, CXCL5, EMILIN2, ADAMTS15, TRPC6, ANKRD1, NRP1, FOXC1, PNPLA5, KCNN3, ENTPD2, FOXQ1, TNFAIP3, ATP6V0D2, EFHD1, IFFO2, TAL1, SMTNL2, ID4, CRISPLD2, ADGRA2, TKTL1, LPL, IRF8, JAK1, LAYN, SGK1, NGF, LGALS3, CASP17P, GPR139, DTX1, EBF1, PDE3A, EPHX1, SCGB3A2, MCHR1, CREB5, SRPX, SNAI2, KCNK17, FAM49A, MMP13, RGCC, PDZD2, TFF1, PAPSS2, OAF, KERA, PTH1R, ATP12A, ADAMTSL4, CAV2, ANKRD33B, TRIML2, HES5, PLD1, ARHGAP42, GFRA2, IL12A, EFNA1, SFXN3, NECTIN4, SORBS2, TGFB11I, GLP1R, SLC7A5, EPHA3, FURIN, HEYL, FN1, COL5A3, UAP1L1, KIAA1549L, INHBB, WFDC2, MPPED1, LAMC2, PGM5, ST14, MMP7, CDC42EP1, NRARP, SH3KBP1, MGAT4C, FHDC1, PCDH10, LRRC10B, CD82, ITGB3, TUBA4A, IGFBP3, FOXI1, MXRA8, TNNT3, IFI16, AFAP1L2, SPON1, CAV1, IRF6, PMEPA1, LRRC32, COL8A1, GUCY1B1, KCNA1, KRT16, ARHGEF28, MYOM2, CACNG5, SCGB1A1, AFAP1L1, EPAS1, VAV3, EXPH5, CDH11, STMN2, PROK1, USP43, FBLN5, KCNE4, GABBR2, ETS1, SSUH2, KRT6B, SVIL, SOX9, LOX, CYGB, F2RL1, FABP7, ALDH1A3, MMP14, ITGA1, MPP1, SOX18, GAS7, B3GNT7, ACKR3, PELI1, EOGT, SRL, CISH, GPC1, TGFB1, RFTN1, CABP1, OSTF1, PDZK1IP1, IGFL1, GLIS3, TNFSF10, COBLL1, CALHM5, ADAP2, SLC13A5, SHISA3, LAMA4, KRT6A, ADGRF2, HTR1F, NOS1, PLP2, SAT1, ITM2A, FRMD4A, ADAMTS12, IGF2, COL5A1, EEPD1, LAMC3, ITIH5, ERFE, SCG2, MTIX, JAK2, RASSF4, MCTP1, CSPG4, TNFRSF21, BHMGI, CAPN9, RASGRP1, SLC7A7, NTSR2, NOTCH1, THSD4, PLA2G5, CXCL12, NIPAL1, KRT14, LOC101929798, SLFN13, LMNA, SPINK1, DUSP15, ALDH1A2, TAGLN2, NIBAN1, TMEM63C, PPM1H, PLEKHG1, BBS5, LPGAT1, GATA3, HSD17B2, KRT5, JPH2, TM4SF19, IFIT3, ADAM19, DENND2B, SPATA8, MYC, STX3, SAMD12, CCR1, DPF3, WNT7B, CPEB2, MBP, IFIT2, TNS2, SPARCL1, HR, PAEP, NALCN, GRIP2, TEK, COL5A2, DMD, ARHGEF3, STK32B, CDKN2B, CABLES1, ELF4, LGI2, ERO1A, FAM234B, GJA4, IER3, CXCL14, FOSL2, MBOAT1, GRIN2D, TMBIM1, HRH1, KALRN, PMAIP1, ALDH1L2, PALMD, FZD1, KCNF1, DKK3,</i></p>

Continuation of appendix C

		<p><i>IL1RAP, JCAD, S100A3, LSP1, SOCS2, HAPLN3, CRHBP, APOA1, MECOM, KCNQ4, TRIM22, UNC5B, CDC14B, LINC00461, PLCXD3, LINC00346, CLIP2, CHST15, SYK, TMEM51, GABRB3, PLEKHA2, ITGA9, CRYBB1, AFP, ALOX12, HSD11B2, BCL11A, ANKRD50, TPPP, NR3C1, MMP25, RARRES2, HES2, SERPINB6, PTGIS, TMEM144, NEURL1B, SLC22A23, LYST, FGD5, ELL2, ADGRB3, LINC01198, MYL3, MEGF10, KIAA0040, SPON2, ROBO2, SLCO2B1, TENT5C, ITGA3, RHBDL3, ESRG, LINC00698, MMP12, F12, IL15RA, FOXS1, PLXNA2, NMNAT2, MAPK13, PCSK5, C2CD4C, SLIT3, SPATS2L, IFNGR1, LINC01278, ANXA2, PDE1C, DSC3, FYB1, CLIC2, SLC8A1, PRNP, EBF4, THRB, THBD, NUDT4, CXCL1, MYOZ3, TGM2, PEAR1, ADGRF4, SYP, IL10RA, TBX18, BNC1, SLC25A18, SNRK, TRIB3, CEMIP, XPO5, CAPG, TMEM163, JAG1, LYSMD3, VCAM1, PRDM16, MPPED2, PLXND1, MARC2, TMEM64, SORBS1, ADAM9, UPP1, ZFP36, TTYH1, TMEM268, RNF128, CSMD3, LCK, DENND2D, PHLDA2, EDNRB, CCDC102B, KRT17, IL32, PLAT, ARHGEF6, DIRAS2, KLF9, NKAPL, CD44, ADGRD1, LOC101927359, PPARGC1B, ADORA2B, CDH1, MAFK, SLC12A2, KDR, SH2B2, TRIM47, ESYT3, FJX1, P2RY2, FOSL1, DOCK11, TCIRG1, NID1, CDC42EP3, GBP1, ACSL6, SLC7A10, SLC46A3, MYO3A, ASAH1, VSNL1, RNF168, ARHGAP28, PRR16, COL18A1, MYO5B, COX4I2, PHLDA1, LIPG, TES, EMX2OS, KCNAB1, TRIB1, PLAAT5, SHANK2, PLK2, IRF1, CHPF, LPAR3, MAF, TRAF3IP2, KLHL3, FAM241A, ESRP2, WNT9A, CTTN, GBX2, ANK1, CD109, SYTL3, RPS6KA2, DAAM2-AS1, OSGINI, TEC, CD59, NFATC1, FAM114A1, DUSP5, CGNL1, RCL1, CASS4, PTGFRN, KLHL6, KRT75, EN2, LMCD1, LINC02154, SESN2, OSBPL3, FRMD4B, DHRS3, POU2AF1, LINC01168, EEF1A2, GUCY1A2, KLHL29, IDH3A, ADARB2, NXN, C15orf39, STAT5A, DIRAS1, GRID1, GSG1L, MOCOS, TP53AIP1, RHOC, PDGFRB, ESR1</i></p>
	Down-regulated	<p><i>TNNC1, EGR2, MAP2, C6orf141, CALB1, PRMT8, KLHDC8A, S100B, NR2F2, CAMK2A, TNP1, KCNK12, NRGN, TFAP2B, PRRT2, EFCC1, TFDP2, SCD5, C6orf118, FGF10, LOC105375304, PLEKHA7, MAP6, FAM92B, PIMREG, TSPAN7, LINC00476, FLRT3, TMEM106C, PIK3R3, EID2B</i></p>
SH-NICD	Up-regulated	<p><i>LAMP5, PLXDC1, MMP9, CORIN, PLA2G2A, ACSBG1, CCN3, RHOV, GABRP, TAL1, KCNA5, LBH, TCN1, OLFML2B, RGS4, OLFM4, RUNX3, POMC, SFTA1P, MYORG, CCDC192, PPEF1, CYTOR, DAAM2, MAFB, HEY1, DEPPI, EVA1C, DUSP15, ANGPT2, VEPH1, KCNN3, ADAMTS18, HCK, TMEM100, MMP13, LIFR, KCNE4, MCAM, CPXM2, SLC1A4, SLC45A4, RGS6, CHST1, ILIR1, DTX1, RFTN1, FOXC1, PLD1, SLC6A12, KRT17, EFNA1, LAYN, HES5, ADGRA2, IRF4, TKTL1, CASP17P, ACKR3, GADD45G, PMEPA1, CHI3L2, EFHD1, EBF1, TFF1, MYOM2, ENTPD2, IL12A, PNPLA5, PDZD2, FLT1, GDNF, PTH1R, MIR4435-2HG, GPR139, TRPC6, KCNK17, TNFAIP3, KERA, FOXQ1, ENDOD1, INHBB, RHCG, ZNF750, EMILIN2, PLCXD3, SMTNL2, EPHX1, NRP1,</i></p>

Continuation of appendix C

	<p> <i>HBEGF, SCGB1A1, IRF8, SCGB3A2, FOXI1, NOS1, BBS5, SPON1, EBF4, MMP7, MGAT4C, MXRA8, MME, MCHR1, PCDH10, EPHA3, ITGB3, ID4, CACNG5, FABP7, FN1, HTR1F, HEYL, RASGRP1, PROK1, LRRC10B, MPPED1, ADAMTS15, CRISPLD2, ABCA4, ADAP2, FZD1, JPH2, OSMR, KRT16, VAMP8, SERPINB9, SHC2, PPIC, KRT14, GAS7, ARHGEF28, NGF, IGF2, HSPB8, LINC00461, NRARP, GLP1R, IGFL1, TNFSF10, IFFO2, HR, CISH, LAMA4, CLDN5, PGM5, CDH11, MASP1, KRT6B, SCG2, HSD17B2, DMD, PDE3A, LAMC2, NTSR2, SEMA5A, LINC01198, PLA2G5, GUCY1B1, GFRA2, SRL, HAPLN3, MTIX, COL5A1, RASSF4, JAK2, KRT6A, B3GNT7, SH3KBP1, PDZK1IP1, AFAP1L2, FBLN5, LRRC32, THBD, TRIM55, LAMC3, HRH1, GLIS3, TM4SF19, IFI16, SNAI2, CCR1, TNNT3, ALDH1A2, SOX18, SHISA3, BHMGI, C2CD4C, IRF6, SPARCL1, COL8A1, CGNL1, FAM107A, EXPH5, CRYBB1, ADAMTS12, PALMD, CACNA2D1, THSD4, MBP, FAM49A, FHDC1, SMOC2, NALCN, VSTM4, PELI1, JAK1, SPATA8, KRT5, ITGA9, STMN2, SVIL, NOTCH1, CEMIP, DPF3, GPC1, TTYH1, ANKRD33B, SNTG2, IFIT2, P2RY2, WNT7B, TMEM63C, LPL, KRT75, ST14, POPDC2, SLC22A5, MCTP1, SLC22A23, SH2B2, GJA4, TGFB1I1, HES4, USP43, GABBR2, UAP1L1, TENM4, PLEKHG1, ADAMTSL4, MMP14, RGCC, MYL3, IFIT3, RNF152, GATA3, KIAA1549L, LINC00346, CXCL5, SLC7A7, LMCD1, LOC101929798, SLIT3, KLHL29, SYTL3, MMP12, CXCL12, CYGB, KLHL3, TC2N, NECTIN4, ADRA2A, NMNAT2, ADGRB3, PLXNA2, FAM234B, ALPK2, COBLL1, CAPN6, CAPN9, ADGRF2, SOX9, CD82, SEMA5B, AGT, STK32B, PAPSS2, PAEP, CXCL2, XPO5, POU2AF1, ITGA1, IL10RA, PLEKHF1, BMPR1B, C8orf34, KALRN, TMEM163, SLC13A5, ADGRD1, TMBIM1, SAT1, OSGIN1, STX3, CABP1, FURIN, MATK, TOX2, IFNGR1, MEGF10, IRF1, JCAD, NKAPL, EEPD1, DIRAS1, RPS6KA2, TMEM144, CXCL1, CALHM5, MAF, PPM1H, FAM110D, SLC46A3, DKK3, CLIP2, TNFRSF9, JAG1, KCNA1, WFDC2, KCNQ4, LPGAT1, ACSL6, FOXF1, SAMD12, C11orf88, GBP1, ADGRF4, GRIN2D, DAAM2-AS1, OSTF1, SLC25A18, DENND2B, TMOD1, WNT9A, CTTNBP2, EMP1, EMX2OS, FBXL7, ARHGAP42, KCNAB1, CDH1, GPR55, ARHGAP28, TMEM158, NFATC1, CDC42EP1, HPSE2, SLC38A8, PTGIS, LOC101927359, SERHL2, IL32, CAV2, KCTD12, SLCO2B1, SPINK1, C3AR1, RNH1, NAV1, PRR16, LRRC55, ALOX12, VAV3, EPHB6, HES2, CD59, FJX1, LINC01168, ERO1A, NACAD, LOC105370969, LGALS3, DENND2D, MOCS1, NEURL1B, HS6ST1, NUDT4, VCAM1, EN2, SRPX, PRODH, NIPAL1, ESR1, MMP17, CTNND1, WFIKKN2, CASS4, LPAR3, ADCYAP1R1, CFAP65, DHH, MOCOS, LIG2, PDE1C, PEAR1, PLEKHA2, CCDC102B, DIPK1C, TGFB1, MYC, TENT5C, EDNRB, CDC14B, MYO3A, OAF, PLEKHG4B, ZDHHC1, FOXS1, LOX, BNC1, TP53AIP1, SHANK2, KCNG2, FOXC2, SPSB1, MYOSLID, C6orf223, SFXN3, SLC8A1, STAT5A, MAP3K8, MTNR1B, MYO5B, CLIC2, GSX1, FAM110B, KLF9,</i> </p>
--	--

Continuation of appendix C

		<i>SLC9A9, FYB1, EPB41L1, CIT, AFAP1L1, CREB5, LRFN1, TNFSF4, EOGT, TBX18, SSUH2, PRDM16, MS4A15, LINC01278, GPR157, AFP, VWA2, TMEM37, DUSP22, LOC101929130, FRMD4A, TNFRSF21, MBOAT1, OTOP2, TDO2, MARC2, RAB32, USH1G, HOPX, OPHN1, SOCS2-AS1, TMEM51, MOBP, EDNRA, ERFE, SPPL3, TSPAN18</i>
	Down-regulated	<i>TRIM55, CDH6, EGR2, BMPR1B, NEFM, METTL7B, APLN, FBXO32, MAP6, GPR55, LRRC55, CMKLR1, DUSP4, TAGLN, LRRC75A, PTX3, GAP43, DUSP2, CD52, ANGPT1, NRG1, SCD5, GNG11, MATN2, CPLX2, C5, RARB, C2orf92, LOC283731</i>
CONTR-SH	Up-regulated	<i>SERPINE1</i>
	Down-regulated	-
SH-DAPT	Up-regulated	<i>FOXA2, PDZRN3, FOXJ1, SPOCK2, INSR, PTCH1, GABRG3, SYNDIG1, LINC00261, RELN, TFAP2B, VWA5A, SLC22A8, DEPTOR, FREM1, NKX3-2, STARD4-AS1, PLCXD3, PDGFD, REC8</i>
	Down-regulated	<i>AHNAK2, TNFRSF10A, APLN, CD70, ANK1, FOSL1, FBXO32, LINC00678, SERPINE1, EMP1, CDKN1A, IL6R, ST14, IL11, CAV1, CCR7, VAT1L, TNFSF9, AEN, HES2, DUSP5, TRIM22, TNFRSF12A, CXCL14, CD44, TAGLN, TMEM132B, ATAD3B, COL5A3, LGALS3, HERC5, ZNF385A, ANXA1, PTX3, INPP5D, SMS, MTHFD2, TFPI2, OLIG3, NECTIN4, TNFRSF10D, MAFF, CDCP1, NEFM, F2RL1, PHLDA3, TRIML2, LRRC15, THBS2, LIF, HES4</i>