

Церебральные органоиды – перспективная модель в клеточных технологиях

Т.А. Шнайдер

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Развитие головного мозга человека представляет собой сложный многоэтапный процесс, включающий образование различных типов нейральных клеток и их взаимодействия. Многие фундаментальные механизмы нейрогенеза установлены благодаря изучению модельных животных. Однако значительные структурные различия головного мозга по сравнению с другими животными не позволяют рассмотреть все аспекты формирования головного мозга у человека, которые могут играть решающую роль для развития его уникальных когнитивных способностей. Новая технология трехмерных церебральных органоидов открывает исследователям уникальную возможность моделировать ранние этапы нейрогенеза человека. В обзоре рассматриваются технология получения трехмерных церебральных органоидов, примеры ее успешного внедрения в фундаментальные и прикладные исследования, имеющиеся проблемы, а также перспективы ее развития.

Ключевые слова: нейрогенез; церебральные органоиды; клеточные технологии.

Cerebral organoids: a promising model in cellular technologies

T.A. Shnaider

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The development of the human brain is a complex multi-stage process including the formation of various types of neural cells and their interactions. Many fundamental mechanisms of neurogenesis have been established due to the studying of model animals. However, significant differences in the brain structure compared to other animals do not allow considering all aspects of the human brain formation, which could play the main role in the development of unique cognitive abilities for human. Four years ago, Lancaster's group elaborated human pluripotent stem cell-derived three-dimensional cerebral organoid technology, which opened a unique opportunity for researchers to model early stages of human neurogenesis *in vitro*. Cerebral organoids closely remodel many endogenous brain regions with specific cell composition like ventricular zone with radial glia, choroid plexus, and cortical plate with upper and deeper-layer neurons. Moreover, human brain development includes interactions between different brain regions. Generation of hybrid three-dimensional cerebral organoids with different brain region identity allows remodeling some of them, including long-distance neuronal migration or formation of major axonal tracts. In this review, we consider the technology of obtaining human pluripotent stem cell-derived three-dimensional cerebral organoids with different modifications and with different brain region identity. In addition, we discuss successful implementation of this technology in fundamental and applied research like modeling of different neurodevelopmental disorders and drug screening. Finally, we regard existing problems and prospects for development of human pluripotent stem cell-derived three-dimensional cerebral organoid technology.

Key words: neurogenesis; cerebral organoids; cellular technologies.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шнайдер Т.А. Церебральные органоиды – перспективная модель в клеточных технологиях. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):168-178. DOI 10.18699/VJ18.344

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shnaider T.A. Cerebral organoids: a promising model in cellular technologies. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):168-178. DOI 10.18699/VJ18.344 (in Russian)

Человеческий мозг – один из самых сложно устроенных органов у всех животных. Он имеет уникальную клеточную архитектуру и выполняет множество различных функциональных задач. Неудивительно, что исследователей давно интересовали процессы его развития, становления и функционирования, однако недоступность органа для различных экспериментальных манипуляций всегда препятствовала прогрессу в этой области. Многие выдающиеся результаты были получены на модельных животных, прежде всего грызунах и человекообразных обезьянах. Однако значительные различия в строении головного мозга человека и других млекопитающих не позволяют исследовать многие нейробиологические вопросы и проблемы. Стремительное развитие методов клеточной биологии дало возможность реконструировать некоторые аспекты пространственной организации нервной ткани человека и процесса ее дифференцировки. Одним из самых выдающихся достижений последних лет является разработка системы церебральных органоидов (ЦО), позволяющая реконструировать трехмерную цитоархитектонику некоторых отделов головного мозга (Lancaster et al., 2013). Технология ЦО предоставляет абсолютно уникальную возможность воссоздавать начальные этапы развития головного мозга человека и исследовать поведение нервных клеток в условиях, максимально приближенных к *in vivo*. Особую ценность ЦО представляют для изучения патологических изменений фетального головного мозга, вызванных различными хромосомными (Bershteyn et al., 2017; Iefremova et al., 2017) или инфекционными заболеваниями (Qian et al., 2016). Установление молекулярно-генетических и клеточных патологических механизмов многих болезней на модели ЦО может помочь в разработке потенциальных лекарственных препаратов (Li C. et al., 2017) и в конечном итоге служить уникальной системой для их тестирования (Zhou et al., 2017).

Ранние этапы развития головного мозга человека *in vivo*

Человеческий мозг содержит десятки миллионов различных нейронов и глиальных клеток, которые путем сложных взаимодействий обеспечивают его уникальные функции. Такая сложность организации органа проявляется в процессе его развития, который занимает большую часть эмбрионального, а также значительную часть постнатального онтогенеза (Malik et al., 2013). По сравнению с другими группами млекопитающих, прежде всего с ближайшими предками – приматами, относительный размер мозга человека сильно увеличен, а процесс его развития занимает более продолжительный период времени (Geschwind, Rakic, 2013).

Развитие человеческого мозга начинается с формирования из эктодермы зачатка всей центральной нервной системы – нервной пластинки, состоящей из нейроэпителиальных клеток (НЭК), которые дают начало всему разнообразию клеточного состава головного мозга (Götz, Nottner, 2005). Одно из первых и наиболее важных изменений, которое претерпевает нервная пластинка, – ее смыкание с образованием нервной трубки. Впоследствии из сформировавшейся внутри полости будут развиваться желудочки головного мозга. Как и нервная пластинка,

нервная трубка состоит из НЭК, которые представляют собой псевдомногослойный эпителий (рис. 1).

Группа клеток, непосредственно контактирующих с желудочком, называется вентрикулярной зоной (ВЗ). Их пролиферация осуществляется путем симметричного пролиферативного деления (веретено деления ориентировано горизонтально), в результате которого клеточное потомство представляет собой две идентичные НЭК. При таком способе деления увеличивается численность клеточной популяции и происходит пространственное расширение области нейроэпителия. Перед самым началом нейрогенеза НЭК претерпевают некоторые изменения и трансформируются в клетки радиальной глии (РГ), из которой формируются практически все типы нейронов головного мозга (Anthony et al., 2004). Моментом начала нейрогенеза считается возникновение первых нейронов, которые появляются у человека на 5-й – 6-й гестационной неделе (Howard et al., 2008). Их появление вызвано переходом РГ от симметричного пролиферативного деления к асимметричному (веретено деления ориентировано вертикально). При таком типе деления дочерние клетки представлены одной клеткой РГ и одним нейроном или его предшественником (Lancaster, Knoblich, 2012). Образовавшиеся клетки-предшественники теряют свои эпителиальные свойства и мигрируют из ВЗ в направлении базальной стороны нейроэпителия, формируя слой, который называется субвентрикулярной зоной (СВЗ). Отличить данный слой от ВЗ можно по ориентации клеток и экспрессии специфических молекулярных маркеров (Smart et al., 2002; Howard et al., 2008). Клетки-предшественники СВЗ называются промежуточными предшественниками (ПП), поскольку представляют собой переходную стадию между РГ и нейронами (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004). Помимо этой группы клеток, которая у человека, по сравнению с другими животными, сильно увеличена (Smart et al., 2002), в СВЗ располагается другой тип клеток-предшественников – базальная радиальная глия (БРГ) (Fietz et al., 2010). Они образуются также путем деления РГ и переходят к асимметричным делениям, для того чтобы производить нейроны и пополнять свой собственный пул. Тем не менее наличие в СВЗ двух четко делимых популяций клеток-предшественников остается спорным вопросом, поскольку сейчас появляется все больше доказательств того, что ПП и БРГ могут флукутировать в морфологических характеристиках и пролиферативном потенциале (Betizeau et al., 2013). Процесс раннего нейрогенеза заканчивается тем, что все типы нейральных предшественников делятся симметрично и дают начало нейронам, которые мигрируют в сторону базальной мембраны, используя для своего движения отростки радиальной глии. Последовательное появление нейронов глубоких слоев, а затем верхних слоев приводит к формированию шестислойной кортикальной пластинки (КП). Далее наступают поздние этапы нейрогенеза, включающие процессы астроглиогенеза, олигодендрогенеза и васкуляризации.

Получение ЦО

Первые успешные попытки культивирования в условиях *in vitro* клеток живых организмов предприняты более ста лет назад (Harrison, 1906). Для нейробиологии развитие

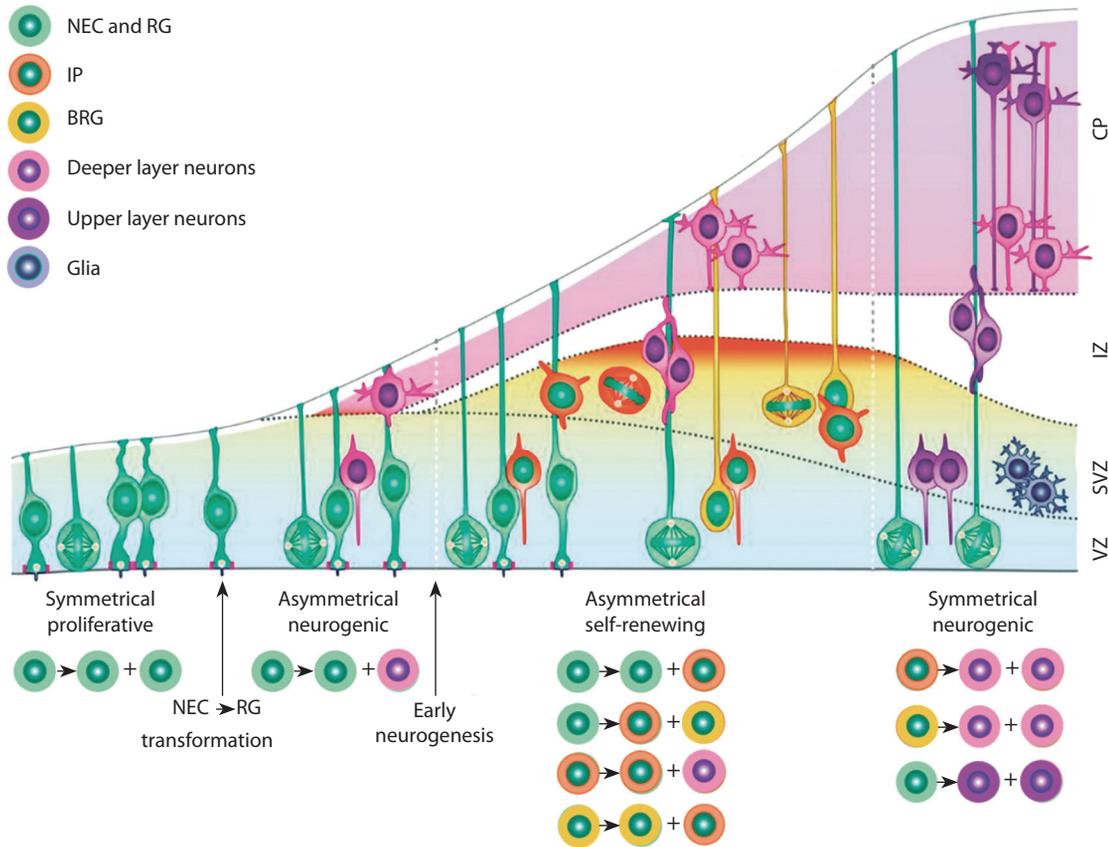


Fig. 1. Early stages of human neurogenesis (simplified). The main types of neural precursor cells and their progeny. Types of division for each cell type are shown according to (Paridaen and Huttner, 2014), with modifications.

NEC, neuroepithelial cells; RG, radial glia; IP, intermediate progenitors; BRG, basal radial glia; VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate.

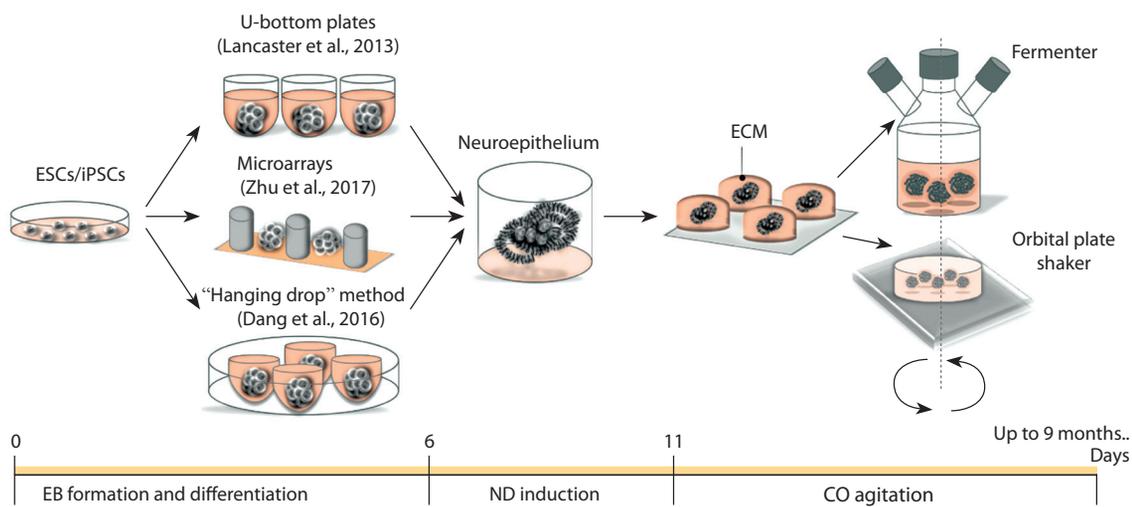


Fig. 2. Raise of cerebral organoids.

The first stage (up to 6 days) is the formation and differentiation of EB into cells of three germ layers. The second stage is the induction of neural differentiation. During this period, expansion of neuroectodermal cells occurs. It is additionally stimulated after the embedding into the extracellular matrix (EM). The final stage is the agitation in the medium for differentiation.

Designations: ESC, embryonic stem cells; iPSCs, induced pluripotent stem cells; EB, embryoid bodies; ECM, extracellular matrix; ND, neural differentiation; COs, cerebral organoid.

методов культивирования нейральных клеток сыграло важную роль в понимании многих процессов их развития и функционирования (Lapham, Markesbery, 1971; Kennedy et al., 1994). Открытие эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) (Evans, Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998), и в особенности индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (Takahashi, Yamanaka, 2006), ознаменовало новый этап в развитии нейробиологии. Исследователям представилась уникальная возможность получать путем дифференцировки любой тип клеток (Ghodsizadeh et al., 2010; Qiu et al., 2011; Mou et al., 2012; Kim et al., 2013; Kang et al., 2016), включая различные типы нейральных клеток (Cai et al., 2010; Sareen et al., 2014; Huang et al., 2017). Изучение ИПСК и их дифференцированных производных от пациентов с соответствующими заболеваниями во многом позволило исследователям продвинуться в понимании их патологических механизмов (Ananiev et al., 2011; Seibler et al., 2011; Chen et al., 2014). Однако, как любая система двухмерных клеточных культур, нейральные клетки, полученные путем дифференцировки ЭСК/ИПСК, не способны воспроизводить трехмерную структуру головного мозга, что, в свою очередь, важно для изучения заболеваний, вызывающих нарушение нормального хода нейрогенеза. Развитие технологии трехмерных ЦО представляет собой уникальную возможность реконструировать первые этапы развития человеческого мозга наиболее приближенно к условиям *in vivo*.

Известно, что нервная система эмбриона развивается из эктодермального зародышевого листка. В условиях *in vitro* из плюрипотентных стволовых клеток человека (ЭСК или ИПСК) можно получить эктодерму с применением технологии эмбрионидных телес (ЭТ), которые имитируют предимплантационную стадию развития эмбриона и процесс гаструляции (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Самый распространенный способ их получения – культивирование в суспензии (Kim et al., 2011) – не является оптимальным, поскольку среди ЭТ наблюдается широкая вариабельность в размере и морфологии, что может негативно сказаться на дифференцировке ЦО. Унифицировать данный этап можно при помощи планшетов с U-образным дном и низкой адгезией (Lancaster et al., 2013), специально разработанных микрочипов (Zhu et al., 2017) или метода «вишней капли» (Dang et al., 2016) (рис. 2).

Для дальнейшего развития эктодермальных клеток в нейроэпителиальные ЭТ перемещаются в среду для индукции нейральной дифференцировки, которая дополнительно препятствует развитию мезодермы и энтодермы (Lancaster, Knoblich, 2014). В качестве исходного типа клеток для формирования ЦО могут быть использованы плюрипотентные клетки, предварительно дифференцированные в НСК (Monzel et al., 2017). При отсутствии базальной мембраны в условиях *in vitro* нейроэпителиальные клетки довольно быстро теряют свою специфическую организацию и уникальные свойства. Для того чтобы предотвратить этот процесс, органоиды необходимо заключать в специальный каркас внеклеточного матрикса, имитирующий базальную мембрану и способствующий дальнейшему разрастанию нейроэктодермы. В качестве такого материала применяются гидрогели (Schwartz et al., 2015; Lindborg et al., 2016) или матригель (Lancaster,

Knoblich, 2014). Ключевой этап в получении ЦО – культивирование в условиях агитации (постоянное перемешивание ростовой среды). Этот элемент крайне важен, поскольку обеспечивает более правильную оксигенацию и распределение питательных веществ во всем органоиде по сравнению со стационарным культивированием, при котором со временем появляется много некротической ткани. Для создания таких условий обычно используются орбитальные шейкеры (Lancaster et al., 2013), биореактор (Lancaster, Knoblich, 2014) или специально разработанные вращающиеся платформы (мини-биореакторы) (Qian et al., 2016). Период культивирования ЦО в зависимости от задач исследователей может длиться до 9 мес. (Lancaster, Knoblich, 2012).

Одно из последних заметных улучшений протокола для получения ЦО появилось в 2017 г. Исследователи совместили трехмерные клеточные культуры с простыми биоинженерными конструкциями. В своей работе они использовали кополимерные микрофибриллы из PLGA в качестве плавающего каркаса для получения эмбрионидных телес вытянутой формы. Такие условия имитировали базальную мембрану кортекса. Полученные таким образом органоиды демонстрировали более эффективную нейроэктодермальную дифференцировку с минимальным вкладом клеток с эндо- и мезодермальным происхождением по сравнению с органоидами, полученными стандартным протоколом. Кроме того, применение вспомогательных конструкций приводило к более правильному формированию характерной цитоархитектоники кортикальной ткани, включая формирование поляризованной КП и радиальных юнитов (Lancaster et al., 2017).

ЦО как перспективная модель для фундаментальных и прикладных исследований

При детальном исследовании клеточной организации ЦО в их составе были идентифицированы разнообразные районы мозга, включая передний мозг и гиппокамп (Lancaster, Knoblich, 2014; Qian et al., 2016), хороидное сплетение (Lancaster, Knoblich, 2014), средний мозг (Qian et al., 2016; Lancaster et al., 2017) и КП (Lancaster et al., 2017) (рис. 3).

Кроме того, несколько исследовательских групп разработали отдельные протоколы для получения ЦО, воспроизводящих строго определенные отделы мозга. Например, ЦО среднего мозга содержали пространственно организованные группы дофаминергических нейронов (Monzel et al., 2017). В этих же органоидах обнаружен процесс миелинизации нейритов и формирование синапсов. Специализированные органоиды получены также для мозжечка (Muguruma et al., 2015), гиппокампа (Sakaguchi et al., 2015) и переднего мозга (Kadoshima et al., 2013; Magriani et al., 2015). Трехмерная организация районов переднего мозга имела четкую структуру, идентичную КП, формирующейся *in vitro*. Показано, что воспроизводится слоистая структура кортекса, включающая ВЗ, СВЗ, нейроны глубоких и верхних слоев кортекса (Qian et al., 2016). Обнаружено, что в процессе дифференцировки ЦО внутри них могут образовываться пустоты, которые по своим молекулярным характеристикам и клеточному окружению

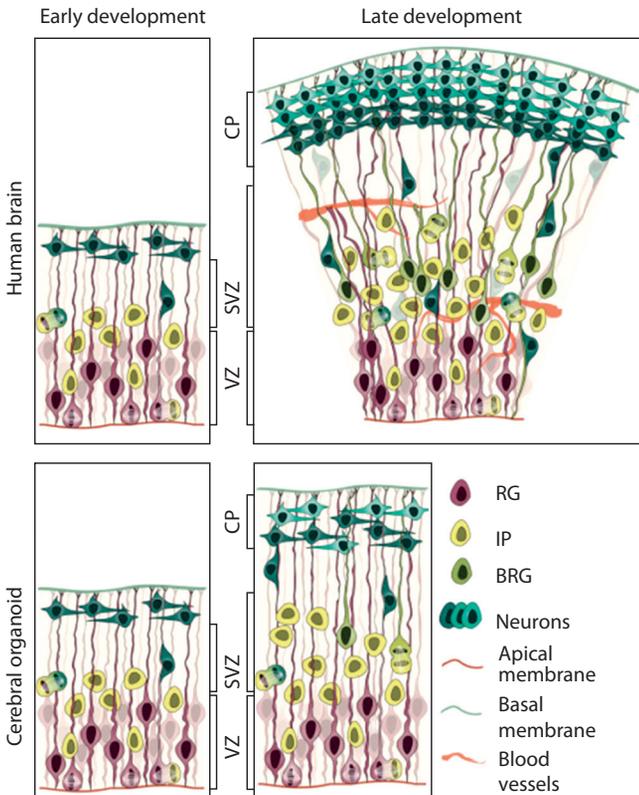


Fig. 3. Comparison of brain development *in vivo* and in cerebral organoids according to Kelava and Lancaster (2016), with modifications. At early stages (left), the cellular compositions and three-dimensional organizations are identical. At later stages (right), differences in cortical plate size and in the diversity and number of neural precursors and neurons are observed. The absence of blood vessels in organoids leads to SVZ reduction and incomplete CP development.

Designations: VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; CP, cortical plate.

соответствуют желудочкам головного мозга. Помимо разнообразных типов нейральных клеток на разных стадиях дифференцировки в органоидах образуются глиальные клетки, в том числе астроциты, которые по молекулярным и функциональным характеристикам соответствуют своим аналогам *in vivo* (Dezonne et al., 2017). При длительном культивировании (более 9 мес.) в органоидах появляются дендритные шипики и спонтанно активные нейронные сети (Quadrato et al., 2017).

Еще одним весомым аргументом в пользу целесообразности использования органоидов как модели ранних этапов нейрогенеза человека является соответствие их транскрипционной и эпигенетической программ фетальному мозгу. Исследования транскриптомов ЦО подтвердили, что паттерн и временная динамика экспрессии генов практически полностью воспроизводят аналогичные параметры, обнаруженные в эмбриональном мозге человека (Camp et al., 2015; Luo et al., 2016). Анализ метилома ЦО выявил около 74 % деметилированных районов генома, которые перекрываются с регуляторными элементами фетального мозга. Более того, другой эпигенетической модификацией ДНК – метилированием CpA, CpC или CpT сайтов (He, Ecker, 2015; Schultz et al., 2015), характерной для клеток головного мозга (Lister et al., 2013; Varley et

al., 2013; Guo et al., 2014), оказались обогащены районы генома ЦО, называемые супер-энхансерами. Локусы с большей аккумуляцией подобных меток в этих районах включали несколько генов, участвующих в нейрогенезе (*CUX1*, *AUTS2*, *NFI1*). Интересно, что данный тип метилирования в ЦО и фетальном мозге не подавляет экспрессию этой группы генов, однако во взрослом состоянии вызывает транскрипционную репрессию подобных районов (Lister et al., 2013; Guo et al., 2014). По всей видимости, такая модификация ДНК представляет собой один из важнейших способов регуляции генной экспрессии при дифференцировке нейральных предшественников в зрелые нейроны (Lister et al., 2013; Varley et al., 2013; Jang et al., 2017), а динамика накопления этих меток, продемонстрированная в ЦО, соответствует динамике *in vivo* (Luo et al., 2016).

Развитие мозга человека включает в себя не только развитие большого количества клеточных типов, объединенных в отдельные отделы и структуры мозга, но и целый комплекс взаимодействий между ними, в том числе миграцию нейронов (Jiménez et al., 2002; Rapalska, Szwab, 2003). В частности, миграция ГАМКергических интернейронов является одним из важнейших процессов при формировании неокортекса, поскольку они, наряду с глутаматергическими пирамидными нейронами и глией, составляют его клеточную основу (Marín, Müller, 2014). К настоящему времени уже разработаны несколько протоколов для получения ЦО, соответствующих определенным районам мозга (Qian et al., 2016), в связи с чем исследователям предоставляется уникальная возможность изучать некоторые аспекты взаимодействий отдельных регионов мозга. С использованием метода «слитых» ЦО, эквивалентных дорсальной и вентральной частям переднего мозга, исследователи получили дорсо-вентральную ось и смогли промоделировать процесс миграции ГАМКергических вставочных нейронов из ганглиозного бугорка в дорсальную часть церебрального кортекса (Bagley et al., 2017; Xiang et al., 2017). ЦО могут быть применены для изучения взаимодействий не только эндогенных, но и экзогенных клеток, например, при трансплантации микроглии внутрь органоида (Abud et al., 2017).

ЦО в моделировании наследственных заболеваний

Впервые состоятельность метода ЦО как системы для моделирования заболеваний человека продемонстрирована на примере микроцефалии (Lancaster et al., 2013). В ЦО, полученных из ИПСК пациента с микроцефалией, вызванной мутацией в гене *CDK5RAP2*, обнаружены преждевременная дифференцировка ранних нейральных предшественников, нарушения в ориентации веретена деления клеток радиальной глии и уменьшение в целом нейральной ткани. Кроме того, продемонстрировано, что выключение этого гена при помощи РНК-интерференции в нормальных ЦО вызывает гипоплазию, в частности приводит к нарушению ориентации веретена деления в радиальной глии, в то время как сверхэкспрессия, несмотря на свою токсичность, давала возможность частично восстановить фенотип (Lancaster et al., 2013). В качестве еще одного примера хромосомного заболевания выступает

Modeling of human hereditary diseases with COs derived from patient-specific iPSCs

| Disease | Gene / Mutation | Organoid phenotype | Reference |
|--------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Primary microcephaly | <i>CDK5RAP2</i> | Reduced CO size, premature neural differentiation of progenitors, abnormal SD in RG cells (The vertical orientation is indicative of the switch to asymmetrical division) | Lancaster et al., 2013 |
| Miller–Dieker syndrome (microcephaly) | <i>LIS1</i> , <i>YWHAЕ</i> | Reduced CO size, abnormal SD in RG cells (vertical orientation) | Bershteyn et al., 2017; Iefremova et al., 2017 |
| Seckel syndrome (microcephaly) | <i>CENP-J</i> | Reduced CO size, premature neural differentiation of progenitors, abnormal SD in RG cells (vertical orientation) | Gabriel et al., 2016 |
| Rett syndrome | <i>MeCP2</i> | VZ thickness enlarged owing to extensive proliferation of neural progenitors. Differentiation retarded (The progenitors : neurons ratio is elevated) | Mellios et al., 2017 |
| Autism | | | |
| (idiopathic) | – | Enhanced proliferation of neural progenitors (shortened cell cycle). Elevated density of neurites and synapses, in particular, inhibitory | Mariani et al., 2015 |
| with macrocephaly | <i>PTEN</i> | Enhanced proliferation of neural progenitors (shortened cell cycle) | Marchese et al., 2014; Li Y. et al., 2017 |
| | <i>CHD8*</i> | Overexpression of genes involved in neurogenesis, neural differentiation, and formation of the forebrain and synaptic transmission* | Wang et al., 2017. |
| Aicardi–Goutieres syndrome (autoimmune encephalopathy) | <i>TRX1*</i> | Smaller COs, enhanced neuronal apoptosis, elevated astrocyte neurotoxicity (owing to interferon α overproduction) | Thomas et al., 2017 |

SD, spindle orientation.

*Human iPSCs and ESCs with mutations were generated by the CRISPR/Cas9 genome editing system.

синдром Миллера–Дейкера, наиболее тяжелой формы лиссенцефалии, проявляющейся в виде серьезных пороков развития головного мозга, таких как сглаженная поверхность коры больших полушарий, нарушения в строении кортикальных слоев, микроцефалия и некоторых других. Пациенты с этим синдромом несут гетерозиготную мутацию – микроделецию на 17-й хромосоме (17p13.3). В состав пораженного локуса входят гены *LIS1* и *YWHAЕ*, моносомия по которым приводит к нарушению процесса миграции нервных клеток в коре головного мозга в течение первых трех месяцев развития. Вызвано это тем, что белок Lis1 в комплексе с динеином и NDEL1 регулируют сборку микротрубочек и центросом в клетке и тем самым осуществляют контроль над ориентацией веретена деления в клетке и митоза в целом (Yingling et al., 2008; Moon et al., 2014). Полученные из ИПСК пациентов с этим синдромом ЦО отличались значительно меньшими размерами по сравнению с контрольными, что аналогично микроцефалии у развивающегося эмбриона человека. Описанные выше различия вызваны aberrантным переходом клеток радиальной глии от пролиферативного симметричного типа деления к асимметричному нейрогенному. При индукции соответствующего сигнального пути были исправлены дефекты роста органоидов (Iefremova et al., 2017). Помимо описанных случаев микроцефалии, ЦО успешно применены для моделирования других заболеваний (таблица).

ЦО в моделировании инфекционных заболеваний

Пандемия вируса Зика началась в 2015 г., когда из Центральной Америки стали поступать тревожные сообщения о резко возросшем количестве случаев микроцефалии у новорожденных. В настоящее время связь между тяжелыми пороками развития и лихорадкой Зика широко признана, однако молекулярные и клеточные механизмы этой патологии плохо изучены. Использование животных моделей для исследования патологических процессов, вызванных различными инфекциями, может быть частично полезным, однако такой подход не способен точно воспроизвести все особенности нарушений, появляющихся в эмбриональном головном мозге человека. В связи с этим именно ЦО представляют собой уникальную модель для подобного рода исследований.

При изучении последствий инфекции вируса Зика на ЦО человека несколько независимых исследовательских групп получили схожие результаты. В частности, показано, что инфекция приводит к уменьшению общего размера органоидов, а это, в свою очередь, имитирует микроцефалию, которая возникает у эмбриона (Dang et al., 2016; Garcez et al., 2016; Qian et al., 2016; Gabriel et al., 2017; Li Y. et al., 2017). При более детальном исследовании выяснилось, что вирус Зика имеет собственные клетки-мишени, которыми оказались нейральные клетки-предшественники, преимущественно апикальные, и нейроэпителии

(Cugola et al., 2016; Garcez et al., 2016; Tang et al., 2016). На клеточном уровне последствия вирусной инфекции проявляются в виде индукции апоптоза и аутофагии и преждевременной дифференцировки вследствие нарушения процесса митоза (Cugola et al., 2016; Garcez et al., 2016; Onogati et al., 2016; Gabriel et al., 2017). В органоидах эти патологические процессы приводят к уменьшению зон пролифераций, в частности V3, и нарушению строения кортикальных слоев (Cugola et al., 2016; Qian et al., 2016).

Ранее было установлено, что вирус Зика активирует толл-подобные рецепторы 3 (TLR3) в фибробластах кожи человека (Hamel et al., 2015). Аналогичный результат получен для ЦО, зараженных вирусом Зика (Dang et al., 2016). Связь между активацией TLR3 и нарушениями процесса нейрогенеза, включая апоптоз, продемонстрирована в экспериментах с обработкой конкурентными ингибиторами TLR3 инфицированных органоидов. Оказалось, что такое подавление TLR3 уменьшает негативные последствия перенесенной инфекции. Транскриптомный анализ органоидов позволил выявить набор из 41 гена, которые вовлечены в процесс нейрогенеза и меняют свою экспрессию во время активации TLR3. Эти результаты подтверждают факт вовлеченности TLR3 в развитие патологических изменений головного мозга, вызванных вирусом Зика (Dang et al., 2016).

Детальное исследование механизмов проникновения вируса Зика связано не только с получением фундаментальных знаний, но и с их непосредственным применением для разработки лекарственных препаратов, поскольку терапевтическое лечение пациентов в настоящее время отсутствует. По результатам транскриптомного анализа единичных клеток-мишеней вируса Зика (нейральных стволовых клеток) исследователи выдвинули в качестве потенциального «помощника» для проникновения вирусных частиц в клетки рецептор AXL, который высоко экспрессировался в радиальных клетках органоидов человека (Nowakowski et al., 2016). Однако в другом исследовании (Wells et al., 2016) это предположение поставили под сомнение. В органоидах, полученных из линии ИПСК с нокаутированным геном AXL при помощи системы редактирования генома CRISPR/Cas9, выявить влияние этой мутации на эффективность проникновения вирусных частиц в клетки или индукцию апоптоза не удалось. Полученные результаты ставят под сомнение эффективность ингибиторов AXL как потенциальных лекарственных препаратов для предотвращения врожденных дефектов после заражения вирусом Зика (Wells et al., 2016).

Благодаря использованию ЦО достигнуты определенные успехи в поиске потенциальных лекарственных средств. Например, масштабный высокочувствительный химический скрининг позволил отобрать два соединения: гидробромид гиппеатрина и дигидрат дигидрохлорида амодиахина, которые могут ингибировать вирус Зика в кортикальных предшественниках и при обработке ими органоидов улучшают дефекты роста и дифференцировки, вызванные инфекцией (Zhou et al., 2017). Еще одним из наиболее перспективных соединений является 25-гидроксистерин. Известно, что в ответ на вирусную инфекцию в клетках индуцируется холестерин-25-гидроксилаза, а ее ферментативный продукт 25-гидроксистерин –

основной медиатор защиты хозяина от вируса Зика. Добавление синтетического 25-гидроксистерина *in vitro* блокировало проникновение вирусных частиц в клетки, а лечение инфицированных мышей и макак-резусов привело к снижению виремии и повышению выживаемости. Аналогичное «лечение» пораженных вирусом Зика ЦО приводило не только к подавлению инфекции, но и к уменьшению повреждений тканей внутри органоидов. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что 25-гидроксистерин обладает эффективным противовирусным действием и потенциально может быть использован в качестве лекарственного препарата для борьбы с инфекцией и предотвращения возникновения таких ее тяжелых последствий, как, например, микроцефалия (Li C. et al., 2017).

Довольно часто поиск потенциальных препаратов для лечения нового заболевания осуществляется среди списка существующих и клинически одобренных, поскольку это помогает преодолеть важные проблемы, в том числе связанные с многолетними клиническими испытаниями. Для лечения вируса Зика было предложено несколько препаратов, которые продемонстрировали противовирусное действие на различных клеточных и животных моделях (Barrows et al., 2016; Delvecchio et al., 2016; Zmurko et al., 2016). Одним из ярких примеров является препарат Софосбувир, клинически одобренный для использования против гепатита С. Его механизм действия заключается в ингибировании РНК-полимеразы – наиболее консервативного белка среди семейства Flaviviridae. Оказалось, что Софосбувир эффективно ингибировал РНК-полимеразу вируса Зика, принадлежащего к тому же семейству, в различных клеточных системах, включая клетки гепатомы, нейробластомы, нервные стволовые клетки, и даже в ЦО человека. Кроме непосредственного ингибирования РНК-полимеразы, Софосбувир индуцировал увеличение частоты мутаций аденозина в гуанозин (A→G) в вирусном геноме. Результаты свидетельствуют о потенциальном использовании ранее клинически одобренного препарата Софосбувир и для лечения вирусной инфекции Зика (Sacramento et al., 2017).

ЦО как модель для изучения эволюционных событий

Размеры головного мозга и его отдельных частей широко варьируются в эволюционном ряду. Вполне вероятно, что именно увеличение относительных размеров коры головного мозга человека способствовало появлению у него уникальных познавательных способностей. Большинство количественных и качественных различий в строении неокортекса разных видов выявлено в сравнительных анатомических исследованиях. Считается, что экспансия коры головного мозга обусловлена различиями в пролиферации и дифференцировке кортикальных предшественников (Rakic, 2009; Geschwind, Rakic, 2013). Тем не менее многие молекулярно-генетические и клеточные механизмы возникновения различий в строении коры больших полушарий у разных видов остаются невыясненными. По всей видимости, единственный способ разгадать эти события заключается в изучении ранних эмбриональных этапов развития человека. Основными ограничениями, стоящими

на пути исследователей, являются морально-этические проблемы, связанные с получением образцов фетального мозга. В связи с этим технология трехмерных ЦО представляет собой уникальную и крайне перспективную модель для установления важнейших механизмов, лежащих в основе эволюционных изменений, возникающих в процессе нейрогенеза (Giandomenico, Lancaster, 2017). Группа исследователей под руководством W.B. Huttner (Mora-Bermúdez et al., 2016), используя метод ЦО, предприняла первую успешную попытку обнаружить некоторые различия в нейрогенезе у человека, шимпанзе и орангутанга. Клеточный состав, цитоархитектоника и транскрипционная программа в нейрогенезе ЦО человека и шимпанзе оказались очень похожи. Среди отличий обнаружено, что в апикальных предшественниках переход от прометафазы к метафазе митоза у человека пролонгирован по сравнению с человекообразными обезьянами. Известно, что у мышей удлинение данной фазы митоза свидетельствует о более высоком пролиферативном потенциале апикальных предшественников (Haubensak et al., 2004). Транскриптомный анализ этих популяций клеток в органоидах человека и шимпанзе позволил выявить небольшой набор генов, которые в них высоко экспрессируются и обеспечивают увеличение их пролиферативного потенциала. Кроме того, доля нейрогенных базальных предшественников в органоидах человека оказалась ниже, что свидетельствует о большей доле активно пролиферирующих клеток (Mora-Bermúdez et al., 2016). По всей видимости, подобные тонкие отличия в различных кортикальных клетках-предшественниках и их пролиферативном потенциале могут иметь решающие последствия для эволюции неокортекса человека.

Недостатки технологии ЦО

ЦО представляют собой уникальную платформу для моделирования ранних этапов нейрогенеза человека. Однако, несмотря на очевидные достоинства, они имеют ряд ограничений и недостатков. Во-первых, ЦО не могут полностью воссоздать структуру эмбрионального мозга *in vivo*, т. е. сформировать отдельные районы мозга в правильном порядке (Lancaster et al., 2013). Прежде всего это связано с отсутствием нормального эмбрионального окружения, включая клеточные элементы и различные паттерны ростовых и сигнальных молекул, которые необходимы для развития в полностью сформированный зрелый орган. Приблизиться к условиям *in vivo* могут помочь биоинженерные методы, в том числе создание трехмерных каркасов, направляющих и стимулирующих развитие конкретных областей мозга (Lancaster et al., 2017). Реконструировать пространственный и временной паттерн сигналов в ЦО в перспективе можно будет при помощи введения миниатюрных носителей, покрытых соответствующими сигнальными молекулами (Kelava, Lancaster, 2016).

Но, пожалуй, самой важной проблемой ЦО остается отсутствие васкуляризации, которая обеспечивает правильную оксигенацию и распределение питательных веществ в головном мозге. Раннее развитие неокортекса происходит без формирования кровеносных сосудов (Vasudevan et al., 2008), однако более поздние стадии развития полностью зависят от этого, поскольку сосудистая система обеспе-

чивает создание ниши в СВЗ для нейральных предшественников (Javaherian, Kriegstein, 2009) и играет важную роль при дифференцировке в нейроны (Lange et al., 2016). Из-за отсутствия васкуляризации размеры органоидов ограничены по причине невозможности проникновения в толщу ЦО питательных веществ и кислорода. Для имитации сосудистой системы перспективными подходами могут оказаться трансплантация мезенхимальных клеток (Takebe et al., 2015) или различные микрофлюидные устройства (Bhatia, Ingber, 2014; Giobbe et al., 2015; Moreno et al., 2015). Решение проблемы васкуляризации в ЦО, вероятно, откроет новые возможности для моделирования не только ранних этапов нейрогенеза, но и поздних, включающих формирование КП и глиогенез.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016. The author is grateful to A.G. Menzorov, I.E. Prityazhnyuk, and O.I. Shnaider for valuable remarks.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abud E.M., Ramirez R.N., Martinez E.S., Healy L.M., Nguyen C.H.H., Newman S.A., Yeromin A.V., Scarfone V.M., Marsh S.E., Fimbres C., Caraway C.A., Fote G.M., Madany A.M., Agrawal A., Kaye R., Gyls K.H., Cahalan M.D., Cummings B.J., Intel J.P., Mortazavi A., Carson M.J., Poon W.W., Blurton-Jones M. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*. 2017;94(2):278-293.e9. DOI 10.1016/j.neuron.2017.03.042.
- Ananiev G., Williams E.C., Li H., Chang Q. Isogenic pairs of wild type and mutant induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from Rett syndrome patients as in vitro disease model. *PLoS One*. 2011; 6(9):e25255. DOI 10.1371/journal.pone.0025255.
- Anthony T.E., Klein C., Fishell G., Heintz N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*. 2004;41(6):881-890.
- Bagley J.A., Reumann D., Bian S., Lévi-Strauss J., Knoblich J.A. Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat. Methods*. 2017;14(7):743-751. DOI 10.1038/nmeth.4304.
- Barrows N.J., Campos R.C., Powell S.T., Prasanth K.R., Schott-Lerner G., Soto-Acosta R., Galarza-Muñoz G., McGrath E.L., Urrabaz-Garza R., Gao J., Wu P., Menon R., Saade G., Fernandez-Salas I., Rossi S.L., Vasilakis N., Routh A., Bradrick S.S., Garcia-Blanco M. A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. *Cell Host Microbe*. 2016;20(2):259-270. DOI 10.1016/j.chom.2016.07.004.
- Bershteyn M., Nowakowski T.J., Pollen A.A., Di Lullo E., Nene A., Wynshaw-Boris A., Kriegstein A.R. Human iPSC-derived cerebral organoids model cellular features of lissencephaly and reveal prolonged mitosis of outer radial glia. *Cell Stem Cell*. 2017;20(4):435-449.e4. DOI 10.1016/j.stem.2016.12.007.
- Betizeau M., Cortay V., Patti D., Pfister S., Gautier E., Bellemin-Ménard A., Afanassieff M., Huissoud C., Douglas R.J., Kennedy H., Dehay C. Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. *Neuron*. 2013;80(2):442-457. DOI 10.1016/j.neuron.2013.09.032.
- Bhatia S.N., Ingber D.E. Microfluidic organs-on-chips. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(8):760-772. DOI 10.1038/nbt.2989.
- Cai J., Yang M., Poremsky E., Kidd S., Schneider J.C., Iacovitti L. Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats. *Stem Cells Dev*. 2010;19(7):1017-1023. DOI 10.1089/scd.2009.0319.

- Camp J.G., Badsha F., Florio M., Kanton S., Gerber T., Wilsch-Bräuninger M., Lewitus E., Sykes A., Hevers W., Lancaster M., Knoblich J.A., Lachmann R., Pääbo S., Huttner W.B., Treutlein B. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(51):15672-15677. DOI 10.1073/pnas.1520760112.
- Chen C., Jiang P., Xue H., Peterson S.E., Tran H.T., McCann A.E., Parast M.M., Li S., Pleasure D.E., Laurent L.C., Loring J.F., Liu Y., Deng W. Role of astroglia in Down's syndrome revealed by patient-derived human-induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 2014; 5:4430. DOI 10.1038/ncomms5430.
- Cugola F.R., Fernandes I.R., Russo F.B., Freitas B.C., Dias J.L., Guimarães K.P., Benazzato C., Almeida N., Pignatari G.C., Romero S., Polonio C.M., Cunha I., Freitas C.L., Brandão W.N., Rossato C., Andrade D.G., Faria D.E., Garcez A.T., Buchpigiel C.A., Braconi C.T., Mendes E., Sall A.A., Zanotto P.M., Peron J.P., Muotri A.R., Beltrão-Braga P.C. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016;534(7606):267-271. DOI 10.1038/nature18296.
- Dang J., Tiwari S.K., Lichinchi G., Qin Y., Patil V.S., Eroshkin A.M., Rana T.M. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. *Cell Stem Cell.* 2016;19(2):258-265. DOI 10.1016/j.stem.2016.04.014.
- Delvecchio R., Higa L.M., Pezzuto P., Valadão A.L., Garcez P.P., Monteiro F.L., Loiola E.C., Dias A.A., Silva F.J., Aliota M.T., Caine E.A., Osorio J.E., Bellio M., O'Connor D.H., Rehen S., de Aguiar R.S., Savarino A., Campanati L., Tanuri A. Chloroquine, an endocytosis blocking agent, inhibits Zika virus infection in different cell models. *Viruses.* 2016;8(12). DOI 10.3390/v8120322.
- Dezonne R.S., Sartore R.C., Nascimento J.M., Saia-Cereda V.M., Romão L.F., Alves-Leon S.V., de Souza J.M., Martins-de-Souza D., Rehen S.K., Gomes F.C. Derivation of functional human astrocytes from cerebral organoids. *Sci. Rep.* 2017;7:45091. DOI 10.1038/srep45091.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-156.
- Fietz S.A., Kelava I., Vogt J., Wilsch-Bräuninger M., Stenzel D., Fish J.L., Corbeil D., Riehn A., Distler W., Nitsch R., Huttner W.B. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat. Neurosci.* 2010;13(6):690-699. DOI 10.1038/nn.2553.
- Gabriel E., Ramani A., Karow U., Gottardo M., Natarajan K., Gooi L.M., Goranci-Buzhala G., Krut O., Peters F., Nikolic M., Kuivanen S., Korhonen E., Smura T., Vapalahti O., Papantonis A., Schmidt-Chanasit J., Riparbelli M., Callaini G., Krönke M., Utermöhlen O., Gopalakrishnan J. Recent Zika virus isolates induce premature differentiation of neural progenitors in human brain organoids. *Cell Stem Cell.* 2017;20(3):397-406.e5. DOI 10.1016/j.stem.2016.12.005.
- Gabriel E., Wason A., Ramani A., Gooi L.M., Keller P., Pozniakovsky A., Poser I., Noack F., Telugu N.S., Calegari F., Šarić T., Hescheler J., Hyman A.A., Gottardo M., Callaini G., Alkuraya F.S., Gopalakrishnan J. CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *EMBO J.* 2016;35(8):803-819. DOI 10.15252/embj.201593679.
- Garcez P.P., Loiola E.C., Madeiro da Costa R., Higa L.M., Trindade P., Delvecchio R., Nascimento J.M., Brindeiro R., Tanuri A., Rehen S.K. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science.* 2016;352(6287):816-818. DOI 10.1126/science.aaf6116.
- Geschwind D.H., Rakic P. Cortical evolution: judge the brain by its cover. *Neuron.* 2013;80(3):633-647. DOI 10.1016/j.neuron.2013.10.045.
- Ghodsizadeh A., Taei A., Totonchi M., Seifinejad A., Gourabi H., Pournasr B., Aghdami N., Malekzadeh R., Almadani N., Salekdeh G.H., Baharvand H. Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev.* 2010;6(4):622-632. DOI 10.1007/s12015-010-9189-3.
- Giandomenico S.L., Lancaster M.A. Probing human brain evolution and development in organoids. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2017;44: 36-43. DOI 10.1016/j.ceb.2017.01.001.
- Giobbe G.G., Michielin F., Luni C., Giulitti S., Martewicz S., Dupont S., Floreani A., Elvassore N. Functional differentiation of human pluripotent stem cells on a chip. *Nat. Methods.* 2015;12(7): 637-640. DOI 10.1038/nmeth.3411.
- Götz M., Huttner W.B. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2005;6(10):777-788. DOI 10.1038/nrm1739.
- Guo J.U., Su Y., Shin J.H., Shin J., Li H., Xie B., Zhong C., Hu S., Le T., Fan G., Zhu H., Chang Q., Gao Y., Ming G.L., Song H. Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 2014;17(2):215-222. DOI 10.1038/nn.3607.
- Hamel R., Dejarnac O., Wicht S., Ekcharyawat P., Neyret A., Luplertlop N., Perera-Lecoin M., Surasombattana P., Talignani L., Thomas F., Cao-Lorreau V.M., Choumet V., Briant L., Desprès P., Amara A., Yssel H., Missé D. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J. Virol.* 2015;89(17):8880-8896. DOI 10.1128/JVI.00354-15.
- Harrison R.G. Observations on the living developing nerve fiber. *Exp. Biol. Med.* 1906;7:140-143.
- Haubensak W., Attardo A., Denk W., Huttner W.B. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(9): 3196-3201. DOI 10.1073/pnas.0308600100.
- He Y., Ecker J.R. Non-CG methylation in the human genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2015;16:55-77. DOI 10.1146/annurev-genom-090413-025437.
- Howard B.M., Mo Z., Filipovic R., Moore A.R., Antic S.D., Zecevic N. Radial glia cells in the developing human brain. *Neuroscientist.* 2008;14(5):459-473. DOI 10.1177/1073858407313512.
- Huang L., Chen M., Zhang W., Sun X., Liu B., Ge J. Retinoid acid and taurine promote NeuroD1-induced differentiation of induced pluripotent stem cells into retinal ganglion cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2017. DOI 10.1007/s11010-017-3114-x.
- Iefremova V., Manikakis G., Krefft O., Jabali A., Weynans K., Wilkens R., Marsoner F., Brändl B., Müller F.J., Koch P., Ladewig J. An organoid-based model of cortical development identifies non-cell-autonomous defects in Wnt signaling contributing to Miller-Dieker syndrome. *Cell Rep.* 2017;19(1):50-59. DOI 10.1016/j.celrep.2017.03.047.
- 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. *Mol. Med.* 2000;6(2):88-95.
- Jang H.S., Shin W.J., Lee J.E., Do J.T. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes (Basel).* 2017;8(6). DOI 10.3390/genes8060148.
- Javaherian A., Kriegstein A. A stem cell niche for intermediate progenitor cells of the embryonic cortex. *Cereb. Cortex.* 2009; 19(Suppl. 1):i70-i77. DOI 10.1093/cercor/bhp029.
- Jiménez D., López-Mascaraque L.M., Valverde F., De Carlos J.A. Tangential migration in neocortical development. *Dev. Biol.* 2002; 244(1):155-169. DOI 10.1006/dbio.2002.0586.
- Kadoshima T., Sakaguchi H., Nakano T., Soen M., Ando S., Eiraku M., Sasai Y. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(50):20284-20289. DOI 10.1073/pnas.1315710110.
- Kang H., Shih Y.R., Nakasaki M., Kabra H., Varghese S. Small molecule-driven direct conversion of human pluripotent stem cells into functional osteoblasts. *Sci. Adv.* 2016;2(8):e1600691. DOI 10.1126/sciadv.1600691.
- Kelava I., Lancaster M.A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev. Biol.* 2016; 420(2):199-209. DOI 10.1016/j.ydbio.2016.06.037.
- Kennedy T.E., Serafini T., de la Torre J.R., Tessier-Lavigne M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell.* 1994;78(3):425-435.

- Kim C., Wong J., Wen J., Wang S., Wang C., Spiering S., Kan N.G., Forcales S., Puri P.L., Leone T.C., Marine J.E., Calkins H., Kelly D.P., Judge D.P., Chen H.S. Studying arrhythmic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 2013;494(7435):105-110. DOI 10.1038/nature11799.
- Kim J.M., Moon S.H., Lee S.G., Cho Y.J., Hong K.S., Lee J.H., Lee H.J., Chung H.M. Assessment of differentiation aspects by the morphological classification of embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2011;20(11):1925-1935. DOI 10.1089/scd.2010.0476.
- Lancaster M.A., Corsini N.S., Wolfinger S., Gustafson E.H., Phillips A.W., Burkard T.R., Otani T., Livesey F.J., Knoblich J.A. Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids. *Nat. Biotechnol*. 2017;35(7):659-666. DOI 10.1038/nbt.3906.
- Lancaster M.A., Knoblich J.A. Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2012;22(5):737-746. DOI 10.1016/j.conb.2012.04.003.
- Lancaster M.A., Knoblich J.A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc*. 2014;9(10):2329-2340. DOI 10.1038/nprot.2014.158.
- Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A., Wenzel D., Bicknell L.S., Hurler M.E., Homfray T., Penninger J.M., Jackson A.P., Knoblich J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013;501(7467):373-379. DOI 10.1038/nature12517.
- Lange C., Turrero G.M., Decimo I., Bifari F., Eelen G., Quaegebeur A., Boon R., Zhao H., Boeckx B., Chang J., Wu C., Le Noble F., Lambrechts D., Dewerchin M., Kuo C.J., Huttner W.B., Carmeliet P. Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *EMBO J*. 2016;35(9):924-941. DOI 10.15252/embj.201592372.
- Lapham L.W., Markesbery W.R. Human fetal cerebellar cortex: organization and maturation of cells in vitro. *Science*. 1971;1173(3999):829-832.
- Li C., Deng Y.Q., Wang S., Ma F., Aliyari R., Huang X.Y., Zhang N.N., Watanabe M., Dong H.L., Liu P., Li X.F., Ye Q., Tian M., Hong S., Fan J., Zhao H., Li L., Vishlaghi N., Buth J.E., Au C., Liu Y., Lu N., Du P., Qin F.X., Zhang B., Gong D., Dai X., Sun R., Novitskiy B.G., Xu Z., Qin C.F., Cheng G. 25-Hydroxycholesterol protects host against Zika virus infection and its associated microcephaly in a mouse model. *Immunity*. 2017;46(3):446-456. DOI 10.1016/j.immuni.2017.02.012.
- Li Y., Muffat J., Omer A., Bosch I., Lancaster M.A., Sur M., Gehrke L., Knoblich J.A., Jaenisch R. Induction of expansion and folding in human cerebral organoids. *Cell Stem Cell*. 2017;20(3):385-396.e3. DOI 10.1016/j.stem.2016.11.017.
- Lindborg B.A., Brekke J.H., Vegoe A.L., Ulrich C.B., Haider K.T., Subramaniam S., Venhuizen S.L., Eide C.R., Orchard P.J., Chen W., Wang Q., Pelaez F., Scott C.M., Kokkoli E., Keirstead S.A., Dutton J.R., Tolar J., O'Brien T.D. Rapid induction of cerebral organoids from human induced pluripotent stem cells using a chemically defined hydrogel and defined cell culture medium. *Stem Cells Transl. Med*. 2016;5(7):970-979. DOI 10.5966/sctm.2015-0305.
- Lister R., Mukamel E.A., Nery J.R., Urich M., Puddifoot C.A., Johnson N.D., Lucero J., Huang Y., Dwork A.J., Schultz M.D., Yu M., Tonti-Filippini J., Heyn H., Hu S., Wu J.C., Rao A., Esteller M., He C., Haghghi F.G., Sejnowski T.J., Behrens M.M., Ecker J.R. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*. 2013;341(6146):1237905. DOI 10.1126/science.1237905.
- Luo C., Lancaster M.A., Castanon R., Nery J.R., Knoblich J.A., Ecker J.R. Cerebral organoids recapitulate epigenomic signatures of the human fetal brain. *Cell Rep*. 2016;17(12):3369-3384. DOI 10.1016/j.celrep.2016.12.001.
- Malik S., Vinukonda G., Vose L.R., Diamond D., Bhimavarapu B.B., Hu F., Zia M.T., Hevner R., Zecevic N., Ballabh P. Neurogenesis continues in the third trimester of pregnancy and is suppressed by premature birth. *J. Neurosci*. 2013;33(2):411-423. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4445-12.2013.
- Marchese M., Conti V., Valvo G., Moro F., Muratori F., Tancredi R., Santorelli F.M., Guerrini R., Sicca F. Autism-epilepsy phenotype with macrocephaly suggests PTEN, but not GLLALCAM, genetic screening. *BMC Med. Genet*. 2014;15:26. DOI 10.1186/1471-2350-15-26.
- Mariani J., Coppola G., Zhang P., Abyzov A., Provini L., Tomasini L., Amenduni M., Szekely A., Palejev D., Wilson M., Gerstein M., Grigorenko E.L., Chawarska K., Pelphrey K.A., Howe J.R., Vaccarino F.M. FOXG1-dependent dysregulation of GABA/Glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders. *Cell*. 2015;162(2):375-390. DOI 10.1016/j.cell.2015.06.034.
- Marin O., Müller U. Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2014;26:132-141. DOI 10.1016/j.conb.2014.01.015.
- Mellios N., Feldman D.A., Sheridan S.D., Ip J.P.K., Kwok S., Amoah S.K., Rosen B., Rodriguez B.A., Crawford B., Swaminathan R., Chou S., Li Y., Ziats M., Ernst C., Jaenisch R., Haggarty S.J., Sur M. MeCP2-regulated miRNAs control early human neurogenesis through differential effects on ERK and AKT signaling. 2017; *Mol. Psychiatry*. DOI 10.1038/mp.2017.86.
- Miyata T., Kawaguchi A., Saito K., Kawano M., Muto T., Ogawa M. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development*. 2004;131(13):3133-3145. DOI 10.1242/dev.01173.
- Monzel A.S., Smits L.M., Hemmer K., Hachi S., Moreno E.L., van Wuelen T., Jarazo J., Walter J., Brüggemann I., Boussaad I., Berger E., Fleming R.M.T., Bolognin S., Schwamborn J.C. Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells. *Stem Cell Reports*. 2017;8(5):1144-1154. DOI 10.1016/j.stemcr.2017.03.010.
- Moon H.M., Youn Y.H., Pemble H., Yingling J., Wittmann T., Wynshaw-Boris A. LIS1 controls mitosis and mitotic spindle organization via the LIS1-NDEL1-dynein complex. *Hum. Mol. Genet*. 2014;23(2):449-466. DOI 10.1093/hmg/ddt436.
- Mora-Bermúdez F., Badsha F., Kanton S., Camp J.G., Vernot B., Köhler K., Voigt B., Okita K., Maricic T., He Z., Lachmann R., Pääbo S., Treutlein B., Huttner W.B. Differences and similarities between human and chimpanzee neural progenitors during cerebral cortex development. *Elife*. 2016;5:e18683. DOI 10.7554/eLife.18683.
- Moreno E.L., Hachi S., Hemmer K., Trietsch S.J., Baumratov A.S., Hankemeier T., Vulto P., Schwamborn J.C., Fleming R.M. Differentiation of neuroepithelial stem cells into functional dopaminergic neurons in 3D microfluidic cell culture. *Lab. Chip*. 2015;15(11):2419-2428. DOI 10.1039/c5lc00180c.
- Mou H., Zhao R., Sherwood R., Ahfeldt T., Lapey A., Wain J., Sicilian L., Izvolsky K., Musunuru K., Cowan C., Rajagopal J. Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs. *Cell Stem Cell*. 2012;10(4):385-397. DOI 10.1016/j.stem.2012.01.018.
- Muguruma K., Nishiyama A., Kawakami H., Hashimoto K., Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep*. 2015;10(4):537-550. DOI 10.1016/j.celrep.2014.12.051.
- Nowakowski T.J., Orlean A.A., Di Lullo E., Sandoval-Espinosa C., Bershteyn M., Kriegstein A.R. Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 2016;18(5):591-596. DOI 10.1016/j.stem.2016.03.012.
- Onorati M., Li Z., Liu F., Sousa A.M., Nakagawa N., Li M., Dell'Anno M.T., Gulden F.O., Pochareddy S., Tebbenkamp A.T., Han W., Pletikos M., Gao T., Zhu Y., Bichsel C., Varela L., Szigeti-Buck K., Lisgo S., Zhang Y., Testen A., Gao X.B., Mlakar J., Popovic M., Flamand M., Strittmatter S.M., Kaczmarek L.K., Anton E.S., Horvath T.L., Lindenbach B.D., Sestan N. Zika virus disrupts pPhospho-TBK1 localization and Mitosis in human neuroepithelial stem cells and radial glia. *Cell Rep*. 2016;16(10):2576-2592. DOI 10.1016/j.celrep.2016.08.038.
- Paridaen J.T., Huttner W.B. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep*. 2014;15(4):351-364. DOI 10.1002/embr.201438447.

- Qian X., Nguyen H.N., Song M.M., Hadiono C., Ogden S.C., Hammack C., Yao B., Hamersky G.R., Jacob F., Zhong C., Yoon K.J., Jeang W., Lin L., Li Y., Thakor J., Berg D.A., Zhang C., Kang E., Chickering M., Nauen D., Ho C.Y., Wen Z., Christian K.M., Shi P.Y., Maher B.J., Wu H., Jin P., Tang H., Song H., Ming G.L. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell*. 2016;165(5):1238-1254. DOI 10.1016/j.cell.2016.04.032.
- Qiu X., Yang J., Liu T., Jiang Y., Le Q., Lu Y. Efficient generation of lens progenitor cells from cataract patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2011;7(3):e32612. DOI 10.1371/journal.pone.0032612.
- Quadrato G., Nguyen T., Macosko E.Z., Sherwood J.L., Min Yang S., Berger D.R., Maria N., Scholvin J., Goldman M., Kinney J.P., Boyden E.S., Lichtman J.W., Williams Z.M., McCarroll S.A., Arlotta P. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature*. 2017;545(7652):48-53. DOI 10.1038/nature22047.
- Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10(10):724-735. DOI 10.1038/nrn2719.
- Rapalska K., Szwabe M. Tangential migration of neocortical neurons in early human fetuses. *Folia Morphol. (Warsz.)*. 2003;62(3):223-225.
- Sacramento C.Q., de Melo G.R., de Freitas C.S., Rocha N., Hoelz L.V., Miranda M., Fintelman-Rodrigues N., Marttorelli A., Ferreira A.C., Barbosa-Lima G., Abrantes J.L., Vieira Y.R., Bastos M.M., de Mello Volotão E., Nunes E.P., Tschoeke D.A., Leomil L., Loiola E.C., Trindade P., Rehen S.K., Bozza F.A., Bozza P.T., Boechat N., Thompson F.L., de Filippis A.M., Brüning K., Souza T.M. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Sci. Rep.* 2017;7:40920. DOI 10.1038/srep40920.
- Sakaguchi H., Kadoshima T., Soen M., Narii N., Ishida Y., Ohgushi M., Takahashi J., Eiraku M., Sasai Y. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat. Commun.* 2015;6:8896. DOI 10.1038/ncomms9896.
- Sareen D., Gowing G., Sahabian A., Staggenborg K., Paradis R., Avalos P., Latter J., Ornelas L., Garcia L., Svendsen C.N. Human induced pluripotent stem cells are a novel source of neural progenitor cells (iNPCs) that migrate and integrate in the rodent spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 2014;522(12):2707-2728. DOI 10.1002/cne.23578.
- Schultz M.D., He Y., Whitaker J.W., Hariharan M., Mukamel E.A., Leung D., Rajagopal N., Nery J.R., Urich M.A., Chen H., Lin S., Lin Y., Jung I., Schmitt A.D., Selvaraj S., Ren B., Sejnowski T.J., Wang W., Ecker J.R. Human body epigenome maps reveal non-canonical DNA methylation variation. *Nature*. 2015;523(7559):212-216. DOI 10.1038/nature14465.
- Schwartz M.P., Hou Z., Propson N.E., Zhang J., Engstrom C.J., Santos Costa V., Jiang P., Nguyen B.K., Bolin J.M., Daly W., Wang Y., Stewart R., Page C.D., Murphy W.L., Thomson J.A. Human pluripotent stem cell-derived neural constructs for predicting neural toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(40):12516-12521. DOI 10.1073/pnas.1516645112.
- Seibler P., Graziotto J., Jeong H., Simunovic F., Klein C., Krainc D. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J. Neurosci.* 2011;31(16):5970-5976. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4441-10.2011.
- Smart I.H., Dehay C., Giroud P., Berland M., Kennedy H. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb. Cortex*. 2002;12(1):37-53.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Takebe T., Enomura M., Yoshizawa E., Kimura M., Koike H., Ueno Y., Matsuzaki T., Yamazaki T., Toyohara T., Osafune K., Nakauchi H., Yoshikawa H.Y., Taniguchi H. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. *Cell Stem Cell*. 2015;16(5):556-565. DOI 10.1016/j.stem.2015.03.004.
- Tang H., Hammack C., Ogden S.C., Wen Z., Qian X., Li Y., Yao B., Shin J., Zhang F., Lee E.M., Christian K.M., Didier R.A., Jin P., Song H., Ming G.L. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell*. 2016;18(5):587-590. DOI 10.1016/j.stem.2016.02.016.
- Thomas C.A., Tejawani L., Trujillo C.A., Negraes P.D., Herai R.H., Mesci P., Macia A., Crow Y.J., Muotri A.R. Modeling of TREX1-dependent autoimmune disease using human stem cells highlights L1 accumulation as a source of neuroinflammation. *Cell Stem Cell*. 2017;7(21(3)):319-331.e8. DOI 10.1016/j.stem.2017.07.009.
- 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;282(5391):1145-1147.
- Varley K.E., Gertz J., Bowling K.M., Parker S.L., Reddy T.E., Pauli-Behn F., Cross M.K., Williams B.A., Stamatoyannopoulos J.A., Crawford G.E., Absher D.M., Wold B.J., Myers R.M. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res*. 2013;23(3):555-567. DOI 10.1101/gr.147942.112.
- Vasudevan A., Long J.E., Crandall J.E., Rubenstein J.L., Bhide P.G. Compartment-specific transcription factors orchestrate angiogenesis gradients in the embryonic brain. *Nat. Neurosci.* 2008;11(4):429-439. DOI 10.1038/nn2074.
- Wang P., Mokhtari R., Pedrosa E., Kirschenbaum M., Bayrak C., Zheng D., Lachman H.M. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in cerebral organoids derived from iPSC cells. *Mol. Autism*. 2017;8:11. DOI 10.1186/s13229-017-0124-1.
- Wells M.F., Salick M.R., Wiskow O., Ho D.J., Worringer K.A., Ihry R.J., Kommineni S., Bilican B., Klim J.R., Hill E.J., Kane L.T., Ye C., Kaykas A., Eggan K. Genetic ablation of AXL does not protect human neural progenitor cells and cerebral organoids from Zika virus infection. *Cel Stem Cell*. 2016;19(6):703-708. DOI 10.1016/j.stem.2016.11.011.
- Xiang Y., Tanaka Y., Patterson B., Kang Y.J., Govindaiah G., Roselaar N., Cakir B., Kim K.Y., Lombroso A.P., Hwang S.M., Zhong M., Stanley E.G., Elefanty A.G., Naegele J.R., Lee S.H., Weissman S.M., Park I.H. Fusion of regionally specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration. *Cell Stem Cell*. 2017;7(21(3)):383-398.e7. DOI 10.1016/j.stem.2017.07.007.
- Yingling J., Youn Y.H., Darling D., Toyo-Oka K., Pramparo T., Hirotsune S., Wynshaw-Boris A. Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell*. 2008;132(3):474-486. DOI 10.1016/j.cell.2008.01.026.
- Zhou T., Tan L., Cederquist G.Y., Fan Y., Hartley B.J., Mukherjee S., Tomishima M., Brennand K.J., Zhang Q., Schwartz R.E., Evans T., Studer L., Chen S. High-content screening in hPSC-neural progenitors identifies drug candidates that inhibit Zika virus infection in fetal-like organoids and adult brain. *Cell Stem Cell*. 2017;21(2):274-283.e5. DOI 10.1016/j.stem.2017.06.017.
- Zhu Y., Wang L., Yu H., Yin F., Wang Y., Liu H., Jiang L., Qin J. In situ generation of human brain organoids on a micropillar array. *Lab. Chip*. 2017;22(17):2941-2950. DOI 10.1039/c7lc00682a.
- Zmurko J., Marques R.E., Schols D., Verbeken E., Kaptein S.J., Neyts J. The viral polymerase inhibitor 7-deaza-2'-C-methyladenosine is a potent inhibitor of in vitro Zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(5):e0004695. DOI 10.1371/journal.pntd.0004695.