

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРА АТОН1 ИНДУЦИРУЕТ БЫСТРУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ИПСК В НЕЙРОННОМ НАПРАВЛЕНИИ

А. И. Степанов^{1,2}, Л. В. Путляева^{1,2}, Д. А. Дидыч², А. А. Галиакберова^{3,4}, Н. Г. Гурская^{1,3}✉, К. А. Лукьянов²

¹ Сколковский институт науки и технологии, Центр молекулярной и клеточной биологии, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Изучение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК) и создание технологий их практического использования — одно из самых наукоемких направлений современных биомедицинских исследований. Несмотря на потенциал применения иПСК в персонализированной медицине и в создании клеточных моделей заболеваний различной этиологии, использование иПСК остается крайне сложным. Так, межклеточная гетерогенность иПСК при отсутствии эффективных способов определения идентичности и оценки существенно затрудняет воспроизводимость подобных исследований. Целью работы было создать линию иПСК, несущую ген транскрипционного фактора АТОН1 под контролем системы индукции экспрессии Tet-One, ген флуоресцентного белка TagBFP и ген устойчивости к пуromycin для селекции клеток. В работе использовали методы молекулярного клонирования, лентивирусную трансдукцию, культивирование клеток, иммунофлуоресцентное окрашивание и флуоресцентную микроскопию. Созданная клеточная модель позволит анализировать состояние единичных клеток и, следовательно, имеет большой практический потенциал как для лабораторных, так и для медицинских исследований.

Ключевые слова: иПСК, АТОН1, лентивирус, нейронная дифференцировка

Финансирование: работа была поддержана грантом РНФ № 22-14-00141.

Вклад авторов: А. И. Степанов — проведение эксперимента; Л. В. Путляева — планирование эксперимента, написание статьи; Д. А. Дидыч — дизайн и молекулярное клонирование элементов лентивирусной плазмиды, обработка рисунков; А. А. Галиакберова — культивирование клеток; Н. Г. Гурская — концепция и дизайн работы с иПСК; К. А. Лукьянов — общее руководство исследованием.

✉ **Для корреспонденции:** Надежда Георгиевна Гурская
ул. Островитянова, д. 1, стр. 1, г. Москва, 117997, Россия; ngurskaya@mail.ru

Статья получена: 01.08.2023 **Статья принята к печати:** 09.09.2023 **Опубликована онлайн:** 22.09.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.036

АТОН1 FACTOR EXPRESSION INDUCES RAPID DIFFERENTIATION OF iPSCs INTO NEURONS

Stepanov AI^{1,2}, Putlyaeva LV^{1,2}, Didych DA², Galiakberova AA^{3,4}, Gurskaya NG^{1,3}✉, Lukyanov KA²

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Center for Molecular and Cellular Biology, Moscow, Russia

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The study of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) and developing the technology for their practical use is one of the most knowledge-intensive areas of modern biomedical research. Despite the potential of using iPSCs in personalized medicine and to build cell-based models for disorders of various etiology, iPSC utilization remains challenging. Thus, the iPSC intercellular heterogeneity and the lack of effective identity determination and assessment methods considerably hamper reproducibility of such studies. The study was aimed to generate an iPSC line carrying the gene encoding the ATOH1 transcription factor controlled by the Tet-One expression induction system, along with TagBFP2 fluorescent protein and the puromycin resistance gene for cell selection. Molecular cloning, lentiviral transduction, cell culturing, immunofluorescence staining, and fluorescence microscopy were used during the study. The created cell model will allow analyzing the state of single cells and, therefore, has great practical potential for both laboratory and medical research.

Keywords: iPSC, ATOH1, lentivirus, neural differentiation

Funding: the study was supported through the grant by RSF (№ 22-14-00141).

Author contribution: Stepanov AI — experimental procedure; Putlyaeva LV — experiment planning, manuscript writing; Didych DA — design and molecular cloning of the lentiviral plasmid components, processing of figures; Galiakberova AA — cell culture; Gurskaya NG — concept and design of iPSC study; Lukyanov KA — general management.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nadya G. Gurskaya
Ostrovitjanova, 1, str. 1, Moscow, 117997, Russia; ngurskaya@mail.ru

Received: 01.08.2023 **Accepted:** 09.09.2023 **Published online:** 22.09.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.036

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (иПСК) были впервые получены в 2007 г. [1]. иПСК схожи с эмбриональными стволовыми клетками и способны дифференцироваться в самые различные типы клеток. Поскольку иПСК могут быть получены из легкодоступных соматических клеток пациентов (например, фибробластов кожи или мононуклеарных клеток периферической крови), их использование решает важные методические и этические проблемы, например, доступности нейрональных клеток. иПСК представляют

собой крайне интересную модель для фундаментальных исследований дифференцировки и де-дифференцировки клеток человека, а также имеют большой практический потенциал для медицины. Человеческие иПСК могут быть использованы для получения клеток разных типов и, потенциально, для их последующей трансплантации пациентам [2]. Многие проблемы на пути к этому (например, неполная дифференцировка человеческих иПСК и образование тератом) пока не решены и требуют дальнейшего изучения. Не менее

важным направлением использования iPСК является тестирование лекарственных средств на клетках человека, в том числе для подбора схемы лечения индивидуальных пациентов (персонализированная медицина) [3, 4]. Используя iPСК пациентов, полученные из соматических клеток, исследователи с помощью дифференцировки могут получить изогенные линии клеток, в которых воспроизводятся механизмы заболевания, и использовать их для скрининга лекарств. Так, iPСК пациентов после дифференцировки в нейроны или клетки глии используют в изучении нейродегенеративных заболеваний [5, 6].

Дифференцировка iPСК в нейроны может быть достигнута за счет использования двух групп методов: 1) химической индукции; 2) генетически опосредованной индукции [7]. В первом случае для запуска дифференцировки обычно используют смесь низкомолекулярных ингибиторов и пептидов, подавляющих экспрессию пронейрональных факторов роста, а также молекулярные пути, которые индуцируют т. е. нейрональную индукцию. Хорошо известным примером этого является процедура двойного ингибирования SMAD [8]. Целью генетически опосредованной индукции является введение в клетку кДНК, кодирующей ген транскрипционного фактора, специфичного для программы нейронной дифференцировки (например, нейрогенин-2), или регуляторные последовательности, такие как промоторы и энхансеры [9]. Однако обе стратегии позволяют дифференцировать iPСК в нейроны не менее чем за две недели.

В 2021 г. была опубликована новаторская работа, авторы которой предложили новый метод направленной дифференцировки iPСК в нейроны с использованием гиперэкспрессии транскрипционного фактора АТОН1 [10]. Новый подход превосходит ранее используемые методы по скорости и простоте работы, и позволяет достигать дифференцировки (до 99%) в течение всего нескольких дней в стандартной среде.

Целью данной работы было получение линии iPСК, несущей ген транскрипционного фактора АТОН1 под контролем системы индукции экспрессии Tet-One и флуоресцентного белка TagBFP2 в качестве селективного маркера. В задачи работы входило получение стабильной линии iPСК, в которой можно индуцировать процесс дифференцировки в нейронном направлении добавлением в ростовую среду доксициклина. Данная линия клеток может быть использована в ходе различных исследований, в том числе в анализе межклеточной гетерогенности iPСК, разработке генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров, а также тестировании новых лекарственных средств на клетках человека и подбора схемы лечения индивидуальных пациентов (разработка протоколов персонализированной медицины).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярное клонирование

Нуклеотидную последовательность транскрипционного фактора *АТОН1* амплифицировали из плазмиды Addgene pTet-O-АТОН1-T2A-PuroR (Addgene #162342) с помощью праймеров АТОН1 for ATATGAAGACTTGATCATGTCCCCTGCTGCATGCAGAGAG и АТОН1 rev ATATGAAGACAAACCTCTAGAACCTTGCCTCATCCGAGTCAC TGTAATGGGAATG. Далее *АТОН1* был вставлен вместе с *TagBFP2* в лентивирусный вектор pRRLSIN.cPPT.EF1 по

BamH1 и EcoR1 (Thermo Scientific, Waltham, MA; USA) рестриктазным сайтам. Для амплификации *TagBFP2* использовали следующие праймеры *TagBFP2* for ATATG AAGACGGAGGTGTGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGC и *TagBFP2* rev GCATGAAGACATTTCGATCATCACTTGTGC CCCAGTTTGCTAGGGAGGTGCGAGTATCTGGCC. Фьюз АТОН1 и *TagBFP2* был осуществлен с использованием расщепляемого пептида T2A GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP. Лентивирусный вектор pRRLSIN.cPPT.EF1 был любезно предоставлен доктором Д. Трно (Лозанна; Швейцария). Затем ДНК АТОН1-t2a-*TagBFP2* была перенесена в вектор pLVX-TetOne-Puro (Clontech, #631847; США) по сайтам рестрикции BamH1 и Age1 (Thermo Scientific, Waltham, MA; США). Для лигирования «липких» концов использовали T4 ДНК лигазу («Евроген»; Россия).

Работа с клеточными линиями

Клетки линии HEK293T культивировали при 37 °С (5% CO₂) в среде DMEM («ПанЭко»; Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (BioSera, Nuaille; Франция), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина («ПанЭко»; Россия).

Клеточная линия iPСК iPS-KYOU была приобретена в банке клеток ATCC (KYOU-DXR0109B, ATCC® ACS-1023™). iPСК культивировали в среде mTeSR (StemCell Technologies; США) при 37 °С (5% CO₂) с ежедневной сменой среды для оптимального роста и Matrigel (Corning; США) в качестве матрицы для поверхностного покрытия. Accutase (StemCell Technologies; США) использовали для открепления клеток от поверхности матраса.

Создание стабильной клеточной линии

Клеточную линию iPСК TetOne-АТОН1-t2a-*TagBFP2* получали с помощью лентивирусной трансдукции. За 24 ч до трансфекции $1,5 \times 10^6$ клеток HEK293T высевали в чашку для культивирования диаметром 60 мм. Всего для трансфекции использовали 2 мкг плазмиды pR8.91, 0,6 мкг плазмиды pMD.G и 6 мкг плазмиды TetOne-АТОН1-t2a-*TagBFP2*. Для транзиентной трансфекции клеток HEK293T использовали реагент Трансфектин (ИБХ РАН; Москва, Россия) в соотношении 2,5 мкл реагента на 1 мкг плазмиды. Смесь ДНК и трансфектина инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре, а затем добавляли по каплям. Через 4 ч среду заменяли 2 мл свежей DMEM. На следующие сутки среду, содержащую собранные лентивирусы, фильтровали (фильтр с размером пор 0,45 мкм) и концентрировали ультрацентрифугированием при 100 000 g (Beckman; США) при 4 °С в течение 3 ч. Осадок ресуспендировали в 500 мкл mTeSR (StemCell Technologies; США) и использовали для трансдукции клеток iPСК. Для создания стабильных клеточных линий лентивирусные частицы добавляли к 1×10^5 iPСК. Затем трансдуцированные клетки селективно отбирали с помощью добавления в ростовую среду антибиотика пурамицина (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; США) с финальной концентрацией 5 мкг/мл.

Иммуноокрашивание фиксированных клеток

Клетки были посажены и выращены, как описано выше, зафиксированы в 4% формальдегиде в PBS в течение 15 мин при комнатной температуре, промыты три раза в PBS, пермеабилзация была обеспечена в течение 20 мин в

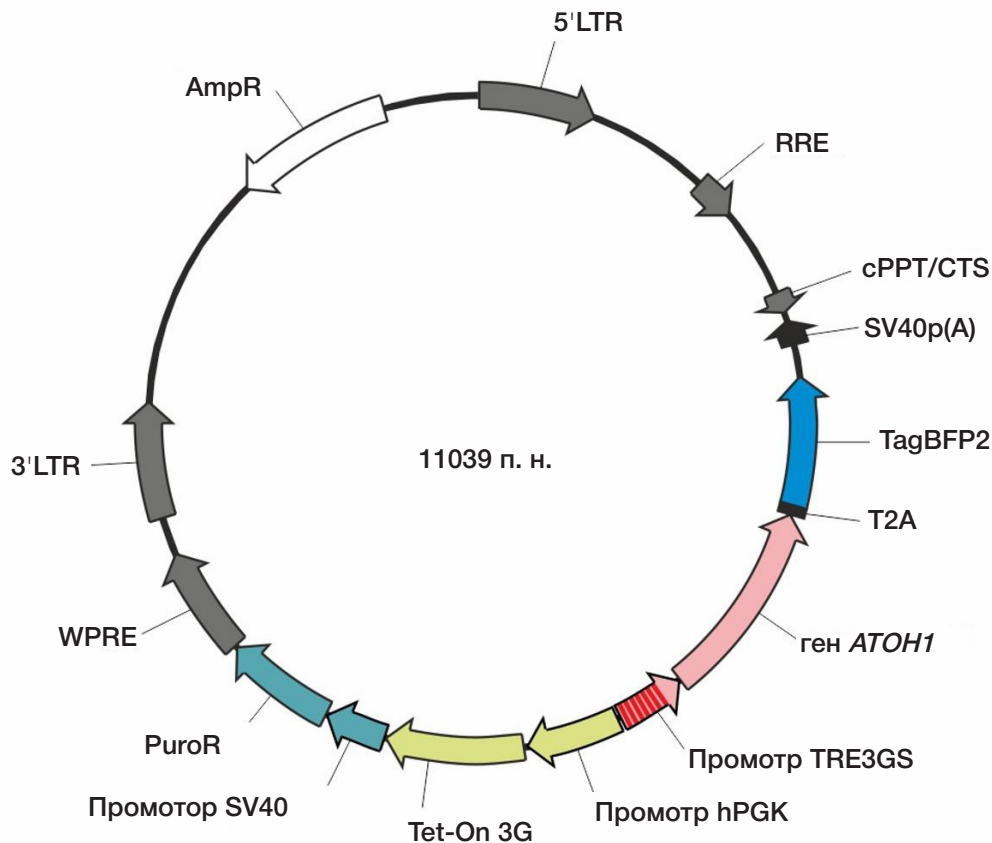


Рис. 1. Схема лентивирусной плазмиды *TetOne-ATOH1-t2a-TagBFP2*, использованной для получения стабильной клеточной линии иПСК с индуцируемой экспрессией слитого гена *ATOH1-T2A-TagBFP2*. Ген *ATOH1-T2A-TagBFP2* находится под контролем индуцибельного доксициклин-зависимого промотора TRE3GS, содержащего семь повторов последовательности оператора tetO. Дополнительно плазмида содержит гены *Tet-On 3G* (трансактиватор промотора TRE3GS) и *PuroR* (ген устойчивости к пуromицину) под контролем конститутивных промоторов hPGK (промотор гена *PGK1* человека) и SV40 соответственно. Серым обозначены стандартные элементы лентивирусных плазмид, необходимые для правильной и эффективной сборки функциональных вирусных частиц в пакующих клетках, а также обеспечивающие высокую экспрессию трансгенов (5'LTR/3'LTR — длинные концевые повторы (long terminal repeat), RRE — участок связывания вирусного белка Rev (Rev response element); cPPT/CTS — центральный полипуриновый тракт/центральная терминирующая последовательность (central polyurine tract/central termination sequence); WPRE — посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита северноамериканского лесного сурка (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element); SV40p(A) — терминатор транскрипции SV40 с поли(A)-сигналом; AmpR — ген устойчивости к ампициллину

0,1% Triton X-100 (Helicon; США) в PBS, и инкубированы в течение 1 ч с 1% BSA (Sigma; США) в PBS для блокировки. Инкубацию первичными антителами проводили 1 ч, инкубацию вторичными антителами проводили в течение часа при комнатной температуре. Клетки промывали PBS и изображали в среде для изображения с помощью микроскопа BZ-9000 (Keyence, Осака; Япония). Использовали следующие антитела: Rabbit anti-TUBB3 и Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 568 (ThermoFisher, Waltham, MA; США), в разведении 1 : 500 и 1 : 1000 соответственно.

Флуоресцентная микроскопия живых клеток

При проведении экспериментов по визуализации живых клеток клетки культивировали в конфокальных чашках со стеклянным дном (SPL Life Sciences; Корея). Непосредственно перед микроскопией среду mTESR заменяли на среду для визуализации MEM («ПанЭко»; Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (BioSera, Cholet; Франция) и 20 mM HEPES (Corning, NY; США).

Для *in vivo* флуоресцентной микроскопии использовали флуоресцентный микроскоп Keyence Biorevo BZ-9000 (Keyence; Япония). Клетки снимали при увеличении $\times 60$, используя объектив CFI Plan Apo $\times 60\text{X}/\text{NA}1.40$. Съемки вели в синем канале, используя фильтр-куб DAPI (возбуждение 360/40 нм, испускание 460/50 нм) для детекции флуоресценции TagBFP.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При создании наиболее эффективной модели для запуска дифференцировки иПСК в нейронные клетки мы использовали подход, опубликованный в 2021 г. группой Дж. Чёрча [10]. В данной работе был проведен масштабный скрининг трех линий иПСК человека и показано, что транскрипционный фактор ATOH1 является наиболее эффективным драйвером индукции нейронной дифференцировки. В отличие от других путей дифференцировки иПСК в нейроны, ATOH1-индуцируемая дифференцировка не требует специальных сред и дополнительных факторов, а также данный процесс протекает в кратчайшие сроки (4 дня). Для создания наиболее биологически релевантной модели ATOH1-опосредованной нейрональной дифференцировки мы решили сконструировать стабильную линию иПСК, несущую ген *ATOH1* под индуцируемым промотором TRE3Gs. Для этого мы создали лентивирусную плазмиду с индуцируемой экспрессией ATOH1 (рис. 1). Данная плазмида включает в себя три независимые экспрессионные кассеты:

TRE3G promoter-ATOH1-t2a-TagBFP2 — ген *ATOH1* находится под тетрациклиновым промотором и в одной рамке считывания с маркером экспрессии (слит) с маркером экспрессии — флуоресцентным белком TagBFP2 посредством T2A-пептида. Индукция экспрессии

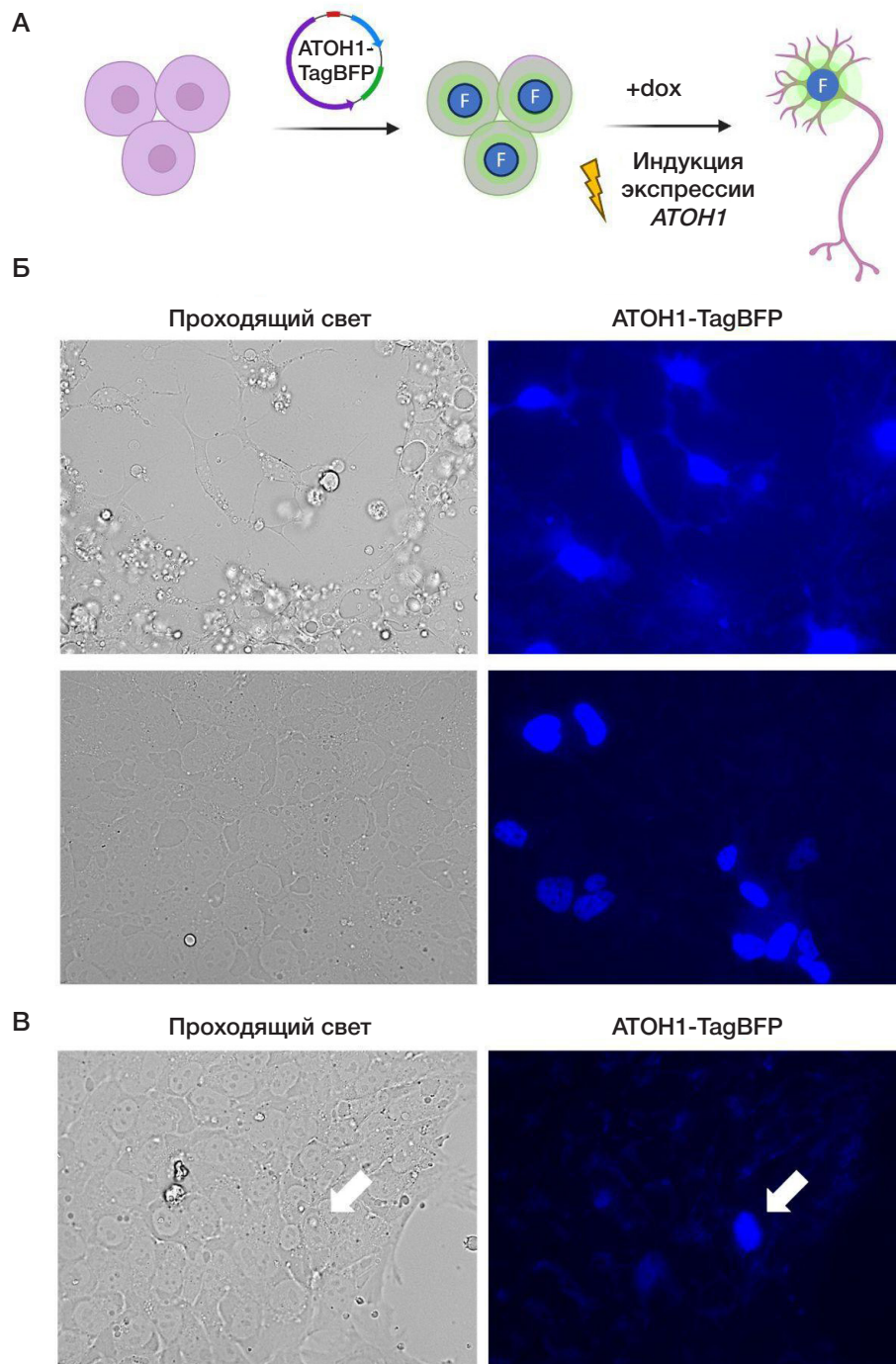


Рис. 2. Экспрессия конструкции *TetOne-ATOH1-TagBFP2* в иПСК. **А.** Схема создания стабильной клеточной линии иПСК, несущей ген *АТОН1* под индуцируемым промотором TRE3G. F — флуоресцентный белок TagBFP. **Б.** Клетки через 24 ч после индукции экспрессии доксициклином. **В.** После замораживания и размораживания клеточной линии большинство клеток теряют способность к доксициклин-зависимой экспрессии (стрелкой показана единственная клетка в поле зрения, экспрессирующая яркий сигнал TagBFP2 после добавления доксициклина)

АТОН1-t2a-TagBFP2 осуществляется при добавлении в ростовую среду доксициклина;

hPGK promoter-TetOn3G — *TetOn3G*, ген активатора тетрациклинового промотора TetOn находится под контролем промотора hPGK;

SV40 promoter-PuroR — обеспечивает экспрессию пурамицина, необходимую для селективного отбора иПСК, несущих только целевую конструкцию.

Данную генетическую конструкцию, получившую название *TetOne-ATOH1-t2a-TagBFP2*, использовали для создания лентивирусных частиц и заражения клеточной линии iPS-KYOU (рис. 2А). Далее клетки подвергали селекции на среде с пурамицином, после чего

добавляли доксициклин для активации тетрациклинового промотора. Спустя 24 ч после добавления доксициклина мы зафиксировали слабую флуоресценцию синего белка TagBFP2, что свидетельствует о начальной стадии экспрессии фактора АТОН1. На вторые сутки сигнал был сильным и хорошо детектируемым на флуоресцентном микроскопе, отмечено изменение морфологии клеток на нейроноподобную (рис. 2Б; *вверху*).

Эффективность дифференцировки оценивали с помощью иммунохимической окраски на наличие экспрессии маркера нейральных стволовых клеток — β III-тубулина (TUBB3) (рис. 3А). Мы показали гетерогенность полученной при дифференцировке культуры клеток по

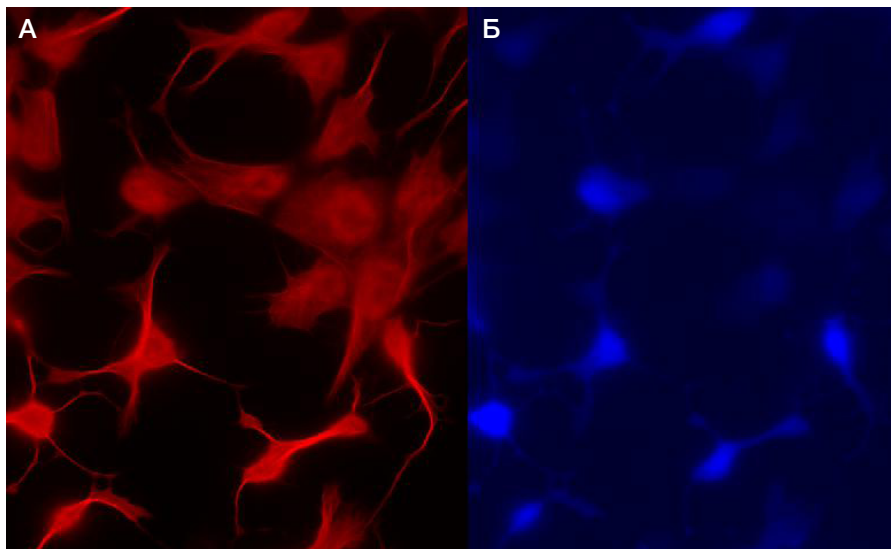


Рис. 3. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии β III-тубулина (TUBB3) и одновременно TagBFP2 в клетках на 4-й день дифференцировки после индукции *TetOne-ATOH1-t2a-TagBFP2*. **А.** Красный сигнал — использовали антитела к TUBB3 Rabbit anti-TUBB3 (Affinity), вторичные антитела Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 568 (ThermoFisher). **Б.** Синий сигнал — флуоресценция TagBFP2

экспрессии TUBB3: часть клеток с флуоресценцией TagBFP2 не экспрессировала TUBB3 и не имела морфологических признаков, специфичных для нейронного направления (рис. 3Б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Созданная клеточная линия *TetOne-ATOH1-t2a-TagBFP2* продемонстрировала успешную возможность индуцируемого запуска экспрессии на 1–2 сутки после начала эксперимента. Однако экспрессия синего белка, отражающая количество белка ATOH1 в клетке, была неоднородной (рис. 2Б, *внизу*; рис. 3Б). Возможно, данный феномен мы наблюдали ввиду гетерогенности исходной клеточной линии иПСК, а также ввиду отсутствия клональной селекции трансдуцированных клеток в данном эксперименте. Мы также предполагаем, что в клетках иПСК может происходить со временем метилирование тетрациклинового промотора и/или hPGK промотора, что ведет к снижению белка активатора тетрациклинового

промотора, а суммарным эффектом данных процессов является снижение экспрессии ATOH1-t2a-TagBFP2. Действительно, после разморозки новой аликвоты линии *TetOne-ATOH1-t2a-TagBFP2* и повтора эксперимента мы обнаружили, что количество клеток, экспрессирующих TagBFP2, снизилось (рис. 1В).

ВЫВОДЫ

Применение нового метода направленной дифференцировки иПСК в нейронном направлении позволяет быстро (за 4 дня) получать популяции обогащенных дифференцированными в нейронном направлении клетками. Созданная клеточная линия с экспрессией *ATOH1* под контролем индуцируемого промотора TRE3Gs пригодна к использованию в экспериментах, требующих быстрой дифференцировки иПСК, однако предполагается проведение непрерывного эксперимента (отсутствия циклов замораживания и выведения из заморозки клеток), что является ограничением данного метода при получении экспериментальных данных.

Литература

1. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861–72.
2. Chang C-Y, Ting H-C, Su H-L, Jeng J-R. Combining Induced Pluripotent Stem Cells and Genome Editing Technologies for Clinical Applications. *Cell Transplant*. 2018; 27: 379–92.
3. Kleiman RJ, Engle SJ. Human inducible pluripotent stem cells: Realization of initial promise in drug discovery. *Cell Stem Cell*. 2021; 28: 1507–15.
4. Madrid M, Sumen C, Aivio S, Saklayen N. Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapies: Promise, Progress, and Challenges. *Curr Protoc*. 2021; 1: e88.
5. Zhang N, Bailus BJ, Ring KL, Ellerby LM. iPSC-based drug screening for Huntington's disease. *Brain Res*. 2016; 1638: 42–56.
6. Chang C-Y, Ting H-C, Liu C-A, Su H-L, Chiou T-W, Lin S-Z, et al. Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Based Neurodegenerative Disease Models for Phenotype Recapitulation and Drug Screening. *Molecules*. 2020; 25. DOI: 10.3390/molecules25082000.
7. Telias M. Neural differentiation protocols: how to choose the correct approach. *Neural Regeneration Res*. 2023; 18: 1273–4.
8. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*. 2009; 27: 275–80.
9. Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S, et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron*. 2013; 78: 785–98.
10. Ng AHM, Khoshakhlagh P, Rojo Arias JE, Pasquini G, Wang K, Swiersy A, et al. A comprehensive library of human transcription factors for cell fate engineering. *Nat Biotechnol*. 2021; 39: 510–9.

References

1. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861–72.
2. Chang C-Y, Ting H-C, Su H-L, Jeng J-R. Combining Induced Pluripotent Stem Cells and Genome Editing Technologies for Clinical Applications. *Cell Transplant*. 2018; 27: 379–92.
3. Kleiman RJ, Engle SJ. Human inducible pluripotent stem cells: Realization of initial promise in drug discovery. *Cell Stem Cell*. 2021; 28: 1507–15.
4. Madrid M, Sumen C, Aivio S, Saklayen N. Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapies: Promise, Progress, and Challenges. *Curr Protoc*. 2021; 1: e88.
5. Zhang N, Bailus BJ, Ring KL, Ellerby LM. iPSC-based drug screening for Huntington's disease. *Brain Res*. 2016; 1638: 42–56.
6. Chang C-Y, Ting H-C, Liu C-A, Su H-L, Chiou T-W, Lin S-Z, et al. Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Based Neurodegenerative Disease Models for Phenotype Recapitulation and Drug Screening. *Molecules*. 2020; 25. DOI: 10.3390/molecules25082000.
7. Telias M. Neural differentiation protocols: how to choose the correct approach. *Neural Regeneration Res*. 2023; 18: 1273–4.
8. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*. 2009; 27: 275–80.
9. Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S, et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron*. 2013; 78: 785–98.
10. Ng AHM, Khoshakhlagh P, Rojo Arias JE, Pasquini G, Wang K, Swiersy A, et al. A comprehensive library of human transcription factors for cell fate engineering. *Nat Biotechnol*. 2021; 39: 510–9.