ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 6, с. 389–396

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 591.392

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГИСТОНОВ ИЗМЕНЯЕТ НАПРАВЛЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИПСК ЧЕЛОВЕКА С ФОРМИРОВАНИЕМ КАРДИОСФЕР ВМЕСТО КОЖНЫХ ОРГАНОИДОВ

© 2023 г. В. К. Абдыев[a, *], А. А. Рябинин[a, **], Е. Д. Ерофеева[b], М. Д. Панкратова[a, b], Е. А. Воротеляк[a], А. В. Васильев[a, b]

[a] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия*

[b] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия*

**e-mail: mailtovepa@gmail.com*

***e-mail: andrey951233@mail.ru*

Поступила в редакцию 14.07.2023 г.
После доработки 09.10.2023 г.
Принята к публикации 21.10.2023 г.

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) являются уникальным типом клеток, способным дифференцироваться во все типы клеток организма. В культуре ПСК могут существовать субпопуляции с различным уровнем плюрипотентности, что приводит к различным результатам при их дифференцировке. Одним из ключевых факторов, определяющих состояния плюрипотентности и влияющих на потенциал дифференцировки ПСК, является эпигенетическое состояние клеток, в том числе уровень деацетилирования гистонов. Активация деацетилазы гистонов (HDAC) в ПСК человека и мыши увеличивает процентное содержание гетерохроматина. В данной работе мы использовали протокол дифференцировки эмбриоидных телец из индуцированных плюрипотентных клеток человека (чИПСК), рассчитанный на формирование эктодермы и нейроэктодермы с последующим их развитием в кожные органоиды. Однако после воздействовия на чИПСК ингибиторов HDAC (бутирата натрия и вальпроевой кислоты), направление их дифференцировки менялось: формировалась мезодерма, которая в дальнейшем развивалась в сокращающиеся кардиосферы.

Ключевые слова: чИПСК, направленная дифференцировка, HDAC, кожный органоид, эктодерма, нейроэктодерма, HDACi, кардиосферы

DOI: 10.31857/S0475145023060022, **EDN:** HKRZYI

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) обладают неограниченным пролиферативным потенциалом и способны дифференцироваться в три зародышевых листка. По источнику происхождения выделяют два типа ПСК: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). В ходе эмбрионального развития происходит изменение эпигенетического состояния клеток. В ПСК увеличивается процентное содержание гетерохроматина за счет активности деацетилазы гистонов (HDAC), которая удаляет ацетильные группы с гистонов и стимулирует компактизацию хроматина (Johnstone, 2002; Saraiva et al., 2010). Было показано, что ингибирование HDAC способствует гиперацетилированию гистонов (Seto, Yoshida, 2014), что приводит к переходу гетерохроматина в эухроматин и способствует увеличению доступности промоторов и энхансеров. Кроме того, известно, что в культуре ПСК могут существовать субпопуляции, различающиеся потенциалом к дифференцировке и профилем экспрессии генов. В связи с этим, представляет интерес разработка способов модуляции экспрессии генов с помощью воздействия на ацетилирование гистонов.

В рамках данного исследования мы пронаблюдали воздействие ингибиторов HDAC (HDACi) на чИПСК, культивировавшиеся в соответствии с протоколом, который ранее применялся для получения кожных органоидов (Lee et al., 2020, 2021). В результате такого воздействия изменялась траектория дифференцировки этих клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование линии чИПСК

В работе использовалась линия чИПСК (hiPSC-KYOU-DXR0109B [201B7] (ANCC ACS-1023)).

Клетки культивировали в условиях нормоксии (5% CO_2 и 20% O_2) в среде Essential 8 (Thermo Fisher Scientific, США). Замену среды осуществляли каждый день. По достижении 60–80% конфлюентности, клетки пассировали с помощью аккутазы (1 мг/мл) (STEMCELL Technologies, Канада). Для получения ЧИПСК человека, обработанных HDACi, стандартную среду заменяли на среду mTeSR1 с добавлением HDACi (с VPA и бутиратом натрия) (0.5× mTESR1 (Stemcell, США), 0.5× Neurobasal™ medium (Gibco, США), 0.5% Glutamax (Gibco), 0.5% Пенициллин/стрептомицин (Gibco, США) 0.5% N2 (Gibco, США), 1% B27 (Gibco, США), 0.5% NEAA (Gibco, США), 50 нМ вальпроевая кислота (VPA) (Sigma, США), 0.1 мМ бутират натрия (NaB) (Stem cells, США), 0.05 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma, США), 25 мкг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США). Замена среды осуществлялась каждый день.

Получение и дифференцировка кожных органоидов

Формирование эмбриоидных телец. Формирование эмбриоидных телец осуществлялось в соответствии с описанным ранее протоколом (Lee et al., 2020), за исключением того, что в среду не вносили нормоцин.

Дифференцировка органоидов. Для дифференцировки эмбриоидных телец и созревания органоидов использовали ранее опубликованный протокол (Lee et al., 2020). На стадии созревания вместо низкоадгезивных планшетов были использованы обычные планшеты для адгезивных культур (Corning, США), покрытые 1% агарозой (Sigma). Помимо этого, в среды для дифференцировки и созревания не вносили нормоцин. В эксперименте для проведения дифференцировки эмбриоидных телец в контрольных условиях (эмбриоидные тельца, полученные из чИПСК, культивируемых на E8 в условиях нормоксии) и в модифицированных условиях (эмбриоидные тельца, полученные из чИПСК, культивируемых на модифицированной среде на базе mTeSR1 с добавлением HDACi) использовали по 10 органоидов.

Иммуноцитохимическое маркирование

Перед фиксацией культуру клеток трижды промывали раствором PBS (ПанЭко, Россия), далее клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma) в течении 60 мин при 4°C. После фиксации клетки трижды промывали раствором PBS по 3–5 мин. Далее производили пермеабилизацию с помощью 0.2% раствора Triton X-100 (Sigma) в PBS в течение 15 мин. Затем клетки дважды промывали PBS в течение 10–15 мин. Для блокировки неспецифической сорбции антител клетки предварительно инкубировали 60 мин при 37°C в блокирующем растворе (5% FBS (Hyclone, США); 0.3% Triton (Sigma); 0.01% Tween (Sigma)). Далее удаляли блокирующий раствор и добавляли первичные антитела к белкам, специфичным для чИПСК, растворенные в блокирующем растворе, содержащем PBS и 2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma). Использовали концентрации первичных антител, соответствующие рекомендациям производителя, инкубацию в них производили при 4°C в течение ночи. После инкубации клетки трижды промывали раствором PBS. Вторичные антитела использовали в разведении 1 : 1000. Далее клетки инкубировали во вторичных антителах 90 мин при 37°C. Далее клетки трижды отмывали раствором PBS. Ядра клеток в течение 5 мин окрашивали DAPI (VitroVivo biotech, США) в конечной концентрации 0.1 мкг/мл. Клетки визуализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе EVOS FL AUTO (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения обрабатывали в программе ImageJ (https://imagej.net/). Список первичных антител: OCT4 (Abcam ab181557, 1 : 250); KLF17 (Santa Cruz sc-398132, 1 : 200, США). Список вторичных антител: Alexa Flour 568 goat anti mouse IgG (H+L) (Invitrogen A-21201, 1 : 1000, США); Alexa Flour 488 goat anti rabbit IgG (H+L) (Invitrogen A-21441, 1 : 1000).

Получение криосрезов и иммуногистохимическое маркирование кожных органоидов

Для иммуноокрашивания органоиды трижды отмывали от среды раствором PBS (ПанЭко, Россия), далее фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma) в течение 30 мин при комнатной температуре. После фиксации органоиды трижды промывали PBS (ПанЭКо, Россия) по 5 мин, и затем проводили через 15 и 30% растворы сахарозы (Helicon, Россия). Далее органоиды погружали в коммерческую среду для замораживания тканей Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Япония) и замораживали в жидком азоте. Криосрезы органоидов толщиной 10 мкм изготавливали на криостате Leica SM1900. Первичные антитела наносили на срезы в блокирующем растворе (0.5% FBS; 0.2% Tween 20; 0.2% Triton X-100) в разведениях, соответствующих рекомендациям производителя. Инкубация с первичными антителами проходила при 4°C в течение 24 ч. После инкубации срезы трижды промывали раствором PBS. Затем на срезы наносили раствор фаллоидина (Alexa Fluor 488, A12379, Thermo Fisher, США) для визуализации F-актина, а также раствор вторичных антител в разведении 1 : 500 и инкубировали при 4°C в течение 60 мин в темноте. Далее срезы трижды отмывали от вторичных антител и фаллоидина раствором PBS. Для визуализации ядер клеток проводили окрашивание ДНК-связывающимся красителем DAPI в концентрации 1 мкг/мл в течение 10 мин. Срезы заключали в среду Aqueous Mounting Medium (Abcam, Великобритания) и визуализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Olympus IX73 с камерой

Olympus DP74. Изображения обрабатывали в программе ImageJ (https://imagej.net/). Список первичных антител: N-кадгерин (Abcam ab18203, 1 : 1000); Eomes (Abcam ab183991, 1 : 2000), Vimentin (Abcam ab24525, 1 : 5000), Cytokeratin 14 (Abcam ab181595, 1 : 500); AE 13 (K40) (Invitrogen MA1-5765, 1 : 300); Desmin (R&D Systems AF3844, 1 : 650). Список вторичных антител: Alexa Fluor 546 Donkey-anti-rabbit (Invitrogen A10040 (1 : 500)); Alexa Fluor 594 Goat-anti-chicken (Invitrogen A11042, 1 : 500); Alexa Fluor 660 goat-anti-mouse (Invitrogen A21055, 1 : 500), Alexa Fluor 546 donkey-anti-goat (Invitrogen A11056, 1 : 500).

Выделение тотальной РНК и синтез кДНК

Выделение РНК из клеточных культур осуществляли с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Реагент добавляли в суспензию клеток в объеме 1 мл из расчета 1×10^6–10^7 клеток и оставляли при комнатной температуре 10–15 мин. Далее смесь центрифугировали 10 мин при 12000 *g*, а супернатант переливали в новую пробирку. В пробирку с супернатантом добавляли 0.2 мл хлороформа и встряхивали ее в течение 15 с. Далее образец инкубировали 3–5 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая. Образец центрифугировали при 12000 *g* в течение 15 мин при 4°С. Далее из пробирки отбирали водную фазу, добавляли в нее 0.5 мл 100% изопропанола (Sigma) и инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем образец центрифугировали при 12000 *g* в течение 10 мин при комнатной температуре. Из пробирки отбирали супернатант, оставив осадок РНК на дне, и по стенке добавляли 2 мл 75% этанола. Далее образец центрифугировали на 15000 *g* в течение 5 мин при комнатной температуре, удаляли этанол, высушивали осадок на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течение 5–7 мин. Осадок растворяли в 20 мкл воды, свободной от РНКаз, прогревая образцы 3–5 мин при 55–60°С Концентрацию выделенной РНК определяли на приборе NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для реакции обратной транскрипции брали 1 мкг РНК. Реакцию проводили с использованием MMLV RT kit (Евроген, Россия), согласно протоколу производителя. Для осуществления реакции готовили две смеси. Первая смесь в объеме 9 мкл содержала 1 мкг РНК-матрицы, 20 мкМ праймеров, 1 мкл игибитора РНКаз и деионизированную, свободную от нуклеаз воду (Евроген). Смесь перемешивали пипетированием и прогревали 2 мин при 70°С для денатурации вторичных структур РНК и переносили образцы в лед. Состав второй смеси в объеме 11 мкл включал: деионизированную воду, свободную от нуклеаз; 4 мкл 5× буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл смеси dNTP (10 мМ каждого), 2 мкл DTT (20 мМ), 1 мкл MMLV ревертазы. Обе смеси смешивали и инкубировали 60 мин при 42°С. Для остановки реакции итоговую смесь прогревали при 70°С в течение 10 мин. Образцы хранили при –20°С, заранее разделив на аликвоты. Перед применением аликвоту прогревали 2 мин при 65°С для дезагрегации молекул кДНК. После обратной транскрипции для проведения реакции ПЦР-РВ кДНК разводили в 10 раз.

Подбор праймеров

Праймеры были подобраны в онлайн ресурсе Primer-BLAST, интегрированном в базу данных NCBI (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Дополнительную проверку праймеров проводили в программах Primer Select и Oligo Analyzer. Температуру отжига праймеров определяли с помощью программы Oligo или опытным путем. Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

ПЦР, ПЦР-РВ

Качественную и количественную оценки экспрессии исследуемых генов проводили с помощью ПЦР и ПЦР-РВ. ПЦР проводили на матрице, ранее синтезированной кДНК с помощью набора Screenmix (Евроген, Россия) для амплификации в соответствии с инструкцией производителя на амплификаторе T1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad, США).

Для ПЦР в реальном времени в качестве матрицы использовали кДНК (синтезирована из 1 мкг тотальной РНК) и готовую смесь для ПЦР qPCR mix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия). Относительный уровень экспрессии генов интересов определяли с помощью калибровочной кривой и нормализовали на экспрессию гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Исследование проводилось в трех технических и трех независимых экспериментальных повторах. Реакции проводились на приборе LightCycler 96 System (Roche, Швейцария). Для сравнения экспрессии генов в различных условиях использовался сравнительный CT-метод для относительного количественного анализа. По полученным значениям CT рассчитывался ΔΔCT для оценки различий в экспрессии генов.

Проверка статистической значимости различий в уровнях экспрессии исследуемых генов осуществлялась при помощи однофакторного дисперсионного анализа, проведенного в приложении MS Excel (Microsoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика чИПСК в контрольных и модифицированных условиях

Эффект воздействия HDACi на вектор трехмерной дифференцировки чИПСК ранее не был

Таблица 1. Праймеры, использованные при проведении ПЦР-РВ

Название праймера	Последовательность (5'–3')
DAZL-forward	ATGTTGTACCTCCGGCTTATTCA
DAZL-reverse	CCATTTCCAGAGGGTGGAGTA
GAPDH-forward	CACCCACTCCTCCACCTTGAC
GAPDH-reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG
KLF2-forward	CAAGAGTTCGCATCTGAAGGC
KLF2-reverse	AGAAGGCACGATCGCACAG
KLF4-forward	ACCAGGCACTACCGTAAACACA
KLF4-reverse	GGTCCGACCTGGAAAATGCT
KLF17-forward	TAGACCCCACCCAGTCTTCAT
KLF17-reverse	CGCTGAGTTCTCGTTATCCTGGG
NANOG-forward	CAATGGTGTGACGCAGGGAT
NANOG-reverse	TGCACCAGGTCTGAGTGTTC
OCT4/Pou5f1-forward	ACCCACACTGCAGCAGATCA
OCT4/Pou5f1-reverse	CACACTCGGACCACATCCTTCT
PRDM14-forward	AAGCAACTGGATGCGCTATGT
PRDM14-reverse	GGGATGGGCTTAATGGTGTAGAA
REX1-forward	GCCTTATGTGATGGCTATGTGT
REX1-reverse	ACCCCTTATGACGCATTCTATGT
SOX2-forward	TGCGAGCGCTGCACAT
SOX2-reverse	GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA
STAT3-forward	CGGAGAAACAGGATGGCCC
STAT3-reverse	GCGGCTATACTGCTGGTCAA
STELLA/DPPA3-forward	AGAGAAGGGTCCGCACTTTG
STELLA DPPA3-reverse	TTCCCGATTTTCGCATTCTC
TFE3-forward	AGCCATCACTGTCAGCAACT
TFE3-reverse	TGTCTTTCTTCTGCCGTTCCT
YAP-forward	TCCCAGATGAACGTCACAGC
YAP-reverse	GAAGAGGACTGAAGCCGAG

описан. Мы изучали этот эффект на модели дифференцировки эмбриоидных телец в кожные органоиды (Lee et al., 2020). Для этого перед формированием эмбриоидных телец мы культивировали чИПСК в 2 разных условиях: контрольных, в среде E8, где чИПСК поддерживаются в так называемом праймированном состоянии и компетентны к дифференцировке (Teslaa et al., 2016), а также в экспериментальных, в среде с bFGF, бутиратом натрия и вальпроевой кислотой, где клетки поддерживаются в модифицированном, менее праймированном состоянии (см. Материалы и методы). В результате сравнительного анализа этих состояний не было обнаружено отличий в морфологии чИПСК, обработанных HDACi, относительно контрольных чИПСК (рис. 1а, 1б). Однако в присутствии HDACi уровень экспрессии генов *KLF2*, *KLF4, SOX2, NANOG* увеличивался (рис. 1в). Мы также зафиксировали значительное повышение уровня экспрессии *DAZL* в контроле относительно экспериментальной группы. Кроме того, в среде с HDACi, наблюдали повышение экспрессии генов-маркеров более раннего (наивного) состояния плюрипотентности (*KLF2*, *KLF4*, *SOX2*, *NANOG*), что свидетельствуют о сохранении плюрипотентного статуса чИПСК в среде с HDACi одновременно с их сдвигом в раннее состояние плюрипотентности.

Сравнительный анализ дифференцировки эмбриоидных телец и органоидов в контрольной и экспериментальной группах

Эмбриоидные тельца (ЭТ) были сформированы из контрольных чИПСК и чИПСК, обработанных HDACi. Метод формирования был взят из статьи, описывающей формирование кожного органоида из чИПСК (Lee et al., 2020). Сформированные ЭТ на начальной стадии содержали по 3000 клеток. В контрольных условиях у ЭТ дифференцировались покровная эктодерма и нейроэктодерма. Впоследствии покровная эктодерма формировала цисту, выстланную эпидермисом, а нейроэктодерма формировала соединительную ткань, что было подтверждено иммуногистохимическим маркированием K14 и виментина на 30й день дифференцировки эмбриоидных телец (рис. 2а). На 110й день дифференцировки в органоидах сформировались волосяные фолликулы, что подтверждается экспрессией AE13, маркера стержня волоса (рис. 2а). Эти результаты согласуют-

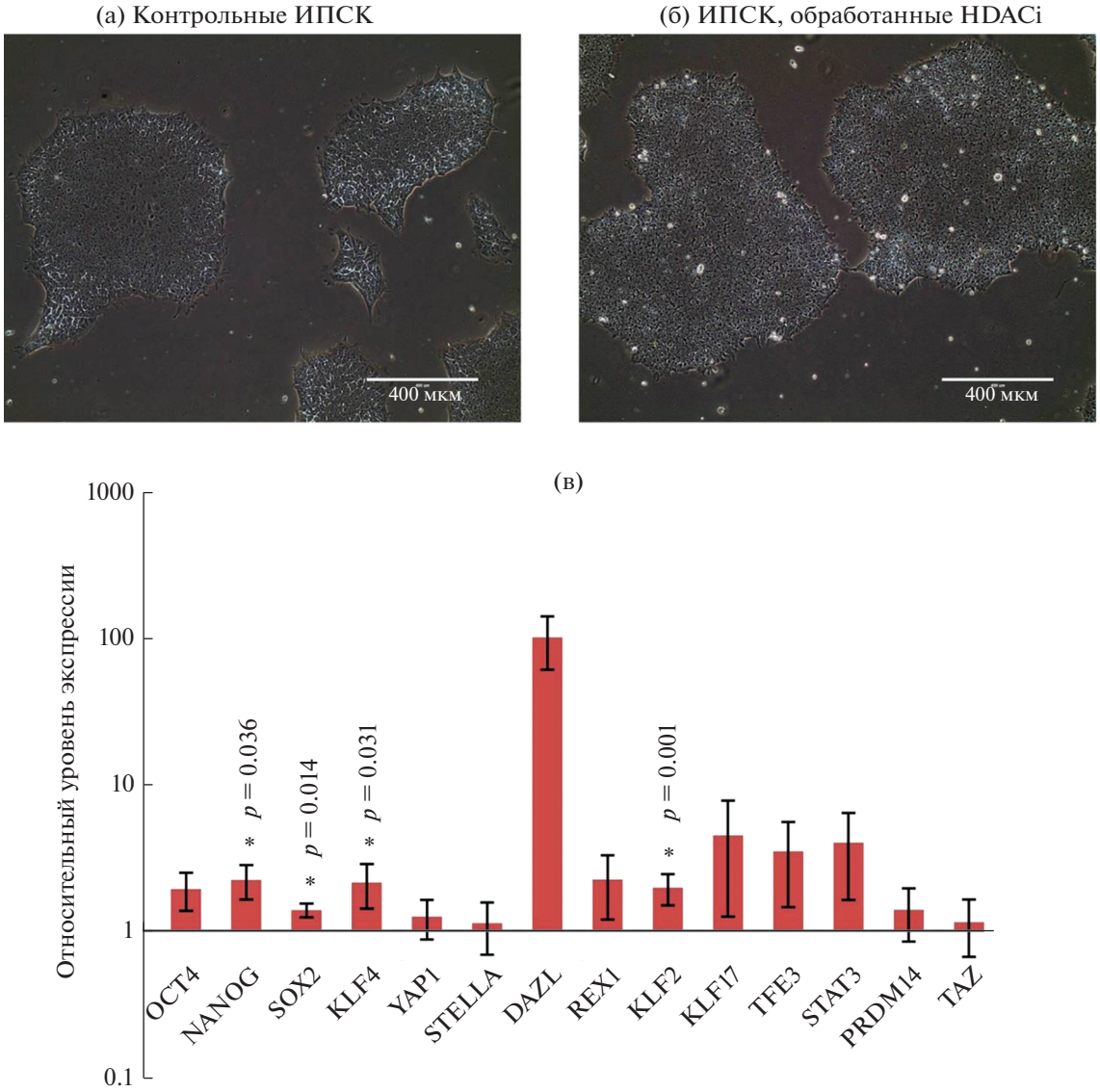


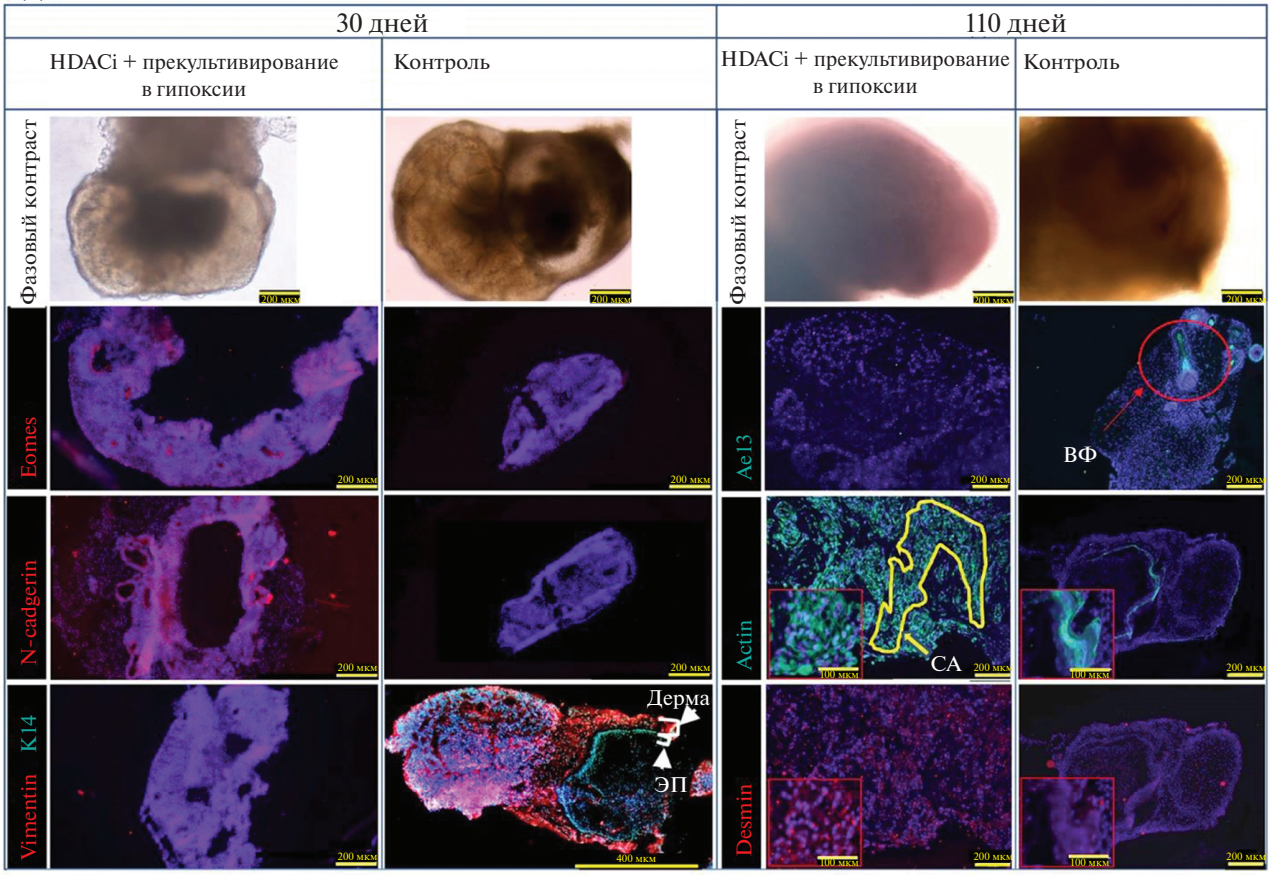
Рис. 1. Морфология колоний чИПСК и экспрессия генов-маркеров плюрипотентности в чИПСК. (а) Морфология колоний контрольных чИПСК. Фазово-контрастная микроскопия, пятые сутки культивирования. Масштабный отрезок 400 мкм. (б) Морфология колоний чИПСК в среде с добавлением HDACi. Фазово-контрастная микроскопия, пятые сутки культивирования. Масштабный отрезок 400 мкм. (в) Экспрессия генов-маркеров плюрипотентности в чИПСК. Сравнение профилей экспрессии маркерных генов в чИПСК после воздействия HDACi и в контроле. Данные представлены в виде средних значений с разбросом в виде ошибки среднего. По оси ординат – относительный уровень экспрессии генов, нормированных на экспрессию гена домашнего хозяйства, *GAPDH,* и на экспрессию генов в контрольной группе (логарифмическая шкала, log10-(значение)). * – Статистическая достоверность результатов однофакторного дисперсионного анализа на уровне $p < 0.05$.

ся с литературными данными, описывающими формирование кожных органоидов в ходе дифференцировки ЭТ (Lee et al., 2020). В то же время, в органоидах, полученных из чИПСК, обработанных HDACi, не были выявлены K14 и виментин. Однако, в отличие от контроля, в этих органоидах были идентифицированы ранние маркеры мезодермальной дифференцировки – EOMES и N-кадгерин. На 110й день маркеры волосяных фолликулов в органоидах выявлены не были. Однако результаты выявления актина и десмина демонстрируют, что цитоплазматические паттерны этих белков различаются в контроле и в эксперименте, при использовании модифицированного протокола. Актин-десмин положительные клетки в экспериментальной группе формируют структуры, напоминающие сеть (рис. 2а).

Также с 80-го дня дифференцировки в органоидах экспериментальной группы были зафиксированы ритмичные сокращения с периодом 1 секунда (рис. 2б). Этот признак характерен для кардиоваскулярных органоидов.

Все описанные выше паттерны экспрессии, а также наличие сокращений наблюдались у органои-

(а)


30 дней
110 дней
HDACi + прекультивирование в гипоксии
Контроль
HDACi + прекультивирование в гипоксии
Контроль
Фазовый контраст
Eomes
N-cadgerin
K14
Vimentin
Ae13
Actin
Desmin
ВФ
СА
Дерма
ЭП
200 мкм
400 мкм
100 мкм

(б)

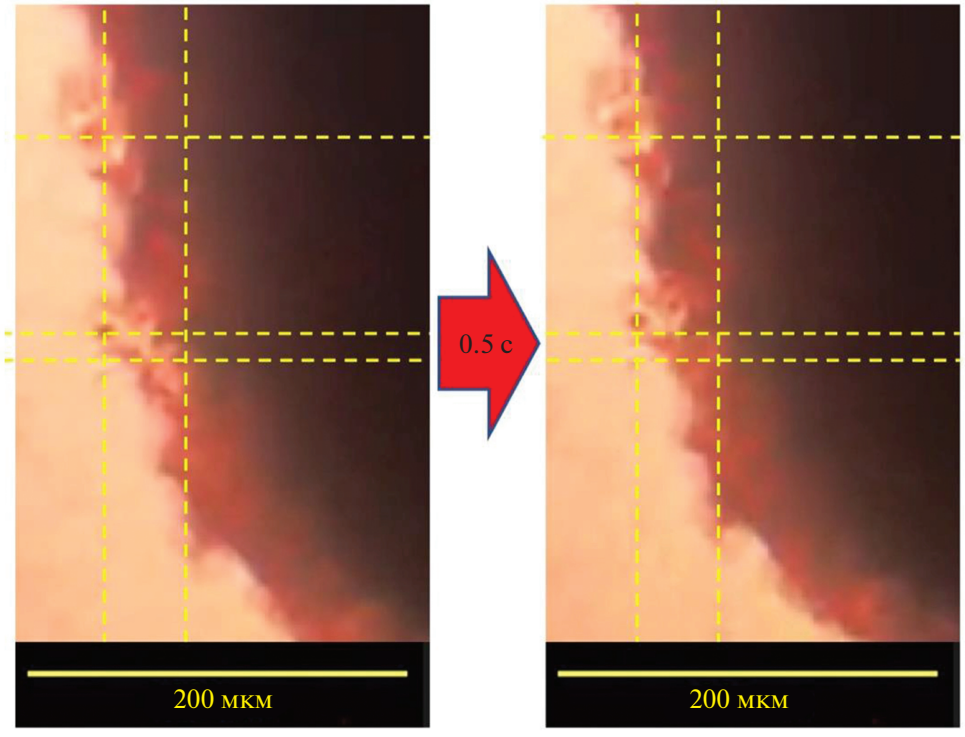

0.5 с
200 мкм
200 мкм

Рис. 2. Результаты иммуногистохимического анализа дифференцировки эмбриоидных телец и детекция сокращения органоидов. (а) Сравнительный иммуногистохимический анализ дифференцировки эмбриоидных телец в кожные органоиды в контроле и в эксперименте. Сверху: эмбриоидные тельца на стадиях 30 и 110 дней дифференцировки, световая микроскопия, фазовый контраст. Масштабный отрезок 200 мкм. Снизу: выявление маркеров мезодермальной дифференцировки (Eomes и N-cadgerin), маркеров базальных кератиноцитов (K14) и маркера фибробластов (виментин) на стадии 30 дней дифференцировки; мышечных маркеров (актин и десмин) и маркера стержня волоса волосяного фолликула (AE13) на стадии 110 дней дифференцировки. ЭП – эпителий; ВФ – волосяной фолликул; СА – сеть актина. Масштабные отрезки равны 200 мкм на всех изображениях, кроме правого изображения в группе с маркированием виментина и K14 (400 мкм) и увеличенных фрагментов изображений (100 мкм). (б) Детекция сокращения органоида, полученного из эмбриоидного тельца, обработанного HDACi. Фазово-контрастная микроскопия, 80 сутки дифференцировки. Масштабный отрезок 200 мкм.

дов, сформированных из чИПСК, обработанных HDACi, в 100% случаев ($N = 10$). У всех изученных органоидов период сокращений составлял около секунды. На основании полученных результатов можно предположить, что в ходе потенциального перехода ПСК в новое эпигенетическое состояние изменился и вектор их дифференцировки. На основании полученных данных можно предположить формирование мезодермы в составе органоидов и, в результате ее дальнейшего развития, кардиомиоцитов. Похожих результатов, то есть получения кардиомиоцитов через стадию мезодермальных клеток в ходе двумерной дифференцировки чИПСК добивались при использовании таких факторов дифференцировки как CHIR99021 (активатор WNT-сигналлинга) и IWP2 (ингибитор WNT-сигналлинга) (Balafkan et al., 2020). Схожие результаты были получены при использовании BMP4 и CHIR99021, но уже при дифференцировке эмбриоидных телец из чИПСК. Также кардиоваскулярные органоиды получали в условиях трехмерной дифференцировки эмбриоидных телец из ПСК мыши под действием неспецифического фактора дифференцировки – фетальной бычьей сыворотки в гидрогеле с заданном модулем эластичности (Shkumatov et al., 2014). Однако данных о получении кардиоваскулярных органоидов по описанному выше протоколу на данный момент нет. Известно, что активация WNT-сигнального пути играет ключевую роль при закладке кардиальной мезодермы в эмбриогенезе (Zhao et al., 2019). Активатор этого пути используется в работах, описывающих получение кардиомиоцитов в ходе дифференцировки чИПСК. Вероятно, в используемом в нашей работе протоколе дифференцировки, активация WNT-пути происходит в результате предварительного воздействия HDACi на чИПСК. Данная гипотеза требует проведения дополнительных исследований, которые мы планируем в ходе дальнейшей работы по данной теме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходный протокол дифференцировки, использованный в данной работе, предполагал формирование из чИПСК эмбриоидных телец, состоящих из нейроэктодермы и покровной эктодермы, с последующим формированием кожных органоидов. Мы предполагаем, что под воздействием HDACi у чИПСК экспериментальной группы был активирован сигнальный путь WNT. Именно это могло привести к наблюдавшемуся в эксперименте изменению направления индуцированной дифференцировки эмбриоидных телец, полученных из чИПСК. На основании полученных иммуногистохимических данных по трехмерной дифференцировке эмбриоидных телец можно предположить, что чИПСК под воздействием HDACi дифференцировались в мезодермальном направлении с последующим формированием каридиосфер. Помимо этого, под действием HDACi у чИПСК повысились уровни экспрессии маркеров плюрипотентности, которые экспрессируются во внутренней массе клеток бластоцисты человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0088-2021-0016 Института биологии развития РАН им. Н.К. Кольцова и поддержана Министерством науки и высшего образования, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования клеточных культур человека в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены в соответствии с протоколом комиссии по биоэтике ИБР РАН № 45 от 05.02.2021.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.К. Абдыев: дизайн исследования. В.К. Абдыев, А.А. Рябинин: составление рукописи, интерпретация данных. В.К. Абдыев, А.А. Рябинин, Е. Ерофеева, М.Д. Панкратова: культивирование чЧИПСК, получение и дифференцировка эмбриоидных телец, фазово-контрастная микроскопия, выделение РНК, проведение ПЦР в реальном времени, ИГХ анализ, сбор и

анализ данных. Е.А. Воротеляк, А.В. Васильев: редактирование рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Balafkan N., Mostafavi S., Schubert M. et al. A method for differentiating human induced pluripotent stem cells toward functional cardiomyocytes in 96-well microplates // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. 18498. PMID: 33116175; PMCID: PMC7595118. https://doi.org/10.1038/s41598-020-73656-2

Brons I., Smithers L.E., Trotter M.W.B. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // Nature. 2007. V. 448. № 7150. P. 191–195. https://doi.org/10.1038/nature05950

Fischer B., Meier A., Dehne A. et al. A complete workflow for the differentiation and the dissociation of hiPSC-derived cardiospheres // Stem Cell Res. 2018. V. 32. P. 65–72. Epub 2018 Aug 24. PMID: 30218895. https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.08.015

Johnstone R.W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer // Nature. 2002. V. 1. № 4. P. 287–299. https://doi.org/10.1038/nrd772

Lagarkova M.A., Eremeev A.V., Svetlakov A.V. et al. Human embryonic stem cell lines isolation, cultivation, and characterization // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 2010. V. 46. № 3–4. P. 284–293. https://doi.org/10.1007/s11626-010-9282-6

Lau K.X., Mason E.A., Kie J. et al. Unique properties of a subset of human pluripotent stem cells with high capacity for self-renewal // Nature Communications. 2020. V. 11. № 1. P. 1–18. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16214-8

Lee J., Koehler K.R. Skin organoids: A new human model for developmental and translational research // Exp. Dermatol. 2021. V. 30. № 4. P. 613–620. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33507537; PMCID: PMC8265774.4). https://doi.org/10.1111/exd.14292

Lee J., Rabbani C.C., Gao H. et al. Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells // Nature. 2020. V. 582. № 7812. P. 399–404.

Saraiva N.Z., Oliveira C.S., Garcia J.M. Histone acetylation and its role in embryonic stem cell differentiation // World J. Stem. Cells. 2010. V. 2. № 6. P. 121–126. https://doi.org/10.4252/WJSC.V2.I6.121

Seto E., Yoshida M. Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014. V. 6. № 4. a018713. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018713

Shkumatov A., Baek K., Kong H. Matrix rigidity-modulated cardiovascular organoid formation from embryoid bodies // PLoS One. 2014. V. 14. № 9. 4 PMID: 24732893; PMCID: PMC3986240. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094764

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024

Teslaa T., Chaikovsky A.C., Lipchina I. et al. a-Ketoglutarate accelerates the initial differentiation of primed human pluripotent stem cells cell metabolism differentiation of primed human pluripotent stem cells // Cell Metabolism. 2016. V. 24. P. 485–493. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.002

Toyooka Y., Shimosato D., Murakami K. et al. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture // Development. 2008. V. 135. № 5. P. 909–918. https://doi.org/10.1242/DEV.017400

Zhao M., Tang Y., Zhou Y., Zhang J. Deciphering role of wnt signalling in cardiac mesoderm and cardiomyocyte differentiation from human iPSCs: Four-dimensional control of Wnt pathway for hiPSC-CMs differentiation // Sci. Rep. 2019. V. 18. № 9. 1. PMID: 31852937; PMCID: PMC6920374. https://doi.org/10.1038/s41598-019-55620-x

Preliminary Exposure to Histone Deacetylase Inhibitors Changes the Direction of Human IPSCs Differentiation with the Formation of Cardiospheres Instead of Skin Organoids

V. K. Abdyev[1, *], A. A. Riabinin[1, **], E. D. Erofeeva[2], M. D. Pankratova[1, 2], E. A. Vorotelak[1], and A. V. Vasiliev[1, 2]

[1]Koltsov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

[2]Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119234 Russia

**e-mail: mailtovepa@gmail.com*

***e-mail: andrey951233@mail.ru*

Pluripotent stem cells (PSCs) are a unique cell type that can differentiate into all cell types in the body. In PSC culture, subpopulations with different levels of pluripotency may exist, which leads to different results during their differentiation. One of the key factors that determine the state of pluripotency and influence the differentiation potential of PSCs is the epigenetic state of cells, including the level of histone deacetylation. Activation of histone deacetylase (HDAC) in human and mouse PSCs increases the percentage of heterochromatin. In this work, we used a protocol for the differentiation of embryoid bodies from induced human pluripotent hIPSC cells, designed for the formation of ectoderm and neuroectoderm with their subsequent development into skin organoids. However, after hIPSCs were exposed to HDAC inhibitors (sodium butyrate and valproic acid), the direction of their differentiation changed: mesoderm was formed, which subsequently developed into contracting cardiospheres.

Keywords: hIPSCs, directed differentiation, HDAC, skin organoid, ectoderm, neuroectoderm, HDACi, cardiospheres