

РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭКТОДЕРМАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. А. А. Огнивцев^а, Е. П. Калабушева^{а, *}, Е. О. Осидак^б,
С. П. Домогатский^{с, d}, Е. А. Воротеляк^а

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

^бООО фирмы “ИМТЕК”, 3-я Черепковская ул., 15А, Москва, 121552 Россия

^сНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, ул. Гамалеи, 18, Москва, 123098 Россия

^dНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии
им. Академика Е.И. Чазова, 3-я Черепковская ул., 15А, Москва, 121552 Россия

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

Поступила в редакцию 08.06.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Одним из важнейших событий эмбрионального развития млекопитающих является разделение эктодермы на покровную и нейроэктодерму. Сигнальные каскады, индуцируемые факторами роста и цитокинами, вовлеченными в эти процессы, детально изучаются последние десятилетия. В то же время вклад компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) в эти направления дифференцировки остается неизвестным для млекопитающих, в то время как важнейшая роль ВКМ в этом процессе показана на других модельных организмах. Для оценки влияния компонентов ВКМ на формирование эктодермальных производных мы моделировали нейральную и эпидермальную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека с использованием субстратов, состоящих из различных компонентов ВКМ, а также исследовали вовлеченность в процессы дифференцировки одного из центральных звеньев сигнальных каскадов ВКМ, транскрипционного коактиватора YAP1. Наши результаты выявили стимулирующий эффект ламинина 332 на ранние этапы эпидермальной дифференцировки и коллагенов I и III типов на выделение глиального направления поздней нейральной дифференцировки.

Ключевые слова: эпидермальная дифференцировка, нейральная дифференцировка, ИПСК, ламинин, коллаген, YAP1

DOI: 10.31857/S047514502301010X, **EDN:** FRONQI

ВВЕДЕНИЕ

ВКМ является важнейшим компонентом стволовой ниши. В его многочисленные функции входит поддержание стволового состояния, стимуляция и выбор направления дифференцировки (Brafman et al., 2013; Long et al., 2016), контроль пролиферации (Soulintzi, Zagris, 2007; Ford-Perriess et al., 2003) и обеспечение жизнеспособности клеток (Costell et al., 1999). Огромную роль он играет в эмбриогенезе на ранних этапах гаструляции и нейруляции (Walma, Yamada, 2020). Стоит отметить, что роль компонентов ВКМ на этих этапах эмбриогенеза наиболее изучена на насекомых (Meyer et al., 2014), рыбах (Araza et al., 2016), амфибиях (Feledy et al., 1999; Linker et al., 2009) и птицах (Liem et al., 1995; Zagris et al., 2011). Данных о роли ВКМ в дифференцировке эктодермы

млекопитающих на нейральную и покровную ткани чрезвычайно мало, некоторые авторы обзорных статей напрямую отмечают пробел в этой области (Long, Huttner, 2019). В то же время данный вопрос актуален как для исследований фундаментальных процессов протекания эмбриогенеза млекопитающих, так и в контексте изучения патологий эмбриона человека и разработки тест-систем на основе дифференцировки ИПСК для фармакологических исследований.

Использование эмбриональных и индуцированных ПСК человека для получения дифференцированных культур нейральных, эпидермальных, мезенхимных и других клеток является одним из самых современных способов моделирования процессов морфо- и органогенеза человека (Rust et al., 2006; Qiao et al., 2012; Brafman et al., 2013; Warmflash et al.,

2014; Gomez et al., 2019). Этот подход в сочетании с технологиями секвенирования единичных клеток эмбрионов мыши (Mohammed et al., 2017; Pi-juan-Sala et al., 2019), позволяет определить ключевые факторы, контролирующие процессы гистогенеза и органогенеза в эмбриональном развитии млекопитающих. Основные подходы при разработке протоколов дифференцировки отталкиваются от данных, наработанных при изучении механизмов дифференцировки *in vivo* в эмбриогенезе модельных организмов. В частности, протоколы индукции нейральной и эпидермальной дифференцировки были разработаны по похожему плану. Основными методами нейральной индукции являются получение нейросфер и двойное SMAD-ингибирование (Wattanapanitch et al., 2014; Pauly et al., 2018). Получение нейросфер из эмбриональных теллец имитирует процесс формирования нервной трубки в эмбриогенезе (Zhang et al., 2001). В основе метода двойного SMAD-ингибирования лежит имитация выделения нейроэктодермы в процессе дифференцировки по умолчанию путем добавления ингибиторов сигнальных каскадов BMP и TGF β (Ozair et al., 2013). Эпидермальную судьбу эктодермальные клетки эмбриона мыши приобретают на E7.0, что было показано на эксплантах эпибласта (Li et al., 2013). Эпидермальная индукция требует добавления фактора BMP4, а также ретиноевой кислоты, необходимой для созревания кератиноцитов (Itoh et al., 2011; Itoh et al., 2013; Kogut et al., 2014). В то время как необходимые факторы роста или заменяющие их химические соединения сохраняются в любых модификациях протоколов дифференцировки, компоненты внеклеточного матрикса, используемые в качестве субстратов для культивирования, различаются. В качестве классического субстрата используют матригель — продукт клеточной линии саркомы мыши, по составу сходный с базальной мембраной. Данный субстрат подходит для культивирования и поддержания культуры ПСК, поэтому часто используется при индукции дифференцировки. Протоколы дифференцировки кератиноцитов также включают в себя коллагены I и IV типов (Itoh et al., 2011; Kim et al., 2018; Domingues et al., 2022), в то время как протоколы нейральной дифференцировки включают фибронектин и ламинин (Ma et al., 2008). Тем не менее, единого мнения, такого как в случае применения матригеля для культуры ПСК, у исследователей нет.

Внеклеточный матрикс оказывает комплексное воздействие на клетки: активация лиганд-рецепторных сигнальных путей за счет связывания белков фокальных контактов и полудесмосом (Ma et al., 2008; Brafman et al., 2013), передача механических сигналов микроокружения — жесткость матрикса оказывает влияние на клеточный цитоскелет, что в свою очередь активирует внутриклеточные сигнальные каскады (Evans et al.,

2009), модуляция сигнальных молекул в качестве кофакторов (Lin et al., 2021), и т.д. Все эти сигналы суммируются, оказывая результирующие воздействия на транскриптомный профиль клетки, а, следовательно, и на выбор ею определенного направления дифференцировки. Одним из центральных звеньев суммарного эффекта от всех параметров ВКМ является сигнальный путь белка YAP1 (Hao et al., 2014; Nardone et al., 2017; Cai et al., 2021). В нашем исследовании мы анализировали влияние компонентов ВКМ на эффективность нейральной и эпидермальной дифференцировки ИПСК, а также вовлеченность сигнального каскада YAP1 в этот процесс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование и дифференцировка ИПСК

ИПСК человека линии “Kyoto”, полученные из клеточной коллекции ATCC (кат № ATCC® ACS-1023), культивировали в среде mTeSR1 (StemCell Technologies) в атмосфере 5% O₂, 5% CO₂ при температуре 37°C с ежедневной сменой среды. Пассирование проводили реагентом ReLeSR (StemCell Technologies) согласно рекомендациям производителя. При пассировании добавляли ROCK-ингибитор Y-27632 (StemCell Technologies) в концентрации 10 мкМ на 1 сут.

Дифференцировку в эпидермальном направлении стимулировали добавлением 1 мкМ ретиноевой кислоты (Sigma Aldrich) и 25 нг/мл BMP4 (Sigma Aldrich) на среде DK-SFM (Invitrogen) в течение 4-х суток. Далее культуру вели в атмосфере 21% O₂, 5% CO₂ при температуре 37°C на среде DK-SFM с заменой среды через день.

Для индукции нейральной дифференцировки ИПСК диссоциировали аккутазой (StemCell Technologies), суспензию помещали в низкоадгезивные планшеты (Corning) в среде Neurobasal medium (Gibco), с добавлением 50× Neural Induction Supplement (Gibco), 200 мМ Glutamax (Gibco) и пенициллина/стрептомицина (Gibco) в концентрациях 0.25 и 10 мкг/мл для формирования нейросфер, которые культивировали в атмосфере 5% O₂, 5% CO₂ при температуре 37°C с ежедневной сменой 1/2 среды. Для оценки эффективности ранней дифференцировки нейросферы высаживали на субстраты на 5 сут после формирования нейросфер, для проведения работ, связанных с поздними этапами дифференцировки — на 21 сут. После прикрепления к матриксу для культивирования использовали среду DMEM/F12 (ПанЭко), с добавлением 50× B-27 Supplement (Gibco), 100× N-2 Supplement (Gibco), 200 мМ Glutamax и пенициллина/стрептомицина в концентрациях 0.25 и 10 мкг/мл соответственно.

Эксперименты по анализу влияния компонентов ВКМ на протекание ранних этапов нейральной и эпидермальной дифференцировки проводили в 6 независимых биологических повторах, для поздних этапов нейральной дифференцировки использовали 3 независимых биологических повтора.

Выделение и культивирование первичных кератиноцитов

Биоптаты кожи здоровых взрослых доноров, полученные при косметологических операциях из МНИОИ им. П.А. Герцена с информированного согласия пациентов, промывали раствором Хэнкса (ПанЭко) с добавлением 3 мг/мл гентамицина. В работе использован биоматериал от доноров женского пола в возрасте 27, 35 и 37 лет. Далее хирургически удаляли дерму и помещали в 0.2% раствор диспазы (Gibco) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Эпидермис отделяли механически и диссоциировали в растворе 0.25% трипсина (Gibco)/фосфатного солевого буфера (ПанЭко) 1 : 1 в течение 30 мин. Суспензию кератиноцитов промывали фосфатным солевым буфером и культивировали на среде SnT-07 (CellnTec) в атмосфере 21% O₂, 5% CO₂ при температуре 37°C.

Сорбирование компонентов ВКМ

В экспериментах использовали компоненты ВКМ человека производства биотехнологической фирмы «ИМТЕК» (Россия): коллаген I (HC11, плацента человека), коллаген III (HC33, плацента человека), ламинин 332 (HVne-C, плацента человека). Компоненты ВКМ сорбировали в концентрации 12 мкг/мл. Матригель (Corning) сорбировали в концентрации 100 мкг/мл.

Для культивирования нейросфер использовали матригель, который полимеризовали согласно инструкции производителя, и коллаген I типа. К раствору коллагена I типа добавляли эмбриональ-

ную телячью сыворотку (HyClone), среду M199 (ГУП по производству бактериальных и вирусных препаратов ИПВЭ им. М.П. Чумакова) и Glutamax (Gibco), далее для полимеризации нейтрализовали добавлением 0.34 M NaOH (ХЧ Фарм), бикарбоната натрия (ПанЭко) и HEPES (Sigma Aldrich).

Количественный ПЦР-анализ

РНК изолировали реактивом RNAzol®RT (MolecularResearchCenter) по протоколу, рекомендованному производителем. Удаление геномной ДНК и обратную транскрипцию проводили с использованием “QuantiTect®ReverseTranscriptionKit” (Qiagen) по инструкции производителя. Для проведения обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК. Для проведения ОТ-ПЦР использовали набор “qPCRmix-HS SYBR + Low-ROX” (Евроген). Количественный ПЦР анализ проводили при помощи амплификатора LightCycler96 (Roche). Использовали следующую программу: 10 мин при 95°C, 45 циклов, каждый из которых включал в себя: 20 с при 95°C, 20 с при 60°C и 30 с при 72°C. Все эксперименты выполнены с трехкратными техническими и биологическими повторами. Содержание продуктов в каждой пробе определяли методом 2^{-ΔΔC_q}, результаты нормировали на экспрессию GAPDH и HPRT. На приведенных в работе диаграммах представлены результаты анализа экспрессии, нормированные на GAPDH. Использованные праймеры представлены в табл. 1.

Данные на графиках представлены в виде среднего арифметического с разбросом в виде ошибки среднего. Для статистического анализа использовали программное обеспечение GraphPAD Prism 8.0.1. Статистическую значимость оценивали методом двухфакторного дисперсионного анализа, парные сравнения проводили методом Шидака.

Таблица 1. Праймеры для количественного ПЦР-анализа экспрессии генов человека

Название гена	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
CTGF	5'GAGACGAACGTCCATGCTG3'	5'TGTGCACCGCCAAAGATG3'
CYR61	5'GGGCTGCATTCTCTGTGT3'	5'AAGGAGGCCGTCCTGGGTC3'
GFAP	5'CCTCGCCCTCTAGCAGCTTC3'	5'GGGAGGCGGCCAGTTATCA3'
YAP1	5'AGAGAATCAGTCAGAGTGCTCCA3'	5'TTCAGCCGCAGCCTCTCC3'
SOX2	5'CCCCTGTGGTTACCTCTTCCTCC3'	5'GTGCCGTTAATGGCCGTGCC3'
PAX6	5'CAGGGCAATCGGTGGTAGTAA3'	5'TACGCTTGGTATGTTATCGTTGGT3'
GAPDH	5'CCATGTTCTGTCATGGGTGTG3'	5'GGTGCTAAGCAGTTGGTGGTGT3'
HPRT	5'ACCAGGTTATGACCTTGATT3'	5'AAGTTGGCCTAGTTTATGTT3'

Иммуноцитохимия

Культуры фиксировали 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich) в течение 15 минут. Далее вносили в лунки первичные антитела (табл. 2), разведенные в фосфатном буфере с добавлением 2.5% бычьего сывороточного альбумина (Химмед), 1% Triton X-100 (AppliChem) и 1% Tween20 (AppliChem). Инкубировали при 4°C в течение ночи.

Далее препараты промывали фосфатным буфером и вносили раствор вторичных антител (табл. 3), конъюгированных с флюорофорами. Ядра докрашивали DAPI (Invitrogen) в концентрации 1 мг/мл. Трехмерные культуры заключали в пересыщенный раствор фруктозы.

Для окрашивания актинового цитоскелета клеток использовали AlexaFluor 488® phalloidin (ThermoFisher).

Микроскопия

Фотографии культур в фазовом контрасте получали на инвертированном микроскопе Olympus IX73, оснащенного камерой Olympus U-TV0.63XC. Для получения цифровых изображений использовали программное обеспечение Olympus cellSens Dimension.

Флуоресцентную микроскопию клеток проводили при помощи инвертированного микроскопа Olympus IX73, оснащенного камерой Olympus

U-TV0.63XC. Для получения цифровых изображений использовали программное обеспечение Olympus cellSens Dimension.

Конфокальную микроскопию клеток проводили при помощи микроскопа Zeiss LSM 880. Для получения цифровых изображений использовали программное обеспечение Zeiss Zen Black. Обработку полученных изображений осуществляли при помощи программного обеспечения ImageJ.

Анализ фотографий клеточных культур

При анализе использовали программное обеспечение CellProfiler. Долю автоматически подсчитанных положительных по специализированным маркерам ядер рассчитывали относительно фотографий, окрашенных DAPI. Показатель удельной площади актинового цитоскелета (площадь клетки) получали путем деления общей площади, занимаемой актиновым цитоскелетом, на количество ядер (мкм²). Показатель удельной площади фокальных контактов (площадь фокальных контактов) получали путем деления общей площади, занимаемой фокальными контактами, на количество ядер (мкм²). При проведении количественного анализа на каждый биологический эксперимент делали 3 технических повтора, с каждого из которых получали не менее 10 снимков. Данные на графиках представлены в виде среднего арифметического с разбросом в виде ошибки среднего. Для статистического анализа использовали про-

Таблица 2. Использованные в работе первичные антитела

Антиген	Каталожный номер	Производитель	Разведение	Подтип
β-Tubulin III	MAB-1637	Sigma-Aldrich	1 : 200	Моноклональные IgG1 мыши, клон TU-20
P63	Ab735	Abcam	1 : 50	Моноклональные IgG2a кролика, клон 4A4
NeuN	Ab104225	Abcam	1 : 200	Поликлональные IgG кролика
Keratin 14	Ab181595	Abcam	1 : 500	Моноклональные IgG кролика, клон EPR17350
Vinculin	Ab129002	Abcam	1 : 250	Моноклональные IgG кролика, клон EPR8185
YAP1	Ab52771	Abcam	1 : 100	Моноклональные IgG кролика, клон EP1674Y
Sox2	Ab92494	Abcam	1 : 100	Моноклональные IgG кролика, клон EPR3131
GFAP	Mab5628	Chemicon	1 : 200	Моноклональные IgG2a мыши
Keratin 18	Ab668	Abcam	1 : 100	Моноклональные IgG1 мыши, клон C-04

Таблица 3. Использованные в работе вторичные антитела

Антиген, подтип	Флюорофор	Каталожный номер	Производитель	Разведение
Goat anti-rabbit IgG (H + L) Secondary Antibody	AlexaFluor 488	A-11008	Invitrogen	1 : 500
Donkey anti-rabbit IgG (H + L) Secondary Antibody	AlexaFluor 546	A-10040	Invitrogen	1 : 500
Donkey anti-mouse IgG (H + L) Secondary Antibody	AlexaFluor 546	A-10036	Invitrogen	1 : 500
Goat anti-mouse IgG (H + L) Secondary Antibody	AlexaFluor 488	A-32723	Invitrogen	1 : 500

граммное обеспечение GraphPAD Prism 8.0.1. Статистическую значимость оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа, парные сравнения проводили методом Шидака.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние компонентов ВКМ на индукцию ранней эпидермальной дифференцировки

В работе мы рассматривали влияние ламинина 332 и коллагена I типа на индукцию эпидермальной дифференцировки. Ламинин 332 является одним из компонентов базальной мембраны, его применение для культивирования в виде субстрата (Kariya et al., 2012) или стимуляция его продукции путем генетической модификации (De Rosa et al., 2019) в первичных эпидермальных кератиноцитах позволяет сохранить пул стволовых клеток. Коллаген I типа относится к интерстициальным коллагенам, он используется во многих протоколах в качестве дополнительного индуктора эпидермальной дифференцировки (Itoh et al., 2011; Kim et al., 2018). В качестве дополнительного субстрата сравнения мы использовали коллаген III типа, который также относится к интерстициальным коллагенам, однако при этом не используется в индукции эпидермальной дифференцировки. В качестве контроля мы использовали матригель. Дифференцировку индуцировали внесением BMP4 и ретиноевой кислоты.

Эффективность дифференцировки мы оценивали на основании динамики экспрессии специализированных маркеров. На каждом из исследуемых субстратов мы наблюдали исчезновение SOX2, ключевого фактора плюрипотентности и нейральной дифференцировки, последовательное появление кератинов 18 и 14, возникновение экспрессии ключевого регулятора эпидермальной дифференцировки P63 (рис. 1а). Визуально уровни экспрессии P63 и кератина 14 не различались между группами. В контроле и на субстрате из коллагена III типа наблюдали единичные кератин 18 — положительные клетки, что свидетельствовало о задержке дифференцировки. Количественно оценили долю P63-положительных ядер дифференцирующихся кератиноцитов на разных субстратах (рис. 1б). Результаты показывают, что ламинин 332 статистически значимо повышает эффективность дифференцировки, в то время как коллагены снижают процентное содержание P63⁺ клеток.

В условиях культивирования компоненты ВКМ контролируют процессы клеточной дифференцировки за счет стимуляции клеточной адгезии и формирования специализированных контактов. Мы оценили изменения площади клеток и площади фокальных контактов при индукции эпидермальной дифференцировки при культивиро-

вании на различных субстратах из сорбированных компонентов ВКМ с целью поиска взаимосвязи между исследуемыми параметрами и эффективностью дифференцировки. Площадь клетки и площадь фокальных контактов измеряли с использованием программного обеспечения Cell Profiler на основе фотографий иммуногистохимического выявления актина и винкулина (рис. 2а). Наши результаты показали тенденцию к увеличению площади клетки в культурах на сорбированных коллагенах I и III типа, площадь фокальных контактов при этом пропорционально и статистически значимо возрастала (рис. 2б). Интересно, что с увеличением площади клеток и площади фокальных контактов снижалась эффективность эпидермальной дифференцировки.

Поскольку YAP1 является одним из центральных звеньев сигнальных каскадов ВКМ, а его активность критически важна для выживания кератиноцитов на ранних этапах дифференцировки эпидермиса мыши (Zhang et al., 2011), мы оценили экспрессию и локализацию белка YAP1 в дифференцирующихся кератиноцитах. Во всех исследуемых культурах выявили экспрессию YAP1, однако интенсивность сигнала иммуногистохимического выявления в культурах на коллагенах была значительно ниже в сравнении с контролем (рис. 3а). Различалась доля клеток с активной формой YAP1: на сорбированном коллагене I типа доля YAP1⁺ ядер была значительно снижена в сравнении с остальными субстратами (рис. 3б).

Тем не менее, на основании полученных данных мы можем говорить о более эффективном протекании ранних этапов эпидермальной дифференцировки на субстрате из ламинина 332, в то время как коллагены I и III типов снижали эффективность дифференцировки. Наши данные показывают, что эффективность дифференцировки не зависит от активности YAP1. Хотя мы наблюдали снижение доли P63-положительных и YAP1-положительных ядер в культуре на коллагене I типа, мы не отмечали подобных корреляций на остальных исследуемых субстратах. Независимость протекания ранних этапов дифференцировки в эктодермальном направлении от активации YAP1 отмечают и другие исследователи (Pagliari et al., 2021). Интересно, что снижение эффективности эпидермальной дифференцировки коррелирует с увеличением площади клетки и фокальных контактов. Данный эффект может быть связан со стимуляцией дифференцировки в альтернативных направлениях под воздействием коллагенов (Rasmussen, et al., 2015; Ozasa et al., 2021).

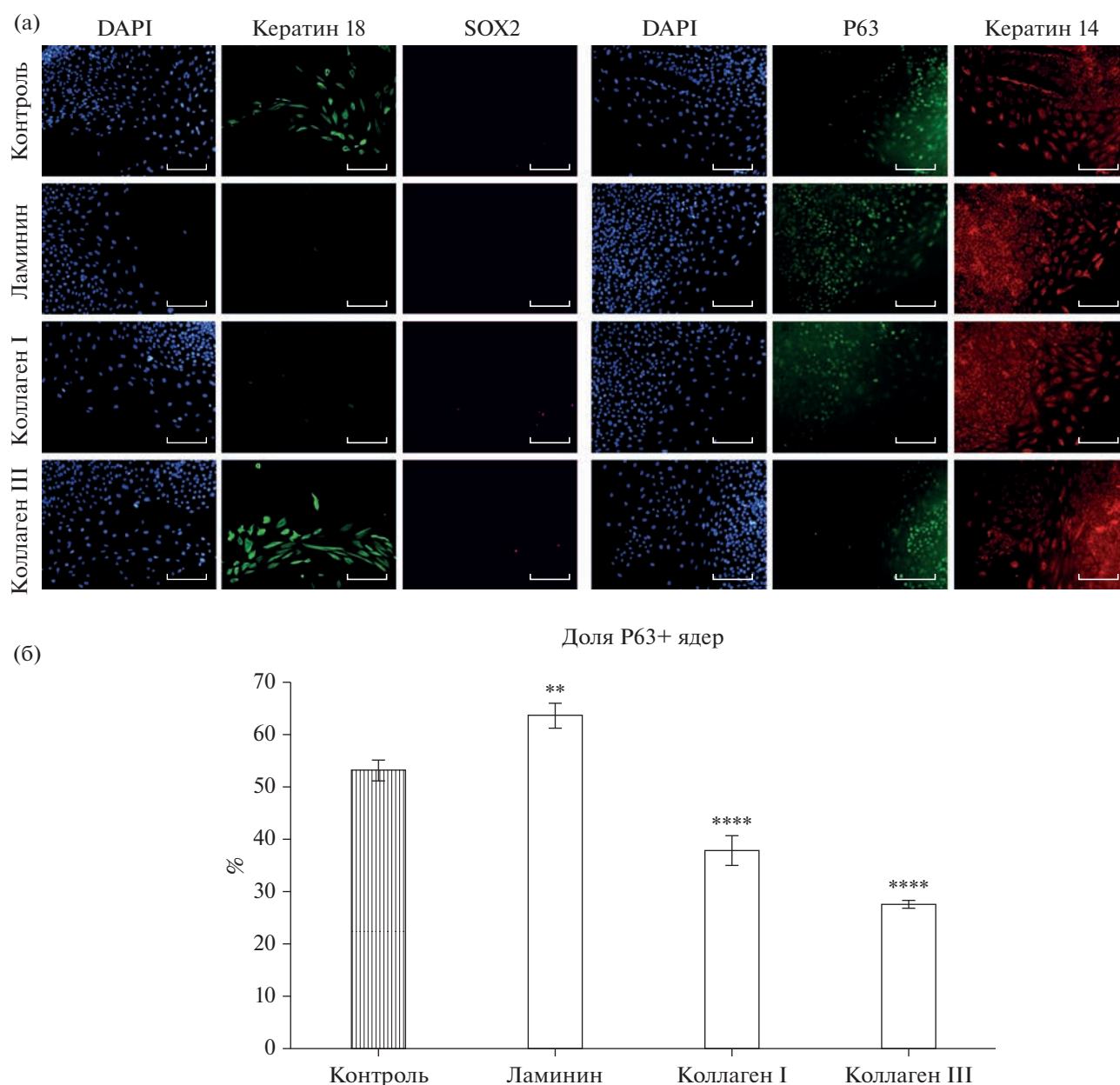


Рис. 1. Эффективность эпидермальной дифференцировки ИПСК на сорбированных компонентах ВКМ. (а) Иммуногистохимическое выявление маркеров эпидермальной дифференцировки. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм. (б) Доля P63-положительных клеток в дифференцирующихся культурах. Тотальное количество клеток на изображение было посчитано на основании окрашивания DAPI. ** — статистически значимое различие при $p \leq 0.01$, **** — статистически значимое различие при $p \leq 0.0001$, тест Шидака для множественных сравнений.

1. Влияние компонентов ВКМ на поддержание культуры первичных эпидермальных кератиноцитов человека

Далее мы сравнили влияние исследуемых субстратов на ранних сроках индукции эпидермальной дифференцировки с эффектами, оказываемыми на уже дифференцированные клетки. Первичные кератиноциты культивировали на вышеописанных субстратах. Во всех анализируемых условиях 100% клеток были положительны по кератину 14 и P63

независимо от используемого субстрата (данные не приведены). Выявление YAP1 показало, что, независимо от используемого типа ВКМ, в низкой плотности кератиноциты имеют ядерную локализацию YAP1, которая по мере формирования конфлюэнтного монослоя становится цитоплазматической (рис. 4а).

Поскольку исследуемые нами субстраты не оказывали значительного влияния на экспрессию и локализацию YAP1, мы культивировали пер-

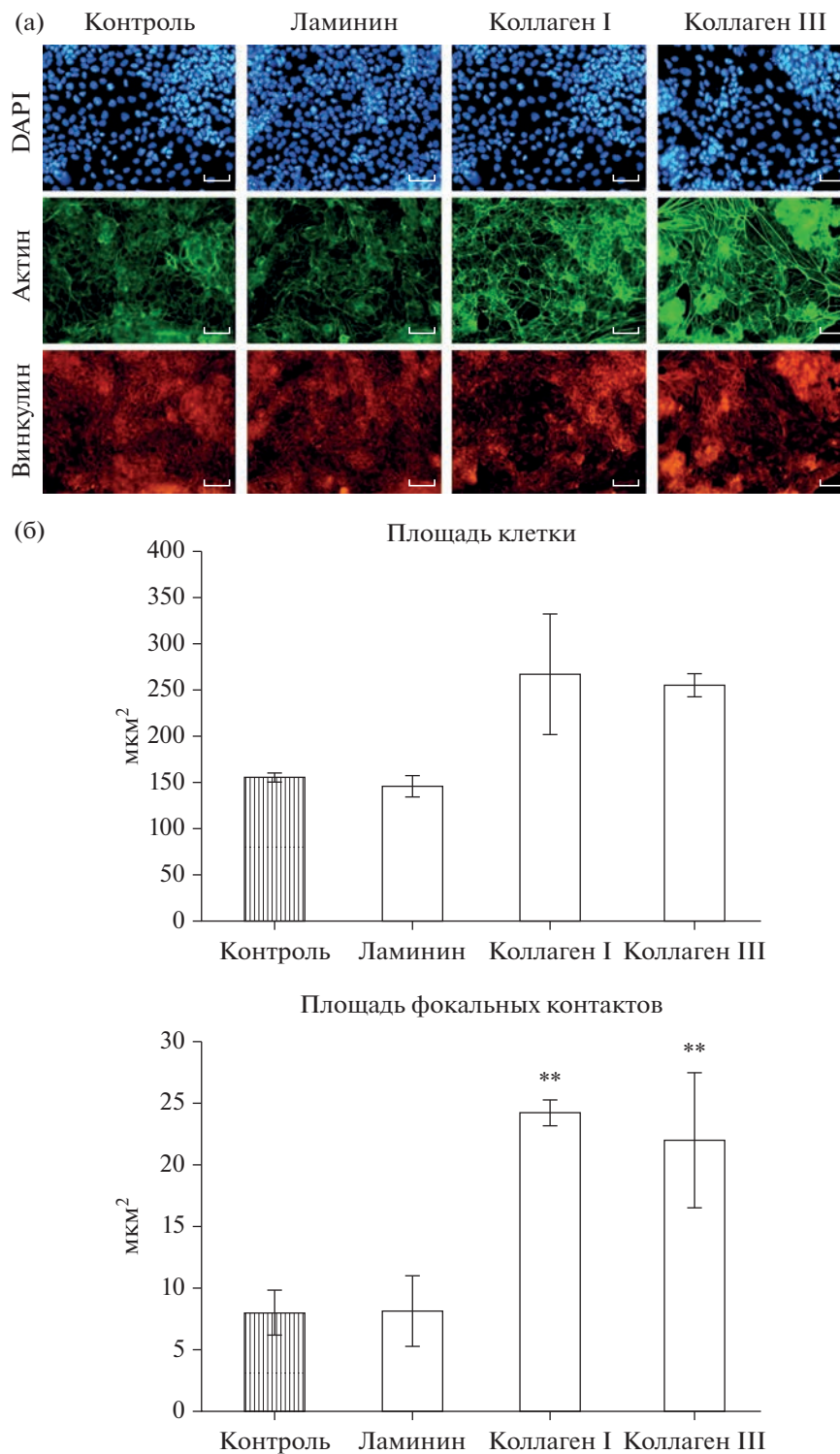


Рис. 2. Площадь клетки и фокальных контактов в дифференцирующихся культурах кератиноцитов на сорбированных компонентах ВКМ. (а) Иммуногистохимическое выявление актина и винкулина. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм. (б) Количественный подсчет площади клеток и фокальных контактов. Totalное количество клеток на изображение было посчитано на основании окрашивания DAPI. ** – статистически значимое различие при $p \leq 0.01$, тест Шидека для множественных сравнений.

вичные кератиноциты в присутствии ROCK- и SRC-ингибиторов для исследования эффектов компонентов ВКМ при модулировании сигналь-

ного пути YAP1. Добавление SRC-ингибитора приводило к гибели клеточных культур как в данном, так и в последующих экспериментах, в то

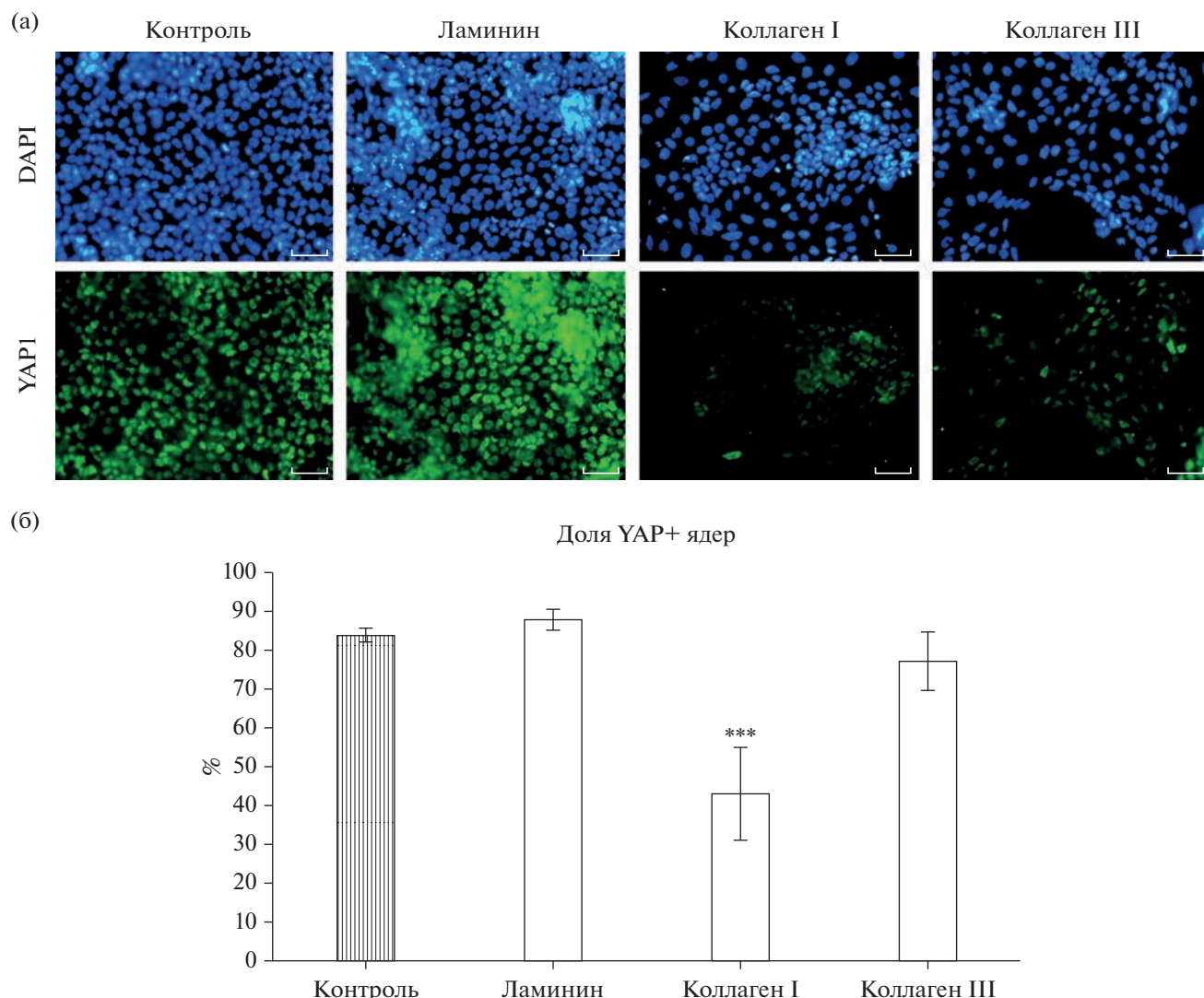


Рис. 3. Экспрессия и активация YAP1 в дифференцирующихся кератиноцитах на сорбированных компонентах ВКМ. (а) Иммуногистохимическое выявление YAP1. Масштабный отрезок 100 мкм. (б) Доля клеток с ядерной локализацией YAP1. Totalное количество клеток на изображение было посчитано на основании окрашивания DAPI. *** – статистически значимое различие при $p \leq 0.001$, тест Шидека для множественных сравнений.

время как добавление ROCK-ингибитора увеличивало скорость роста кератиноцитов. Иммуногистохимическое выявление показало сохранение тенденции цитоплазматической локализации YAP1 при формировании конфлуэнтного монослоя (рис. 4б). Измерение площади клетки и фокальных контактов также не выявило значимых отличий между разными субстратами, однако отразило увеличение плотности клеточной культуры, ассоциированное с увеличением пролиферации под воздействием ROCK-ингибитора (рис. 4в).

Поскольку мы не обнаружили разницы в активации YAP1 в культурах методом иммуногистохимического выявления, далее оценили экспрессию в исследуемых культурах самого YAP1 и его мишеней – CTGF и CYR61 (рис. 5). Мы не обна-

ружили статистически значимой разницы между экспрессией этих факторов в культурах на субстратах из различных компонентов ВКМ, однако ROCK-ингибитор значительно подавлял экспрессию как YAP1, так и его мишеней. Результаты ПЦР-анализа косвенно указывают на то, что, во-первых, ROCK-ингибитор действительно подавляет сигнальный каскад YAP1 в культуре первичных кератиноцитов, и, во-вторых, что субстрат не оказывает влияния на его активацию в этих клетках.

2. Влияние компонентов ВКМ на эффективность нейральной дифференцировки

Нейросферы культивировали в течение 5 и 21 суток, после чего высаживали на субстраты для

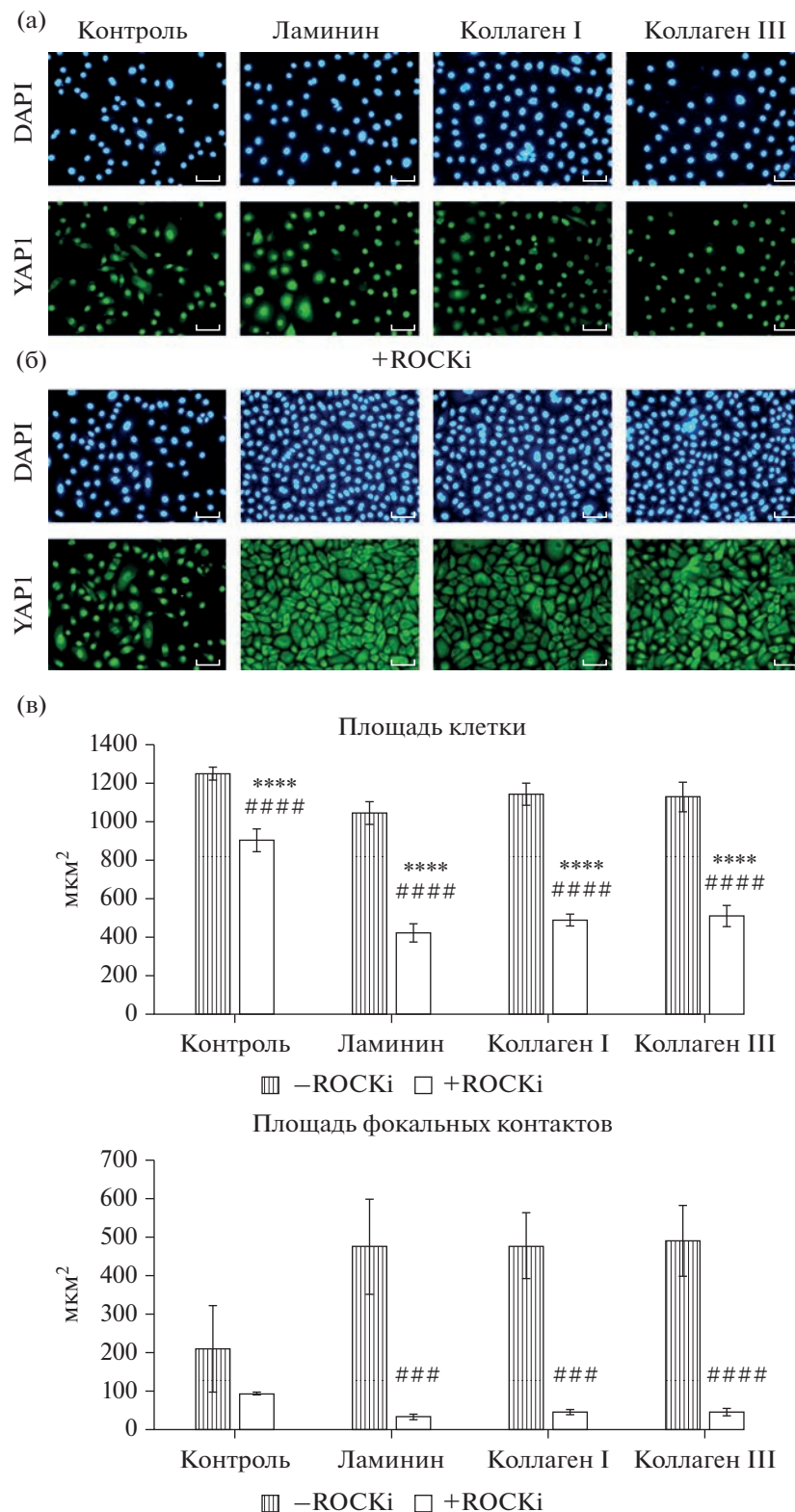


Рис. 4. Иммуногистохимическое выявление YAP1 в культурах первичных кератиноцитов на сорбированных компонентах ВКМ. (а) Контроль. (б) Культуры с добавлением ROCK-ингибитора. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм. (в) Количественный подсчет площади клеток и фокальных контактов. Точное количество клеток на изображение было посчитано на основании окрашивания DAPI. **** – статистически значимое отличие от контрольной группы при $p \leq 0.0001$, ### – статистически значимое отличие от группы без добавления ROCK-ингибитора при $p \leq 0.001$, #### – статистически значимое отличие от группы без добавления ROCK-ингибитора при $p \leq 0.0001$, тест Шидека для множественных сравнений.

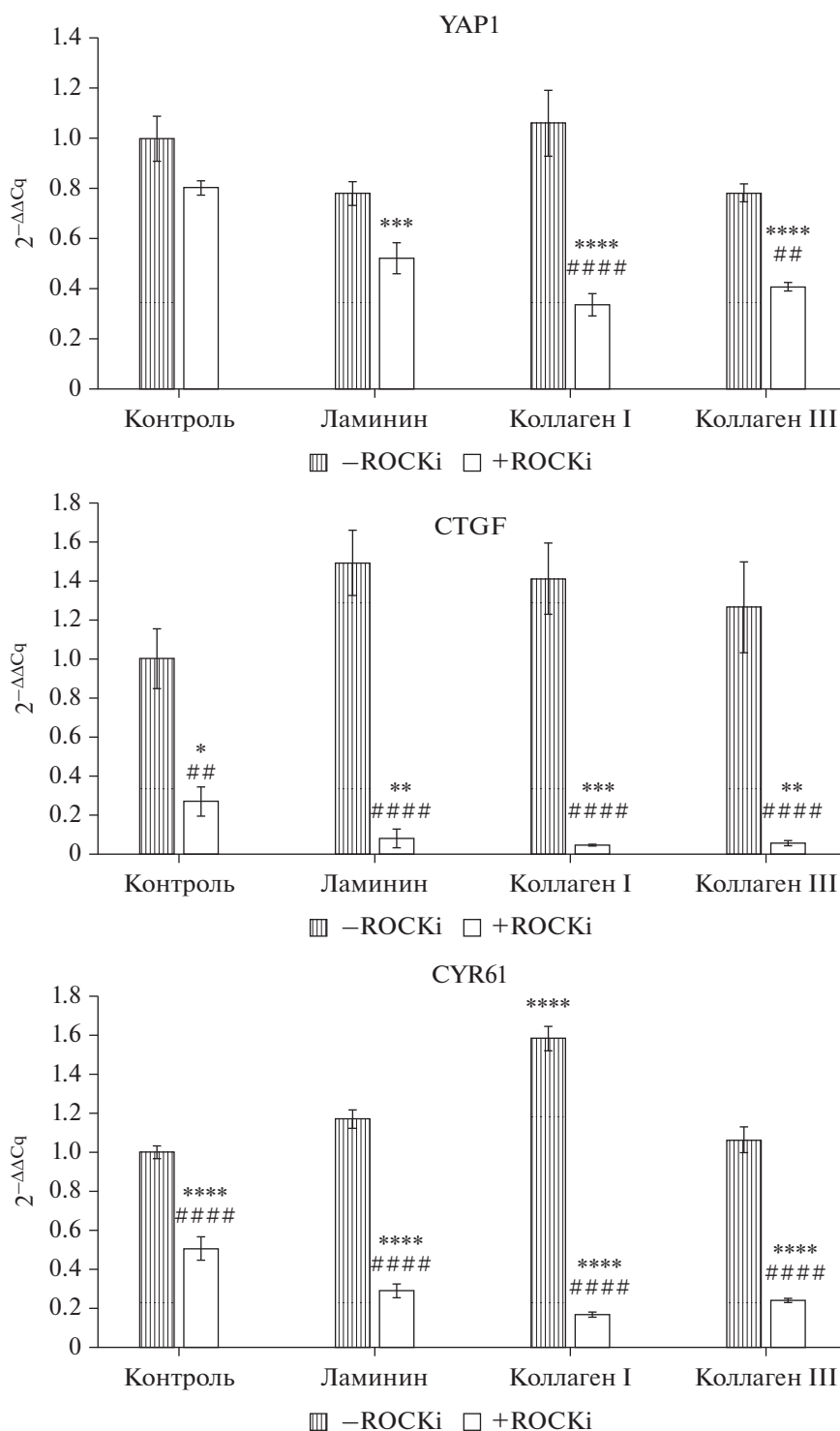


Рис. 5. Экспрессия YAP1 и его мишеней в культуре первичных кератиноцитов на субстратах из сорбированных компонентов ВКМ. Количественный ПЦР-анализ. Результаты нормализованы на уровень экспрессии GAPDH. * – статистически значимое отличие при $p \leq 0.05$, ** – при $p \leq 0.01$, *** – при $p \leq 0.001$, **** – при $p \leq 0.0001$ от контрольной группы. ## – статистически значимое отличие при $p \leq 0.01$, ### – при $p \leq 0.001$, #### – при $p \leq 0.0001$ от группы без добавления ROCK-ингибитора, тест Шидака для множественных сравнений.

анализа влияния последних на ранние и поздние этапы нейральной дифференцировки, соответственно. Эффективность нейральной дифферен-

цировки мы оценивали на основании экспрессии специализированных маркеров – β 3-тубулина, GFAP и SOX2.

После 5 сут культивирования, нейросферы одинаково эффективно адгезировали к сорбированным компонентам ВКМ, нейральные клетки мигрировали из нейросфер по субстрату (рис. 6а). Нейральные прогениторные клетки были положительны по SOX2 и $\beta 3$ -тубулину, однако мы не наблюдали экспрессии GFAP (рис. 6б). Таким образом, компоненты ВКМ не оказывали влияния на интенсивность дифференцировки на данном этапе.

Все культуры были положительны по YAP1, в отличие от индукции эпидермальной дифференцировки его локализация была преимущественно цитоплазматической (рис. 6в). Однако, высокая плотность клеток не позволила нам провести количественные обсчеты. Аналогичные затруднения возникли при подсчете размера площади клетки и фокальных контактов, поэтому этот анализ мы исключили. Добавление ROCK-ингибитора не оказывало влияния на экспрессию специализированных маркеров (данные не приведены). Тем не менее, мы проверили активность сигнального пути YAP1 методом количественного ПЦР-анализа (рис. 6г). ROCK-ингибитор подавлял экспрессию YAP1 и его мишеней на всех субстратах, за исключением коллагена I типа. Экспрессия самого YAP1 не зависела от типа субстрата. На коллагене I типа повышалась экспрессия обеих мишеней YAP1, что свидетельствовало об активации его сигнального пути. Интересно, что все анализируемые субстраты влияют в различной мере на экспрессию исследуемых членов каскада YAP1, хотя это и не приводит к какой-либо разнице в экспрессии нейральных маркеров. Вероятно, данное воздействие сказывается на более поздних этапах дифференцировки.

ВКМ оказывал значительное влияние на поздние этапы дифференцировки. Миграция из нейросфер на субстратах из коллагенов протекала значительно менее эффективно в сравнении с контролем на матрикеле и ламинине (рис. 7а). В то время как на контрольном субстрате и ламинине к 5м суткам культивирования формировался конфлуэнтный монослой, на коллагенах нейросферы оставались в виде отдельных структур, откуда выдавались отростки нейральных клеток. Все исследуемые культуры содержали $\beta 3$ -тубулин, NeuN и SOX2 — положительные клетки (рис. 7б). Количественная оценка показала снижение доли NeuN+ клеток на субстрате из коллагена III типа и тенденцию к снижению количества SOX2+ клеток на субстратах из коллагенов обоих типов (рис. 7в).

Интересные результаты мы обнаружили при детекции глиального маркера GFAP (рис. 8). GFAP-положительные клетки появлялись только при культивировании на субстратах из коллагенов I и III типов, но не на матрикеле или ламинине. Добавление ROCK-ингибитора приводило к ис-

чезновению этого маркера на субстратах из коллагенов, но стимулировало его появление в культуре на матрикеле (рис. 8а, 8б). Дополнительно оценили экспрессию этого маркера методом количественного ПЦР-анализа (рис. 8в). Результаты анализа подтвердили повышение экспрессии GFAP на коллагенах I и III типа в контроле и на матрикеле при добавлении ROCK-ингибитора. Интересно, что статистически значимое повышение экспрессии отметили в культурах на коллагенах I и III типа в присутствии ROCK-ингибитора, хотя иммуногистохимически мы не выявляли данный маркер в культуре. Мы предполагаем, что в данном случае продукция GFAP регулируется главным образом на посттранскрипционном уровне.

Поддержание и стимуляция дифференцировки в нейрональном направлении на субстрате из ламинина и ламинин-содержащем матрикеле была описана и ранее (Flanagan et al., 2006; Ma et al., 2008). При этом стимуляция глиальной дифференцировки под воздействием субстратов из коллагена ранее была показана только для постнатальных нейральных прогениторных клеток кролика (Raghavan et al., 2013). Интересный эффект стимуляции глиальной дифференцировки под воздействием ROCK-ингибитора требует дальнейшего исследования. Одной из причин такого явления может быть стимуляция полной нейральной дифференцировки, включающей в себя как нейрональную, так и глиальную, под воздействием данной малой молекулы. Подобный эффект наблюдали в исследовании на культуре нейральных стволовых клеток мыши, причем эффект ROCK-ингибитора был опосредован частичной активацией сигнального пути YAP1 (Jia et al., 2016).

Количественный ПЦР-анализ показал увеличение экспрессии YAP1 и его мишеней при культивировании на коллагенах I и III типов. Вероятно, сигнальный путь YAP вносит вклад в возникновение глиальных клеток на вышеуказанных субстратах (рис. 9). Однако, ROCK-ингибитор, как и в предыдущих экспериментах, снижал экспрессию участников этого сигнального пути. Стимуляция глиальной дифференцировки в текущем эксперименте, по-видимому, опосредована различными механизмами.

Далее мы исследовали, сохраняется ли подобное соотношение дифференцирующихся нейронов и глиальных клеток в трехмерных условиях. Для этого поместили нейросферы в трехмерный гель, состоящий из матрикеля и коллагена I типа. Интересно, что в трехмерных условиях культивирования мы не наблюдали возникновения глиальных клеток ни на одном из субстратов, при этом добавление ROCK-ингибитора также не приводило к появлению GFAP-экспрессирующих клеток (рис. 10). Плотные клеточные узлы, образованные клеточными ядрами, положитель-

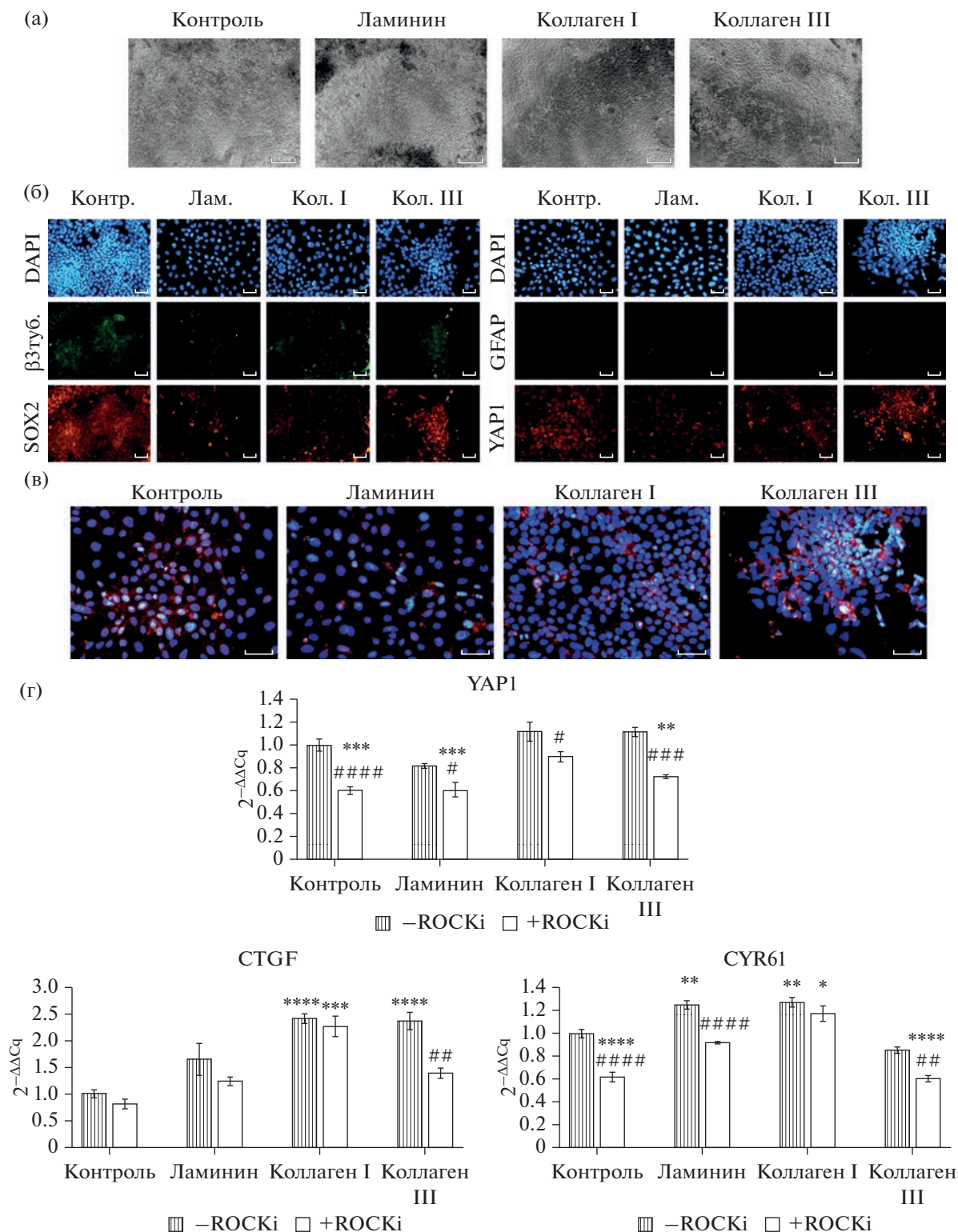


Рис. 6. Ранняя нейральная дифференцировка. (а) Адгезия нейросфер и миграция клеток на сорбированных компонентах ВКМ. Фазовый контраст. Масштабный отрезок 200 мкм. (б) Экспрессия маркеров нейральной дифференцировки. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм. (в) Экспрессия YAP1 на ранних этапах нейральной дифференцировки. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм. (г) Экспрессия YAP1 и его мишеней в культуре дифференцирующихся нейральных прогениторных клеток на субстратах из сорбированных компонентов ВКМ. Количественный ПЦР-анализ. Результаты нормализованы на уровень экспрессии GAPDH. * – статистически значимое отличие при $p \leq 0.05$, ** – при $p \leq 0.01$, *** – при $p \leq 0.001$, **** – при $p \leq 0.0001$ от контрольной группы. # – статистически значимое отличие при $p \leq 0.01$, ## – при $p \leq 0.01$, ### – при $p \leq 0.001$, #### – при $p \leq 0.0001$ от группы без добавления ROCK-ингибитора, тест Шидака для множественных сравнений.

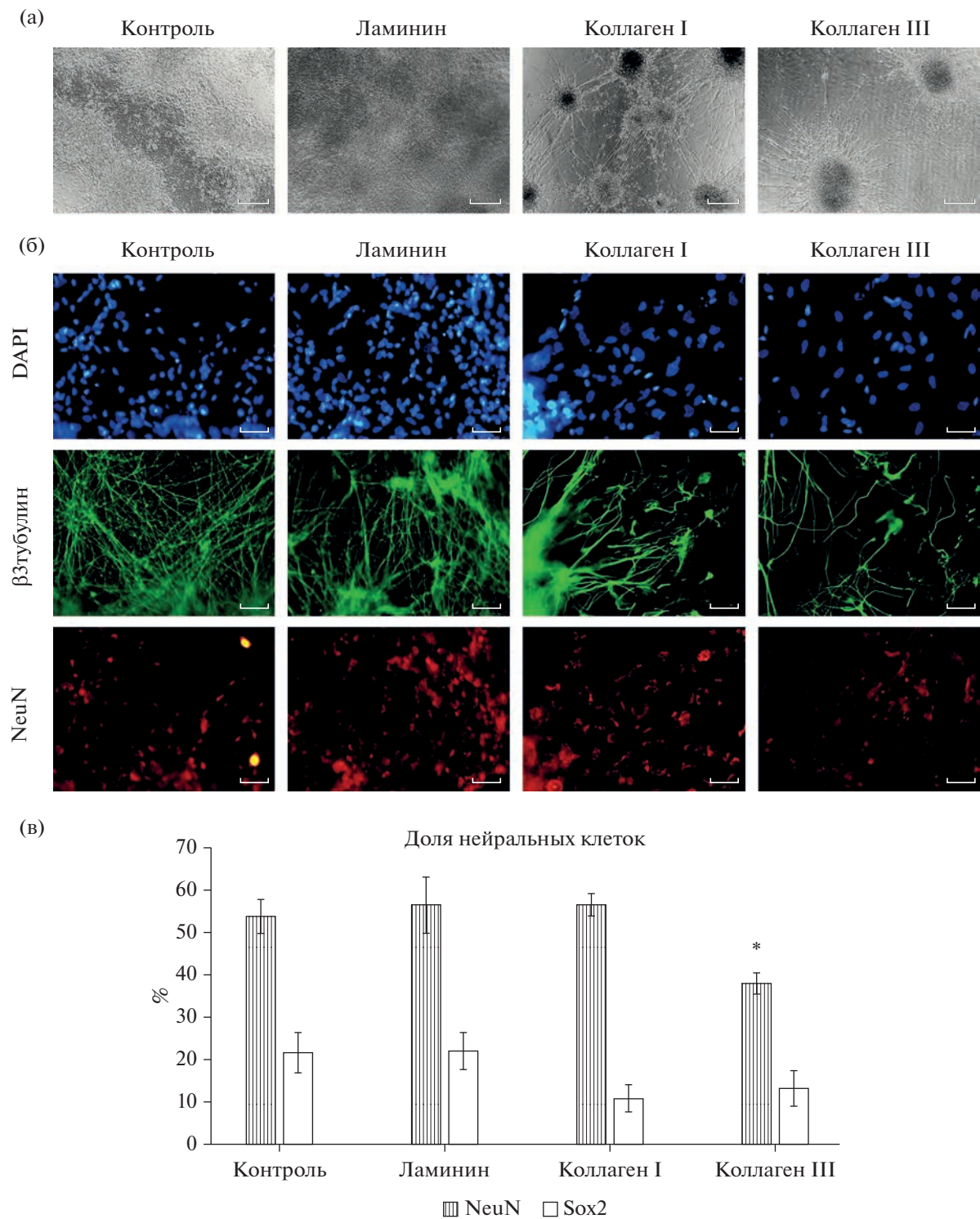


Рис. 7. Поздняя нейральная дифференцировка. (а) Адгезия нейросфер и миграция клеток на сорбированных компонентах ВКМ. Фазовый контраст. Масштабный отрезок 200 мкм. (б) Экспрессия маркеров нейральной дифференцировки. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм. (в) Доля SOX2 и NeuN положительных клеток в культурах. Тотальное количество клеток на изображении было посчитано на основании окрашивания DAPI. * — статистически значимое различие при $p \leq 0.05$, тест Шидака для множественных сравнений.

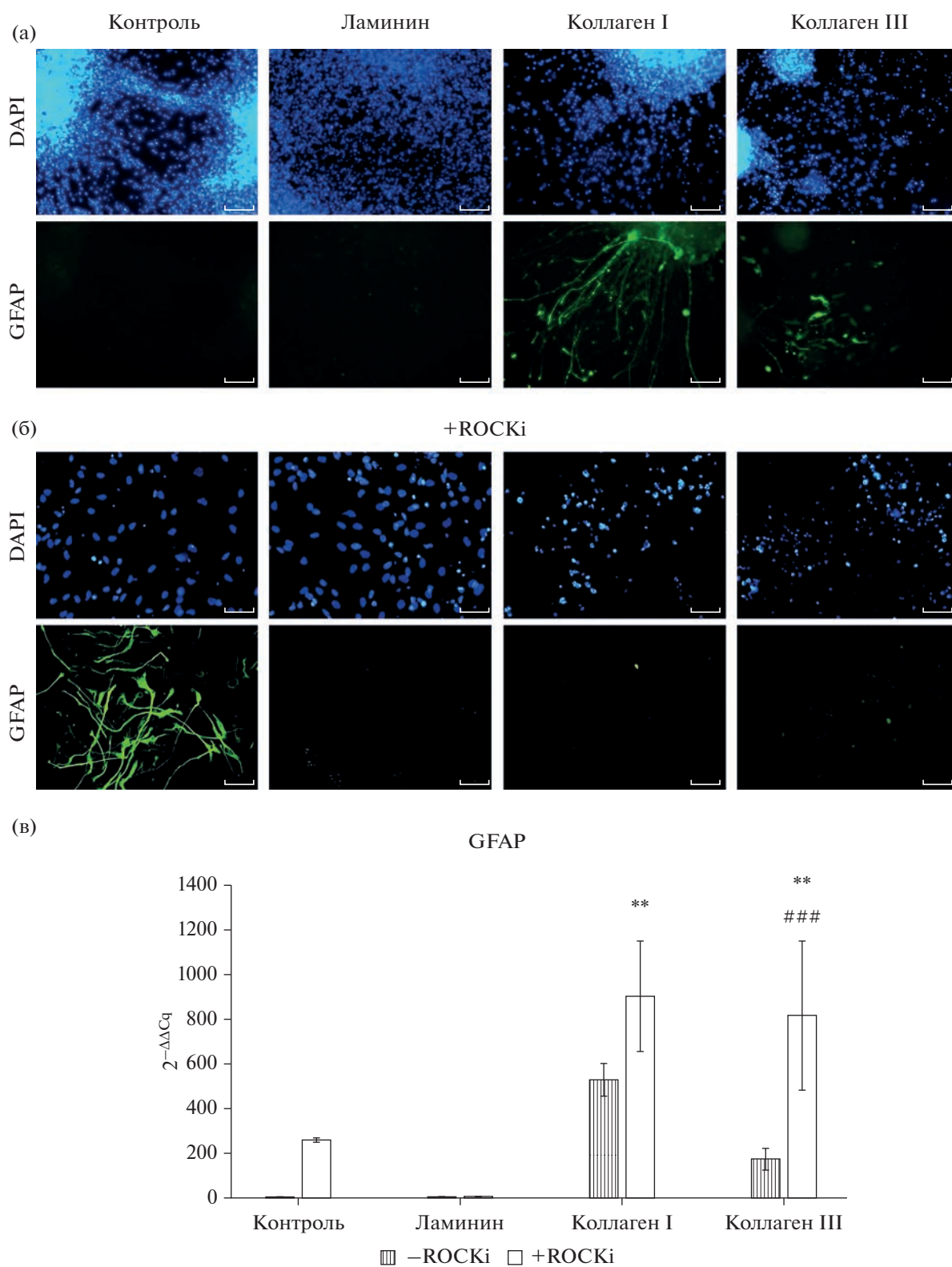


Рис. 8. Иммуногистохимическое выявление GFAP в культурах поздней нейральной дифференцировки на сорбированных компонентах ВКМ. (а) Контрoль. (б) Культуры с добавлением ROCK-ингибитора. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм. (в) Экспрессия GFAP в культурах поздней нейральной дифференцировки на субстратах из сорбированных компонентов ВКМ. Количественный ПЦР-анализ. Результаты нормализованы на уровень экспрессии GAPDH. ** – статистически значимое отличие от контрольной группы при $p \leq 0.01$, ### – статистически значимое отличие от группы без добавления ROCK-ингибитора при $p \leq 0.001$, тест Шидака для множественных сравнений.

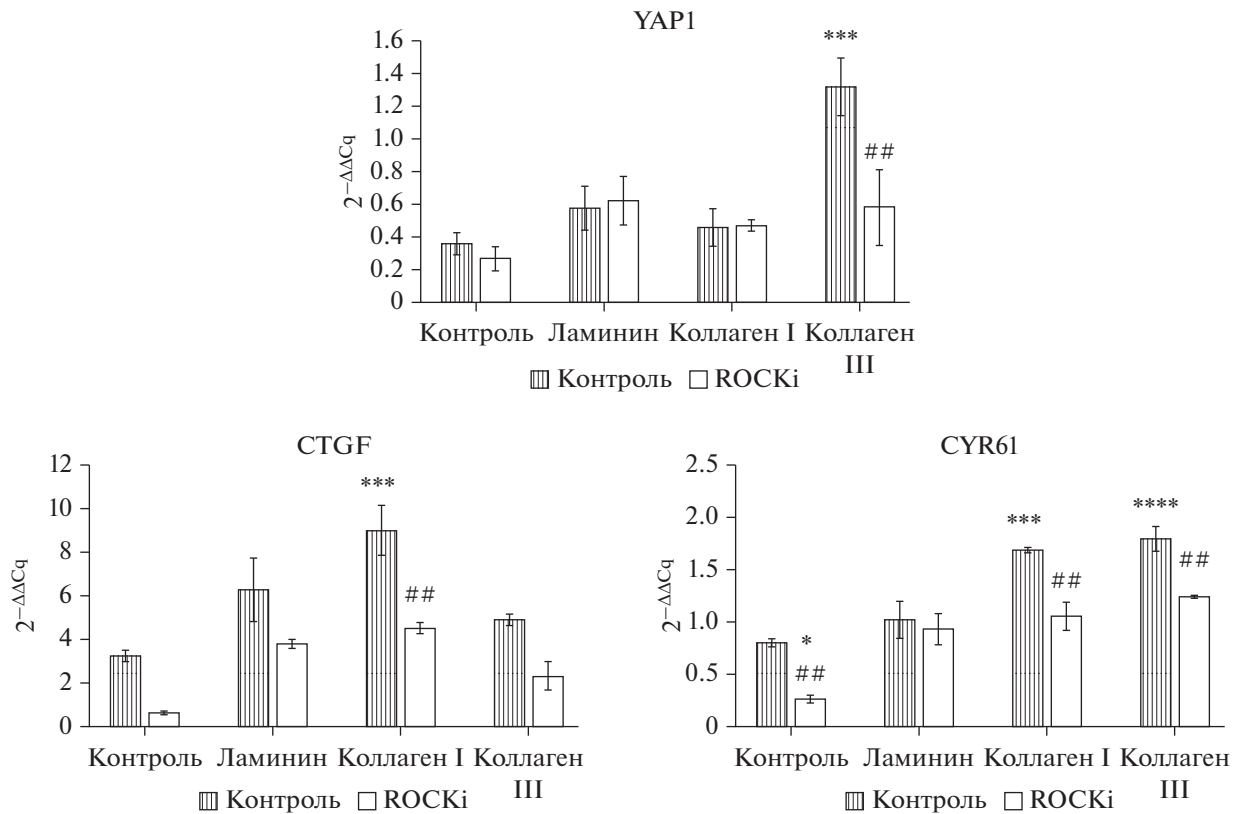


Рис. 9. Экспрессия YAP1 и его мишеней в культуре поздней нейральной дифференцировки на субстратах из сорбированных компонентов ВКМ. Результаты нормализованы на уровень экспрессии GAPDH. *** – статистически значимое отличие при $p \leq 0.001$, **** – при $p \leq 0.0001$ от контрольной группы. ## – статистически значимое отличие от группы без добавления ROCK-ингибитора при $p \leq 0.01$, тест Шидака для множественных сравнений.

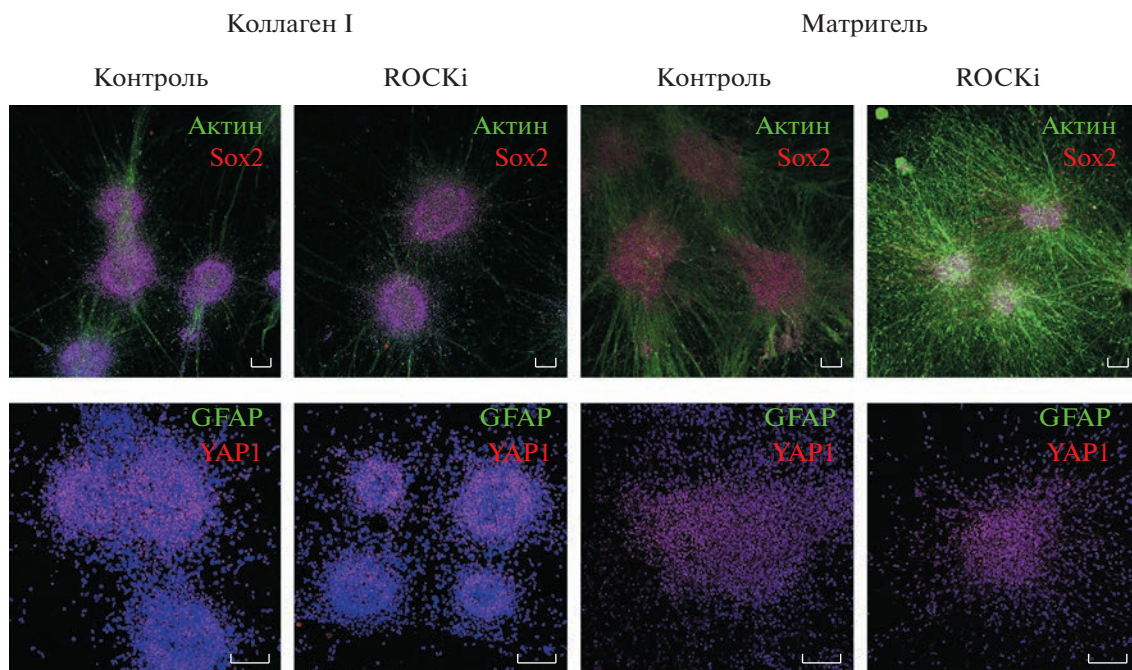


Рис. 10. Морфология культур поздней нейральной дифференцировки в трехмерных условиях. Ядра докрашены DAPI. Конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок 100 мкм.

ными по SOX2 и YAP1 давали протяженные отростки в толщу геля, между отростками располагались ядра мигрирующих клеток. Матригель более способствовал клеточной миграции из нейросфер, однако это не сказывалось на экспрессии анализируемых маркеров. Трехмерные условия культивирования оказывают значительное влияние на клеточную физиологию. Для дифференцирующихся нейральных прогениторных клеток трехмерные условия культивирования способствуют дифференцировке в нейрональном направлении, а также выживаемости и миграции клеток (Kaiser et al., 2019). При этом данный эффект показан как для матригеля, так и для коллагенового геля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы мы выявили, что ламинин стимулирует ранние этапы эпидермальной дифференцировки в отличие от субстратов из коллагенов I и III типа. Данный результат весьма актуален, поскольку в современных протоколах эктодермальной дифференцировки ИПСК рекомендуют использовать коллагенов (Itoh et al., 2011; Kogut et al., 2014; Kim et al., 2018; Ruiz-Torres et al., 2021), но не ламинина. Также мы показали стимулирующий эффект коллагенов I и III типа на глиальную дифференцировку. Изучение механизмов глиальной дифференцировки важно для понимания основ патогенеза нейродегенеративных заболеваний, развития нервной ткани и разработки специализированных носителей для терапии при необходимости стимуляции регенерации нервной ткани. Хотя мы отметили снижение индукции глиальной дифференцировки в трехмерных условиях, вероятно носители с обширной площадью поверхности, сочетающие в себе свойства как двумерных, так и трехмерных условий культивирования, позволяют разработать наиболее выгодные условия для стимуляции необходимого развития нервной ткани.

Наши результаты показали, что процесс индукции ранней нейральной и эпидермальной дифференцировки напрямую не коррелирует с уровнем экспрессии YAP1. Тем не менее, стоит отметить интересное наблюдение, а именно — преимущественно ядерную локализацию данного белка в ходе ранней эпидермальной дифференцировки и преимущественно цитоплазматическую локализацию для ранней нейральной дифференцировки. Условия культивирования лишь отчасти отображают процессы, происходящие *in vivo*, однако данный феномен может дополнить современное понимание морфогенеза эктодермальных дериватов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП ИБР РАН и УНУ “Коллекция клеточных культур” ИБР РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование влияния компонентов ВКМ на эффективность эпидермальной и нейральной дифференцировке проведено в рамках исполнения государственного задания № 0088-2021-0016. Исследование роли сигнального каскада YAP1 в субстрат-опосредованной индукции эпидермальной и нейральной дифференцировки проведено с поддержкой гранта РФ № 21-74-30015.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования лабораторные животные не использовались в качестве объектов. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования первичного материала тканей человека в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Е.О. Осидак и С.П. Домогатский являются сотрудниками ООО фирмы “ИМТЭК”, в которой были произведены компоненты внеклеточного матрикса, используемые в работе. Остальные авторы конфликтов интереса не имеют.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.А. Огнивцев проводил работы по культивированию клеточных линий и индукции дифференцировки, а также отвечал за проведение иммуногистохимической детекции с последующей обработкой полученных фотографий и количественный ПЦР-анализ. Е.О. Осидак и С.П. Домогатский проводили статистические обсчеты полученных результатов. Е.П. Калабушева отвечала за выделение первичного материала и микроскопию. А.А. Огнивцев, Е.П. Калабушева и Е.А. Воротеяк разрабатывали дизайн исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Araya C., Carmona-Fontaine C., Clarke J.D. Extracellular matrix couples the convergence movements of mesoderm and neural plate during the early stages of neurulation // *Dev. Dyn.* 2016. V. 245. P. 580–589.
- Brafman D.A., Phung C., Kumar N., Willert K. Regulation of endodermal differentiation of human embryonic stem cells through integrin-ECM interactions // *Cell Death Differ.* 2013. V. 20. № 3. P. 369–381.
- Cai X., Wang K.C., Meng Z. Mechanoregulation of YAP and TAZ in cellular homeostasis and disease progression // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 673599.
- Costell M., Gustafsson E., Aszódi A., Mörgelin M., Bloch W., Hunziker E., Addicks K., Timpl R., Fässler R. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes // *J. Cell Biol.* 1999. V. 147. № 5. P. 1109–1122.
- De Rosa L., Secone Seconetti A., De Santis G., Pellacani G., Hirsch T., Rothoef T., Teig N., Pellegrini G., Bauer J.W.,

- De Luca M. Laminin 332-dependent YAP dysregulation depletes epidermal stem cells in junctional epidermolysis bullosa // *Cell Rep.* 2019. V. 27. № 7. P. 2036–2049.
- Domingues S., Darle A., Masson Y., Saidani M., Lagoutte E., Bejanariu A., Coutier J., Ayata R.E., Bouschbacher M., Peschanski M., Lemaitre G., Baldeschi C. Clinical grade human pluripotent stem cell-derived engineered skin substitutes promote keratinocytes wound closure *in vitro* // *Cells.* 2022 V. 11. № 7. P. 1151.
- Evans N.D., Minelli C., Gentleman E., LaPointe V., Patankar S.N., Kallivretaki M., Chen X., Roberts C.J., Stevens M.M. Substrate stiffness affects early differentiation events in embryonic stem cells // *Eur. Cell Mater.* 2009. V. 21. P. 1–13.
- Feledy J.A., Beanan M.J., Sandoval J.J., Goodrich J.S., Lim J.H., Matsuo-Takasaki M., Sato S.M., Sargent T.D. Inhibitory patterning of the anterior neural plate in *Xenopus* by homeodomain factors Dlx3 and Msx1 // *Dev. Biol.* 1999. V. 212. № 2. P. 455–464.
- Flanagan L.A., Rebaza L.M., Derzic S., Schwartz P.H., Monuki E.S. Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins // *J. Neurosci. Res.* 2006. V. 83. № 5. P. 845–856.
- Ford-Perriss M., Turner K., Guimond S., Apedaile A., Haubeck H.D., Turnbull J., Murphy M. Localisation of specific heparan sulfate proteoglycans during the proliferative phase of brain development // *Dev. Dyn.* 2003. V. 227. № 2. P. 170–184.
- Gomez G.A., Prasad M.S., Sandhu N., Shelar P.B., Leung A.W., Garcia-Castro M.I. Human neural crest induction by temporal modulation of WNT activation // *Dev. Biol.* 2019. V. 449. № 2. P. 99–106.
- Hao J., Zhang Y., Wang Y., Ye R., Qiu J., Zhao Z., Li J. Role of extracellular matrix and YAP/TAZ in cell fate determination // *Cell Signal.* 2014. V. 26. № 2. P. 186–191.
- Itoh M., Kiuru M., Cairo M.S., Christiano A.M. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 21. P. 8797–8802.
- Itoh M., Umegaki-Arao N., Guo Z., Liu L., Higgins C.A., Christiano A.M. Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. P. 77673.
- Jia X.F., Ye F., Wang Y.B., Feng D.X. ROCK inhibition enhances neurite outgrowth in neural stem cells by upregulating YAP expression *in vitro* // *Neural. Regen. Res.* 2016. V. 11. № 6. P. 983–987.
- Kariya Y., Sato H., Katou N., Kariya Y., Miyazaki K. Polymerized laminin-332 matrix supports rapid and tight adhesion of keratinocytes, suppressing cell migration // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 5. P. e35546.
- Kim Y., Park N., Rim Y.A., Nam Y., Jung H., Lee K., Ju J.H. Establishment of a complex skin structure via layered co-culture of keratinocytes and fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells // *Stem Cell Res. Ther.* 2018. V. 9. № 1. P. 217.
- Kogut I., Roop D.R., Bilousova G. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1195. P. 1–12.
- Li L., Liu C., Biechele S., Zhu Q., Song L., Lanner F., Jing N., Rossant J. Location of transient ectodermal progenitor potential in mouse development // *Development.* 2013. V. 140. № 22. P. 4533–4543.
- Liem K.F., Jr., Tremml G., Roelink H., Jessell T.M. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm // *Cell.* 1995. V. 82. № 6. P. 969–979.
- Lin X., Lu C., Ohmoto M., Choma K., Margolskee R.F., Matsumoto I., Jiang P. R-spondin substitutes for neuronal input for taste cell regeneration in adult mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021. V. 118. № 2. P. e2001833118.
- Linker C., De Almeida I., Papanayotou C., Stower M., Saba-do V., Ghorani E., Streit A., Mayor R., Stern C.D. Cell communication with the neural plate is required for induction of neural markers by BMP inhibition: evidence for homeogenetic induction and implications for *Xenopus* animal cap and chick explant assays // *Dev. Biol.* 2009. V. 327. № 2. P. 478–486.
- Long K.R., Huttner W.B. How the extracellular matrix shapes neural development // *Open Biol.* 2019. V. 9. № 1. P. 180216.
- Long K., Moss L., Laursen L., Boulter L., French-Constant C. Integrin signalling regulates the expansion of neuroepithelial progenitors and neurogenesis via Wnt7a and Decorin // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10354.
- Ma W., Tavakoli T., Derby E., Serebryakova Y., Rao M.S., Mattson M.P. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells // *BMC Dev. Biol.* 2008. V. 8. P. 90.
- Meyer S., Schmidt I., Klämbt C. Glia ECM interactions are required to shape the *Drosophila* nervous system // *Mech. Dev.* 2014. V. 133. P. 105–116.
- Mohammed H., Hernando-Herraez I., Savino A., Scialdone A., Macaulay I., Mulas C., Chandra T., Voet T., Dean W., Nichols J., Marioni J.C., Reik W. Single-cell landscape of transcriptional heterogeneity and cell fate decisions during mouse early gastrulation // *Cell Rep.* 2017. V. 20. № 5. P. 1215–1228.
- Nardone G., Oliver-De La Cruz J., Vrbsky J., Martini C., Pribyl J., Skládal P., Pešl M., Caluori G., Pagliari S., Martino F., Maceckova Z., Hajdúch M., Sanz-García A., Pugno N.M., Stokin G.B., Forte G. YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15321.
- Ozair M.Z., Kintner C., Brivanlou A.H. Neural induction and early patterning in vertebrates // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2013. V. 2. № 4. P. 479–498.
- Ozasa R., Matsugaki A., Matsuzaka T., Ishimoto T., Yun H.S., Nakano T. Superior alignment of human iPSC-Osteoblasts associated with focal adhesion formation stimulated by oriented collagen scaffold // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 12. P. 6232.
- Pagliari S., Vinarsky V., Martino F., Perestrelo A.R., Oliver De La Cruz J., Caluori G., Vrbsky J., Mozetic P., Pompeiano A., Zanca A., Ranjani S.G., Skládal P., Kytýr D., Zdráhal Z., Grassi G., Sampaioles M., Rainer A., Forte G. YAP-TEAD1 control of cytoskeleton dynamics and intracellular tension guides human pluripotent stem cell mesoderm specification // *Cell Death Differ.* 2021. V. 28. № 4. P. 1193–1207.
- Pauly M.G., Krajka V., Stengel F., Seibler P., Klein C., Cape-tian P. Adherent vs. free-floating neural induction by dual SMAD inhibition for neurosphere cultures derived

- from human induced pluripotent stem cells // *Front Cell Dev. Biol.* 2018. V. 6. P. 3.
- Pijuan-Sala B., Griffiths J.A., Guibentif C., Hiscock T.W., Jawaid W., Calero-Nieto F.J., Mulas C., Ibarra-Soria X., Tyser R.C.V., Ho D.L.L., Reik W., Srinivas S., Simons B.D., Nichols J., Marioni J.C., Göttgens B. A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis // *Nature*. 2019. V. 566. № 7745. P. 490–495.
- Qiao Y., Zhu Y., Sheng N., Chen J., Tao R., Zhu Q., Zhang T., Qian C., Jing N. AP2 γ regulates neural and epidermal development downstream of the BMP pathway at early stages of ectodermal patterning // *Cell Res.* 2012. V. 22. № 11. P. 1546–1561.
- Raghavan S., Gilmont R.R., Bitar K.N. Neuroglial differentiation of adult enteric neuronal progenitor cells as a function of extracellular matrix composition // *Biomaterials*. 2013. V. 34. № 28. P. 6649–6658.
- Rasmussen C.H., Petersen D.R., Moeller J.B., Hansson M., Dufva M. Collagen type I improves the differentiation of human embryonic stem cells towards definitive endoderm // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 12. P. e0145389.
- Ruiz-Torres S., Lambert P.F., Wikenheiser-Brokamp K.A., Wells S.I. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into epidermal stem and progenitor cells // *Mol. Biol. Rep.* 2021. V. 48. № 8. P. 6213–6222.
- Rust W.L., Sadasivam A., Dunn N.R. Three-dimensional extracellular matrix stimulates gastrulation-like events in human embryoid bodies // *Stem Cells Dev.* 2006. V. 15. № 6. P. 889–904.
- Soulintzi N., Zagris N. Spatial and temporal expression of perlecan in the early chick embryo // *Cells Tissues Organs*. 2007. V. 186. № 4. P. 243–256.
- Walma D.A.C., Yamada K.M. The extracellular matrix in development // *Development*. 2020. V. 147. № 10. P. dev175596.
- Warmflash A., Sorre B., Etoc F., Siggia E.D., Brivanlou A.H. A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 8. P. 847–854.
- Wattanapanitch M., Klincumhom N., Potirat P., Amornpisutt R., Lorthongpanich C., U-pratya Y., Laowtammathron C., Kheolamai P., Pongvarin N., Issaragrisil S. Dual small-molecule targeting of SMAD signaling stimulates human induced pluripotent stem cells toward neural lineages // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 9. P. 106952.
- Zagris N., Gilipathi K., Soulintzi N., Konstantopoulos K. Decorin developmental expression and function in the early avian embryo // *Int. J. Dev. Biol.* 2011. V. 55. № 6. P. 633–639.
- Zhang H., Pasolli H.A., Fuchs E. Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 6. P. 2270–2275.
- Zhang S.C., Wernig M., Duncan I.D., Brüstle O., Thomson J.A. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 12. P. 1129–1133.

The Role of Extracellular Matrix in Human Pluripotent Cells Differentiation into Ectodermal Derivatives

A. A. Ognivtsev¹, E. P. Kalabusheva^{1,*}, E. O. Osidak², S. P. Domogatsky^{3, 4}, and E. A. Vorotelyak¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

²Imtek Ltd., ul. Cherepkovskaya 3, 15A, Moscow, 121552 Russia

³Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ul. Gamalei, 18, Moscow, 123098 Russia

⁴National Medical Research Center for Cardiology named after academician Yevgeniy Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Cherepkovskaya 3, 15A, Moscow, 121552 Russia

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

One of the most important events in the embryonic development of mammals is the division of the ectoderm into integumentary and neuroectoderm. Signaling cascades induced by growth factors and cytokines involved in these processes have been studied in detail in recent decades. At the same time, the contribution of extracellular matrix (ECM) to these differentiation lineages remains unknown for mammals, while the significance of ECM in this process has been shown in other model organisms. To assess the effect of ECM on the formation of ectodermal derivatives, we modeled the neural and epidermal differentiation of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) using substrates consisting of various ECM molecules; and also studied the involvement of one of the central links of the ECM signaling cascades, a transcriptional coactivator YAP1 in differentiation processes. Our results revealed the stimulatory effect of laminin 332 on the early stages of epidermal differentiation and of type I and III collagens on the inducing of the glial fate of late neural differentiation.

Keywords: epidermal differentiation, neural differentiation, iPSC, laminin, collagen, YAP1