

КОМПЛЕКС НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНГИБИТОРОВ YAC ПОВЫШАЕТ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-МАРКЕРОВ КЛЕТОК СЕРТОЛИ В КУЛЬТУРЕ СЕРТОЛИ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК СЕМЕННИКА ВЗРОСЛОЙ МЫШИ¹

A COMBINATION OF SMALL-MOLECULE INHIBITORS YAC UPREGULATES EXPRESSION OF SERTOLI-CELL MARKERS IN THE CULTURE OF SERTOLI-LIKE CELLS FROM THE ADULT MOUSE TESTIS

**E. Malolina
A. Kulibin**

Summary. A combination of small-molecule compounds, Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 (Y), type 1 transforming growth factor- β receptor inhibitor A-83-01 (A), and glycogen synthase kinase-3 inhibitor CHIR99021 (C) (YAC), allows for the stable culturing of different types of stem and progenitor cells. Here, the effect of YAC on the culture of Sertoli-like cells from the adult mouse testis was studied using laser microdissection and RT-PCR. Some features of Sertoli-like cells make it possible to define them as progenitor cells. It was found that YAC significantly upregulates expression of genes involved in Sertoli cell specification (Wt1, Sox9 and Dmrt1) and function (Trf, Gdnf and Kitl).

Keywords: testis, Sertoli cells, small-molecule compounds, progenitor cells.

Малолина Екатерина Андреевна

К.б.н., н.с., Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН (Москва); Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ (Москва)

kate.ma85@gmail.com

Кулибин Андрей Юрьевич

К.б.н., с.н.с., Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН (Москва)

kulibin.a.bkrj@gmail.com

Аннотация. Комплекс трех низкомолекулярных веществ: ингибитора Rho-ассоциированной киназы Y-27632 (Y), ингибитора рецептора TGF β 1 типа A-83-01 (A) и ингибитора гликоген-синтазы-киназы 3 CHIR99021 (C) (YAC), способствует поддержанию в культуре различных типов стволовых и прогениторных клеток. В работе с помощью методов лазерной микродиссекции и ПЦР в реальном времени изучено влияние YAC на культуру Сертоли-подобных клеток семенника взрослой мыши, которые, по ряду признаков, можно также отнести к прогениторным клеткам. Установлено, что YAC статистически достоверно повышает уровень экспрессии генов, определяющих спецификацию (Wt1, Sox9 и Dmrt1) и функциональное состояние (Trf, Gdnf и Kitl) клеток Сертоли.

Ключевые слова: семенник, клетки Сертоли, низкомолекулярные вещества, прогениторные клетки.

Воздействие на клетки низкомолекулярных веществ, модулирующих отдельные компоненты сигнальных путей, является широко распространенной стратегией для культивирования эмбриональных стволовых клеток и получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из соматических клеток [1, 2]. Этот подход позволяет быстро и обратимо активировать и ингибировать функции специфических белков, ответственных за формирование плюрипотентности (таких, например, как Oct4) [1, 2]. В недавнем исследовании было продемонстрировано, что комбинация трех низкомолекулярных веществ: ингибитора Rho-ассоциированной киназы Y-27632 (Y), ингибито-

ра рецептора TGF β 1 типа A-83-01 (A) и ингибитора гликоген-синтазы-киназы 3 CHIR99021 (C) (сокращенно YAC) — способствует дедифференцировке зрелых гепатоцитов в прогениторные клетки и позволяет длительно поддерживать последние в культуре, с сохранением их способности к обратной дифференцировке в гепатоциты и к дифференцировке в эпителиальные клетки желчных протоков [3]. Также YAC способствует поддержанию в культуре прогениторных клеток других типов [3]. В недавнем исследовании нами было установлено, что в семенниках половозрелых мышей присутствует популяция клеток, экспрессирующая ряд генов-маркеров клеток Сертоли (поддерживающих соматических клеток

¹ Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н. К. Кольцова РАН, при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-34-60119 мол_а_дк.

Таблица. Праймеры, использованные для проведения ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательности прямых (f) и обратных (r) праймеров (5' → 3')
Hprt	f GCAGTACAGCCCCAAATGG; r GGTCTTTTCACCAGCAAGCT
Wt1	f GCTCCAGCTCAGTGAATGGACAGAA; r GGCCACTCCAGATACACGCCG
Sox9	f GCATCTGCACAACGCGG; r AGCCTCCAGAGCTTGCCC
Dmrt1	f GGTTGTAACCAAGTTTTCAGGA; r CCGCTCTTCTCACTGGTCA
Trf	f CAACCTCACGACTCCTGGAAG; r TAAGGCACAGCAGCGAAGAC
Gdnf	f GGGTGCGTTTTAACTGCCATA; r GCCCAAACCAAGTCAGTGA
Kitl	f TGGTGGCAAATCTTCAAATG; r CGGCGACATAGTTGAGGGTTAT
Nr5a1	f AGAGAAGTGGGCAGGAGACA; r GCTTTGATGCTAGTCCCATATA
Gata4	f CCCTTCGACAGCCAGTCCTG; r AGGTAGTGTCCCGTCCCATCTCG
Shbg	f GCTTCTTCTGCCTGAGTG; r GTCCCGATTCTCCCAACTTC
Inha	f CTCGAAGACATGCCGTTGG; r AGCTGGCTGGTCTCACAG

семенника) и в то же время, в отличие от последних, способная пролиферировать в культуре [4]. Далее по тексту эти клетки будут обозначаться как Сертоли-подобные клетки. Сертоли-подобные клетки, по ряду признаков, также можно отнести к прогениторным клеткам.

Целью настоящей работы стало оценить, как комплекс низкомолекулярных веществ YAC влияет на экспрессию генов-маркеров клеток Сертоли в культуре Сертоли-подобных клеток.

Материал и методика

Культуру Сертоли-подобных клеток получали из семенников мышей линии C57BL/6J по методике, описанной ранее [4]. Клетки культивировали на 50-мм чашках Петри с мембраной PEN (WillCo Wells), покрытых Matrigel (Corning), при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher) с добавлением 1% фетальной бычьей сыворотки, пенициллина-стрептомицина, пирувата натрия и смеси инсулина/трансферрина/селенита. К части культур добавляли низкомолекулярные вещества Y-27632 (10 μM, Abcam), A-83-01 (0,5 μM, Sigma) и CHIR99021 (3 μM, Sigma). Среду меняли каждые вторые сутки. На 9 сут культивирования клетки окрашивали прижизненным красителем SYBR Green I (1:5000) в течение 3 мин, отмывали от красителя и вырезали колонии Сертоли-подобных клеток с помощью системы лазерной диссекции Leica LMD7000 по ранее описанной методике [5]. Из полученного материала выделяли РНК с помощью RNeasy Micro Kit (Qiagen). кДНК синтезировали с помощью MMLV RT kit (Евроген). Далее проводили ПЦР в реальном времени, используя SYBR green qPCRmix-HS with ROX (Евроген), на StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). В качестве референс-гена для нормализации результатов ПЦР использовали Hprt. Праймеры для ПЦР перечислены в таблице.

Результаты и обсуждение

Применение методики лазерной диссекции колоний клеток (рис. 1А, Б) позволило отделить Сертоли-подобные клетки от примесных клеток: перитубулярно-мышечных клеток и клеток Сертоли семенных канальцев, располагающихся между колониями. Прижизненная окраска культур SYBR Green I способствовала точному выявлению колоний Сертоли-подобных клеток в культуре во время процедуры лазерной диссекции. Необходимо отметить, что, согласно предварительно проведенным экспериментам, использованный краситель полностью отмывался от образцов во время проведения необходимых манипуляций перед постановкой ПЦР и не влиял на результаты последней.

Анализ экспрессии генов-маркеров клеток Сертоли в культуре Сертоли-подобных клеток показал, что добавление в культуральной среде YAC статистически значимо повышало уровень экспрессии транскрипционных факторов Wt1, Sox9 и Dmrt1 (рис. 1В). Все эти факторы являются ключевыми для спецификации клеток Сертоли в ходе эмбрионального развития [6], а также входят в состав комплекса генов, которые необходимо и достаточно активировать в фибробластах, чтобы прошла их трансдифференцировка в клетки Сертоли [7]. Также YAC достоверно увеличивал экспрессию Trf, Gdnf и Kitl (рис. 1В). Белки, кодируемые этими генами, участвуют в процессах поддержания жизнеспособности и дифференцировки половых клеток [8]. Экспрессия части генов, специфичных для клеток Сертоли (Nr5a1, Gata4, Shbg), не зависела от добавления YAC (рис. 1В). И только один из проанализированных генов, Inha, достоверно снижал уровень своей экспрессии в культуре, поддерживаемой на среде с YAC (рис. 1В). Inha кодирует альфа-субъединицу ингибина, эндокринного фактора, секретируемого клетками Сертоли в ответ на воздействие фолликуло-стимулирующего гормона и ингибирующего продукцию

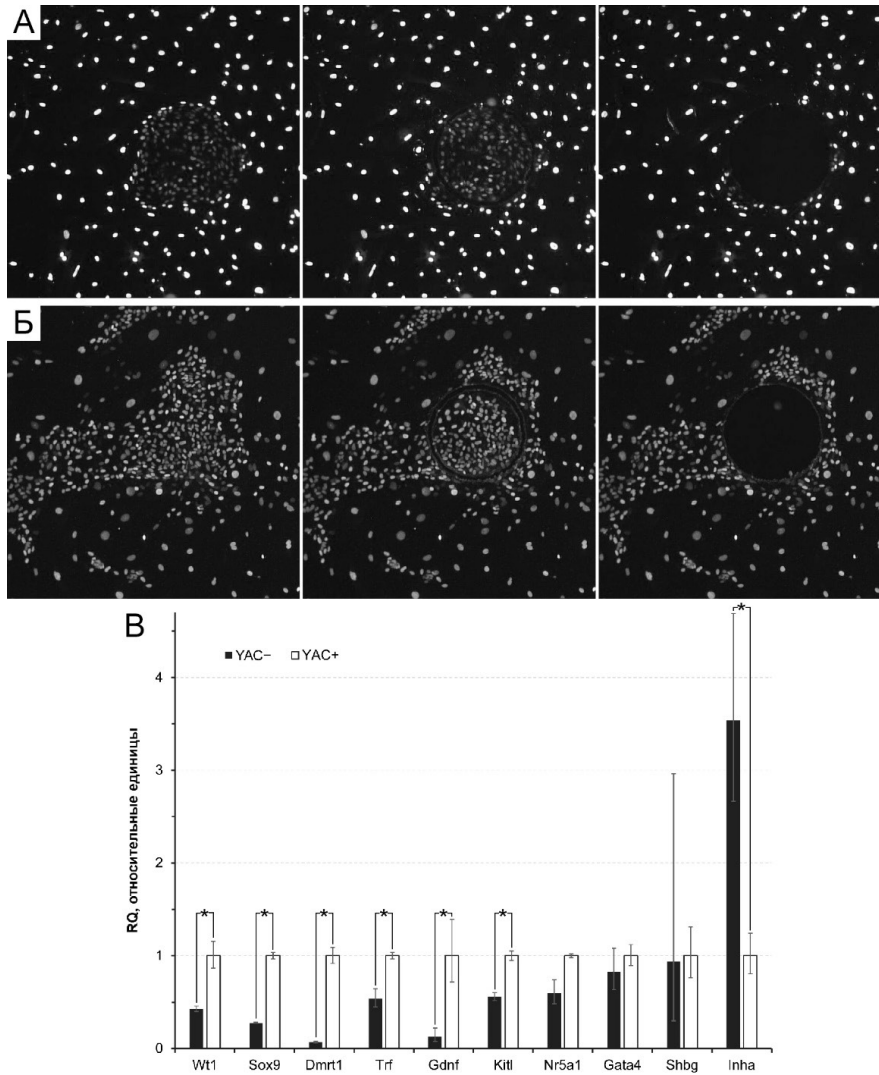


Рисунок. Анализ экспрессии генов-маркеров клеток Сертоли в культурах Сертоли-подобных клеток. А, Б — репрезентативные фотографии колоний клеток, поддерживаемых на среде с YAC (А) или без YAC (Б), во время проведения лазерной микродиссекции. Показан процесс вырезания клеток. Клетки окрашены SYBR Green I. Ув.: x20. В — результаты ПЦР в реальном времени. RQ — относительное количество РНК. Представлены средние значения от трех независимых экспериментов и стандартные ошибки среднего. * — $p < 0.05$, непараметрический критерий Манна-Уитни.

этого гормона в гипофизе. Возможно, регуляция его экспрессии в культуре Сертоли-подобных клеток, без воздействия фолликулостимулирующего гормона, нарушена, и добавление в культуральную среду этого гормона увеличит экспрессию *Inha* в культуре с добавлением YAC. Другим объяснением может быть недифференцированное состояние клеток: действительно, уровень экспрессии *Inha* в клетках Сертоли крайне низок в эмбриональный период развития, и резко увеличивается после рождения [9].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что комплекс низкомолекулярных веществ

YAC, при его добавлении к культуре Сертоли-подобных клеток, повышает уровень экспрессии большей части проанализированных генов-маркеров спецификации и функционального состояния клеток Сертоли, то есть способствует их дифференцировке в сторону клеток Сертоли. YAC может быть использован для эффективного поддержания Сертоли-подобных клеток в культуре. Это особенно важно, так как позволит продолжить изучение свойств этих клеток *in vitro*, которые, в силу своей схожести с поддерживающими клетками семенников, потенциально могут быть использованы в качестве замены клеток Сертоли в различных биомедицинских технологиях, в том числе связанных с репродукцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K., Ge J., Xu J., Zhang Q., Zhao Y., Deng H. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013;341(6146):651–654.
2. Tsutsui H., Valamehr B., Hindoyan A., Qiao R., Ding X., Guo S., Witte O. N., Liu X., Ho C. M., Wu H. An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells. *Nat Commun*. 2011;2:167.
3. Katsuda T., Kawamata M., Hagiwara K., Takahashi R. U., Yamamoto Y., Camargo F. D., Ochiya T. Conversion of terminally committed hepatocytes to culturable bipotent progenitor cells with regenerative capacity. *Cell stem cell*. 2017;20(1):41—55.
4. Kulibin A. Yu., Malolina E. A. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture. *Reproduction*. 2016;152(4):271–281.
5. Podgorny O. V. Live cell isolation by laser microdissection with gravity transfer. *J Biomed Opt*. 2013;18(5):55002.
6. Lin Y.T., Capel B. Cell fate commitment during mammalian sex determination. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2015;32:144–152.
7. Buganim Y., Itskovich E., Hu Y. C., Cheng A. W., Ganz K., Sarkar S., Fu D., Welstead G. G., Page D. C., Jaenisch R. Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells by defined factors. *Cell Stem Cell*. 2012;11(3):373–386.
8. Sertoli Cell Biology. Eds M. K. Skinner, M. D. Griswold. San Diego; L.: Elsevier Academic Press, 2005. 512 p.
9. Majdic G., McNeilly A.S., Sharpe R. M., Evans L. R., Groome N. P., Saunders P. T. Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinology*. 1997;138(5):2136–2147.

© Малолina Екатерина Андреевна (kate.ma85@gmail.com), Кулибин Андрей Юрьевич (kulibin.a.bkrj@gmail.com).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»

