

УДК 57.017.642

АНАЛИЗ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МУЖСКОЙ ГОНАДЫ МЕТОДОМ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК

Смагина О.В. (МПУ)

Научные руководители – кандидат биологических наук, доцент Бочкарева А.Г. (МПУ), ассистент кафедры физиологии человека и животных Мун В.В. (МПУ)

Введение. Для развития репродуктивной биологии и медицины фундаментальное значение имеет понимание процессов эмбрионального развития соматических линий гонады. Так, ключевой для поддержания сперматогенеза является линия поддерживающих клеток или клеток Сертоли (КС). Её развитие начинается с клеток целомического эпителия, которые после стадии определения пола дифференцируются в клетки Сертоли (КС) и формируют половые тяжи, в которых далее будут созреть сперматозоиды [1]. Выносящая система гонады (придаток семенника и выносящие канальцы), необходимая для выведения гамет из гонады развивается из другого зачатка – ткани мезонефроса. Сеть семенника (СС), соединяет эти две системы и выполняет транзитную функцию. Вероятно, что данная область в развитии возникает из двух зачатков. Дистальная часть сети семенника мыши, сочленяющаяся непосредственно с выносящими канальцами, образуется из клеток, мигрировавших из целомического эпителия на ранних этапах - E10.5, еще до выселения предшественников клеток Сертоли [2]. Происхождение проксимальной части, соединяющейся с половыми тяжами, будущими извитыми семенными канальцами, изучено хуже. После стадии E13.5 среди клеток сети семенника появляется группа клеток, экспрессирующая различные маркеры поддерживающих клеток, такие как *Dhh*, *Amh*, *Dmrt1*. Эти данные указывают на потенциальный переход между популяцией сети семенника и клетками Сертоли, но требуются дополнительные исследования для определения направления этого перехода. В настоящем исследовании мы изучали процесс формирования сети семенника и ее взаимодействие с поддерживающей линией семенника в эмбриональный период развития, используя методы анализа транскриптомных данных единичных клеток.

Основная часть. С помощью методов анализа транскриптомных данных единичных клеток решены следующие задачи:

1. Определение клеточного состава сети семенника

Для анализа мы использовали данные РНК-секвенирования единичных клеток эмбриональных семенников мыши Mayère et al [3], на стадиях 12.5, 13.3 и 16.5 dpc. Кластеризацию проводили для каждой стадии отдельно. Кластеры, которые характеризовались повышенным уровнем экспрессии *Amh* мы предварительно определили как клетки Сертоли (КС). Те кластеры, для которых характерна повышенная экспрессия *Rax8* - клетки сети семенника (СС). В результате, мы получили 1809КС / 299СС, 2134КС / 198СС, 2346КС / 45СС на стадиях E12.5, E13.5 и E16.5 соответственно.

2. Анализ гетерогенности клеток сети семенника

Мы решили провести повторную кластеризацию КС и СС на всех исследуемых сроках, т.к. клетки внутри кластера, которые мы предварительно называли СС экспрессируют маркерный ген *Rax8* на разных уровнях на стадии E12.5. В результате, клетки из предварительных кластеров СС и КС разделились на 9 субкластеров E12.5, 9 субкластеров E13.5 и 7 субкластеров E16.5. Мы вновь провели анализ дифференциальной экспрессии генов. В итоге, на стадии E12.5 мы получили 7 кластеров КС (1807 клеток), популяцию клеток Сети

семенника СС (149 клетки) и кластер С5 (152 клетки). Этот кластер экспрессирует на слабом уровне известные из данных литературы маркеры: поддерживающей линии Wnt6 [4], недифференцированных соматических клеток Lhx9 [7] и сети семенника Wnt4 [3]. Также кластер С5 экспрессирует гены-маркеры сети семенника, которые мы выявили в ходе анализа дифференциальной экспрессии генов, например (Htra1, Mid1ip1, Prcd). На стадии E13.5 мы аннотировали 1 кластер клеток СС (162 клетки) и 8 кластеров КС (2170 клеток), на стадии E16.5 — 1 кластер клеток СС (42 клетки) и 6 кластеров КС (2349 клеток). Небольшие изменения в численности кластеров СС и КС на стадиях E13.5 и E16.5 и формирование нового кластера С5 на стадии E12.5 по всей видимости связаны с более точным анализом в условиях изолированного изучения избранных кластеров.

Детальный анализ транскриптомного профиля кластера КС—Lhx9 показал, что на всех исследуемых сроках развития в нем экспрессируются маркеры недифференцированных соматических клеток гонады (Lhx9, Arx, и тд.), при этом наблюдается экспрессия маркеров поддерживающей линии Amh, Dmrt1, Wnt6. Транскрипционный профиль кластера С5 схож с ранними поддерживающими гонадными клетками.

3. Исследование возможного перехода между клеточными линиями

Для полученных образцов мы рассчитали RNA velocity, чтобы смоделировать развитие сети семенника. Мы видим, что на стадиях E12.5 и E13.5 происходит переход КС—Lhx9 в клетки СС. На стадии E16.5 подобный переход не детектируется, что может быть связано с обособлением клеток сети семенника. Кластер С5 также демонстрирует возможность перехода в СС на стадии E12.5.

4. Оценка пролиферативной активности

Далее мы провели оценку пролиферативной активности клеток сети семенника и клеток Сертоли. В данных (Mayèreet al, 2022) [6] уже была проведена оценка стадий клеточного цикла каждой клетки, поэтому мы применили опубликованные данные для нашей кластеризации. В результате было установлено, что в популяции клеток сети семенника (СС) на E12.5 пролиферирует 2.6% клеток, E13.5 — 9.2%, E16.5 — 28.6%. При этом, в кластере С5 доля пролиферирующих клеток составила 32.6%, а среди всех клеток Сертоли — 38.2%, 37.6% и 56.4% на 12.5, 13.5 и 16.5 день эмбрионального развития соответственно. Примечательно, что уровень пролиферации клеток кластера КС—Lhx9 на 12.5 и 13.5 день эмбрионального развития выше, чем средний уровень для всех клеток Сертоли: 64.7%, 55.9% соответственно. На 16.5 день их пролиферация падает до уровня всех клеток Сертоли — 53.6%. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что клетки сети семенника не дают начало клеткам с промежуточным фенотипом из-за слабой пролиферативной активности.

Выводы. Таким образом, полученные нами данные RNA velocity вкупе с данными по пролиферации клеток поддерживающей линии и сети семенника свидетельствуют в пользу частичного происхождения клеток СС из эмбриональных КС.

Список использованных источников:

- 1) Karl J, Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium // Dev Biol. 1998. V. 203(2). P. 323-333.

- 2) Omotehara T, Wu X, Kuramasu M, Itoh M. Connection between seminiferous tubules and epididymal duct is originally induced before sex differentiation in a sex-independent manner // *Dev Dyn*. 2020. V. 249(6) P. 754-764.
- 3) Mayère C, Regard V, Perea-Gomez A, et al. Origin, specification and differentiation of a rare supporting-like lineage in the developing mouse gonad // *Sci Adv*. 2022. V. 8(21). Art. no. eabm0972.
- 4) Garcia-Alonso L, Lorenzi V, Mazzeo CI, et al. Single-cell roadmap of human gonadal development // *Nature*. 2022. V. 607(7919). P. 540-547.