



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Biologii

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

**Rola hormonu folikulotropowego i estrogenów
w kontroli sygnalizacji Notch w komórkach Sertoliego gryzoni**

Sylwia Lustofin

Rozprawa doktorska
wykonana pod opieką
dr hab. Anny Hejmej, prof. UJ
w Zakładzie Endokrynologii
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych

Kraków 2023

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania mojemu Promotorowi,
Pani dr hab. Annie Hejmej, prof. UJ
za każdą cenną uwagę i wskazówkę oraz nieocenioną pomoc w pisaniu niniejszej pracy,
a także za okazaną mi niezwykle życzliwość i wyrozumiałość
w trakcie wszystkich lat wyjątkowej współpracy,
co stanowiło dla mnie ogromne wsparcie i motywację do ciągłego rozwoju.*

*Dziękuję również mojemu Promotorowi Pomocniczemu,
Pani dr Alicji Kamińskiej,
za liczne porady merytoryczne, nieocenione wsparcie i troskliwość,
a także za poświęcony czas oraz pomoc w pracach doświadczalnych.*

*Dziękuję także Pani Prof. dr hab. Barbarze Bilińskiej
Za wsparcie merytoryczne, okazaną mi serdeczność i dobre słowo.*

*Dziękuję mgr Małgorzacie Brzoskwini i dr Laurze Pardyak
za serdeczną atmosferę, wszelką pomoc oraz wsparcie i motywację do działania.*

*Dziękuję wszystkim pracownikom i doktorantom Zakładu Endokrynologii
za ich życzliwość i przyjazną atmosferę.*

*Składam również serdeczne podziękowania Drogim Rodzicom
oraz Mężowi Krzysztofowi za nieustanną wiarę we mnie,
a także za wspieranie mnie, szczególnie w momentach zwątpienia.*

Niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach projektów badawczych:

1. „Regulacja komunikacji jukstakrynowej w nabłonku plemnikotwórczym gryzoni w okresie dojrzewania płciowego i dorosłości: rola środowiska hormonalnego” OPUS13; Narodowe Centrum Nauki; kierownik: dr hab. Anna Hejmej, prof. UJ (2017/25/B/NZ4/01037).
2. „Wpływ estrogenów oraz transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β) na sygnalizację Notch w komórkach Sertoliego *in vitro*”, Dofinansowanie działalności naukowej doktorantów na Wydziale Biologii UJ w roku 2020; kierownik projektu: mgr Sylwia Lustofin (N18/MNW/000022).

Część wyników badań zaprezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej została opublikowana w czasopismach naukowych indeksowanych w bazie Journal Citation Reports:

1. **Lustofin S**, Kamińska A, Pardyak L, Pawlicki P, Brzoskwinia M, Szpręgiel I, Bilińska B, Hejmej A. Follicle-stimulating hormone regulates Notch signalling in seminiferous epithelium of continuously and seasonally breeding rodents. *Reproduction, Fertility and Development* 2022, 34: 560–575.
(IF: 1,973; 140 punktów MEiN)
2. **Lustofin S**, Kamińska A, Brzoskwinia M, Cyran J, Kotula-Balak M, Bilińska B, Hejmej A. Nuclear and membrane receptors for sex steroids are involved in the regulation of Delta/Serrate/LAG-2 proteins in rodent Sertoli cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23: 2284.
(IF: 6,208; 140 punktów MEiN)

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	4
1. WSTĘP	9
1.1. Rola komórek Sertoliego w procesie spermatogenezy	10
1.2. Szlak sygnałowy Notch	13
1.3. Sygnalizacja FSH w komórkach Sertoliego	19
1.4. Rola FSH w nabłonku plemnikotwórczym	22
1.5. Sygnalizacja estrogenowa w gonadzie męskiej. Wewnątrzkomórkowe (jądrowe) i błonowe receptory estrogenowe	24
1.6. Rola estrogenów w regulacji funkcji gonady męskiej	30
2. HIPOTEZA I CELE PRACY	33
3. MATERIAŁ I METODY	35
3.1. Doświadczenia w układzie <i>in vivo</i>	35
3.1.1. Materiał doświadczalny	35
3.1.2. Przebieg doświadczeń	35
3.2. Doświadczenia w układzie <i>ex vivo</i>	37
3.2.1. Materiał doświadczalny	37
3.2.2. Przebieg doświadczeń	38
3.3. Doświadczenia w układzie <i>in vitro</i>	39
3.3.1. Materiał doświadczalny	39
3.3.1.1. Izolacja oraz hodowla pierwotnych szczurzych komórek Sertoliego (PRSC)	39
3.3.1.2. Hodowla komórek Sertoliego linii TM4	40
3.3.2. Przebieg doświadczeń	41
3.3.2.1. Ekspozycja komórek Sertoliego PRSC i TM4 na FSH, 17 β -estradiol oraz antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780; G15)	41
3.3.2.2. Wyciszanie ekspresji FSHR, ER α , ER β , GPER i HES1 w komórkach Sertoliego linii TM4 z wykorzystaniem mechanizmu interferencji zależnej od RNA (RNAi)	41
3.4. Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja i ilościowa analiza RT-PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)	43
3.5. Analiza western blot	45
3.6. Procedura histologiczna i analiza morfologiczna	47

3.7. Analiza immunohistochemiczna	48
3.8. Analiza immunofluorescencyjna	49
3.9. Testy immunoenzymatyczne	50
3.10. Pomiar aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J	51
3.10.1. Analiza aktywności czynnika RBP-J po ekspozycji na FSH, 17 β -estradiol oraz antagonistów receptorów jądrowych (ICI 182,780; G15)	51
3.10.2. Analiza aktywności czynnika RBP-J po wyciszeniu ekspresji FSHR, ER α , ER β i GPER	53
3.11. Immunoprecypitacja chromatyny	53
3.12. Analiza statystyczna	55
4. WYNIKI	56
4.1. Rola FSH w kontroli aktywności i ekspresji komponentów szlaku Notch w gonadzie męskiej gryzoni	56
4.1.1. Wpływ FSH na ekspresję komponentów szlaku Notch w jądrze szczura w okresie dojrzewania płciowego	56
4.1.2. Wpływ FSH na ekspresję komponentów szlaku Notch w jądrze nornicy rudej	61
4.1.3. Wpływ FSH oraz wyciszenia receptora FSH na ekspresję komponentów szlaku Notch w komórkach Sertoliego	66
4.1.4. Wpływ FSH oraz wyciszenia receptora FSH na aktywność czynnika transkrypcyjnego RBP-J w komórkach Sertoliego	76
4.1.5. Wpływ FSH na ekspresję <i>Numb</i> oraz wpływ wyciszenia <i>HES1</i> na ekspresję receptora Notch1 w komórkach Sertoliego	76
4.2. Rola sygnalizacji estrogenowej w kontroli aktywności i ekspresji komponentów szlaku Notch w gonadzie męskiej gryzoni	78
4.2.1. Wpływ stymulacji lub zablokowania sygnalizacji estrogenowej na ekspresję komponentów szlaku Notch w jądrach szczurów	78
4.2.2. Sygnalizacja estrogenowa a ekspresja ligandów szlaku Notch w komórkach Sertoliego	80
4.2.2.1. <i>Wpływ estradiolu oraz antagonistów receptorów estrogenowych na ekspresję DLL1, DLL4 i JAG1</i>	80
4.2.2.2. <i>Wpływ wyciszenia receptorów estrogenowych na ekspresję DLL1, DLL4 i JAG1.</i>	86
4.2.3. Sygnalizacja estrogenowa a ekspresja receptora Notch1 i genów efektorowych szlaku Notch w komórkach Sertoliego	91
4.2.3.1. <i>Wpływ estradiolu oraz antagonistów receptorów estrogenowych na ekspresję Notch1/NIICD, HES1 i HEY1</i>	91
4.2.3.2. <i>Wpływ wyciszenia receptorów estrogenowych na ekspresję Notch1/NIICD, HES1 i HEY1</i>	96

4.2.4. Wpływ sygnalizacji estrogenowej na aktywność czynnika transkrypcyjnego RBP-J w komórkach Sertoliego	99
4.2.5. Wpływ sygnalizacji estrogenowej na interakcję czynnika transkrypcyjnego RBP-J z promotorami genów efektorowych szlaku Notch w komórkach Sertoliego	101
5. DYSKUSJA	102
5.1. Rola sygnalizacji FSH w regulacji szlaku Notch w komórkach Sertoliego	102
5.2. Rola sygnalizacji estrogenowej w regulacji szlaku Notch w komórkach Sertoliego	110
6. WNIOSKI	118
7. STRESZCZENIE	119
SUMMARY	121
8. LITERATURA	123

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Skrót	Nazwa angielska	Nazwa polska
α ERKO	<i>estrogen receptor-α knockout</i>	myszy z nokautem genu kodującego receptor estrogenowy α
β ERKO	<i>estrogen receptor-β knockout</i>	myszy z nokautem genu kodującego receptor estrogenowy β
ABC	<i>avidin-biotynylated enzyme complex</i>	kompleks awidyna-biotynyłowany enzym
ABP	<i>androgen binding protein</i>	białko wiążące androgeny
<i>Actb</i>	<i>β-actin gene</i>	gen β -aktyny
ADAM17	<i>a disintegrin and metalloproteinase 17</i>	białko zawierające domenę dezintegryny i metaloproteiny 17
AF	<i>activation function</i>	region transaktywacyjny
AMH	<i>anti-Müllerian hormone</i>	hormon anty-Müllerowski
ANK	<i>ankyrin repeats</i>	powtórzenia ankirynowe
ANOVA	<i>one-way analysis of variance</i>	jednokierunkowa analiza wariancji
AP-1	<i>activator protein 1</i>	białko aktywatorowe 1
APES	<i>3-aminopropyltriethoxysilane</i>	3-aminopropylotrietoksyilan
APH-1	<i>anterior pharynx defective 1</i>	podjednostka γ -sekreazy APH-1
Ar/AR	<i>androgen receptor</i>	receptor androgenowy
ArKO	<i>aromatase knockout</i>	myszy z nokautem genu kodującego aromatazę
<i>B2m</i>	<i>β2-microglobulin gene</i>	gen β 2-mikroglobuliny
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>	motyw spirala-pętla-spirala
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	albumina surowicy bydłowej
cAMP	<i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i>	cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
cDNA	<i>complementary DNA</i>	komplementarny DNA
ChiP	<i>chromatin immunoprecipitation</i>	immunoprecypitacja chromatyny
CMV	<i>cytomegalovirus</i>	cytomegalowirus
CR	<i>cetorelix</i>	cetoreliks
CRD	<i>cysteine rich domain</i>	domena bogata w cysteinę
CRE	<i>cAMP response element</i>	element odpowiedzi na cAMP
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>	białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP
Ct	<i>cycle threshold</i>	cykl progowy
Cy3	<i>cyanine 3</i>	cyjanina 3

DAB	<i>3,3'-diaminobenzidine</i>	3,3'-diaminobenzodyna
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DBD	<i>DNA-binding domain</i>	domena wiążąca DNA
DD	<i>long day voles</i>	nornice hodowane w warunkach długiego dnia
<i>Dll/DLL</i>	<i>Delta-like ligand</i>	ligand Delta-like
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	podłoże Eagle'a zmodyfikowane
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>	podłoże Eagle'a zmodyfikowane/ podłoże odżywcze Hama F-12
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>	dimetylosulfotlenek
DBPS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>	bufor fosforanowy
DSL	<i>Delta/Serrate/Lag2</i>	białka zawierające domenę Delta/Serrate/Lag2
EDC	<i>extracellular domain</i>	domena zewnątrzkomórkowa
EDTA	<i>ethylene-diaminitetraacetate</i>	kwasy etylenodiaminotetraoctowy
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	nabłonkowy czynnik wzrostu
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu
EL	<i>extracellular loop</i>	pętla zewnątrzkomórkowa
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	test immunoenzymatyczny
<i>Esr1/ERα</i>	<i>estrogen receptor α</i>	receptor estrogenowy α
<i>Esr2/ERβ</i>	<i>estrogen receptor β</i>	receptor estrogenowy β
ERE	<i>estrogen response element</i>	element odpowiedzi na estrogeny
FGF	<i>fibroblast growth factors</i>	czynnik wzrostu fibroblastów
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i>	hormon folikulotropowy
<i>Fshr/FSHR</i>	<i>follicle-stimulating hormone receptor</i>	receptor hormonu folikulotropowego
<i>Gapdh</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene</i>	gen dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej
GDNF	<i>glial cell-line derived neurotrophic factor</i>	glejopochodny czynnik neurotroficzny
GDP	<i>guanosine-5'-diphosphate</i>	guanozyno-5'-difosforan
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	białko zielonej fluorescencji
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>	gonadoliberyna
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>	receptor sprzężony z białkiem G

<i>Gper/GPER/GPR30</i>	<i>G protein-coupled estrogen receptor</i>	receptor estrogenowy sprzężony z białkiem G
GTP	<i>guanosine-5'-triphosphate</i>	guanozyno-5'-trifosforan
HBSD	<i>hormone binding subdomain</i>	subdomena wiążąca hormon
<i>Hes/HES</i>	<i>hairy and enhancer of split</i>	czynniki transkrypcyjne Hes
<i>Hey/HEY</i>	<i>Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif</i>	czynniki transkrypcyjne Hey
HPG	<i>hypothalamic-pituitary-gonadal axis</i>	oś podwzgórze-przysadka-jądro
<i>Hprt1</i>	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 gene</i>	gen fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	peroksydaza chrzanowa
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>	białko szoku cieplnego 90
<i>hpg</i>	<i>hypogonadal mice</i>	myszy hypogonadalne
IDC	<i>intracellular domain</i>	domena wewnątrzkomórkowa
IL	<i>intracellular loop</i>	pętla wewnątrzkomórkowa
INHA	<i>inhibin α subunit</i>	podjednostka α inhibiny
<i>Jag/JAG</i>	<i>Jagged ligand</i>	ligand Jagged
KD	<i>short day voles</i>	nornice hodowane w warunkach krótkiego dnia
kDa	<i>kilodalton</i>	kilodalton
LBD	<i>ligand-binding domain</i>	domena wiążąca ligand
LH	<i>luteinizing hormone</i>	hormon luteinizujący
LNR	<i>Lin-12/Notch repeat</i>	domena zawierająca sekwencje Lin-12/Notch
MAML	<i>mastermind-like protein</i>	białko mastermind-like
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>	kinazy białkowe aktywowane mitogenami
MMP	<i>matrix metalloproteinases</i>	metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej
NIICD	<i>Notch1 intracellular domain</i>	wewnątrzkomórkowa domena receptora Notch1
NECD	<i>Notch extracellular domain</i>	zewnątrzkomórkowa domena receptora Notch
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells</i>	jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B
NGS	<i>normal goat serum</i>	surowica kozia

NICD	<i>Notch intracellular domain</i>	wewnątrzkomórkowa domena receptora Notch
NOER	<i>nuclear-only estrogen receptor α</i>	myszki z ekspresją ER α wyłącznie w jądrze komórkowym
NT	<i>negative control</i>	kontrola negatywna
NTD	<i>N-terminal domain</i>	domeną N-końcowa
<i>Numb/NUMB</i>	<i>Numb homolog</i>	gen/białko NUMB
PD	<i>postnatal day</i>	dzień po urodzeniu
PDZL	<i>PSD-95/Dlg/ZO-1 ligand</i>	domena PSD-95/Dlg/ZO-1
PEN-2	<i>presenilin enhancer 2</i>	podjednostka γ -sekreazy PEN-2
PEST	<i>peptide sequence rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S) and threonine (T)</i>	sekwencja peptydowa bogata w prolinę (P), kwas glutaminowy (E), serynę (S) i treoninę (T)
<i>Pgk1</i>	<i>phosphoglycerate kinase 1 gene</i>	gen kinazy fosfoglicerynianowej 1
PKA	<i>protein kinase A</i>	kinaza białkowa A
PRSC	<i>primary rat Sertoli cell</i>	szczurze komórki Sertoliego w hodowli pierwotnej
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i>	polifluorek winylidenu
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy
RAM	<i>RBPjk – associated molecule domain</i>	domena pośrednicząca w interakcjach z białkiem RBP-J
RBP-J	<i>recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region</i>	czynniki transkrypcyjny RBP-J
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>	bufor lizujący
RNAi	<i>RNA interference</i>	mechanizm interferencji zależny od RNA
<i>Rpl13a</i>	<i>ribosomal protein L13a gene</i>	gen kodujący białko rybosomalne L13a
RQ	<i>relative quantification</i>	względna ilość kopii genu
RT	<i>reverse transcription</i>	odwrotna transkrypcja
RT-qPCR	<i>reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction</i>	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją
SCF	<i>stem cell factor</i>	czynniki wzrostu komórek macierzystych
SD	<i>standard deviation</i>	odchylenie standardowe

SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	mały interferujący RNA
SP-1	<i>specificity protein 1</i>	białko specyficzności 1
Src	<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>	kinaza tyrozynowa Src
SSSD	<i>signal-specificity subdomain</i>	subdomena specyficzności sygnału
TAD	<i>transcriptional activation domain</i>	domena transaktywująca
TBS	<i>tris buffered saline</i>	bufor trisowy
TBST	<i>tris buffered saline/Tween20</i>	bufor trisowy wzbogacony o Tween20
TGF	<i>transforming growth factor</i>	transformujący czynnik wzrostu
TMB	<i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i>	3,3',5,5'-tetrametylobenzydina
TMD	<i>transmembrane domain</i>	domena transbłonowa
TSH	<i>thyroid stimulating hormone</i>	hormon tyreotropowy

1. WSTĘP

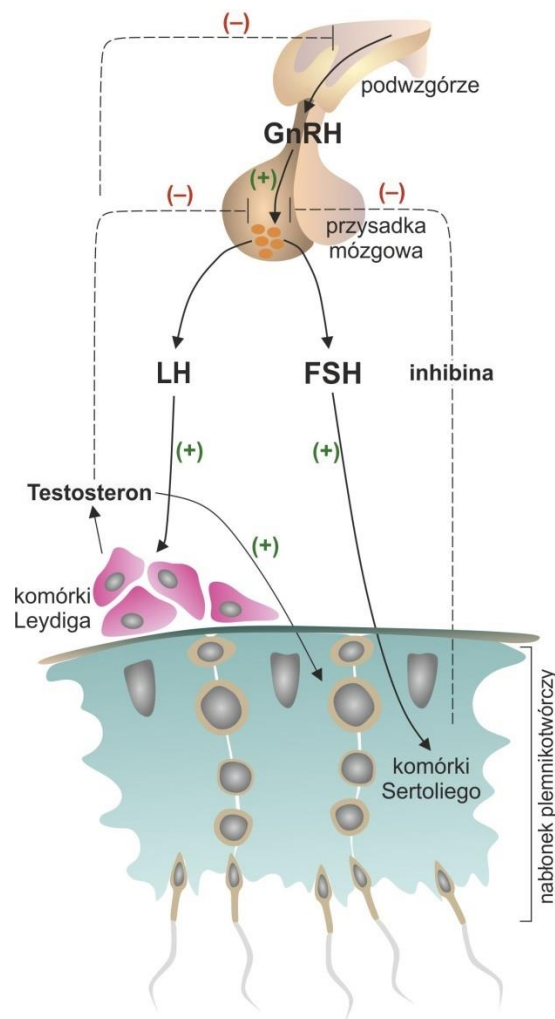
Spermatogeneza to złożony i wieloetapowy proces, zachodzący u samców ssaków w kanalikach plemnikotwórczych jąder. Wnętrze kanalików wyścielone jest przez wyspecjalizowany nabłonek plemnikotwórczy, składający się z dwóch populacji komórek: somatycznych komórek Sertoliego oraz dojrzewających komórek plemnikotwórczych, których kolejne populacje ułożone są warstwowo w nabłonku (Holstein i wsp. 2003). W procesie spermatogenezy niedojrzałe komórki rozrodcze przechodzą podziały i podlegają różnicowaniu. Możemy wyróżnić trzy główne etapy spermatogenezy: 1) spermatogoniogenezę, obejmującą podziały mitotyczne spermatogoniów i ich przekształcenie w spermatocyty I rzędu; 2) spermatocytogenezę, która obejmuje podziały mejotyczne spermatocytów, prowadząc do powstania haploidalnych spermatyd okrągłych; 3) spermioogenezę, w której dochodzi do transformacji spermatyd okrągłych w spermatydy wydłużone (Holstein i wsp. 2003, Jan i wsp. 2012). Następnie w procesie spermacji komórki te uwalniane są do światła kanalików jako plemniki.

Prawidłowy przebieg procesu spermatogenezy uwarunkowany jest współdziałaniem regulacji endokrynej oraz lokalnych mechanizmów (takich jak sygnalizacja parakrynowa i sygnalizacja zależna od kontaktu), w które zaangażowane są komórki Sertoliego.

Głównym systemem kontroli hormonalnej jest oś podwzgórze-przysadka-gonady (HPG, ang. *hypothalamic-pituitary-gonadal axis*) (**Rycina 1**). Neurony podwzgórza pulsacyjnie wydzielają gonadoliberynę (GnRH, ang. *gonadotropin-releasing hormone*) do krążenia wrotnego przysadki mózgowej. Neurohormon ten stymuluje komórki gonadotropowe zlokalizowane w przednim płacie przysadki mózgowej do produkcji i uwalniania dwóch gonadotropin: hormonu folikulotropowego (FSH, ang. *follicle-stimulating hormone*) oraz hormonu luteinizującego (LH, ang. *luteinizing hormone*) (McLachlan i wsp. 1996). Na poziomie gonady, FSH stymuluje proliferację komórek Sertoliego przed okresem dojrzewania, a także kontroluje aktywność tych komórek u dojrzałych osobników, w konsekwencji regulując przebieg spermatogenezy. Natomiast docelowym miejscem działania LH są komórki Leydiga tkanki interstycjalnej gonady, które w odpowiedzi na ten hormon syntetyzują androgeny niezbędne do różnicowania wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych podczas rozwoju płodowego, a w okresie dojrzewania i dojrzałości płciowej uczestniczące

w inicjacji i regulacji spermatogenezy oraz kontrolujące rozwój i utrzymanie drugo- i trzeciorzędowych cech płciowych męskich (Walker i Cheng 2005, Ramaswamy i Weinbauer 2014).

Aktywność osi HPG kontrolowana jest przez pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego. Produkowany przez komórki Sertoliego białkowy hormon – inhibina B, ogranicza wydzielanie FSH przez przysadkę mózgową, natomiast testosteron hamuje wydzielanie GnRH przez neurony podwzgórza oraz LH przez gonadotropy przysadki (Tilbrook i Clarke 2001).



Rycina 1. Schemat działania osi podwzgórze-przysadka-jądra u samców ssaków.

GnRH – gonadoliberyna, FSH – hormon folikulotropowy, LH – hormon luteinizujący; (+) działanie stymulujące, (-) działanie hamujące.

1.1 Rola komórek Sertoliego w procesie spermatogenezy

Komórki Sertoliego pełnią kluczową rolę w kontroli rozwoju komórek plemnikotwórczych w kanaliku nasiennym - zapewniają dojrzewającym komórkom

strukturalne i funkcjonalne wsparcie, aż do momentu ich uwolnienia z nabłonka w postaci plemników.

Różnicowanie komórek Sertoliego określa początkowy etap rozwoju jąder już w życiu płodowym. Komórki te wykazują ekspresję genu *Sry* zlokalizowanego na chromosomie Y, który determinuje płęć męską gonady. Komórki Sertoliego są też miejscem produkcji hormonu anty-Müllerowskiego (AMH, ang. *anti-Müllerian hormone*), który opowiada za hamowanie rozwoju żeńskich narządów płciowych (De Santa i wsp. 1998). Podczas rozwoju płodowego i postnatalnego jądra, komórki Sertoliego przechodzą fazy intensywnej proliferacji. Jej prawidłowy przebieg jest niezwykle istotny, gdyż wyznacza liczebność dorosłej populacji komórek Sertoliego, która z kolei determinuje wielkość dojrzałych jąder oraz liczbę produkowanych plemników (Orth i wsp. 1988). W miarę zbliżania się okresu dojrzewania, komórki Sertoliego wygaszają swoją aktywność proliferacyjną, wydłużają się i wytwarzają połączenia ściśle, formując barierę krew-jądro (Petersen i Soder 2006; França i wsp. 2016). Połączenia bariery ograniczają swobodny przepływ substancji, co umożliwia utrzymywanie specyficznego mikrośrodowiska kanalików plemnikotwórczych, w których zachodzi różnicowanie komórek rozrodczych (O'Donnell i wsp. 2022).

Dojrzałe komórki Sertoliego ssaków mają walcowaty, nieregularny kształt. Częścią przypadkową kontaktują się z błoną podstawną kanalika, a częścią apikalną sięgają aż do jego światła. Stosunkowo duże, asymetryczne jądro zlokalizowane jest w przypadkowej części komórki. Swoją funkcję w regulacji spermatogenezy komórki Sertoliego mogą pełnić dzięki złożonej, trójwymiarowej strukturze. Posiadają długie wypustki cytoplazmatyczne, które u szczurów otaczają i stanowią wsparcie dla 30-50 komórek plemnikotwórczych (Weber i wsp. 1983). To właśnie ten specyficzny związek między komórkami rozrodczymi a komórkami Sertoliego leży u podstaw cyklu nabłonka plemnikotwórczego. Każdy konkretny zespół komórek rozrodczych jest określany jako stadium cyklu nabłonka plemnikotwórczego, a cechy fenotypowe i funkcjonalne komórek Sertoliego zmieniają się w zależności od poszczególnych stadiów (Griswold 2018). Liczba stadiów cyklu nabłonka plemnikotwórczego jest gatunkowo specyficzna, np. u szczura wynosi 14, a u myszy 12 (Leblond i Clermont 1952; Abe i wsp. 1991).

Na funkcję wspierającą różnicowanie komórek plemnikotwórczych podczas spermatogenezy składają się liczne procesy, w których komórki Sertoliego pełnią centralną rolę. Komórki te w części przypadkowej tworzą barierę krew-jądro, dzięki

której kontrolują przepływ substancji do wnętrza kanalika plemnikotwórczego (Mruk i Cheng 2015). Z kolei w części przyśrodkowej kanalika, w miejscach kontaktu ze spermatydami biorą udział w tworzeniu apikalnych specjalizacji powierzchniowych i kompleksów cewkowo-buławkowatych, które wraz z barierą krew-jądro utrzymują polarność komórek Sertoliego, a także uczestniczą w spermiogenezie i spermiacji. Ten unikalny układ morfologiczny komórki pozwala na zachodzenie różnych procesów fizjologicznych w odpowiednich przedziałach komórkowych w uporządkowany sposób (Gao i wsp. 2016). Ważną funkcją komórek Sertoliego jest także utrzymanie środowiska immunologicznie uprzywilejowanego zarówno poprzez funkcję bariery krew-jądro, jak i poprzez produkcję licznych czynników immunoregulujących, które modułują procesy odpornościowe w gonadzie męskiej (Washburn i wsp. 2022).

Inną istotną rolę komórek Sertoliego jest metabolizm glukozy i dostarczanie pomejotycznym komórkom plemnikotwórczym substratów energetycznych, takich jak pirogroniany i mleczany (Rato i wsp 2012b). Biorą one również udział w transporcie mikroelementów do przedziału przyśrodkowego nabłonka plemnikotwórczego dzięki wytwarzaniu transferyny oraz ceruloplazminy (Tvrda i wsp. 2015). Komórki Sertoliego są zdolne do fagocytozy zarówno resztkowej cytoplazmy odrzucanej w procesie spermiogenezy przez spermatydy, jak i morfologicznie nieprawidłowych komórek plemnikotwórczych, które nie są zdolne do ukończenia różnicowania. Kontrolują także uwalnianie plemników z nabłonka do światła kanalika w procesie spermiacji (O'Donnell 2015). Plemniki są dalej transportowane w płynie kanalikowym, w którego produkcji również uczestniczą komórki Sertoliego (Rato i wsp. 2010).

Komórki Sertoliego pośredniczą w endokrynej kontroli spermatogenezy dzięki ekspresji receptorów dla wielu hormonów, m.in. FSH, prolaktyny, hormonów tarczycy, androgenów oraz estrogenów (Shah i wsp. 2021). Za podstawowe hormonalne czynniki warunkujące funkcje komórek Sertoliego uważa się FSH (**rozdział 1.3**) i testosteron – główny androgen produkowany w gonadzie męskiej.

Komórki Sertoliego są jedynymi komórkami w kanaliku plemnikotwórczym wykazującymi ekspresję receptora androgenowego (AR, ang. *androgen receptor*). Wykazano, że u myszy z selektywnym nokautem genu *Ar* w tych komórkach spermatogeneza ulega zahamowaniu podczas podziału mejotycznego (De Gendt i wsp. 2004). Testosteron jest także regulatorem połączeń pomiędzy komórkami Sertoliego oraz komórkami Sertoliego a komórkami plemnikotwórczymi, wspierając utrzymanie

bariery krew-jądro oraz przebieg spermiogenezy i spermiacji (Holdcraft i Braun 2004; Wang i wsp. 2006).

Należy również wspomnieć o istotnej roli komórek Sertoliego w parakrynej regulacji procesu spermatogenezy. Produkują one m. in. glejopochodny czynnik neurotroficzny (GDNF, ang. *glial cell-line derived neurotrophic factor*) czy czynnik wzrostu komórek macierzystych (SCF, ang. *stem cell factor*), które wpływają odpowiednio na utrzymanie puli spermatogonialnych komórek macierzystych oraz na ich różnicowanie. Dużą grupą związków syntetyzowanych przez komórki Sertoliego są czynniki wzrostu, m. in. transformujący czynnik wzrostu (TGF, ang. *transforming growth factor*) α i β oraz czynniki wzrostu fibroblastów (FGF, ang. *fibroblast growth factors*) zaangażowane w kontrolę proliferacji i różnicowania komórek plemnikotwórczych (Skinner 2005).

Poza hormonalną oraz parakrynową kontrolą spermatogenezy, komórki Sertoliego uczestniczą także w bezpośrednich oddziaływaniach pomiędzy komórkami w nabłonku plemnikotwórczym, które są niezbędne do prawidłowego różnicowania komórek rozrodczych (Mruk i Cheng 2004). Do zależnej od kontaktu komunikacji międzykomórkowej można zaliczyć połączenia szczelinowe, a także sygnalizację jukstakrynową (Fagotto i Gumbiner 1996).

1.2 Szlak sygnałowy Notch

Sygnalizacja jukstakrynowa zachodzi pomiędzy sąsiadującymi komórkami, które są ze sobą w fizycznym kontakcie poprzez interakcję liganda oraz białka receptorowego, zlokalizowanych w ich błonach komórkowych. Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów komunikacji jukstakrynowej jest szlak sygnałowy Notch, wysoce konserwatywny system komunikacyjny obecny u większości organizmów wielokomórkowych (Mattes i Scholpp 2018). Po raz pierwszy opisany u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) (Mohr 1919), szlak Notch został też później scharakteryzowany w komórkach ssaków. Odgrywa on kluczową rolę w regulacji procesów związanych w rozwojem, takich jak proliferacja, różnicowanie czy apoptoza, a także uczestniczy w utrzymaniu puli komórek macierzystych oraz zachowaniu homeostazy dojrzałego organizmu (Siebel i Lendahl 2017). Zaburzenia sygnalizacji Notch o podłożu genetycznym związane są z występowaniem zespołów wad wrodzonych, takich jak zespół Alagille'a lub zespół Hajdu-Cheney'a, co potwierdza

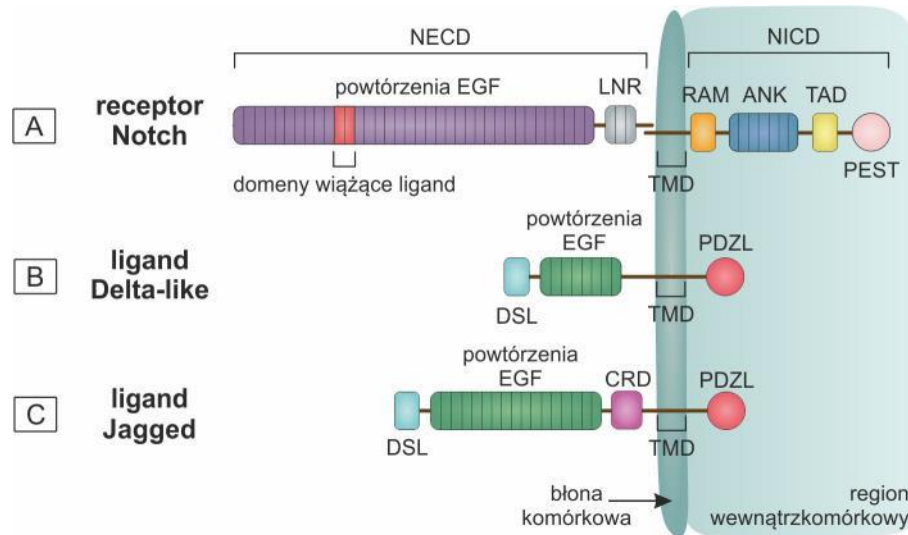
istotną rolę sygnalizacji Notch w różnicowaniu komórek od wczesnych etapów rozwoju organizmu (Mašek i Andersson 2017). Liczne badania wskazują również na istotny udział tego szlaku w procesach nowotworowych (Aster i wsp. 2017).

Komunikacja poprzez szlak sygnałowy Notch odbywa się dzięki interakcji ligandów obecnych w błonie komórki wysyłającej sygnał z receptorami Notch zlokalizowanymi na powierzchni komórki odbierającej sygnał. U ssaków w sygnalizacji uczestniczą cztery receptory Notch (Notch1-4) oraz pięć białkowych ligandów należących do rodziny białek DSL (ang. *Delta/Serrate/Lag2*): Delta-like1 (DLL1), Delta-like 3 (DLL3), Delta-like 4 (DLL4) oraz Jagged1 (JAG1) i Jagged2 (JAG2) (Bray 2016).

Receptory Notch to duże (około 300 kDa) transbłonowe białka o heterodimerskiej budowie, składające się z domeny zewnątrzkomórkowej (NECD, ang. *Notch extracellular domain*) oraz wewnątrzkomórkowej (NICD, ang. *Notch intracellular domain*) (**Rycina 2A**). Domena NECD zawiera od 29 do 36 powtórzeń motywów podobnych do nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*), wśród których powtórzenia 11-12 odpowiadają za wiązanie liganda; trzy bogate w cysteinę moduły (LNR, ang. *Lin-12/Notch repeat*), które zapobiegają niezależnej od liganda aktywacji receptora; oraz domeny heterodimerszacji. Natomiast w obrębie NICD można wyróżnić: domenę RAM (ang. *RBPjk – associated molecule domain*) oraz domenę zawierającą powtórzenia ankirynowe (ANK, ang. *ankyrin repeats*); obie uczestniczą w interakcji z białkiem RBP-J (ang. *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*) związanym z DNA komórki odbierającej sygnał. Kolejno znajduje się domena transaktywująca (TAD, ang. *transcriptional activation domain*) oraz domena PEST (ang. *proline (P), glutamid acid (E), serine (S), threonine(T)*), regulująca degradację białka Notch (Hori i wsp. 2013, Andersson i Lendahl 2014).

Ligandy Delta-like oraz Jagged to również transbłonowe białka, których zasadniczym elementem jest domena zewnątrzkomórkowa (**Rycina 2B, C**). Podobnie do receptorów Notch, większa część tej domeny składa się z kilku powtarzających się sekwencji podobnych do EGF. W jej obrębie występuje też motyw DSL, który wraz z domeną N-końcową i pierwszymi dwoma powtórzeniami EGF odpowiada za oddziaływanie liganda z receptorem. Ligandy z rodziny Jagged różnią się od ligandów Delta-like większą liczbą powtórzeń EGF oraz obecnością dodatkowej domeny bogatej w cysteinę (CRD, ang. *cysteine rich domain*), bezpośrednio poprzedzającej region

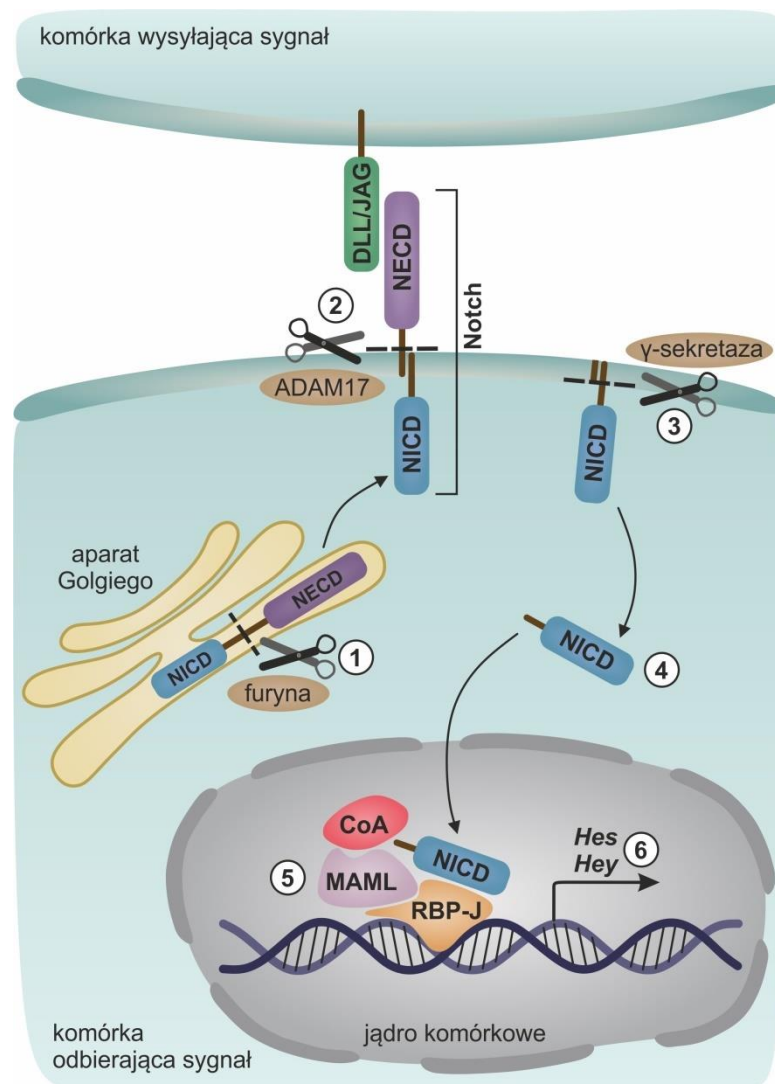
transbłonowy (TMD ang. *transmembrane domain*). Po stronie wewnątrzkomórkowej w niektórych ligandach (DLL1, DLL4 i JAG1) zidentyfikowano dodatkowo domenę PDZL (ang. *PSD-95/Dlg/ZO-1 ligand*), która odpowiedzialna jest za interakcje liganda z cytoszkieletem komórki (D'Souza i wsp. 2010).



Rycina 2. Budowa receptora Notch (A) oraz ligandów Delta-like (B) i Jagged (C) ssaków. ANK – powtórzenia ankirynowe, CRD – domena bogata z cysteinę, DSL – domena Delta/Serrate/LAG2, powtórzenia EGF – motywy o budowie podobnej do nabłonkowego czynnika wzrostu, LNR – sekwencje Lin-12/Notch, NECD – domena zewnątrzkomórkowa receptora Notch, NICD – domena wewnątrzkomórkowa receptora Notch, PEST – sekwencja peptydowa bogata w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę, PDZL – domena PSD-95/Dlg/ZO-1, RAM – domena asocjująca z białkiem RBP-J, TAD – domena transaktywująca, TMD – domena transbłonowa.

Transdukcja sygnału z udziałem kanonicznego szlaku Notch (**Rycina 3**) poprzedzona jest obróbką proteolityczną receptora Notch przez konwertazę białkową – furynę oraz glikozylacją w aparacie Golgiego (1), a następnie transportem receptora do błony komórkowej. Po związaniu z ligandem obecnym w błonie komórki wysyłającej sygnał, receptor podlega zmianom konformacyjnym, w wyniku których dochodzi do odsłonięcia miejsc cięć proteolitycznych. Domena NECD zostaje odcięta przez metaloproteinazę ADAM17 (ang. *a disintegrin and metalloproteinase 17*) (2), a następnie ulega endocytozie i degradacji w komórce wysyłającej sygnał. Drugie cięcie proteolityczne następuje przy udziale γ -sekreazy, czyli kompleksu enzymatycznego złożonego z preseniliny 1, nikastryny, białka PEN-2 (ang. *presenilin enhancer 2*) oraz białka APH-1 (ang. *anterior pharynx defective 1*). Zostaje wtedy uwolniona wewnątrzkomórkowa domena receptora Notch NICD (3), która jest transportowana do jądra komórkowego (4), gdzie wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym RBP-J (5). Tak

powstały kompleks jest rozpoznawany przez białko MAML (ang. *mastermind-like protein*) i przyłącza koaktywatory transkrypcji, regulując ekspresję genów docelowych szlaku Notch (6). Wśród genów efektorowych sygnalizacji Notch najlepiej scharakteryzowane są czynniki transkrypcyjne z motywem helisa-pętla-helisa (bHLH, ang. *basic helix-loop-helix*), należące do rodzin Hes (ang. *Hairy and enhancer of split*) i Hey (ang. *Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif*). Białka kodowane przez te geny działają głównie jako represory transkrypcji (Fischer i Gessler 2007, Bray 2016).



Rycina 3. Mechanizm aktywacji kanonicznej ścieżki sygnałowej Notch (opis w tekście).

ADAM17 – dezintegryna i metaloproteinaza 17, CoA – koaktywatory, DLL/JAG – ligand Delta-like lub Jagged, NECD – zewnątrzkomórkowa domena receptora Notch, NICD – wewnątrzkomórkowa domena receptora Notch, MAML – białko Mastermind-like, RBP-J – czynnik transkrypcyjny wiążący się z DNA, *Hes/Hey* - geny efektorowe szlaku Notch.

Opisany powyżej mechanizm sygnalizacji szlaku Notch dotyczy sytuacji, w której ligand aktywuje receptor zlokalizowany w błonie komórki sąsiedniej (ang. *trans-*

-*activation*). Jednak możliwe jest również oddziaływanie pomiędzy ligandem i receptorem, które zlokalizowane są na powierzchni tej samej komórki (Fleming 2020). Taka interakcja polega głównie na hamowaniu aktywacji receptorów (ang. *cis-inhibition*), ale jak wskazują ostatnie badania, może również prowadzić do aktywacji szlaku Notch (ang. *cis-activation*) w niektórych typach komórek (Nandagopal i wsp. 2019). Wykazano ponadto, że nie tylko związanie liganda z receptorem, ale także wzajemne oddziaływanie między dwoma receptorami Notch obecnymi w tej samej komórce może mieć działanie hamujące ich aktywność (James i wsp. 2014). Zarówno *trans*-, jak i *cis*-interakcje są bardzo wrażliwe na zmiany względnej ekspresji ligandów i receptorów, co pozwala na przełączanie pomiędzy wzajemnie wykluczającymi się stanami aktywności, stanowiąc istotny mechanizm regulujący homeostazę komórek (Sprinzak i wsp. 2010).

Pomimo stosunkowo podobnej budowy receptorów i ligandów szlaku Notch, sygnalizacja z udziałem poszczególnych białek może wywoływać różne, czasem nawet przeciwstawne efekty biologiczne. Wykazano na przykład, że aktywacja Notch1 ma przeciwny wpływ na wzrost embrionalnego nowotworu mózgu oraz nowotworu pęcherza moczowego niż aktywacja Notch2 (Fan i wsp. 2004, Hayashi i wsp. 2016). Dowiedziono również, że sygnalizacja z udziałem jednego typu receptora (Notch1) może indukować przeciwstawne odpowiedzi w tej samej komórce w zależności od poziomu aktywacji (Guentchev i McKay 2006). Podobne zjawiska dotyczą ligandów szlaku Notch. Stwierdzono, iż JAG1 i DLL4 wykazujące różne wzorce ekspresji w komórkach śródbłonna, odpowiednio, promują lub hamują formowanie naczyń krwionośnych (Benedito i wsp. 2009). Ostatnie badania wykazały również, że różne ligandy z rodziny Delta-like mimo znacznego podobieństwa sekwencji mają przeciwstawne działanie podczas różnicowania tkanki mięśniowej. Aktywacja szlaku Notch z udziałem DLL1 w komórkach grzebienia nerwowego indukuje miogenezę w sąsiadujących z nimi komórkach mezodermalnych, natomiast transdukcja sygnału z udziałem DLL4 hamuje ten proces (Nandagopal i wsp. 2018). Przyczyny tak zróżnicowanej odpowiedzi komórek wobec kanonicznej sygnalizacji Notch są wciąż słabo poznane. Sugeruje się, że może ona być spowodowana m. in. występowaniem różnic w powinowactwie ligandów do receptora (Andrawes i wsp. 2013), a także aktywacją różnych genów efektorowych w zależności od typu liganda (Petrovic i wsp. 2014).

W gonadzie męskiej samców gryzoni zidentyfikowano cztery receptory Notch (Notch 1-4) i pięć ligandów (DLL1, DLL3, DLL4, JAG1, JAG2) oraz geny efektorowe HES1, HES5, HEY1 i HEYL (Dirami i wsp. 2001; Mori i wsp. 2003; Murta i wsp. 2013; Garcia i wsp. 2014). Ekspresja komponentów szlaku Notch ulega dynamicznym zmianom w trakcie rozwoju oraz w cyklu nabłonka plemnikotwórczego u dojrzałych samców. W komórkach Sertoliego w okresie dojrzewania oraz u dojrzałych płciowo gryzoni stwierdzono obecność białek Notch1, DLL1, DLL4, JAG1, HES1, HES5 oraz HEY1, natomiast w komórkach plemnikotwórczych dodatkowo wykryto białka Notch2 oraz Notch3 (Murta i wsp. 2013; Kamińska i wsp. 2018; Kamińska i wsp. 2020b).

Na znaczenie sygnalizacji Notch w funkcjonowaniu gonady męskiej ssaków wskazywały już prowadzone ponad dwie dekady temu badania Hayashi i wsp. (2001), którzy zaobserwowali obniżenie ekspresji receptora Notch1 u pacjentów z azoospermią. W kolejnych latach wykazano, że zablokowanie szlaku sygnałowego Notch *in vivo* u dorosłych myszy skutkowało zaburzonym różnicowaniem oraz nieprawidłowościami morfologicznymi komórek plemnikotwórczych, ich zwiększoną apoptozą, a także defektami plemników najądrzowych (Murta i wsp. 2014).

Garcia i wsp. (2014) dowiedli, że krytyczne znaczenie dla przebiegu spermatogenezy ma prawidłowa aktywność szlaku Notch w komórkach Sertoliego. Stwierdzili bowiem u myszy z nokautem genu *Rbp-j* w komórkach Sertoliego znaczące zwiększenie liczby przedmeiotycznych i pomeiotycznych komórek germinalnych, co prowadziło do niewydolności i atrofii gonad. Konstytutywna aktywność Notch1 w komórkach Sertoliego przyczyniła się natomiast do przedwczesnego różnicowania gonocytów, a w konsekwencji ich apoptozy i prawie całkowitej utraty komórek plemnikotwórczych tuż po urodzeniu (Garcia i wsp. 2013). Ostatnie badania Kamińskiej i wsp. (2020c) wskazują również na udział szlaku Notch w regulacji ekspresji receptorów androgenowych oraz białek tworzących barierę krew-jądro, kładyn, w mysich komórkach Sertoliego.

Znaczenie szlaku Notch w komórkach linii płciowej jest dotąd poznane tylko w niewielkim stopniu. Chociaż specyficzny dla komórek linii płciowej nokaut receptora Notch1 nie miał negatywnego wpływu na przebieg spermatogenezy i płodność, to nadmierna aktywacja tego receptora w komórkach plemnikotwórczych powodowała wzmożoną apoptozę spermatogoniów, co wiązało się z obniżeniem masy jąder oraz postępującym z wiekiem spadkiem liczby plemników (Huang i wsp. 2013).

1.3. Sygnalizacja FSH w komórkach Sertoliego

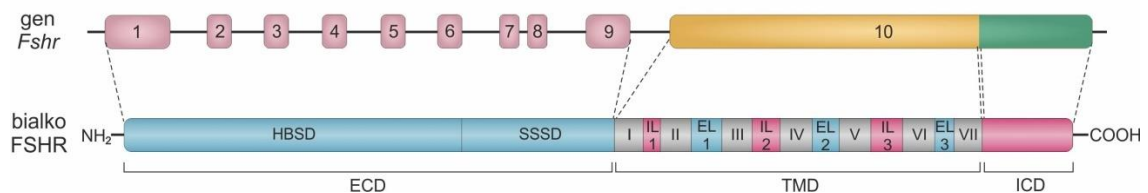
Hormon folikulotropowy produkowany i wydzielany do krwi przez komórki gonadotropowe przedniej części przysadki mózgowej, jest jednym z głównych regulatorów gonady męskiej ssaków, kontrolującym rozwój jąder w okresie okołodojrzewaniowym, a także regulującym utrzymanie funkcji plemnikotwórczej w życiu dorosłym. FSH wykazuje strukturalne podobieństwo do innych hormonów glikoproteinowych wydzielanych przez przysadkę i łożysko, takich jak hormon luteinizujący (LH), hormon tyreotropowy (TSH, ang. *thyroid stimulating hormone*) i gonadotropina kosmówkowa. W budowie FSH możemy wyróżnić dwie odrębne podjednostki α i β . Podjednostka α kodowana jest przez pojedynczy gen *Cga*, wspólny dla wszystkich wyżej wymienionych hormonów glikoproteinowych, kodujący 92-aminokwasowe białko. Podjednostka β kodowana przez gen *Fshb* i składająca się z 110 aminokwasów, połączona jest niekowalencyjnie z podjednostką α i warunkuje specyficzność hormonu (Ascoli i Narayan 2014).

Działanie tego hormonu zachodzi poprzez związanie z błonowym receptorem FSH (FSHR, ang. *follicle-stimulating hormone receptor*), który w gonadzie męskiej ssaków ulega ekspresji wyłącznie w komórkach Sertoliego. Receptor ten należy do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR, ang. *G protein-coupled receptor*) klasy A, tzw. receptorów rodopsyno-podobnych. U szczura gen *Fshr* zlokalizowany jest na chromosomie 6. i składa się z 10 eksonów, zawierających około 80 tysięcy par zasad (kb) DNA (Huhtaniemi i wsp. 1992; George i wsp. 2011). Gen *Fshr* koduje białko o masie około 75 kilodaltonów (kDa), którego dojrzała forma zbudowana z około 695 aminokwasów (Sprengel i wsp. 1990). Dokładna masa cząsteczkowa oraz liczba aminokwasów może się różnić ze względu na występowanie izoform tego receptora (Dias i wsp. 2002, Siegel i wsp. 2013). Białko FSHR tworzą trzy strukturalnie odrębne domeny: domena zewnątrzkomórkowa (ECD, ang. *extracellular domain*), domena transbłonowa (TMD) i domena wewnątrzkomórkowa (ICD, ang. *intracellular domain*) (**Rycina 4**). Eksony 1 – 9 kodują większość ECD, podczas gdy ekson 10 koduje pozostałą część białka, czyli TMD i ICD. Homologia w budowie FSHR pomiędzy różnymi gatunkami ssaków jest wysoka i sięga około 90% dla TMD. Chociaż podobieństwo międzygatunkowe dla ECD wynosi 85%, to właśnie w tej części można zidentyfikować najbardziej zmienny region (Simoni i wsp. 1997).

Domena EDC podzielona jest na dwa regiony: większą subdomenę wiążącą hormon (HBSD, ang. *hormone binding subdomain*) oraz mniejszą subdomenę specyficzności sygnału (SSSD, ang. *signal-specificity subdomain*), która jest również nazywana regionem zawiasowym. Region HBSD zawiera 10 powtórzeń bogatych w leucynę zapewniających hydrofilowy charakter, który jest niezbędny do wiązania FSH. Region SSSD odgrywa z kolei kluczową rolę w aktywacji receptora. Ta subdomena zawiera pętlę o strukturze spinki do włosów, której zadaniem jest utrzymanie TMD w stanie nieaktywnym (Jiang i wsp. 2012; Tetsuka i wsp. 2018).

Struktura heptahelikalna (inaczej nazywa również serpentynową) domeny TMD jest typowa dla wszystkich receptorów GPCR. Charakteryzuje się występowaniem 7 hydrofobowych odcinków o długości 20-25 aminokwasów, które tworzą transbłonowe α -helisy, połączone naprzemiennymi pętlami zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowymi. Wykazano, że pętle te pełnią istotną rolę w funkcjonowaniu receptora, a mianowicie biorą udział w wiązaniu FSH oraz transdukcji sygnału. Dodatkowo pętle zewnątrzkomórkowe aktywują receptor oraz uczestniczą w transporcie receptora do błony komórkowej (Costagliola i wsp. 2005; Banerjee i Mahale 2015).

Domena ICD jest bogata w seryny i treoniny, które są miejscami fosforylacji i wraz z pętlami wewnątrzkomórkowymi uczestniczy w oddziaływaniu z białkami G i innymi cząsteczkami zaangażowanymi w transdukcję sygnału (Ulloa-Aguirre i wsp. 2007, Jiang i wsp. 2012).

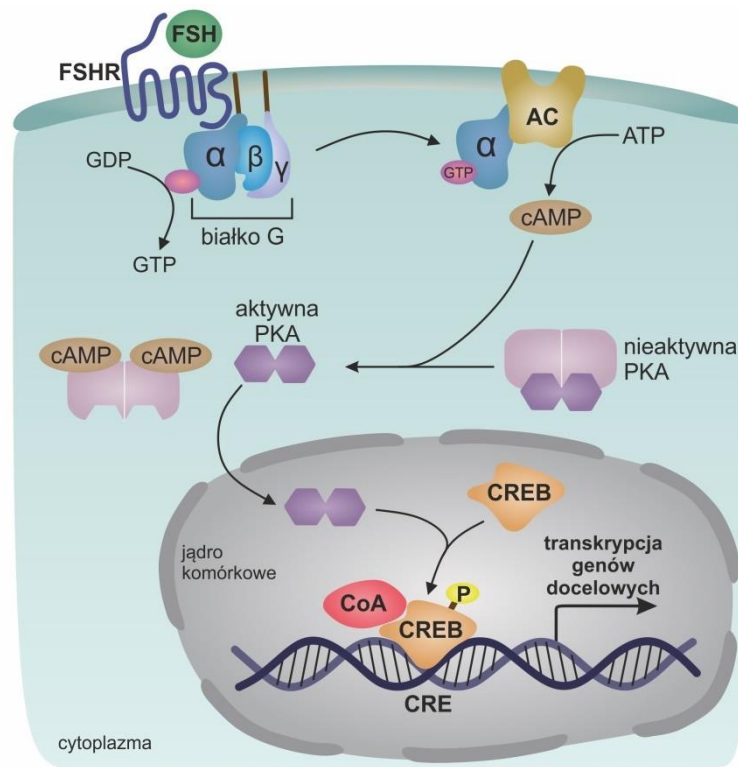


Rycina 4. Schemat budowy genu i białka receptora FSH (wg Tetsuka i wsp. 2018).

EL – pętla zewnątrzkomórkowa, ECD – domena zewnątrzkomórkowa, HBSD – subdomena wiążąca ligand, IDC – domena wewnątrzkomórkowa, IL – pętla wewnątrzkomórkowa, SSSD – subdomena aktywacji receptora, TMD – domena transbłonowa.

Pod nieobecność liganda FSHR znajduje się w nieaktywnej konformacji utrzymywanej dzięki rejonowi SSSD domeny zewnątrzkomórkowej. Interakcja FSH z domeną zewnątrzkomórkową (ECD) skutkuje zmianą konformacji domeny transbłonowej (TMD) oraz odsłonięciem miejsc wiążących białka G w obrębie pętli wewnątrzkomórkowych (Jiang i wsp. 2012). Heterotrimeryczne białka G złożone są z 3 podjednostek i w formie nieaktywnej podjednostka $G\alpha$ zawiera związaną cząsteczkę

GDP (guanozyno-5'-difosforan) (**Rycina 5**). Po zmianie konformacji receptora następuje przyłączenie oraz aktywacja białka G poprzez wymianę GDP na GTP (guanozyno-5'-trifosforan). Pozwala to na oddysocjowanie z kompleksu podjednostki $G\alpha$, która z kolei moduluje aktywność cyklazy adenylanowej, stymulując syntezę cyklicznego AMP (cAMP, ang. *3',5'-cyclic adenosine monophosphate*). Odpowiedź komórki w postaci wzrastającego stężenia cAMP powoduje aktywację kinazy białkowej A (PKA, ang. *protein kinase A*), która bierze udział w fosforylacji białka wiążącego z elementem odpowiedzi na cAMP (CREB, ang. *cAMP response element binding protein*). Aktywowany czynnik transkrypcyjny CREB uczestniczy w indukcji transkrypcji docelowych genów (Simoni i wsp. 1997).



Rycina 5. Główny mechanizm działania FSH w komórce Sertoliego.

AC – cyklaza adenylanowa, ATP – adenozy-no-5'-trifosforan, cAMP – cykliczny adenozy-no-3',5'-monofosforan, CoA – koaktywator, CRE – element odpowiedzi na cAMP, CREB – białko wiążącego element odpowiedzi na cAMP, FSH – hormon folikulotropowy, FSHR – receptor FSH, GDP – guanozyno-5'-difosforan, GTP - guanozyno-5'-trifosforan, PKA – kinaza białkowa A.

Chociaż ścieżka sygnalizacyjna z udziałem PKA jest najwcześniej opisanym mechanizmem działania FSH i jest zaangażowana w kluczowe procesy, takie jak różnicowanie komórek Sertoliego oraz produkcja wielu czynników parakrynowych kontrolujących przebieg spermatogenezy, to ostatnie badania wykazują, że sygnalizacja

FSHR jest bardziej złożona (Wang i wsp. 2022). Stwierdzono, że w komórkach Sertoliego FSH może aktywować również kaskady sygnałowe z udziałem m. in. kinazy 3-fosfoinozytydowej, fosfolipazy A2 czy kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinases*) (Jannini i wsp. 1994; Crépieux i wsp. 2001; Meroni i wsp. 2002). Odpowiada to za plejotropowe działanie FSH w komórkach zależne też od ich stopnia zróżnicowania (Shah i wsp. 2021).

W komórkach Sertoliego ssaków FSHR obecny jest już na wczesnych etapach rozwoju. Wykazano, że jego ekspresja w jądrze gryzoni rozpoczyna się w połowie okresu płodowego, zanim stężenie FSH we krwi osiągnie znaczące wartości. Następnie ekspresja FSHR rośnie aż do narodzin (Warren i wsp. 1984). Liczba receptorów przypadających na komórkę Sertoliego u szczura jest względnie stała od 2. do 21. dnia po urodzeniu, a następnie wzrasta stopniowo aż do dorosłości (Bortolussi i wsp. 1990). Stężenie FSH w osoczu szczurów wzrasta pod koniec rozwoju płodowego i utrzymuje się na wysokim poziomie do 5. dnia po urodzeniu. Kolejny wzrost poziomu FSH można zaobserwować w okresie dojrzewania, który rozpoczyna się 21. dnia, a najwyższe stężenia utrzymują się w okresie pomiędzy 25. a 45. dniem, co koreluje z czasem inicjacji spermatogenezy (Lee i wsp. 1975; Walker i Cheng 2005). U dorosłych gryzoni stężenie FSH jest względnie stałe, jednak wykazano, że ekspresja receptora FSH zmienia się w cykliczny sposób i zależy od stadium cyklu nabłonka plemnikotwórczego. U szczurów poziom mRNA *Fshr* oraz poziom wiązania FSH osiągają szczyt w stadiach XIII-II podczas wczesnego rozwoju komórek rozrodczych, natomiast najniższe poziomy można zaobserwować w stadiach VII-VIII, kiedy komórki plemnikotwórcze są na późniejszych etapach różnicowania (Heckert i Griswold 1991, Rannikko i wsp. 1996). Stężenie cAMP w odpowiedzi na działanie FSH w komórkach Sertoliego ściśle odpowiada poziomowi ekspresji FSHR, z najwyższym stężeniem cAMP obserwowanym w stadiach XIV-VI (Kangasniemi i wsp. 1990).

1.4. Rola FSH w nabłonku plemnikotwórczym

Sygnalizacja z udziałem FSH w komórkach Sertoliego jest kluczowa dla przebiegu spermatogenezy. Niezwykle istotną rolę FSH odgrywa już przed dojrzewaniem płciowym, kiedy kontroluje proliferację komórek Sertoliego. Stwierdzono, że stężenie tego hormonu w osoczu silnie koreluje z liczbą komórek Sertoliego i wielkością jąder w wieku dorosłym (Oduwole i wsp. 2018). Wykazano również, że nokaut genów

kodujących FSHR lub podjednostkę FSH β u myszy skutkowało znaczącym obniżeniem liczby komórek Sertoliego, co prowadziło do spadku liczby komórek plemnikotwórczych (Wreford i wsp. 2001; Abel i wsp. 2008). W okresie dojrzewania płciowego po ustaniu proliferacji komórek Sertoliego, FSH ogranicza apoptozę komórek plemnikotwórczych i wspiera ich przeżywalność podczas pierwszej fali spermatogenezy (Meachem i wsp. 2005a; Ruwanpura i wsp. 2008).

U dorosłych samców gryzoni FSH odpowiada za utrzymanie prawidłowej ilościowo spermatogenezy. U dojrzałych szczurów osłabienie działania FSH poprzez immunoneutralizację tego hormonu skutkowało spadkiem liczby komórek rozrodczych (Meachem i wsp. 1999). Z kolei doświadczenia z wykorzystaniem dojrzałych myszy hypogonadalnych (*hpg*) z nokautem genu *Ar*, które następnie otrzymywały substytucję FSH, wykazały, że hormon ten działa stymulująco na spermatogenezę poprzez zwiększenie liczby spermatogoniów i spermatocytów, natomiast nie ma wpływu na ukończenie podziału mejotycznego (O'Shaughnessy i wsp. 2010).

FSH reguluje spermatogenezę, wpływając na wydzielanie przez komórki Sertoliego licznych czynników parakrynowych, m. in. GDNF, SCF czy FGF2 (Mullaney i Skinner 1992; Rossi i wsp. 2000; Tadokoro i wsp. 2002). Istotną rolą FSH jest również stymulacja wydzielania białka wiążącego androgeny (ABP, ang. *androgen binding protein*), odpowiedzialnego za utrzymanie wysokiego stężenia testosteronu w kanalikach nasiennych oraz biorącego udział w transporcie tego hormonu do najądra (Hansson i wsp. 1976). Najnowsze badania sugerują, że zwiększona ekspresja wyżej wymienionych czynników może być wynikiem hamującego wpływu FSH na autofagię oraz biogenezę lizosomalną w komórkach Sertoliego (Xi i wsp. 2022). Wykazano także, że hormon ten uczestniczy w organizacji kompleksów połączeń pomiędzy komórkami Sertoliego, a także połączeń między komórkami Sertoliego i komórkami plemnikotwórczymi tzw. specjalizacji powierzchniowych (Sluka i wsp. 2006). Sygnalizacja FSH zapewnia ponadto prawidłowy metabolizm komórek Sertoliego m. in. regulując produkcję mleczanów – substratów energetycznych dla rozwijających się komórek plemnikotwórczych (Regueria i wsp. 2015). Badania z wykorzystaniem myszy z nokautem *Fshr* dowodzą również możliwej roli tego hormonu w utrzymaniu równowagi wodnej w komórkach Sertoliego (Grover i wsp. 2004; Soffientini i wsp. 2017).

Liczne badania wskazują również, że FSH wpływa na aktywność hormonalną komórek Sertoliego podczas rozwoju gonad, m.in. ograniczając wydzielanie AMH

w okresie neonatalnym (Kuroda i wsp. 1990) czy regulując ekspresję aromatazy i produkcję estrogenów przez te komórki przed dojrzewaniem płciowym (Bouraïma-Lelong i wsp. 2010). Wpływając na ekspresję podjednostki α inhibiny (INHA, ang. *inhibin α subunit*), FSH reguluje także produkcję inhibiny B w dojrzewających i dojrzałych komórkach Sertoliego (Lampa i wsp. 1999; Loveland i Hedger 2015; Andreone i wsp. 2017).

1.5. Sygnalizacja estrogenowa w gonadzie męskiej. Wewnątrzkomórkowe (jądrowe) i błonowe receptory estrogenowe

Do hormonalnych czynników regulujących funkcjonowanie gonady męskiej i przebieg spermatogenezy należą również estrogeny, zaliczane do rodziny hormonów steroidowych. Estrogeny są syntetyzowane z androgenów, a przemiana ta jest katalizowana przez aromatazę cytochromu P450. Dominującym i najbardziej aktywnym naturalnym estrogenem u ssaków jest 17β -estradiol. U samców tkanka tłuszczowa jest uważana za główne źródło krążących estrogenów, ale hormony te wytwarzane są też w mózgu, nadnerczach, trzustce, tkance kostnej oraz w jądrach (Barakat i wsp. 2016). Stężenie estradiolu w gonadzie oraz w płynie nasiennym istotnie przewyższa stężenie w osoczu samców różnych gatunków ssaków, co wynika ze znacznej, lokalnej produkcji estrogenów (Hess 2000). Przez długi czas za główne źródło estrogenów w jądrze uznawane były komórki Leydiga, jednak obecność aromatazy została potwierdzona również w komórkach kanalik plemnikotwórczego (Levallet i wsp. 1998). Ekspresja aromatazy w komórkach Sertoliego szczurów wzrasta pomiędzy 20. i 30. dniem po urodzeniu, a spada u dorosłych osobników. Dlatego komórki Sertoliego wydają się być znaczącym źródłem estrogenów we wczesnych etapach rozwoju, natomiast u dojrzałych gryzoni dominującym źródłem tych hormonów są komórki Leydiga oraz komórki plemnikotwórcze (Carreau i Hess 2010; Bois i wsp. 2010).

Estradiol działa na komórki gonady poprzez wiązanie z receptorem estrogenowym α (ER α , ang. *estrogen receptor α*) oraz receptorem estrogenowym β (ER β , ang. *estrogen receptor β*). Receptory te należą do rodziny receptorów wewnątrzkomórkowych i są białkami o charakterze czynników transkrypcyjnych. U szczura gen *Esr1* zlokalizowany jest na chromosomie 1. i koduje białko ER α składające się z 595 aminokwasów, natomiast białko ER β o długości 485 aminokwasów kodowane jest przez gen *Esr2* znajdujące się na chromosomie 6. (Wang i wsp. 1999; Bois i wsp. 2010). Obydwa geny składają się z 8 eksonów, które kodują 5 odrębnych funkcjonalnie domen: domena A/B

kodowana jest przez ekson 1, domena C w przeważającej części przez eksony 2-3, domena D przez część eksonu 4 i eksony 5 – 8, a domena F przez ekson 8 (Gibson i Saunders 2012; Yaşar i wsp. 2016) (**Rycina 6A, B**).

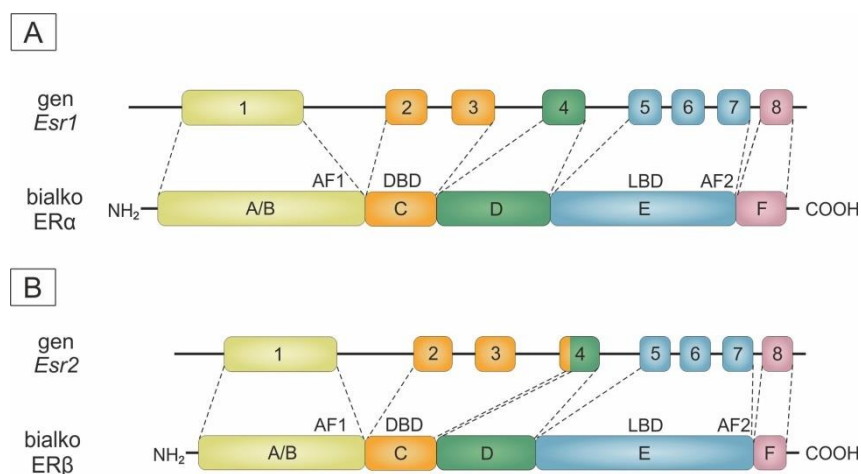
Domena A inaczej nazywana również domeną N-końcową (NTD; ang. *N-terminal domain*), jest największą domeną i zawiera region transaktywacyjny (AF-1, ang. *activation function 1*), który uczestniczy w interakcji z koregulatorami transkrypcji. Zawiera szereg miejsc fosforylacji, które są ważne dla aktywności receptora (Kumar i wsp. 2011). Jest najbardziej zmienna w obrębie receptorów wewnątrzkomórkowych i posiada tylko 17% homologii pomiędzy receptorami estrogenowymi ze względu na wyraźnie większą długość tej domeny w przypadku receptora ER α (Yaşar i wsp. 2016).

Domena C (DBD, ang. *DNA-binding domain*) zawiera sekwencję wiążącą DNA i jest najbardziej konserwatywna ze wszystkich regionów. Posiada dwie struktury przestrzenne określane jako palce cynkowe, powstałe poprzez wiązanie kationu cynku z czterema resztami cysteiny. Aminokwasy u podstawy pierwszego palca cynkowego są kluczowe dla rozpoznawania specyficznej sekwencji DNA warunkującej odpowiedź na estrogeny (ERE, ang. *estrogen response element*). Natomiast aminokwasy u podstawy drugiego palca cynkowego są odpowiedzialne za dimeryzację receptora (Hewitt i Korach 2018).

Domena D stanowi region zawiasowy i posiada sygnał lokalizacji jądrowej, który po przyłączeniu estradiolu zostaje odsłonięty i umożliwia kompleksom ligand-receptor przemieszczenie się do jądra komórkowego. Podobnie jak domena A/B odznacza się wysoką zmiennością sekwencji oraz możliwością zmiany położenia regionu DBD względem pozostałych domen (Kumar i wsp. 2011).

Domena E (LBD, ang. *ligand-binding domain*) w swojej strukturze posiada region odpowiedzialny za przyłączenie liganda. Zbudowany jest z 12 α -helis, które tworzą trójwarstwową strukturę okrywającą miejsce wiązania. Na jej końcu znajduje się drugi region transaktywacyjny (AF-2), który współdziała z domeną A/B w zależnej od liganda aktywacji transkrypcji i uczestniczy w interakcji z koaktywatorami (Yaşar i wsp. 2016).

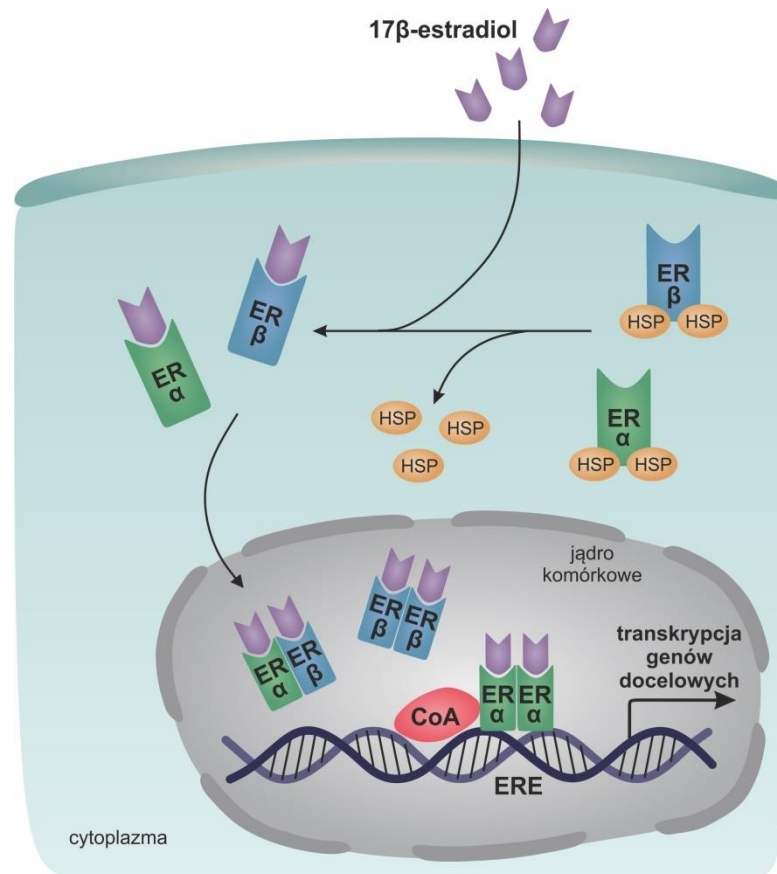
Domena F jest regionem unikalnym dla ER i niewystępującym w innych receptorach wewnątrzkomórkowych. Domena ta bierze udział w selektywnej modulacji aktywności transkrypcyjnej receptora oraz w interakcjach z innymi białkami, ale także w dimeryzacji receptora (Yang i wsp. 2008, Kumar i wsp. 2011).



Rycina 6. Budowa genu *Esr1* i białka ER α (A) oraz genu *Esr2* i białka ER β (B).

AF – region transaktywacyjny, DBD – domena wiążąca DNA, ER α – receptor estrogenowy α , ER β – receptor estrogenowy β , LBD – domena wiążąca ligand.

Pod nieobecność liganda, receptory estrogenowe tworzą w cytoplazmie kompleksy z białkami opiekuńczymi takimi jak białka szoku cieplnego (HSP90, ang. *heat shock proteins 90*) (Inano i wsp. 1994) (**Rycina 7**). Po związaniu estradiolu następuje oddysocjowanie białka opiekuńczego z kompleksu, a receptor ulega zmianom konformacyjnym, które umożliwiają odsłonięcie sygnału lokalizacji jądrowej oraz dimeryzację. Po translokacji do jądra komórkowego kompleksy hormon-receptor w postaci homo- lub heterodimerów wiążą się z sekwencjami ERE w regionach promotorowych genów docelowych i regulują transkrypcję genów zależnych od estrogenów (O'Donnell i wsp. 2001, Sever i Glass 2013). Estrogeny mogą również regulować transkrypcję genów w alternatywnych elementach odpowiedzi poprzez interakcję z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, z pominięciem bezpośredniego wiązania się z DNA. Przykładami takiej niezależnej od ERE sygnalizacji jest wiązanie się z kompleksem czynników transkrypcyjnych AP-1 (ang. *activator protein 1*) lub SP-1 (ang. *specificity protein 1*) (Safe i Kim 2008).



Rycina 7. Klasyczny mechanizm sygnalizacji estrogenowej z udziałem receptorów jądrowych.

CoA – koaktywatory transkrypcji, ER α – receptor estrogenowy α , ER β – receptor estrogenowy β , ERE – element odpowiedzi na estrogeny, HSP – białko szoku cieplnego.

Badania ostatnich lat wskazują, że estrogeny działają nie tylko poprzez klasyczną ścieżkę genomową, związaną z bezpośrednią regulacją ekspresji genów, ale mogą również wywoływać szybkie efekty niegenomowe. W mechanizmach niegenomowych mogą pośredniczyć ER α oraz ER β zakotwiczone w błonie komórkowej, ale mogą one także obejmować aktywację innych, błonowych receptorów (Carreau i Hess 2010). Działania niegenomowe związane są zwykle z aktywacją kaskad kinaz białkowych, co może wywoływać zmiany aktywności i funkcji różnych białek, ale poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych działania te ostatecznie mogą prowadzić także do zmian w ekspresji genów. Wiązanie estrogenów z ER zlokalizowanymi przy powierzchni komórki może powodować, m. in. mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia, stymulację aktywności cyklazy adenylanowej i produkcji cAMP czy aktywację szlaku sygnałowego MAPK (Björnström i Sjöberg 2005). Szybką odpowiedź komórkową z udziałem ER związanych z błoną komórkową obserwowano również w gonadzie męskiej. Wykazano na przykład, że estradiol aktywuje ścieżkę sygnalizacyjną

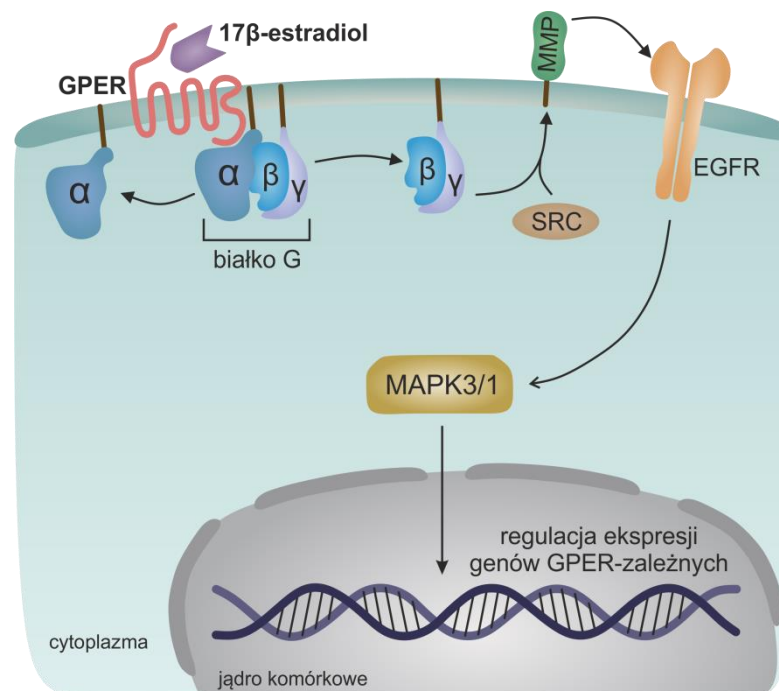
MAPK3/1 w mysich niedojrzałych komórkach Sertoliego, stymulując ich proliferację (Lucas i wsp. 2008).

W gonadzie męskiej ssaków obecność wewnątrzkomórkowych receptorów estrogenowych wykryto zarówno w kanaliku plemnikotwórczym, jak i w tkance interstycjalnej w komórkach Leydiga. U dorosłych szczurów wykazano wyższą ekspresję mRNA *Esr1* w stadiach VII-XIV cyklu nabłonka plemnikotwórczego niż w pozostałych stadiach. Ekspresja zarówno *Esr1*, jak i *Esr2* była wyższa w spermatydach okrągłych niż w spermatocytach, co wskazuje na rolę estrogenów w późniejszych etapach różnicowania komórek plemnikotwórczych (Bois i wsp. 2010). Obecność obu receptorów estrogenowych potwierdzono również w komórkach Sertoliego niedojrzałych oraz dorosłych gryzoni (Lucas i wsp. 2008). Należy jednak zaznaczyć, że wyniki badań lokalizacji tych receptorów w poszczególnych populacjach komórek gonady męskiej ssaków są często niejednoznaczne, a ponadto stwierdza się wyraźne różnice międzygatunkowe we wzorze ich ekspresji (Lucas i wsp. 2011; Cook i wsp. 2017). Na przykład w jądrze ogiera ekspresję ER α wykazano tylko w komórkach Leydiga, podczas gdy obecność ER β potwierdzono zarówno w komórkach Leydiga, jak i w komórkach Sertoliego oraz komórkach plemnikotwórczych (Hejmej i wsp. 2005). U dorosłych knurów ekspresję ER α potwierdzono w komórkach Leydiga, spermatogoniach i spermatocytach, a ER β – tylko w spermatogoniach i spermatocytach (Rago i wsp. 2004). Badania nad lokalizacją ER α w jądrach mężczyzn z prawidłową spermatogenezą ujawniły obecność tego receptora w komórkach Sertoliego oraz komórkach Leydiga (Filipiak i wsp. 2013). Dalsze analizy przyczyniły się do wykrycia niskiej ekspresji ER α w komórkach plemnikotwórczych (Fietz i wsp. 2016). Natomiast ER β wykazywał wysoki poziom ekspresji w komórkach plemnikotwórczych i w komórkach Sertoliego (Fietz i wsp. 2014).

Poza działaniem za pośrednictwem receptorów wewnątrzkomórkowych, estrogeny specyficznie aktywują błonowy receptor – GPER (ang. *G protein-coupled estrogen receptor*) (Revankar i wsp. 2005; Filardo i wsp. 2007). GPER pierwotnie opisany jako sierocy receptor GPR30 (Bonini i wsp. 1997), należy do rodziny błonowych receptorów związanych z białkiem G. U szczura gen *Gper1* jest zlokalizowany na chromosomie 12. i koduje białko składające się z 375 aminokwasów (Waghulde i wsp. 2018). Jego budowa jest podobna do innych przedstawicieli klasy receptorów rodopsyno-podobnych m.in. FSHR (opisanego w **rozdziale 1.3**). U ssaków GPER wykazuje ekspresję w wielu tkankach, m. in. w układzie nerwowym, w układzie trawiennym oraz w tkance

mięśniowej. Początkowo sądzono, że jego ekspresja ograniczona jest tylko do błony komórkowej, ale sugeruje się, że może być również zlokalizowany w błonie siateczki śródplazmatycznej (Funakoshi i wsp. 2006). Jego obecność potwierdzono również w układzie rozrodczym. Ekspresję mRNA *Gper1* wykazano w jądrze myszy oraz w linii komórek spermatogonialnych GC-1 (Sirianni i wsp. 2008; Otto i wsp. 2009). Ekspresję *Gper1* wykryto też w komórkach Sertoliego niedojrzałych i dorosłych szczurów (Lucas i wsp. 2010), a także w komórkach Leydiga człowieka oraz myszy (Fietz i wsp. 2016; Kotula-Balak i wsp. 2018).

W komórkach Sertoliego w odpowiedzi na związanie estradiolu z GPER, podjednostka $G\beta\gamma$ aktywuje niereceptorową kinazę tyrozynową Src (ang. *proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*), która z kolei aktywuje metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP, ang. *matrix metalloproteinases*) (**Rycina 8**). Prowadzi to do transaktywacji receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*) oraz dalszej transdukcji sygnału za pośrednictwem białek MAPK3/1 (Lucas i wsp. 2010).



Rycina 8. Mechanizm sygnalizacji estrogenowej z udziałem błonowego receptora GPER. EGFR – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu, GPER – błonowy receptor estrogenowy, MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenem, MMP – metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, SRC - kinaza tyrozynowa.

1.6. Rola estrogenów w regulacji funkcji gonady męskiej

Badania z wykorzystaniem techniki nokautu genu *Cyp19* kodującego aromatazę (ArKO, ang. *aromatase knockout*) u myszy, dowiodły istotnej roli estrogenów w męskim układzie rozrodczym. Pomimo, że samce te początkowo wykazywały normalną zdolność do rozrodu, to wraz z wiekiem obserwowano u nich postępujące zaburzenia płodności, wynikające z zakłócenia różnicowania się okrągłych spermatyd oraz obniżoną ruchliwość plemników (Robertson i wsp. 1999; Robertson i wsp. 2001). Z kolei analizy skutków nokautu jądrowych receptorów estrogenowych (ERKO, ang. *estrogen receptor knockout*) u gryzoni ujawniły dominującą rolę ER α gonadzie męskiej. Wykazano, że u myszy z nokautem genu *Esr1* (α ERKO) resorpcja płynu z przewodników wyprowadzających była zaburzona, co prowadziło do wzrostu ciśnienia w gonadzie i uszkodzenia nabłonka plemnikotwórczego. U takich osobników stwierdzono też występowanie morfologicznych nieprawidłowości plemników (Eddy i wsp. 1996; Joseph i wsp. 2010). Natomiast myszy z nokautem *Esr2* (β ERKO) charakteryzował prawidłowy fenotyp jądra i zdolność do rozrodu (Dupont i wsp. 2000). Wyniki późniejszych badań Antal i wsp. (2008) wskazały jednak na bezpłodność u myszy β ERKO z całkowitym nokautem genu *Esr2*, mimo prawidłowej morfologii gonady i pozostałych narządów układu rozrodczego oraz prawidłowej ruchliwości plemników.

Wyniki badań na myszach NOER (ang. *nuclear-only estrogen receptor α*) pozbawionych błonowej formy ER α , wykazały w kolei istotną rolę sygnalizacji ER α związanej z błoną komórkową w gonadzie męskiej (Nanjappa i wsp. 2016). U zwierząt tych, podobnie jak u myszy α ERKO, obserwowano histologiczne zmiany w obrębie przewodników wyprowadzających jąder, atrofię kanalików nasiennych, nieprawidłowości strukturalne plemników oraz postępującą bezpłodność. Natomiast w przypadku samców myszy z nokautem genu *Gper* nie stwierdzono zaburzeń funkcji układu rozrodczego i płodności, a wykazano istotne zaburzenia parametrów metabolicznych związane z otyłością oraz cukrzycą (Sharma i wsp. 2013).

Doniesienia ostatnich kilkunastu lat wskazują jednak na udział wewnątrzkomórkowych i błonowych receptorów estrogenowych w regulacji rozwoju i funkcjonowania poszczególnych populacji komórek gonady męskiej. Sygnalizacja estrogenowa w komórkach Sertoliego za pośrednictwem odpowiednio ER α oraz ER β , jest istotna w kontroli proliferacji i różnicowania komórek Sertoliego podczas rozwoju

postnatalnego jądra (Lucas i wsp. 2014; Macheroni i wsp. 2020). Zablokowanie sygnalizacji estrogenowej przez antagonistę jądrowych receptorów estrogenowych ICI 162,780 skutkowało zaburzeniem specjalizacji powierzchniowych pomiędzy spermatydami a komórkami Sertoliego w jądrach myszy, wskazując na znaczenie tych receptorów w regulacji połączeń międzykomórkowych w nabłonku plemnikotwórczym (Anahara i wsp. 2006). Wyniki badań Kumar i wsp. (2015) wykazały także, że estrogeny działając poprzez ER α oraz ER β , regulują ekspresję genów zaangażowanych w przebudowę cytoszkieletu komórek Sertoliego, co dowodzi roli sygnalizacji estrogenowej w procesie spermiacji.

W szczurzych komórkach Sertoliego aktywacja sygnalizacji estrogenowej z udziałem GPER skutkuje obniżeniem ekspresji białek proapoptotycznych oraz wzrostem ekspresji białek antyapoptotycznych, co sugeruje rolę GPER w kontroli przeżywalności tych komórek (Lucas i wsp. 2010; Royer i wsp. 2012). Nasilenie proliferacji związane z aktywacją GPER obserwowano również w hodowli niedojrzałych komórek Sertoliego knura (Yang i wsp. 2017). Na znaczenie GPER w nabłonku plemnikotwórczym człowieka wskazują natomiast wyniki ostatnich badań Walczak-Jędrzejowskiej i wsp. (2022), którzy stwierdzili zwiększoną ekspresję tego receptora w komórkach Sertoliego mężczyzn z azoospermią.

Badania dotyczące roli estrogenów w komórkach Sertoliego wykazały ponadto, że hormony te indukują ekspresję SCF w ludzkich płodowych komórkach Sertoliego, co sugeruje ich rolę w utrzymaniu prawidłowego mikrośrodowiska dla różnicujących się spermatogonialnych komórek macierzystych (Tao i wsp. 2021). Z kolei u szczurów w wieku okołodojrzewaniowym estradiol współdziała z FSH w indukcji dojrzewania komórek Sertoliego oraz kontroli apoptozy komórek plemnikotwórczych podczas pierwszej fali spermatogenezy (Walczak-Jędrzejowska i wsp. 2008). Potwierdzono także udział estradiolu w regulacji metabolizmu energetycznego komórek Sertoliego (Rato i wsp. 2012a) oraz w transporcie wodorowęglanów i regulacji ekspresji akwaporyny 9, które są kluczowe do utrzymania homeostazy jonowej i prawidłowego pH komórki (Bernardino i wsp. 2015; Bernardino i wsp. 2016; Bernardino i wsp. 2018). Nie zostało dotąd jednak wyjaśnione, czy efekty te związane są z aktywacją jądrowych, czy błonowych receptorów estrogenowych.

Estrogeny działając poprzez ER i GPER modulują także bezpośrednio funkcję komórek linii płciowej. Wyniki badań Vicini i wsp. (2006) dowiodły, że w komórkach spermatogonialnych linii GC-1 estrogeny za pośrednictwem ER β wywołują odpowiedź

z udziałem klasycznej ścieżki genomowej, a także wpływają na aktywację szlaku kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK). Z kolei badania Sirianni i wsp. (2008) wykazały, że estrogeny wpływając na interakcję pomiędzy sygnalizacją GPER a ER α , stymulują ekspresję cykliny 1, w konsekwencji indukując proliferację linii spermatogonialnych komórek GC-1. Wykazano również, że w hodowli szczurzych i mysich spermatocytów sygnalizacja estrogenowa z udziałem GPER reguluje ekspresję genów zaangażowanych w utrzymanie równowagi między proliferacją a apoptozą (Chimento i wsp. 2010; Chimento i wsp. 2012).

Sygnalizacja estrogenowa jest też istotna dla funkcjonowania tkanki interstycjalnej jądra. Wykazano, że aktywacja ER α i GPER reguluje proces steroidogenezy i produkcję testosteronu przez komórki Leydiga (Akingbeni i wsp. 2003, Vaucher i wsp. 2014, Miłoś i wsp. 2019). ER α odgrywa także rolę w utrzymaniu prawidłowej liczby tych komórek (Yu i wsp. 2014). Sygnalizacja GPER uczestniczy natomiast w regulacji ekspresji wewnątrzkomórkowych receptorów estrogenowych i aromatazy oraz kontroluje produkcję estrogenów przez komórki Leydiga (Kotula-Balak i wsp. 2018).

Należy również zaznaczyć, że oprócz bezpośredniego wpływu estrogenów na komórki gonady męskiej, estrogeny mogą oddziaływać również na aktywność osi HPG. Badania z wykorzystaniem myszy α ERKO wykazały, że ER α może brać udział w mechanizmie ujemnego sprzężenia zwrotnego kontrolującego wydzielanie GnRH i gonadotropin (Lindzey i wsp. 1998; Wersinger i wsp. 1999; Baines i wsp. 2008). Wyniki kolejnych prac wskazują na rolę w tym mechanizmie zarówno estradiolu powstającego w wyniku lokalnej aromatazacji testosteronu w podwzgórzu i przysadce, jak i krążących estrogenów (Sharma i wsp. 1999; Schnorr i wsp. 2001; Nicol i wsp. 2002; Rochira i wsp. 2006). Względne znaczenie sygnalizacji estrogenowej wobec sygnalizacji z udziałem testosteronu w kontroli wydzielania GnRH i gonadotropin u samców nie zostało jednak dotąd jednoznacznie wyjaśnione.

2. HIPOTEZA I CELE PRACY

Prawidłowy przebieg spermatogenezy uwarunkowany jest współdziałaniem kontroli hormonalnej i lokalnych systemów regulacyjnych, do których należy komunikacja międzykomórkowa przez szlak sygnałowy Notch (Hofmann i McBeath 2022). Badania ostatnich lat wykazały udział androgenów w kontroli aktywności tego szlaku w gonadzie męskiej gryzoni (Kamińska i wsp. 2020a; Kamińska i wsp. 2020b). Dotychczas nie scharakteryzowano natomiast roli innych hormonów istotnych dla funkcjonowania nabłonka plemnikotwórczego, w regulacji sygnalizacji Notch w komórkach Sertoliego.

Hipoteza badawcza niniejszej pracy zakłada, że w nabłonku plemnikotwórczym gryzoni komunikacja jukstakrynowa z udziałem szlaku Notch podlega regulacji przez działanie FSH i estrogenów w komórkach Sertoliego. Biorąc po uwagę kluczowe znaczenie bezpośrednich interakcji między komórkami Sertoliego a różnicującymi się komórkami płciowymi w nabłonku nasiennym, postulowana zależność może stanowić jeden z mechanizmów oddziaływania sygnalizacji FSH i estrogenowej na przebieg procesu spermatogenezy.

Aby zweryfikować założoną hipotezę badawczą wyznaczono następujące cele szczegółowe:

1. Wyjaśnienie roli sygnalizacji FSH w komórkach Sertoliego w regulacji ekspresji ligandów, receptora i genów efektorowych szlaku Notch oraz aktywności tego szlaku w nabłonku plemnikotwórczym gryzoni, poprzez:
 - i. analizę ekspresji oraz lokalizacji komponentów szlaku Notch (DLL1, DLL4, Notch1/N1ICD, HES1, HEY1) w jądrach szczurów po farmakologicznym zahamowaniu produkcji gonadotropin, a następnie aktywacji sygnalizacji FSH *in vivo* w okresie dojrzewania płciowego;
 - ii. analizę ekspresji oraz lokalizacji komponentów szlaku Notch (DLL1, DLL4, Notch1/N1ICD, HES1, HEY1) w jądrach normicy rudej po ograniczeniu sekrecji gonadotropin u samców utrzymywanych w krótkim fotoperiodzie, a następnie suplementacji FSH w warunkach *in vivo*;
 - iii. wykazanie zmian ekspresji komponentów szlaku Notch (DLL1, DLL4, Notch1/N1ICD, HES1, HEY1) oraz aktywności czynnika RBP-J po stymulacji sygnalizacji FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR w komórkach Sertoliego gryzoni *in vitro*;

2. Wyjaśnienie roli sygnalizacji estrogenowej z udziałem receptorów ER α , ER β i GPER w regulacji ekspresji ligandów, receptora oraz genów efektorowych szlaku Notch oraz aktywności tego szlaku w eksplantach jąder oraz komórkach Sertoliego gryzoni, poprzez:

- i. analizę ekspresji komponentów szlaku Notch (DLL1, DLL4, JAG1, Notch1/N1ICD, HES1, HEY1) w eksplantach jąder *ex vivo* po zastosowaniu 17 β -estradiolu lub antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780; G15);
- ii. wykazanie zmian ekspresji i lokalizacji komponentów szlaku Notch (DLL1, DLL4, JAG1, Notch1/N1ICD, HES1, HEY1) po ekspozycji na 17 β -estradiol, antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780; G15) lub wyciszeniu ekspresji ER α , ER β i GPER w komórkach Sertoliego gryzoni *in vitro*;
- iii. określenie udziału 17 β -estradiolu w kontroli aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J oraz interakcji czynnika transkrypcyjnego RBP-J z promotorami genów efektorowych szlaku Notch (*Hes1* i *Hey1*) w mysich komórkach Sertoliego *in vitro*.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Doświadczenia w układzie *in vivo*

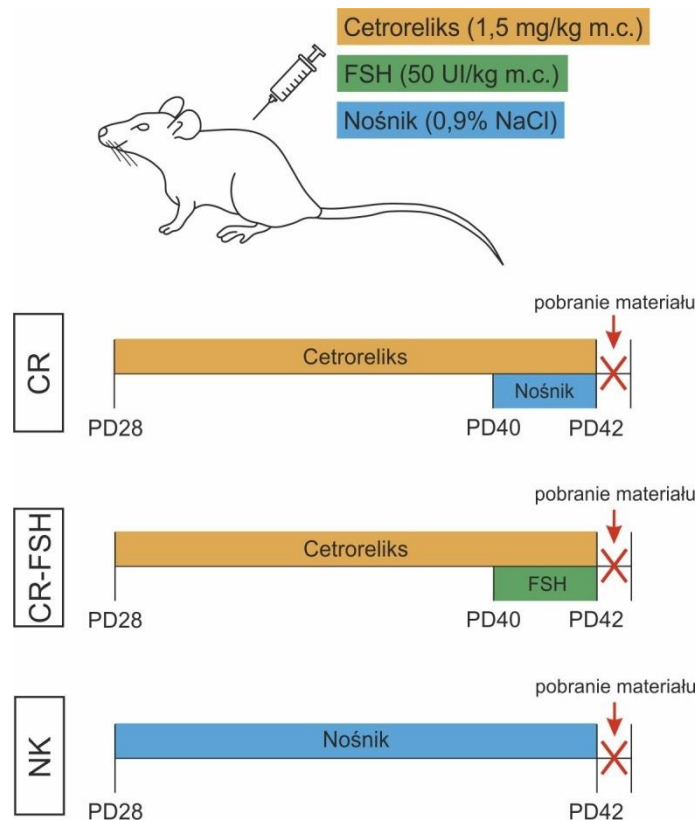
3.1.1. Materiał doświadczalny

Materiał badawczy stanowiły:

- niedojrzałe płciowo samce szczurów Wistar (*Rattus norvegicus*) pochodzące ze Zwierzętarń Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zwierzęta utrzymywano w takich samych warunkach: 12 h światła i 12 h ciemności, z dostępem do wody i paszy *ad libitum*.
- dojrzałe płciowo samce nornicy rudej (*Myodes glareolus*) pochodzące ze Zwierzętarń Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zwierzęta hodowano przez 3 miesiące w dwóch cyklach świetlnych: długim (nornice DD; 18 h światła : 6 h ciemności) lub krótkim (nornice KD; 6 h światła : 18 h ciemności). Obydwie grupy zwierząt utrzymywano z dostępem do wody i paszy *ad libitum*.

3.1.2. Przebieg doświadczeń

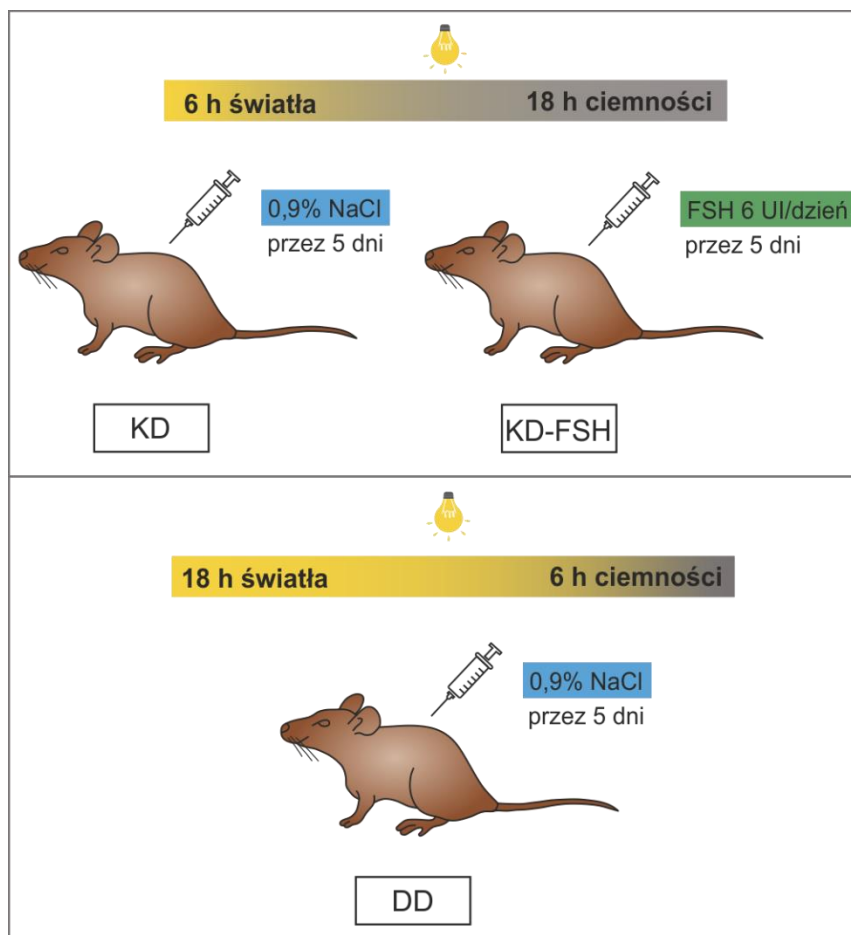
W celu zahamowania produkcji gonadotropin u samców szczurów w okresie dojrzewania płciowego, 4-tygodniowe osobniki ($n = 12$) poddano działaniu antagonisty GnRH – cetroreliksu (1,5 mg/kg masy ciała/dzień; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w okresie od 28. do 42. dnia po urodzeniu. Połowa z tych zwierząt otrzymywała iniekcje FSH (50 IU/kg masy ciała/dzień; Tocris Bioscience, Bristol, UK) przez 3 ostatnie dni doświadczenia (grupa CR-FSH; $n = 6$). Pozostałe szczury otrzymywały w tym czasie iniekcje nośnika (0,9% NaCl) (grupa CR; $n = 6$). Trzecią grupę stanowiły szczury, które otrzymywały tylko iniekcję nośnika (0,9% NaCl) przez 14 dni (grupa NK; $n = 6$). Wszystkie związki podawano poprzez iniekcje podskórne. Schemat doświadczenia (w tym zastosowane dawki oraz czas ekspozycji) (**Rycina 9**) został zaprojektowany w oparciu o dane literaturowe (McLachnan i wsp. 1995; Roth i wsp. 2000). Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta uśmiercono poprzez zastosowanie izofluranu (Aerrane, Baxter, Deerfield, USA; 3% w celu wstępnej anestezji, a następnie 5% w celu eutanazji).



Rycina 9. Schemat przebiegu doświadczeń *in vivo* z wykorzystaniem samców szczurów.
 PD – dzień po urodzeniu

Aby wywołać fizjologiczny niedobór gonadotropin u dojrzałych (70-80 dniowych) samców normicy rudej, zwierzęta hodowano w krótkim cyklu świetlnym (6 h światła : 18 h ciemności) przez 3 miesiące (n = 20). Połowa z tych osobników następnie otrzymywała iniekcje FSH (6 UI/dzień; Tocris Bioscience) przez 5 dni (grupa KD-FSH; n = 10). Pozostałe samce w tym czasie otrzymywały iniekcje nośnika 0,9% NaCl (grupa KD; n = 10). Trzecią grupę stanowiły normice, które hodowane były w warunkach długiego fotoperiodu (18 h światła : 6 h ciemności) i otrzymywały przez 5 dni iniekcje 0,9% NaCl (grupa DD; n = 10). Schemat doświadczenia (**Rycina 10**) został zaprojektowany w oparciu o dane literaturowe (Lerchl i wsp. 1993; Tarulli i wsp. 2008). Po 24 godzinach od ostatniej iniekcji zwierzęta uśmiercono poprzez podanie izofluranu (Aerrane; 3% w celu wstępnej anestezji, a następnie 5% w celu eutanazji).

Na wykorzystanie szczurów oraz normic do przeprowadzenia powyższych doświadczeń uzyskano zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (uchwała nr 189/2018).



Rycina 10. Schemat przebiegu doświadczeń *in vivo* z wykorzystaniem samców nornicy rudej.

Od wszystkich zwierząt z obu doświadczeń wyizolowano jądra, zważono je, a następnie utrwalono do badań morfologicznych i immunohistochemicznych (**rozdział 3.6, 3.7**) lub zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C , do czasu przeprowadzenia analiz molekularnych. Z tkanek następnie izolowano RNA do analizy RT-qPCR w czasie rzeczywistym (**rozdział 3.4**) lub sporządzono homogenaty i wyizolowano białko do analizy western blot (**rozdział 3.5**). Krew pobrano w celu uzyskania osocza do pomiaru stężenia FSH (**rozdział 3.9**).

3.2. Doświadczenia w układzie *ex vivo*

3.2.1. Materiał doświadczalny

Materiał badawczy stanowiły eksplanty jąder izolowane z dojrzałych płciowo (80-90 dniowych) szczurów szczepu Wistar ($n = 6$). Zwierzęta pozyskano ze Zwierzętarń Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

W dniu poprzedzającym izolację eksplantów przygotowano bloczki agarozowe. W tym celu wstępnie autoklawowano 1,5% roztwór agarozy, po czym wylano go do szalek hodowlanych i pozostawiono do wystygnięcia w temperaturze pokojowej. Tak powstały żel pocięto na bloczki o wymiarach 8 mm x 8 mm x 5 mm, które umieszczono na całą noc w pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Niemcy) w atmosferze 5% CO₂, w temperaturze 37°C. Następnego dnia bloczki przełożono do płytek hodowlanych ze świeżą pożywką.

Zwierzęta uśmiercono z zastosowaniem izofluranu (3% w celu wstępnej anestezji, następnie 5% w celu eutanazji), niezwłocznie wyizolowano jądra, usunięto błonę białawą, a jądra pocięto na około 2-3 milimetrowe fragmenty. Tak uzyskane eksplanty umieszczono pojedynczo na powierzchni bloczków agarozowych w 6-dołkowych płytkach hodowlanych z pożywką DMEM w obecności 10% suplementu KnockOut Serum Replacement (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, USA), 50 U/mL penicyliny oraz 50 µg/ml streptomycyny (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Poziom pożywki w płytkach hodowlanych uzupełniono do górnej powierzchni bloczków, tak aby eksplanty nie były całkowicie zanurzone w pożywce. Fragmenty jąder inkubowano w warunkach sterylnych, w atmosferze zawierającej 5% CO₂, w temperaturze 32°C (zbliżonej do fizjologicznych warunków panujących w mosznie). Po 24 godzinach hodowli przeprowadzono poniżej opisane doświadczenia.

3.2.2. Przebieg doświadczeń

Aby ocenić wpływ sygnalizacji estrogenowej na ekspresję komponentów szlaku Notch *ex vivo*, eksplanty jąder inkubowano z:

- 17β-estradiolem (1 nM; Sigma-Aldrich),
- ICI 182,780 (1 µM; Sigma-Aldrich),
- G15 (10 nM; Tocris Bioscience),
- Dimetylosulfotlenkiem (DMSO; 0,01%; Sigma-Aldrich) (rozpuszczalnik dla estradiolu, ICI 182,780 i G15) – grupa kontrolna.

Inkubacje prowadzono przez 24 godziny. Następnie eksplanty wykorzystano do analiz RT-qPCR oraz western blot (**rozdziały 3.4 i 3.5**).

3.3. Doświadczenia w układzie *in vitro*

3.3.1. Materiał doświadczalny

Materiał badawczy stanowiły komórki Sertoliego izolowane z jąder szczurów szczepu Wistar (Zwierzętarnia Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego) oraz mysia linia komórek Sertoliego TM4 (nr kat. CRL-1715; American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, Virginia, USA).

3.3.1.1. Izolacja oraz hodowla pierwotna szczurzych komórek Sertoliego (PRSC)

Komórki Sertoliego izolowano z jąder 20-dniowych szczurów Wistar (n = 18). Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, komórki Sertoliego pochodzące od szczurów w tym wieku są już w pełni zróżnicowane (Orth 1982; Li i wsp. 2001). Izolacja komórek Sertoliego z 20-dniowych szczurów zapewnia wysoką wydajność hodowli, przy jednoczesnym niewielkim zanieczyszczeniu komórkami rozrodczymi. Pozwala to na uzyskanie wysokiego stopnia czystości hodowli (>98%) (Lee i wsp. 2003; Mruk i Cheng 2011a).

Po uśmierceniu zwierząt (**rozdział 3.2.1**), niezwłocznie wyizolowano jądra i umieszczono na szalce hodowlanej w pożywce DMEM, po czym usunięto błonę białawą i pocięto na drobne fragmenty. W celu usunięcia komórek krwi, kawałki jąder wirowano z prędkością 800 x g przez 2 minuty w pokojowej temperaturze, a następnie trzykrotnie płukano pożywką hodowlaną. Aby uwolnić komórki tkanki interstycjalnej (komórki Leydiga oraz fibroblasty), fragmenty jąder poddano trawieniu roztworem 1 mg/ml trypsyny (Sigma-Aldrich) w obecności 0,8 mg DNazy (Sigma-Aldrich) w inkubatorze z wytrząsaniem przez 30 minut w 35°C. Po tym czasie fragmenty tkanki zwirowano oraz dwukrotnie przepłukano, a następnie w celu usunięcia komórek Leydiga, umieszczono je w roztworze zawierającym 1 M glicynę, 2 mM EDTA o pH 7,4 z dodatkiem 0,01% sojowego inhibitora trypsyny (Sigma-Aldrich) oraz 0,8 mg DNazy i mieszano delikatnie przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Kolejnym etapem było wytrząsanie kanalików nasiennych we wzrastających stężeniach kolagenazy (Sigma-Aldrich) w obecności 0,8 mg DNazy: najpierw w roztworze 0,5 mg/mL przez 10 minut, a następnie w 1 mg/ml kolagenazy przez 30 minut, co pozwoliło na eliminację komórek mioidalnych. W celu rozkładu kwasu hialuronowego, głównego składnika macierzy zewnątrzkomórkowej, do zawiesiny dodano 1 mg/ml roztworu hialuronidazy (Sigma-Aldrich) z dodatkiem 0,2 mg DNazy i inkubowano na

wytrząsarce przez 30 minut. Po zakończonej inkubacji komórki wirowano z prędkością 800 x g przez 2 minuty i płukano pięciokrotnie. W ostatnim etapie komórki zawieszano w pożywce DMEM bez czerwieni fenolowej, wzbogaconej insuliną (10 mg/ml; Sigma-Aldrich), transferyną (5 mg/ml; Calbiochem, San Diego, CA, USA), EGF (2,5 ng/ml; Sigma-Aldrich), z dodatkiem bacytracyny (5 mg/ml; Sigma-Aldrich). Komórki wysiano na pokryte wcześniej podłożem Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 6-dołkowe płytki hodowlane w zagęszczeniu $0,5 \times 10^6$ komórek/cm². Po 48 godzinach od wysiania, komórki traktowano roztworem hipotonicznym (20 mM Tris, pH 7,4) przez 2,5 minuty w temperaturze pokojowej, aby usunąć komórki plemnikotwórcze. Hodowle komórek PRSC prowadzono w sterylnych warunkach, w atmosferze zawierającej 5% CO₂, w temperaturze 35°C. Po 24 godzinach przeprowadzono zaplanowane doświadczenia (**rozdział 3.3.2.1**).

3.3.1.2. Hodowla komórek Sertoliego linii TM4

Linia komórkowa TM4 (CRL-1715; ATCC) pochodzi z jąder 11-13 dniowych myszy BALB/c i została otrzymana bez użycia metod inżynierii genetycznej, dlatego fenotyp tych komórek jest zbliżony do pierwotnych komórek Sertoliego. Linia ta wykazuje odpowiedź na FSH, a także posiada receptor androgenowy (AR) (Mather 1980). Komórki TM4 hodowano w pożywce DMEM/F-12 (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) wzbogaconej 2,5 mM L-glutaminą, 1,2 g/l wodorowęglanu sodu, 15 mM Hepes (PAN-Biotech GmbH) oraz 10% płodowej surowicy bydlęcej (Thermo Fisher Scientific). Hodowle prowadzone były w sterylnych warunkach, w atmosferze 5% CO₂, w temperaturze 37°C. Przed rozpoczęciem doświadczeń (**rozdział 3.3.2**) komórki hodowano w pożywce bez dodatku czerwieni fenolowej i surowicy przez 24 godziny.

Morfologię i funkcjonowanie komórek TM4 sprawdzano poprzez obserwacje mikroskopowe, analizy żywotności i proliferacji (automatyczny licznik komórek TC20; Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA), a także badanie na obecność mykoplazmy (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit; Thermo Fisher Scientific).

3.3.2. Przebieg doświadczeń

3.3.2.1. Ekspozycja komórek Sertoliego PRSC i TM4 na FSH, 17 β -estradiol oraz antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780; G15)

W celu oceny wpływu sygnalizacji FSH na aktywność szlaku Notch, komórki PRSC oraz TM4 wysiano w zagęszczeniu $0,5 \times 10^6/\text{cm}^2$, a następnie inkubowano przez 18 godzin w obecności FSH (70 i 100 ng/ml; Tocris Bioscience) rozpuszczonym w DPBS (ang. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*; PAN-Biotech GmbH).

W celu oceny wpływu sygnalizacji estrogenowej na aktywność szlaku Notch, komórki PRSC oraz TM4 wysiano w zagęszczeniu $0,5 \times 10^6/\text{cm}^2$, a następnie inkubowano przez 24 godzin w obecności:

- 17 β -estradiolu (1 nM),
- ICI 182,780 (1 μM),
- ICI 182,780 + 17 β -estradiolu,
- G15 (10 nM),
- G15 + 17 β -estradiolu,
- 0,01% DMSO (rozpuszczalnik dla estradiolu, ICI 182,780 i G15) – grupa kontrolna.

Następnie komórki zebrano i wykorzystano do analiz RT-qPCR, western blot, analizy immunofluorescencyjnej, pomiaru aktywności czynnika RBP-J (**Rozdziały 3.4, 3.5, 3.8, 3.10**). Dodatkowo zebrano pożywkę z nad komórek traktowanych FSH oraz komórek kontrolnych w celu pomiaru stężenia cAMP (**Rozdział 3.9**).

3.3.2.2. Wyciszenie ekspresji FSHR, ER α , ER β , GPER i HES1 w komórkach Sertoliego linii TM4 z wykorzystaniem mechanizmu interferencji zależnej od RNA (RNAi)

W celu przejściowego wyciszenia ekspresji FSHR komórki TM4 wysiano na płytce 6-dołkowej w zagęszczeniu $0,1 \times 10^5/\text{cm}^2$ i hodowano je w pożywce DMEM/F-12, aż do osiągnięcia 50% konfluencji. Następnie komórki hodowano w pożywce Opti-MEM (Life Technologies) w obecności odczynnika do transfekcji INTERFERin (Polyplus-Transfection S.A., Bioparc, Illkirch-Graffenstaden, Francja) oraz specyficznych siRNA (siRNA Silencer Select; Thermo Fisher Scientific) w stężeniach 50 i 100 nM (**Tabela 1**). Efektywność wyciszenia wynosiła ($61 \pm 3\%$). Po 24 godzinach od wyciszenia komórki transfekowane oraz kontrolne traktowano 100 ng/ml FSH przez 18 godzin.

W celu przejściowego wyciszenia ekspresji ER α , ER β , GPER oraz HES1 komórki TM4 wysiano na płytki 6-dółkowe w zagęszczeniu $0,1 \times 10^5/\text{cm}^2$ i hodowano je w pożywce DMEM/F-12, aż do osiągnięcia 60-80% konfluencji. Następnie komórki hodowano w pożywce Opti-MEM w obecności odczynnika do transfekcji Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) oraz specyficznych siRNA (siRNA Silencer Select) w stężeniach 50 i/lub 100 nM (**Tabela 1**). Efektywność wyciszenia wynosiła odpowiednio: $76\% \pm 9\%$ dla ER α siRNA, $80\% \pm 1\%$ dla ER β siRNA, $68\% \pm 9\%$ dla GPER siRNA oraz $70\% \pm 4\%$ dla HES1 siRNA. Po 24 godzinach od wyciszenia komórki transfekowane ER α , ER β lub GPER siRNA oraz komórki kontrolne traktowano:

- 17 β -estradiolem (1 nM),
- ICI 182,780 (1 μ M),
- ICI 182,780 + 17 β -estradiolem,
- G15 (10 nM),
- G15 + 17 β -estradiolem,
- DMSO (0,01%) – grupa kontrolna.

Inkubacje prowadzono przez 24 godziny.

Dodatkowo wykonano kontrole negatywne, które stanowiły komórki traktowane samym odczynnikiem do transfekcji (odpowiednio INTERFERin lub Lipofectamine RNAiMAX) oraz tym odczynnikiem z dodatkiem Silencer Select Negative Control No.1 (siRNA niehomologiczne z żadną mysią sekwencją; Thermo Fisher Scientific). Kontrole pozytywne wykonano przy użyciu siRNA Silencer Select GAPDH (Thermo Fisher Scientific).

Wyciszanie przeprowadzono tylko na komórkach linii TM4, ponieważ komórki PRSC wykazują niską wydajność transfekcji (Garcia i wsp. 2017).

Zebrane komórki zostały użyte do analiz RT-qPCR, western blot, analizy immunofluorescencyjnej oraz pomiaru aktywności czynnika RBP-J (**Rozdziały 3.4, 3.5, 3.8, 3.10**).

Tabela 1. Sekwencje siRNA stosowane w celu wyciszenia ekspresji genów.

Gen	siRNA ID	Sekwencja sensowna
<i>Fshr</i>	s66239	CUACCCAACUUGCAUGAAAtt
<i>Hes1</i>	s201454	AGGGCAAGAAUAAAUGAAAtt
<i>Esr1</i>	s65686	CAUGAUCUAUUCUGAAUAUtt
<i>Esr2</i>	s65689	CACCUUGCCUGUAAACAGAtt
<i>Gper</i>	s94713	GGCUCUAUGUGGAGCAGAAtt

3.4. Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja i ilościowa analiza RT-PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)

Całkowite RNA zostało wyekstrahowane z tkanki jądra (ok. 2 mg) lub komórek Sertoliego (3×10^6) przy użyciu odczynnika TRI Reagent (Ambion, Waltham, Massachusetts, USA) według zaleceń producenta. Materiał najpierw homogenizowano w 400 μ l TRI Reagent, po czym do próbek dodano po 60 μ l chloroformu (Sigma-Aldrich) i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie próbki wirowano przez 5 minut (2000 rpm). Powstałą w ten sposób górną fazę zawierającą RNA, przeniesiono do nowych sterylnych probówek i dodano do niej po 150 μ L 2-propanolu (Sigma-Aldrich) w celu wytrącenia RNA. Po 15 minutach inkubacji wirowano próbki przez 10 minut w temperaturze 4°C (12000 rpm). W kolejnym etapie usunięto nadsącz i dodano po 400 μ l 70% alkoholu etylowego, po czym próbki wirowano przez 10 minut (12000 rpm). W celu dokładnego oczyszczenia RNA proces ten powtórzono dwukrotnie. W ostatniej fazie peletę osuszono i rozpuszczono w 20 μ l wody wolnej od RNaz (Ambion). W celu usunięcia DNA oraz DNaz zanieczyszczających próbki, użyto TURBO DNafree™ kit (Ambion) według instrukcji producenta. Czystość otrzymanego w ten sposób RNA sprawdzono poprzez pomiar absorbancji przy długościach fal 260 nm oraz 280 nm w spektrofotometrze NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Do dalszych procedur wykorzystano tylko próbki, dla których współczynnik A260 : A280 wynosił 1,8 - 1,9 (Gallagher i Desjardins 2008). Na podstawie rozdziału elektroforetycznego w 1,5% - 2,0% żelu agarozowym potwierdzano jakość uzyskanego RNA.

W celu uzyskania cDNA przeprowadzono procedurę odwrotnej transkrypcji z użyciem zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied

Biosystems, Carlsbad, CA) według zaleceń producenta. Próbkę przygotowano w 20- μ l objętościach poprzez dodanie 1 μ g otrzymanego RNA, 2 μ l buforu (10 x RT Buffer), 2 μ l losowych starterów (10x Random Primers), 0,8 μ l mieszaniny trifosforanów deoksynukleotydów (100 mM dNTP Mix), 1 μ l odwrotnej transkryptazy (50 U/ μ l MultiScribe Reverse Transcriptase) oraz 1 μ l inhibitora RNazy, uzupełniając mieszaninę wodą wolną od RNaz. Równocześnie, aby określić zanieczyszczenie DNA, dla każdej próbki wykonano kontrolę negatywną poprzez dodanie wody wolnej od RNaz zamiast odwrotnej transkryptazy. Tak przygotowane próbki krótko zwirowano, a następnie prowadzono reakcję w termocyklerze Veriti (Applied Biosystems), stosując program: 25°C przez 10 min, 37°C przez 120 min, 85°C przez 5 min. Po zakończeniu reakcji próbki rozcieńczono dodając 80 μ l wody wolnej od RNaz i przechowywano w -20°C.

Ilościową analizę ekspresji badanych genów przeprowadzono stosując łańcuchową reakcję polimerazy z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (qPCR; ang. *quantitative polymerase chain reaction*) z wykorzystaniem termocyklera QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Do analizy poziomu ekspresji mRNA badanych genów oraz genów referencyjnych (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Hprt1*, *Pgk1* i *Rpl13a*) wykorzystano startery (Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk) przedstawione w **Tabeli 2**. Wydajność amplifikacji z użyciem poszczególnych starterów sprawdzono stosując metodę krzywej standardowej (Livak i Schmittgen 2001; Svec i wsp. 2015). Wydajność wynosiła między 94% a 104%. Do reakcji PCR użyto 10 ng uzyskanego wcześniej cDNA z dodatkiem 0,5 μ M starterów i SYBR Green (Applied Biosystems) w końcowej objętości 10 μ l. Analizę prowadzono w następujących warunkach: 55 °C przez 2 min, 94 °C przez 10 minut, następnie 40 cykli: po 30 sekund w temperaturze przyłączania starterów oraz 45 sekund w 72 °C. Pozwoliło to na określenie numeru cyklu reakcji PCR, przy którym poziom fluorescencji przekroczył zdefiniowany próg (Ct, ang. *threshold cycle*), wykorzystany do ilościowego pomiaru cDNA w danej próbce. Aby wyeliminować możliwe zanieczyszczenie odczynników użytych do analizy qPCR, sporządzono kontrolę poprzez dodanie do próbek wody wolnej od RNaz zamiast cDNA. Dodatkowo w celu potwierdzenia specyficzności amplifikacji, produkty PCR poddano analizie krzywej topnienia oraz przeprowadzono elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Germany).

Ekspresja mRNA badanych genów została znormalizowana względem średniej ekspresji genów referencyjnych. Do wyznaczenia względnego poziomu ekspresji

badanego genu (RQ, ang. *relative quantification*) wykorzystano metodę $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak i Schmittgen 2001); poziom ekspresji mRNA w próbkach kontrolnych przyjęto jako 1 (RQ = 1).

Tabela 2. Startery użyte do analizy RT-PCR w czasie rzeczywistym.

Gen	Sekwencja startera przedniego	Sekwencja startera wstecznego	Wielkość produktu (bp)	Temperatura przyłączenia starterów
Szczur				
<i>Actb</i>	CACACTGTGCCATCTATGA	CCGATAGTGATGACCTGACG	272	58
<i>B2m</i>	TGCTACGTGTCTCAGTTCCA	GCTCCTTCAGAGTGACGTGT	196	58
<i>Dll1</i>	TCAGATAACCCGTGACGGAGGC	AGGTAAGAGTTGCCGAGGTCC	185	56
<i>Dll4</i>	GCTGGAAGTGGATTGTGG	CTTGTCGCTGTGAGGATAC	405	51
<i>Gapdh</i>	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	207	58
<i>Hes1</i>	GGCAGGCCACCCCGCCTTG	GCAGCCAGGCTGGAGAGGCT	170	62
<i>Hey1</i>	AAAGACGGAGAGGCATCATCG	GCAGTGTGCAGCATTTTCAGG	126	55
<i>Hprt1</i>	GACTTTGCTTTCCTTGGTCA	AGTCAAGGGCATATCCAACA	152	58
<i>Jag1</i>	AACTGGTACCGGTGCGAA	TGATGCAAGATCTCCCTGAAAC	216	54
<i>Notch1</i>	GCAGCCACAGAACTTACAAATCCAG	TAAATGCCTCTGGAATGTGGGTGAT	445	56
<i>Numb</i>	CCACATCAGTGGCAGACAGA	TTCTACGTGGCCGAGGTACT	81	60
<i>Rpl13a</i>	GTGAGGGCATCAACATTTCT	CATCCGCTTTTCTTGTTCAT	242	58
Mysz				
<i>Actb</i>	AAGAGCTATGAGTGCCTGA	TACGGATGTCAACGTCACAC	160	58
<i>B2m</i>	GGCCTGTATGCTATCCAGAA	GAAAGACCAGTCCTTGCTGA	198	58
<i>Dll1</i>	TCAGATAACCCGTGACGGAGGC	AGGTAAGAGTTGCCGAGGTCC	185	56
<i>Dll4</i>	GCTGGAAGTGGATTGTGG	CTTGTCGCTGTGAGGATAC	405	51
<i>Gapdh</i>	CTGGAGAAACCTGCCAAGTA	TGTTGCTGTAGCCGTATTCA	223	58
<i>Hes1</i>	ACCTTCCAGTGGCTCCTC	TTTAGTGTCCGTCAGAAGAGAG	405	52
<i>Hey1</i>	GCCGAAGTTGCCGTTATCTG	GCCGAAGTTGCCGTTATCTG	113	53
<i>Hprt1</i>	GCTGACCTGCTGGATTACAT	TTGGGGCTGTACTGCTTAAC	242	58
<i>Jag1</i>	AACTGGTACCGGTGCGAA	TGATGCAAGATCTCCCTGAAAC	216	54
<i>Notch1</i>	GATGCCACCTGAACAACCTGC	TGACAACAGCAACAGCAAGG	407	62
<i>Pgk1</i>	GCAGATTGTTTGAATGGTC	TGCTCACATGGCTGACTTTA	185	58
<i>Rpl13a</i>	ATGACAAGAAAAGCGGATG	CTTTTCTGCCTGTTTCCGTA	215	58

3.5. Analiza western blot

Fragmenty wyizolowanych jąder lub komórki Sertoliego poddano homogenizacji lub lizie na lodzie w buforze RIPA (ang. *radioimmunoprecipitation assay buffer*; Thermo Scientific) w obecności inhibitorów proteaz (Thermo Scientific). Otrzymane homogenaty tkanek lub lizaty sonikowano w celu rozbicia komórek i uwolnienia białek, a następnie zwirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C (12000 rpm). Stężenie białka w próbkach oznaczono za pomocą kolorymetrycznej metody Lowry'ego (DC Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories) stosując BSA (ang. *bovine serum albumine*; Bio-Rad Laboratories) jako standard. Absorbancję zmierzono z wykorzystaniem

czytnika ELISA LT-4500 (Labtech International Ltd., Heathfield, UK) przy długości fali 750 nm. Na podstawie otrzymanych wyników przygotowano próbki zawierające 20-80 µg białka, do których dodano bufor Laemmli'ego (Bio-Rad Laboratories) z dodatkiem 2% 2-merkaptoetanolu (Sigma-Aldrich), a następnie gotowano przez 5 minut w 100°C w celu denaturacji białka.

Tak zdenaturowane białka rozdzielano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym (8-12 % żel rozdzielający) w warunkach redukujących (SDS-PAGE). Rozdział elektroforetyczny prowadzono z użyciem aparatu MiniPROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) w buforze do elektroforezy (0,192 M glicyna, 0,025 M Tris/HCl, 1% SDS; pH 6,8) przy stałym napięciu 75 V przez pierwsze 15 minut, a następnie 115 V przez 2 godziny. Aby określić przybliżoną masę cząsteczkową badanych białek rozdziałowi poddano jednocześnie marker białkowy (PageRuler Prestained Protein Ladder; Thermo Scientific). Po zakończonym rozdziale przeprowadzono transfer białek na błony PVDF (ang. *polyvinylidene fluoride*; Merck Millipore, Burlington, MA, USA) w urządzeniu Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories). Transfer wykonano w buforze Towbina (0,192 M glicyna, 0,025 M Tris, 20% metanol) przy stałym natężeniu 1,0 A przez 30 minut.

Kolejnym etapem była inkubacja błon w 5% odłuszczonego mleku (BioShop, Burlington, Kanada) w TBST (ang. *tris buffered saline/Tween20*; 0,05 M Tris/HCl, 0,15 M NaCl, 0.1% Tween 20; pH 7.4) przez 30 minut w temperaturze pokojowej, co pozwoliło na zablokowanie miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał. Membrany ponownie przepłukano w TBST i inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym przez 24 godziny w temperaturze 4°C (**Tabela 3**). Kolejnego dnia błony płukano w TBST i inkubowano z kozim anty-króliczym przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (goat anti-rabbit IgG; 1:3000; nr kat. 31460, Thermo Scientific) przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie membrany przepłukano trzykrotnie w TBST, a następnie w TBS (0,05 M Tris/HCl, 0,15 M NaCl; pH 7,4). Do uwidocznienia miejsc związania przeciwciał zastosowano metodę chemiluminescencyjną. W tym celu błony inkubowano przez 90 sekund w 0,1 M Tris (pH 8,6) w obecności 22 µL kwasu kumarynowego (Sigma-Aldrich), 50 µL luminolu (Sigma-Aldrich) i 3 µL 30% H₂O₂ (Mruk i Cheng 2011b). Sygnał uzyskano przy użyciu analizatora ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories). Masę cząsteczkową badanych białek określano w odniesieniu do białek wzorcowych rozdzielonych w tym samym żelu. Obrazowanie markera białkowego przeprowadzono niezależnie, poprzez

detekcję kolorymetryczną. Aby usunąć związane przeciwciała, prowadzono inkubacje membran w buforze o niskim pH (1M glicyna-HCl, 1% SDS; pH 2,0) przez 30 minut. Po tym czasie inkubowano je z przeciwciałem przeciwko β -aktynie (białko referencyjne, **Tabela 3**), a następnie z kozim anty-mysim przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (goat anti-mouse IgG; 1:3000; nr kat. 1706516, Bio-Rad Laboratories). Analizę densytometryczną uwidocznionych prążków wykonano przy pomocy programu ImageLab 2.0 (Bio-Rad Laboratories), a wyniki normalizowano względem gęstości optycznej prążków β -aktyny. Poziom ekspresji w grupie kontrolnej przyjęto jako 1.

Tabela 3. Przeciwciała pierwszorzędowe stosowane w analizie western blot.

Przeciwciało	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent (nr katalogowy)
Anty-β-aktyna	Mysie monoklonalne	1:3000	Sigma-Aldrich (A2228)
Anty-DLL1	Królicze poliklonalne	1:1000	Sigma-Aldrich (SAB2100593)
Anty-DLL4	Królicze poliklonalne	1:2000	Abcam (ab7280)
Anty-ERα	Królicze poliklonalne	1:1000	Abcam (Ab3575)
Anty-ERβ	Królicze poliklonalne	1:1000	Thermo Fisher (PA1-310B)
Anty-FSHR	Królicze poliklonalne	1:1000	BT Laboratory (BT-AP03380)
Anty-GPER	Królicze poliklonalne	1:1000	Abcam (Ab39742)
Anty-INHA	Królicze poliklonalne	1:1000	Thermo Fisher (PA5-13681)
Anty-JAG1	Królicze poliklonalne	1:3000	Thermo Fisher (PA5-72843)
Anty-HES1	Królicze poliklonalne	1:1000	Thermo Fisher (PA5-28802)
Anty-HEY1	Królicze poliklonalne	1:1000	Thermo Fisher (PA5-40553)
Anty-NIICD	Królicze poliklonalne	1:1000	Abcam (Ab8925)

3.6. Procedura histologiczna i analiza morfologiczna

Wyizolowane jądra szczurów i nornic (**rozdział 3.1**) utrwalano w 4% roztworze paraformaldehydu (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, USA) lub w płynie Bouin'a (Sigma-Aldrich) przez 24 godziny. Następnie tkanki odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu etylowego według schematu: alkohol etylowy 50%, 60%, 70%, 80%, 90% (każdy 24 godziny w 4°C); alkohol etylowy 96% (3 godziny); alkohol etylowy 99,8% (3 x 1 godzina). Kolejnym etapem było umieszczenie jąder w ksylenie (2 x 30 minut) oraz przepojenie tkanek w parafinie histologicznej (Paraplast Plus; Sigma-Aldrich) w temperaturze 59°C (2 x 24 godziny). Tak przygotowane bloczki parafinowe krojono na mikrotomie (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Niemcy) na skrawki o grubości 5 μ m, które następnie naklejano na szkiełka podstawowe wcześniej pokryte APES-em (ang. *3-aminopropyltriethoxysilane*) (Sigma-Aldrich).

W celu oceny morfologicznej otrzymanych preparatów wykonano barwienie hematoksyliną i eozyną. Najpierw skrawki jąder odparafinowano w ksylenie (2 x 10 minut), a następnie uwodniono w malejącym gradiencie alkoholu etylowego: 99,8% (2 x 10 minut), 96%, 80%, 70% (każdy 5 minut). Następnie preparaty umieszczono w wodzie destylowanej (5 minut) i barwiono w roztworze hematoksyliny Mayer'a (Vector Laboratories), po czym nadmiar barwnika odpłukano w bieżącej wodzie (15 minut). W kolejnym etapie skrawki jąder przeprowadzono przez szereg alkoholi o wzrastających stężeniach: 50%, 70%, 80%, 90% (każdy 5 minut) i barwiono eozyną alkoholową (Bio Optica, Mediolan, Włochy). Wybarwione preparaty odwadniano dalej w 99,8% alkoholu etylowym (2 x 10 minut) oraz w ksylenie (2 x 10 minut), a na końcu zamykano w żelu DPX (Sigma Aldrich). Preparaty analizowano pod mikroskopem świetlnym Nikon Eclipse Ni (Nikon Instech Co., Tokio, Japonia) oraz sporządzono dokumentację fotograficzną.

3.7. Analiza immunohistochemiczna

Skrawki jąder najpierw odparafinowano poprzez umieszczenie w ksylenie (2 x 5 minut), a następnie uwodniono w malejących stężeniach alkoholu etylowego według schematu: alkohol etylowy 99,8% (2 x 5 minut), 96% (2 x 5 minut), 70% (5 minut), 50% (5 minut), na końcu płuczac w wodzie destylowanej (5 minut). W celu odsłonięcia determinant antygenowych preparaty zanurzono w 0,01 M buforze cytrynianowym (pH 6,0) oraz gotowano w kuchenie mikrofalowej (600W) przez 4 minuty. Po ostudzeniu preparaty płukano trzykrotnie w TBS. W kolejnym etapie skrawki inkubowano w 0,3% roztworze H₂O₂ w buforze TBS przez 15 minut w celu zahamowania aktywności endogennej peroksydazy, po czym płukano ponownie w TBS. Niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał blokowano poprzez inkubację skrawków z 5 – 15% surowicą kozią (NGS, ang. *normal goat serum*; Sigma-Aldrich) przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty inkubowano z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym (**Tabela 4**) przez 24 godziny w temperaturze 4°C. Kolejnego dnia szkiełka przepłukano w TBS oraz na skrawki nałożono kozie anty-królicze biotynylowane przeciwciało drugorzędowe (BA-1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) w rozcieńczeniu 1:400 i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. W celu amplifikacji sygnału, skrawki inkubowano z kompleksem awidyna-biotynylowana peroksydaza chrzanowa (VECTASTAIN

ABC/HRP Kit, Vector Laboratories) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym płukaniu preparatów w TBS, przeprowadzono barwną reakcję w roztworze zawierającym 0,05% 3,3'-diaminobenzydynę (DAB; ang. 3,3'-diaminobenzidine; Sigma-Aldrich) z dodatkiem 0,01% H₂O₂ i 0,07% imidazolu przez 2-5 minut, co pozwoliło na uwidocznienie miejsc wiązania przeciwciał. Po tym czasie preparaty umieszczono w wodzie destylowanej w celu zahamowania reakcji, po czym podbarwiono jądra komórkowe hematoksyliną Mayera przez 10 sekund. Następnie skrawki odwadniano stosując szereg alkoholi o wzrastającym stężeniu według procedury: alkohol etylowy 70% (5 minut), 96% (2 x 5 minut), 99,8% (2 x 5 minut), na końcu umieszczając w ksylenie (2 x 5 minut). Preparaty zamykano w żelu DPX. Dla każdego preparatu wykonano kontrolę negatywną reakcji immunohistochemicznej, w której przeciwciało pierwszorzędowe zastąpiono NGS. Preparaty analizowano pod mikroskopem świetlnym Nikon Eclipse Ni (Nikon Instech Co., Tokio, Japonia) oraz sporządzono dokumentację fotograficzną.

Tabela 4. Przeciwciała pierwszorzędowe stosowane w immunohistochemii (IHC) i immunofluorescencji (IF).

Przeciwciało	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent (nr katalogowy)
Anty-DLL1	Królicze poliklonalne	1:50 (IHC); 1:50 (IF)	Sigma-Aldrich (SAB2100593)
Anty-DLL4	Królicze poliklonalne	1:100 (IHC); 1:50 (IF)	Abcam (ab7280)
Anty-FSHR	Królicze poliklonalne	1:50 (IF)	BT Laboratory (BT-AP03380)
Anty-INHA	Królicze poliklonalne	1:50 (IHC); 1:50 (IF)	Thermo Fisher (PA5-13681)
Anty-JAG1	Królicze poliklonalne	1:100 (IF)	Thermo Fisher (PA5-72843)
Anty-HES1	Królicze poliklonalne	1:100 (IHC); 1:100 (IF)	Thermo Fisher (PA5-28802)
Anty-HEY1	Królicze poliklonalne	1:50 (IHC); 1:100 (IF)	Thermo Fisher (PA5-40553)
Anty-NIICD	Królicze poliklonalne	1:10 (IHC); 1:50 (IF)	Abcam (Ab8925)

3.8. Analiza immunofluorescencyjna

Komórki Sertoliego wyizolowane z jąder szczurów (PRSC) oraz komórki linii TM4 hodowano na okrągłych szkiełkach nakrywkowych umieszczonych w 24-dołkowych płytkach hodowlanych. Po zakończeniu eksperymentów opisanych w **rozdziale 3.3.2** komórki przepłukano w DPBS oraz utrwalono w metanolu (10 minut) i acetonie (7 minut) w temperaturze -20°C. Utrwalone preparaty inkubowano z 5 % roztworem surowicy NGS przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie prowadzono 24-godziną inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym w 4°C (**Tabela 4**). Po tym

czasie stosowano anty-królicze przeciwciało drugorzędowe sprzężone z Cy3 (1:200; Thermo Fisher Scientific) przez 60 minut. Na koniec preparaty inkubowano przez 7 minut w roztworze DAPI (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole*; Thermo Fisher Scientific) w celu uwidocznienia jąder komórkowych, a następnie zamknięto z wykorzystaniem medium Vectashield Vibrance (Vector Laboratories). Preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Nikon Eclipse Ni (Nikon Instech Co.) oraz sporządzono dokumentację fotograficzną.

Zarówno analizę immunohistochemiczną (**rozdział 3.7**), jak i immunofluorescencyjną (**rozdział 3.8**) poszczególnych białek przeprowadzono na preparatach we wszystkich grupach eksperymentalnych oraz kontrolnych w tych samych warunkach i czasie, co pozwoliło na porównanie intensywności sygnału pomiędzy grupami.

3.9. Testy immunoenzymatyczne

Pomiaru stężenia FSH dokonano z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego FSH ELISA Kit (nr kat. ELK1315; Elk Biotechnology, Wuhan, Hubei, China) zgodnie z zaleceniami producenta. Do dołków płytki opłaszczonej przeciwciałem anty-FSH nałożono po 50 µl osocza uzyskanego po zakończeniu doświadczenia (**Rozdział 3.1.2**). Do dołków służących oznaczeniom kalibracyjnym nałożono po 50 µl standardów. Do próbek i standardów dodano biotynylowane przeciwciało anty-FSH, a po godzinie inkubacji w temperaturze 37°C substancje niezwiązane zostały usunięte poprzez płukanie roztworem płuczącym (Wash Buffer). Następnie do dołków dodano koniugat streptawidyna-peroksydaza i inkubowano przez 30 minut w 37°C. Po tym czasie, powierzchnie dołków przepłukano pięciokrotnie. W celu wzbudzenia aktywności peroksydazy oraz otrzymania barwnego produktu, dodano substrat dla tego enzymu (TMB; 3,3',5,5'-tetrametylobenzidyna). Po 20 minutach inkubacji w 37°C reakcję zatrzymano (Stop Solution) i wykonano pomiar spektrofotometryczny z użyciem czytnika ELISA LT-4500 przy długości fali 450 nm. Stężenie FSH wyrażono w ng/ml. Czulość metody wynosiła 0,91 ng/ml.

Pomiaru stężenia cAMP dokonano z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego cAMP ELISA (nr kat. EIA-5204; DRG Diagnostics GmbH, Marburg, Niemcy) według zaleceń producenta. Do odpowiednich dołków nałożono po 50 µl standardów lub pożywki hodowlanej zebranej z komórek PRSC oraz TM4 po

zakończonym eksperymencie (**Rozdział 3.3.2.1**). Następnie do próbek i standardów dodano koniugat cAMP – peroksydaza, a później owcze przeciwciało anty-cAMP i inkubowano przez 2 godziny. Po tym czasie, niezwiązane substancje zostały usunięte poprzez płukanie roztworem płuczającym (Wash Buffer). W kolejnym kroku do dołków dodano substrat dla peroksydazy (TMB). Po 30 minutach inkubacji reakcję zatrzymano (Stop Solution) i wykonano pomiar spektrofotometryczny z użyciem czytnika ELISA LT-4500 przy długości fali 450 nm. Stężenie cAMP wyrażono w pmol/ml. Czułość metody wynosiła 0,64 pmol/ml.

3.10. Pomiar aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J

Względną ocenę aktywności szlaku sygnałowego Notch przeprowadzono w oparciu o pomiar aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J, który bierze udział w transdukcji w tym szlaku. Analizy wykonano z wykorzystaniem zestawu RBP-Jk Reporter Assay Kit (nr kat. 336841, GeneGlobe ID: CCS-014L; Qiagen, Hilden, Niemcy).

3.10.1. Analiza aktywności czynnika RBP-J po ekspozycji na FSH, 17 β -estradiol oraz antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780; G15)

Eksperyment wykonano na płytce 96-dołkowej. Do dołków dodano po 25 μ l roztworu odczynnika do transfekcji (1 μ l Lipofectamine RNAiMAX : 24 μ l Opti-MEM) oraz 100 ng reportera RBP-Jk w 25 μ l pożywki OptiMEM.

W skład mieszaniny reportera RBP-Jk (**Rycina 11A**) wchodzi:

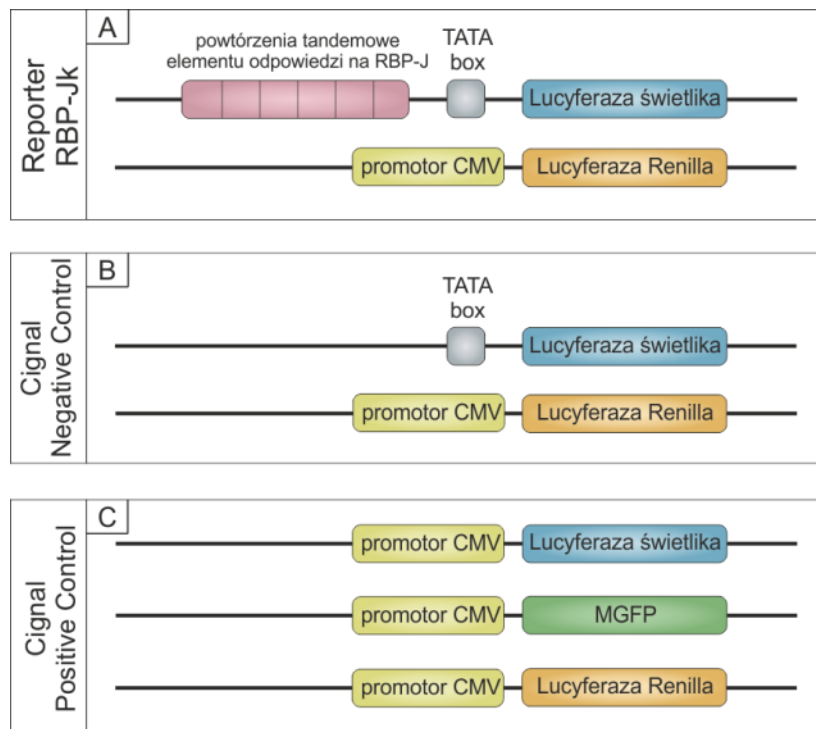
- indukowalny konstrukt odpowiadający na czynnik transkrypcyjny RBP-J (koduje gen reporterowy lucyferazy świetlika pod kontrolą promotora zawierającego sekwencję TATA box oraz powtórzenia tandemowe elementu odpowiedzi na RBP-J),
- konstrukt konstytutywnej ekspresji lucyferazy *Renilla* (koduje gen reporterowy lucyferazy *Renilla* pod kontrolą promotora CMV (ang. *cytomegalovirus*); konstrukt stanowi kontrolę wewnętrzną dla normalizacji wydajności transfekcji i monitorowania żywotności komórek).

Dodatkowo wykonano próby kontrolne poprzez dodanie do dołków po 25 μ l roztworu odczynnika do transfekcji oraz 25 μ l pożywki Opti-MEM zawierającej:

- 100 ng Cignal Negative Control (**Rycina 11B**) (mieszanina nieindukowalnego konstruktów kodujących lucyferazę świetlika pod kontrolą TATA box bez

elementu odpowiedzi na RBP-J oraz konstruktów konstytutywnej ekspresji lucyferazy *Renilla*) – kontrola negatywna,

- 100 ng Cignal Positive Control (**Rycina 11C**) (mieszanka konstruktów konstytutywnej ekspresji: GFP (ang. *green fluorescent protein*), lucyferazy świetlika oraz lucyferazy *Renilla*, będących pod kontrolą promotora CMV) – kontrola pozytywna.



Rycina 11. Schemat przedstawiający budowę reporterów wykorzystanych do oceny aktywności czynnika RBP-J.

MGFP - białko zielonej fluorescencji.

Po 20 minutach inkubacji płytki w temperaturze pokojowej, komórki TM4 wysiano po 40 000 na dołek w 100 μ l pożywki OptiMEM i inkubowano przez 16 godzin w standardowych warunkach. Następnie wymieniono pożywkę na DMEM/F-12, a po 24 godzinach od wysiania komórek dodano odpowiednio: FSH; 17β -estradiol; ICI 182,780; G15; ICI 182,780 + 17β -estradiol; lub G15 + 17β -estradiol. Po 18 godzinach inkubacji z wymienionymi związkami analizowano poziom luminescencji.

Analizę luminescencji w układzie reporterowym lucyferazy wykonano z użyciem testu Promega Dual-Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA). Dla każdej próbki najpierw mierzono aktywność lucyferazy świetlika, a następnie aktywność lucyferazy *Renilla* w aparacie TECAN Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Szwajcaria). Poziom ekspresji lucyferazy świetlika normalizowano do

poziomu ekspresji kontrolnego genu reporterowego – lucyferazy *Renilla*. Otrzymany współczynnik luminescencji lucyferazy świetlika do luminescencji lucyferazy *Renilla* porównano z kontrolą, dla której przyjęto wartość 1.

3.10.2. Analiza aktywności czynnika RBP-J po wyciszeniu ekspresji FSHR, ER α , ER β i GPER

Eksperyment wykonano na płytce 96-dołkowej. Do dołków dodano po 25 μ l roztworu odczynnika do transfekcji. Następnie dodano 100 ng reportera RBP-Jk oraz 2 pmole specyficznego siRNA (FSHR siRNA, ER α siRNA, ER β siRNA lub GPER siRNA; **Tabela 1**) w 25 μ l pożywki OptiMEM.

Wykonano również zalecane kontrole poprzez dodanie do dołków odczynnika do transfekcji oraz pożywki Opti-MEM zawierającej:

- 2 pmole Silencer™ Select Negative Control No. 1 oraz 100 ng reportera RBP-Jk – kontrola negatywna,
- 2 pmole specyficznego siRNA (j.w.) oraz 100 ng Cignal Negative Control – kontrola negatywna,
- 2 pmole Silencer™ Select Negative Control No. 1 oraz 100 ng Cignal Negative Control – kontrola negatywna,
- 1 μ L Cignal Positive Control – kontrola pozytywna.

Po 20 minutach inkubacji płytki w temperaturze pokojowej, komórki TM4 wysiano po 40 000 na dołek w 100 μ l pożywki OptiMEM i inkubowano przez 16 godzin w standardowych warunkach. Po tym czasie wymieniono pożywkę na DMEM/F-12 i dodano odpowiednio FSH lub 17 β -estradiol. Po 24 godzinach inkubacji z wymienionymi związkami analizowano poziom luminescencji z wykorzystaniem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) według procedury opisanej powyżej (**rozdział 3.9.1**).

3.11. Immunoprecypitacja chromatyny

Metoda immunoprecypitacji chromatyny została wykorzystana w celu oceny zmian interakcji czynnika RBP-J z regionami promotorowymi genów efektorowych szlaku Notch, *Hes1* i *Hey1* w odpowiedzi na aktywację lub inhibicję sygnalizacji estrogenowej.

Do analizy wykorzystano komórki TM4, które wysiano na płytce 6-dołkowe w zagęszczeniu $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ i hodowano w pożywce DMEM/F-12 do osiągnięcia 95% konfluencji. Po 24 godzinach komórki traktowano 1 nM 17 β -estradiolem lub nośnikiem

(DMSO, 0,01%) i inkubowano przez 24 godziny. Po tym czasie przeprowadzono immunoprecypitację chromatyny z wykorzystaniem EZ-Magna ChIP Kit (nr kat. 17-10086; Sigma-Aldrich) według zaleceń producenta. Do komórek dodano 1% formaldehyd (Sigma-Aldrich), w celu utrwalenia wiązania białek z DNA (tzw. *cross-link*) i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym dodano 200 μ l glicyny (0,125 M) w celu neutralizacji pozostałego formaldehydu. Po przepłukaniu dołków, zebrano komórki w DPBS z dodatkiem inhibitorów proteaz (1X Protease Inhibitor Cocktail II) i wirowano przez 5 minut w 4°C (800 x g). Następnie komórki poddano trawieniu w buforze lizującym (Cell Lysis Buffer) przez 15 minut na lodzie i zawieszono w buforze do lizy jąder komórkowych (Nuclear Lysis Buffer) w obecności inhibitorów proteaz. W kolejnym etapie komórki sonikowano na lodzie według schematu: 6 razy po 30 sekund z 10-sekundową przerwą przy maksymalnych ustawieniach sonikatora (Bandelin Sonopuls; BANDELIN Electronic GmbH, Berlin, Niemcy) w celu uzyskania fragmentów chromatyny o wielkości 200-1000 bp. Na podstawie rozdziału elektroforetycznego w 1,5% - 2,0% żelu agarozowym potwierdzono obecność fragmentów DNA o odpowiednich długościach. Po sonifikacji komórki wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C (10 000 x g).

Tak otrzymany supernatant (50 μ l) rozcieńczono w 450 μ l buforu (ChIP Dilution Buffer) z dodatkiem inhibitorów proteaz, z którego 5 μ l (1%) przeniesiono do nowych probówek i zachowano do dalszych analiz (INPUT, wyjściowa ilość chromatyny). Następnie do probówek z supernatantem dodano po 20 μ l kulek magnetycznych (Magnetic Protein A/G Beads) oraz przeciwciała:

- królicze poliklonalne anty-RBP-J (10 μ g/ml, AB5790; Merck Millipore);
- mysie anty-IgG (2 μ g/ml; 12-371B; Sigma-Aldrich) – kontrola negatywna,
- anty-polimeraza RNA (2 μ g/ml; 05-623B; Sigma Aldrich) – kontrola pozytywna.

Próbki inkubowano w rotorze przez 3 godziny w temperaturze 4°C. Po tym czasie kompleksy kulki magnetyczne/przeciwciało/chromatyna przepłukano kolejno w 300 μ l buforów płuczących: o niskiej (Low Salt Wash Buffer) oraz wysokiej zawartości soli (High Salt Wash Buffer), z dodatkiem chlorku litu (LiCl Wash Buffer) oraz buforze Tris/EDTA (TE Buffer). Kulki magnetyczne przed oraz po każdym płukaniu oddzielano od supernatantu przy użyciu magnetycznego separatora Magna GrIP RackPo (Merck Millipore). W kolejnym etapie kulki magnetyczne zawieszono w 100 μ l buforu elucyjnego (ChIP Elution Buffer) z dodatkiem proteiny K (1 μ l) i inkubowano w rotorze przez 2 godziny w temperaturze 62°C, a następnie przez 10 minut w 95°C.

Pozwoliło to na uwolnienie wcześniej związanego z przeciwciałem DNA do roztworu (tzw. *reverse cross-link*) oraz umożliwiło usunięcie kulek magnetycznych za pomocą separatora. Następnie DNA oczyszczono metodą kolumnową z wykorzystaniem zestawu QIAquick DNA purification Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) według zaleceń producenta.

W celu ilościowej oceny DNA uzyskanego na drodze immunoprecypitacji chromatyny, zastosowano PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) według opisanej wcześniej procedury w **rozdziale 3.5**. Reakcję przeprowadzono z wykorzystaniem starterów komplementarnych do regionów promotorowych badanych genów, obejmujących motywy wiążące RBP-J (Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk): dla *Hes1* starter przedni GCGGCGGCAATAAAACATCC i starter wsteczny AGCTGCAGTTTGACATCAGC (wielkość produktu 79 bp) (Noguchi i wsp. 2019) oraz dla *Hey1* starter przedni AAAACAAGTGCTCCCCTTCC i starter wsteczny CATGCAGCCAGACTCGTTTC (wielkość produktu 96 bp) (Morikawa i wsp. 2011).

Do oceny różnic w ilościach przyłączonych fragmentów regionów promotorowych badanych genów, które uzyskano w procesie immunoprecypitacji w poszczególnych próbkach, wykorzystano metodę % wyjściowej ilości chromatyny (% INPUT) (Lin i wsp. 2012). Otrzymany % wyjściowej ilości chromatyny w grupach docelowych porównano dodatkowo z kontrolą negatywną IgG.

3.12. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). W celu sprawdzenia normalności rozkładu stosowano test Shapiro-Wilka, a do sprawdzenia jednorodności wariancji wykorzystano test Levene'a. Wyniki poddano: i) jednokierunkowej analizie wariancji (ANOVA), a następnie testowi post-hoc Tukeya lub Dunnetta albo ii) nieparametrycznym testom Kruskala-Wallisa lub U-Manna Whitneya. Rodzaj testu zastosowanego w poszczególnych analizach podano w opisach wyników (**rozdział 4**). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD). Jako wartość istotnie statystyczną przyjęto $P < 0,05$.

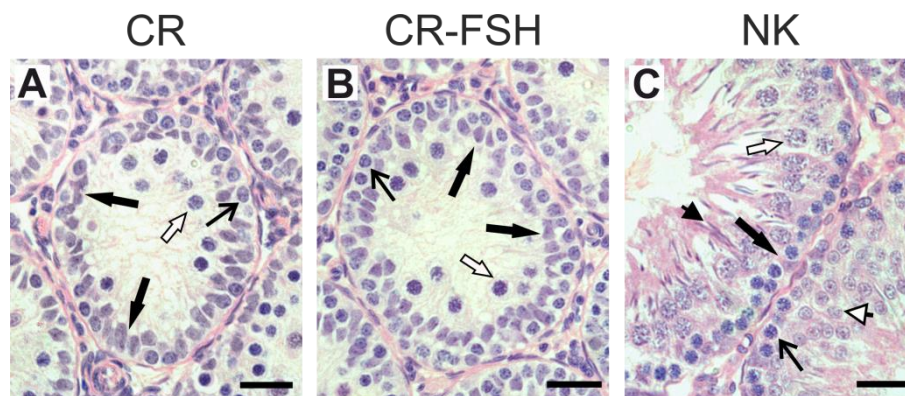
4. WYNIKI

4.1. Rola FSH w kontroli aktywności i ekspresji komponentów szlaku Notch w gonadzie męskiej gryzoni

4.1.1. Wpływ FSH na ekspresję komponentów szlaku Notch w jądrze szczura w okresie dojrzewania płciowego

W celu wyjaśnienia udziału FSH w regulacji szlaku sygnałowego Notch w gonadzie męskiej wykorzystano 4-tygodniowe szczury, u których produkcja gonadotropin została zahamowana poprzez ekspozycję na cetroreliks (CR). Następnie w jednej z grup doświadczalnych zastosowano suplementację FSH w ostatnich 3 dniach eksperymentu (CR-FSH). Dla porównania do analiz wykorzystano szczury, otrzymujące wyłącznie iniekcje nośnika (NK).

Redukcja wydzielania gonadotropin spowodowała zahamowanie postępu spermatogenezy i w konsekwencji zmniejszenie masy jąder (grupa CR $0,12 \pm 0,02$ g vs grupa NK $1,20 \pm 0,04$ g; $P < 0,001$; test U-Manna Whitneya). W jądrach szczurów CR oraz CR-FSH stwierdzono brak pomejotycznych komórek plemnikotwórczych (**Tablica 1A, B**), natomiast postęp spermatogenezy do stadium wydłużonych spermatyd obserwowano u osobników z grupy NK (**C**).

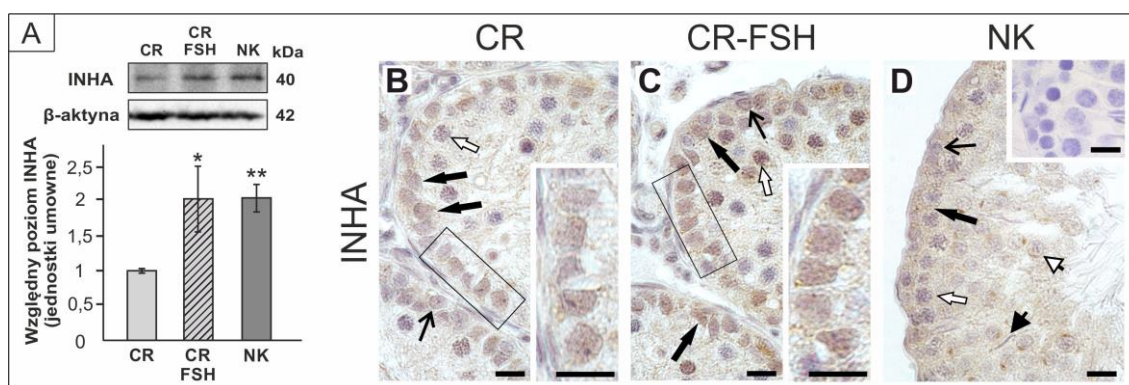


Tablica 1. Morfologia jąder szczurów w okresie dojrzewania płciowego po ekspozycji na cetroreliks (CR; A), cetroreliks i FSH (CR-FSH; B) lub 0,9% NaCl (NK; C). Barwienie hematoksylina/eozyna; czarne strzałki – komórki Sertoliego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatocyty, białe groty – spermatydy okrągłe, czarne groty – spermatydy wydłużone; skala = 25 μ m.

Skuteczność stymulacji komórek Sertoliego przez zastosowane stężenie i czas ekspozycji na FSH potwierdziły wyniki analizy ekspresji podjednostki α inhibiny (INHA), wskazujące na wyraźny wzrost poziomu tego białka w jądrach szczurów CR-FSH, w porównaniu do grupy CR (**Tablica 2A**; $P < 0,05$). Poziom ekspresji INHA

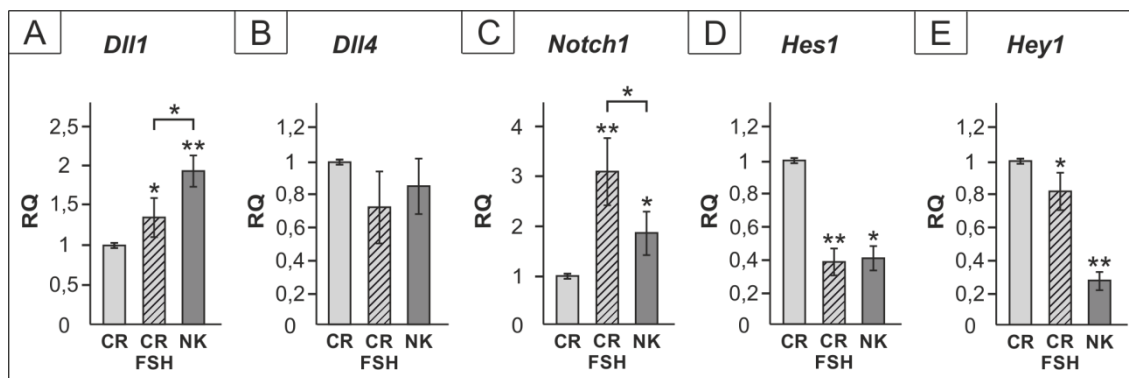
w jądrach szczurów z grupy NK był porównywalny do poziomu w jądrach szczurów CR-FSH.

Barwienie immunohistochemiczne uwidocznilo pozytywny sygnał dla białka INHA w jądrach szczurów CR, który zlokalizowany był głównie w komórkach Sertoliego, ale także w spermatogoniach i spermatocytach (**Tablica 2B**). Po ekspozycji na FSH obserwowano wzrost intensywności reakcji zwłaszcza w komórkach Sertoliego (**C**). W jądrach szczurów z grupy NK immunoreakcję INHA stwierdzono głównie w przypadkowym rejonie nabłonka plemnikotwórczego (**D**). Brak pozytywnej reakcji immunohistochemicznej dla tego białka notowano w kontroli negatywnej (**wstawka w D**).



Tablica 2. Ekspresja białka INHA (A) oraz jego immunohistochemiczna lokalizacja (B-D) w jądrach szczurów po ekspozycji na cetroreliks (CR), cetroreliks i FSH (CR-FSH) lub 0,9% NaCl (NK). (A) Analiza western blot ekspresji białka INHA oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; n = 6/każda grupa, $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (test Tukeya). (B-D) Lokalizacja INHA w jądrach szczurów grup: CR (B), CR-FSH (C) oraz NK (D). Wstawki w B i C przedstawiają zaznaczony fragment nabłonka plemnikotwórczego w powiększeniu. Czarne strzałki – komórki Sertoliego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatocyty, białe grotty – spermatydy okrągłe, czarne grotty – spermatydy wydłużone; kontrola negatywna – wstawka w D; skala = 10 μ m.

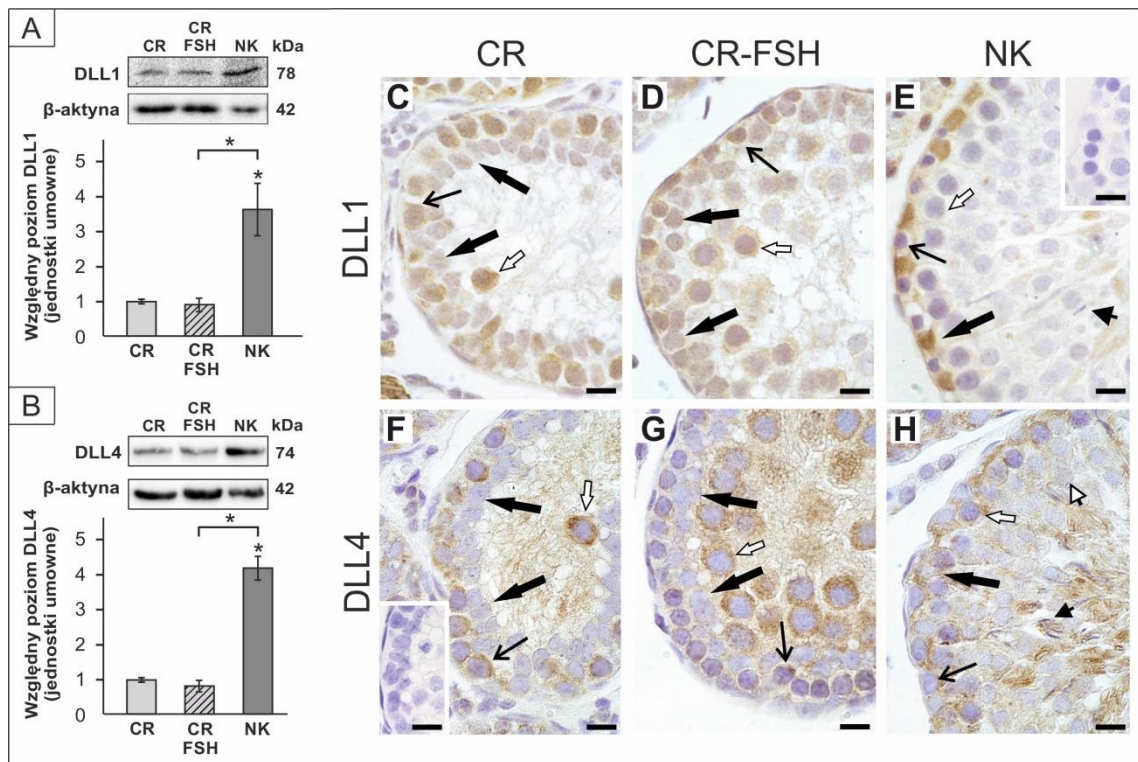
Analiza RT-qPCR wykazała wzrost ekspresji mRNA *Dll1* i *Notch1* (**Tablica 3A, C**; $P < 0,05$; $P < 0,01$), a spadek poziomu mRNA *Hes1* i *Hey1* w jądrach szczurów CR-FSH w porównaniu do szczurów CR (**D, E**; $P < 0,05$; $P < 0,01$). Również w jądrach szczurów NK otrzymujących sam nośnik, ekspresja mRNA *Dll1* i *Notch1* była wyższa, a ekspresja mRNA *Hes1* i *Hey1* niższa niż w gonadach szczurów CR (**A, C-E**). Pomiędzy grupami nie stwierdzono natomiast różnic ekspresji mRNA *Dll4* (**B**).



Tablica 3. Ekspresja mRNA *Dll1* (A), *Dll4* (B), *Notch1* (C), *Hes1* (D) i *Hey1* (E) w jądrach szczurów w okresie dojrzewania płciowego po ekspozycji na cetroreliks (CR), cetroreliks i FSH (CR-FSH) lub 0,9% NaCl (NK). (A-E) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Dll1*, *Dll4*, *Notch1*, *Hes1* i *Hey1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*), RQ - względna liczba kopii genu; n = 6/każda grupa, $\bar{x} \pm SD$, *P < 0,05; **P < 0,01 (test Tukeya, test Kruskala-Wallisa).

Wyniki analizy western blot nie wykazały zmian ekspresji białek DLL1 i DLL4 w jądrach szczurów CR w odpowiedzi na podanie FSH (**Tablica 4A, B**). Poziom obydwu białek był wyraźnie wyższy w jądrach szczurów z grupy NK niż u osobników CR-FSH i CR (P < 0,05).

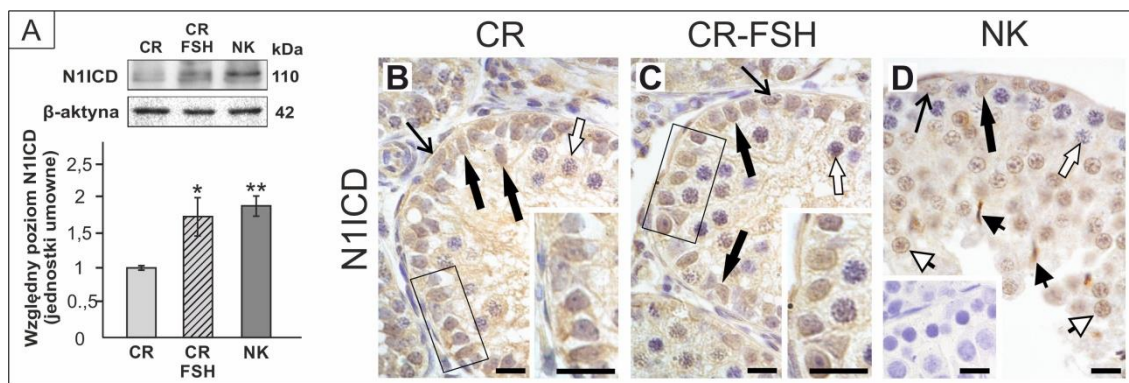
Analiza immunohistochemiczna uwidoczniała w jądrach szczurów CR pozytywną reakcję na obecność białek DLL1 oraz DLL4, która zlokalizowana była głównie w komórkach plemnikotwórczych: spermatogoniach oraz spermatocytach; słabszy sygnał był widoczny w komórkach Sertoliego (**Tablica 4C, F**). Po zastosowaniu FSH nie stwierdzono wyraźnych zmian intensywności sygnału DLL1 oraz DLL4 (**D, G**). Wyższą intensywność reakcji immunohistochemicznej zarówno DLL1, jak i DLL4 wykazywały komórki Sertoliego szczurów z grupy NK (**E, H**). W jądrach tych szczurów stwierdzono dodatkowo intensywną immunoreakcję na obecność białek DLL1 i DLL4 w wydłużonych spermatydach. W kontroli negatywnej notowano brak sygnału dla tych białek (**wstawki w E i F**).



Tablica 4. Ekspresja (A, B) oraz immunohistochemiczna lokalizacja (C-H) białek DLL1 (A, C-E) i DLL4 (B, F-H) w jądrach szczurów po ekspozycji na cetroreliks (CR), cetroreliks i FSH (CR-FSH) lub 0,9% NaCl (NK). (A, B) Analiza western blot ekspresji białek DLL1 i DLL4 oraz histogramy przedstawiające ich poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; $n = 6$ /każda grupa, $x \pm SD$, $*P < 0,05$ (test Kruskala-Wallis). (B-F) Lokalizacja DLL1 i DLL4 w jądrach szczurów grup: CR (B, F), CR-FSH (D, G) oraz NK (E, H). Czarne strzałki – komórki Sertoliego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatocyty, białe groty – spermatydy okrągłe, czarne groty – spermatydy wydłużone; kontrola negatywna – wstawki w E i F; skala = 10 μ m.

Analiza western blot wykazała wzrost ekspresji aktywnej formy białka Notch1 (N1ICD) w jądrach szczurów CR-FSH w porównaniu do szczurów CR (**Tablica 5A**; $P < 0,05$). W jądrach szczurów CR-FSH poziom N1ICD osiągnął poziom zbliżony do wykazanego w jądrach osobników grupy NK.

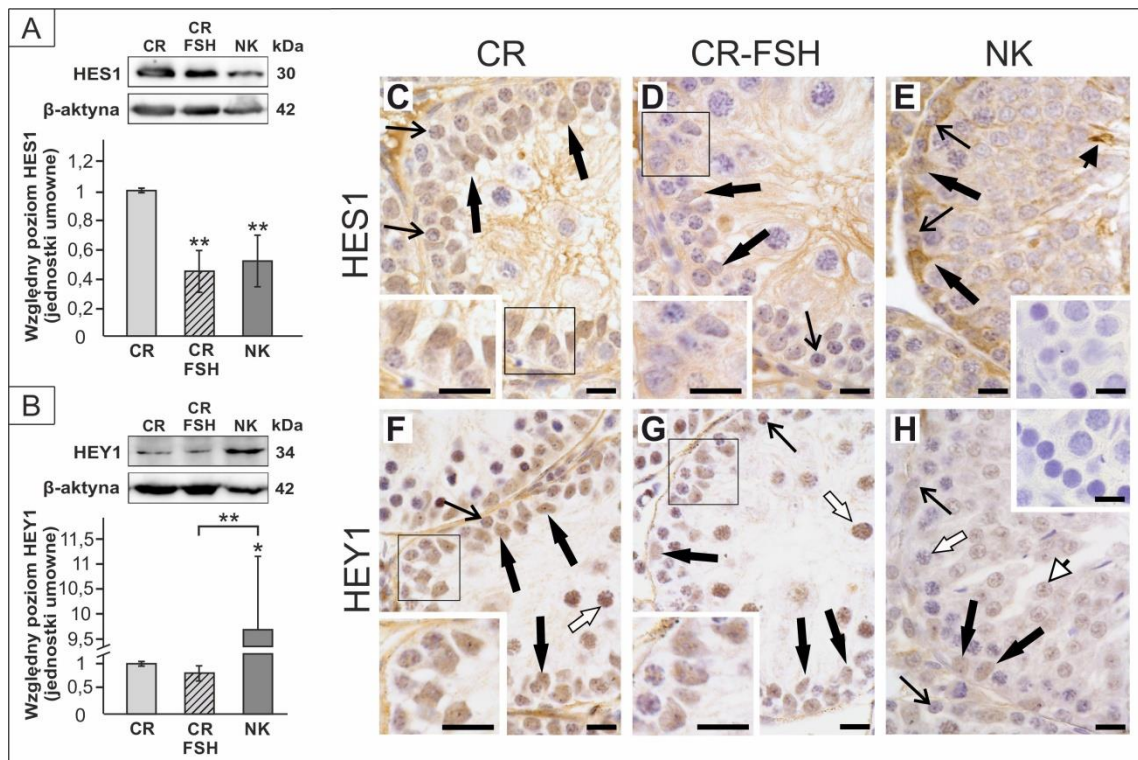
W jądrach szczurów CR uwidoczniło się pozytywną, głównie jądrową reakcję immunohistochemiczną potwierdzającą obecność N1ICD w komórkach Sertoliego oraz w komórkach plemnikotwórczych: spermatogoniach i spermatocytach (**Tablica 5B**). Po ekspozycji na FSH widoczny był wzrost intensywności reakcji (**C**). W jądrach szczurów z grupy NK dodatkowo obserwowano pozytywny sygnał dla N1ICD w okrągłych i wydłużonych spermatydach (**D**), które nie były obecne w pozostałych grupach eksperymentalnych. Brak reakcji dla tego białka notowano w kontroli negatywnej (**wstawka w D**).



Tablica 5. Ekspresja aktywnej formy białka Notch1 (N1ICD; A) oraz jego immunohistochemiczna lokalizacja (B-D) w jądrach szczurów po ekspozycji na cetroreliks (CR), cetroreliks i FSH (CR-FSH) lub 0,9% NaCl (NK). (A) Analiza western blot ekspresji białka N1ICD oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β-aktyny; n = 6/każda grupa, $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (test Tukeya). (B-D) Lokalizacja N1ICD w jądrach szczurów grup: CR (B), CR-FSH (C) oraz NK (D). Wstawki w B i C przedstawiają zaznaczony fragment nabłonka plemnikotwórczego w powiększeniu. Czarne strzałki – komórki Sertoliego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatocyty, białe groty – spermatydy okrągłe, czarne groty – spermatydy wydłużone; kontrola negatywna – wstawka w D; skala = 10 μm.

W wyniku przeprowadzonej analizy western blot wykazano spadek poziomu białka HES1 w jądrach szczurów CR-FSH w porównaniu do szczurów CR (Tablica 6A; $P < 0,01$). Poziom ten był zbliżony do stwierdzonego z jądrach szczurów z grupy NK. Zastosowanie FSH nie miało istotnego wpływu na ekspresję białka HEY1 w porównaniu do szczurów CR (B). Ekspresja tego białka w gonadzie szczurów otrzymujących sam nośnik (NK) była znacznie wyższa niż w obu grupach traktowanych cetroreliksiem ($P < 0,05$; $P < 0,01$).

Immunoekspresję białek HES1 i HEY1 stwierdzono w komórkach Sertoliego oraz w komórkach plemnikotwórczych: HES1 przede wszystkim w spermatogoniach, a HEY1 w spermatogoniach i spermatocytach (Tablica 6C-H). Sygnał białka HES1 widoczny był w jądrach i cytoplazmie komórek, natomiast białko HEY1 wykazywało lokalizację jądrową. Po ekspozycji na FSH nastąpił spadek intensywności sygnału obu badanych białek, widoczny przede wszystkim w komórkach Sertoliego (D, G) w porównaniu do osobników CR (C, F). W jądrach szczurów z grupy NK immunoekspresję HES1 wykazywały dodatkowo spermatydy wydłużone, a w przypadku białka HEY1 sygnał widoczny był także w spermatydach okrągłych (E, H). W kontroli negatywnej notowano brak pozytywnego sygnału dla tych białek (wstawki w E i H).

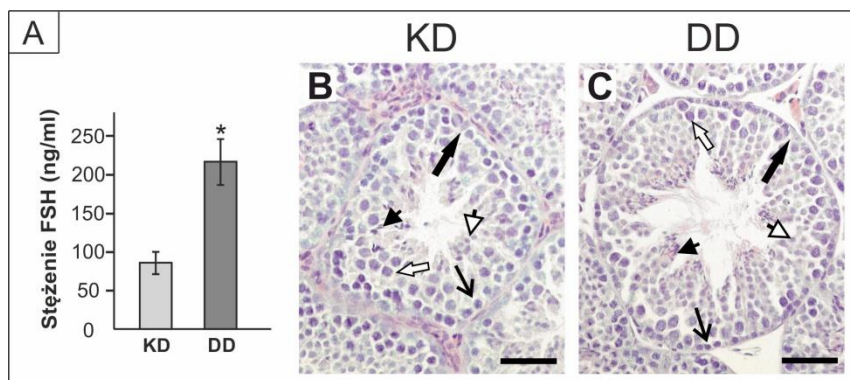


Tablica 6. Ekspresja (A, B) oraz immunohistochemiczna lokalizacja (C-H) białek HES1 (A, C-E) i HEY1 (B, F-H) w jądrach szczurów po ekspozycji na cetroreliks (CR), cetroreliks i FSH (CR-FSH) lub 0,9% NaCl (NK). (A, B) Analiza western blot ekspresji białek HES1 i HEY1 oraz histogramy przedstawiające ich poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; $n = 6$ /każda grupa, $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (test Kruskala-Wallis). (B-F) Lokalizacja HES1 i HEY1 w jądrach szczurów grup: CR (B, F), CR-FSH (D, G) oraz NK (E, H). Wstawki w C, D, F i G przedstawiają zaznaczony fragment nabłonka plemnikotwórczego w powiększeniu. Czarne strzałki – komórki Sertoliego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatocyty, białe grotki – spermatydy okrągłe, czarne grotki – spermatydy wydłużone; kontrola negatywna – wstawki w E i H; skala = 10 μ m.

4.1.2. Wpływ FSH na ekspresję komponentów szlaku Notch w jądrze nornicy rudej

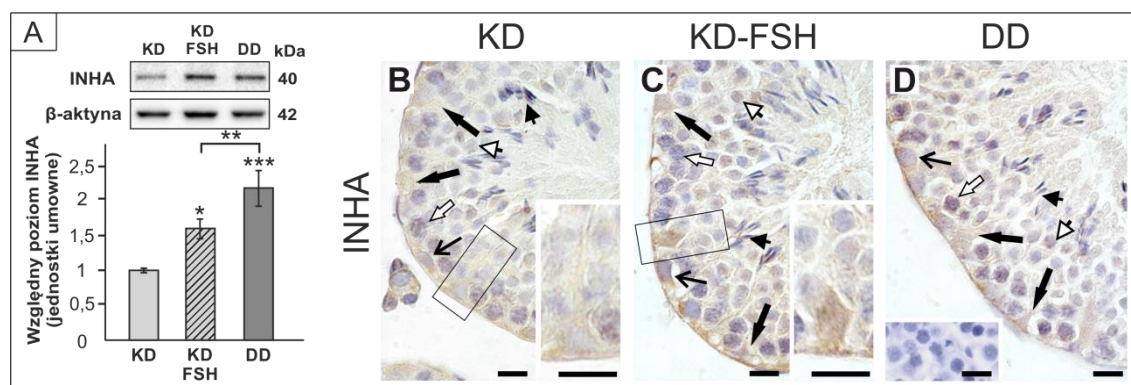
Drugim modelem doświadczalnym, wykorzystanym w celu wyjaśnienia roli FSH w kontroli szlaku Notch w nabłonku plemnikotwórczym, były samce nornicy rudej – gryzonia o rozrodzie sezonowym, u którego aktywność osi podwzgórze-przysadka-gonady jest zależna głównie od długości fotoperiodu.

Aby wywołać fizjologiczny niedobór gonadotropin, samce nornicy rudej były hodowane przez 3 miesiące w warunkach krótkiego fotoperiodu (grupa KD). W osoczu tych samców wykazano istotnie niższe stężenie FSH w porównaniu do osobników utrzymywanych w warunkach długiego fotoperiodu (grupa DD) (Tablica 7A; $P < 0,05$). W jądrach nornic KD w części kanalików nasiennych zaobserwowano zmniejszenie światła i wysokości nabłonka plemnikotwórczego w porównaniu z samcami DD (B, C).



Tablica 7. Stężenie FSH w osoczu krwi (A) oraz morfologia jąder (B-C) nornic hodowanych w warunkach krótkiego fotoperiodu (KD) lub długiego fotoperiodu (DD). (A) Stężenie FSH porównano względem nornic DD; n = 10 każda grupa, $x \pm SD$, * $P < 0,05$ (test U-Manna Whitneya) (B-C) Barwienie hematoksylina/eozyna w jądrach nornic grup: KD (B) oraz DD (C). Czarne strzałki – komórki Sertoliego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatoocyty, białe grotty – spermatozydy okrągłe, czarne grotty – spermatozydy wydłużone; skala = 100 μm.

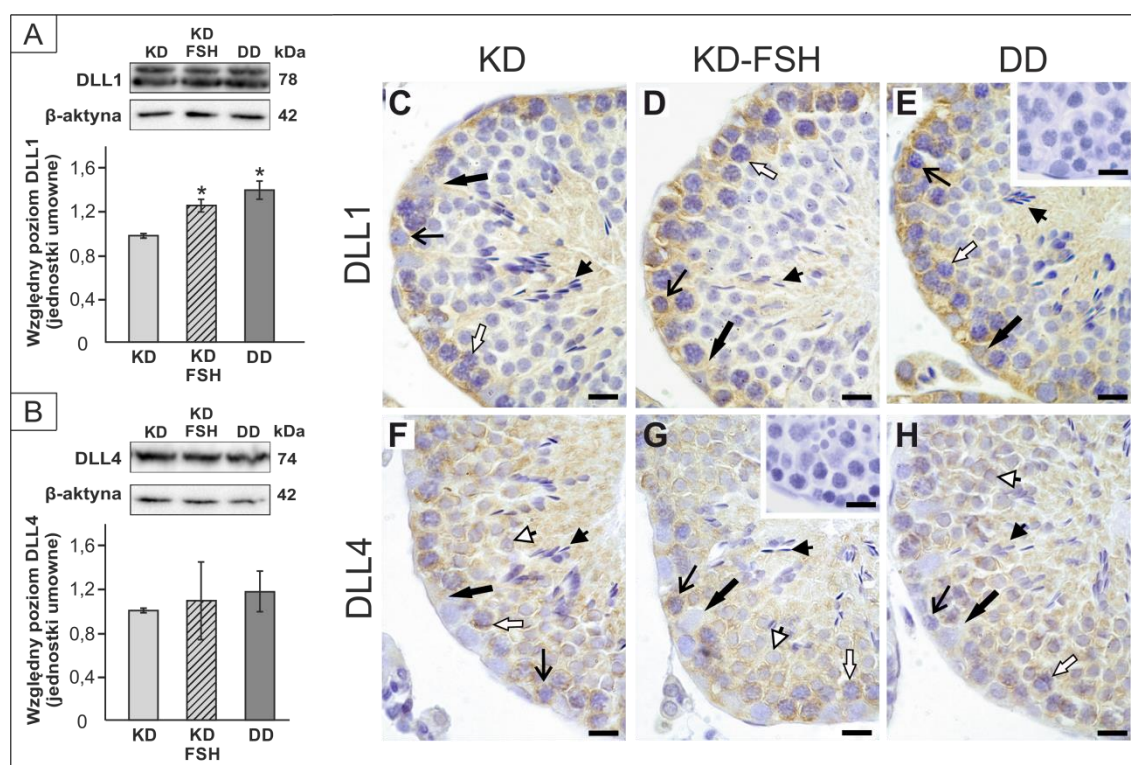
Część samców hodowanych w warunkach dnia krótkiego otrzymała substytucję FSH przez 5 dni (grupa KD-FSH). W oparciu o wyniki analizy ekspresji podjednostki α inhibiny (INHA) potwierdzono skuteczność zastosowanej stymulacji FSH (Tablica 8A). Wykazano wzrost poziomu białka INHA w jądrach nornic KD po ekspozycji na FSH w porównaniu do nornic z grupy KD ($P < 0,05$).



Tablica 8. Ekspresja białka INHA (A) oraz jego immunohistochemiczna lokalizacja (B-D) w jądrach nornic hodowanych w warunkach: krótkiego fotoperiodu (KD), krótkiego fotoperiodu z ekspozycją na FSH (KD-FSH) lub długiego fotoperiodu (DD). (A) Analiza western blot ekspresji białka INHA oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; n = 10/każda grupa, $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (test Tukeya). (B-D) Lokalizacja INHA w jądrach nornic grup: KD (B), KD-FSH (C) oraz DD (D). Wstawki w B i C przedstawiają zaznaczony fragment nabłonka plemnikotwórczego w powiększeniu. Czarne strzałki – komórki Sertoliego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatoocyty, białe grotty – spermatozydy okrągłe, czarne grotty – spermatozydy wydłużone; kontrola negatywna – wstawka w D; skala = 10 μm.

Analiza immunohistochemiczna wykazała ekspresję INHA głównie w komórkach Sertoliego oraz w komórkach plemnikotwórczych nornicy rudej (**Tablica 8B-D**). Po ekspozycji nornic KD na FSH wykazano wzrost intensywności reakcji w komórkach Sertoliego (**C**), który osiągnął poziom porównywalny do obserwowanego w jądrach nornic DD (**D**). U samców DD wyraźny sygnał widoczny był dodatkowo w spermatocytach (**B-D**). Brak reakcji dla tego białka notowano w kontroli negatywnej (**wstawka w D**).

Analiza western blot wykazała wzrost ekspresji białka DLL1 w jądrach nornic KD-FSH do poziomu obserwowanego u nornic DD (**Tablica 9A**; $P < 0,05$). Natomiast nie stwierdzono zmian w poziomie DLL4 po ekspozycji nornic KD na FSH (**B**). Poziom ekspresji DLL4 w jądrach nornic z grup KD i DD był zbliżony (**B**).

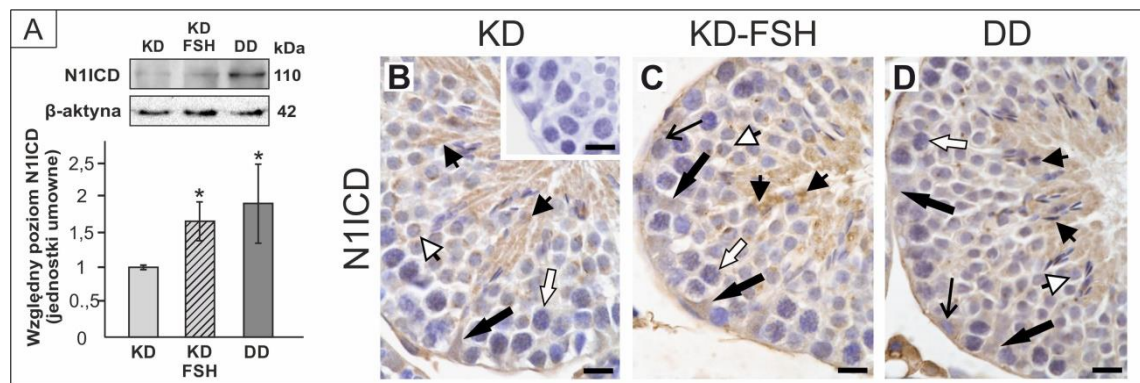


Tablica 9. Ekspresja (A, B) oraz immunohistochemiczna lokalizacja (C-H) białek DLL1 (A, C-E) i DLL4 (B, F-H) w jądrach nornic hodowanych w warunkach: krótkiego fotoperiodu (KD), krótkiego fotoperiodu z ekspozycją na FSH (KD-FSH) lub długiego fotoperiodu (DD). (A, B) Analiza western blot ekspresji białek DLL1 i DLL4 oraz histogramy przedstawiające ich poziom znormalizowany względem poziomu β-aktyny; n = 10/każda grupa, $x \pm SD$, * $P < 0,05$ (test Kruskala-Wallisa). (C-H) Lokalizacja DLL1 i DLL4 w jądrach nornic grup: KD (C, F), KD-FSH (D, G) oraz DD (E, H). Czarne strzałki – komórki Sertoliego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatocyty, białe grotki – spermatydy okrągłe, czarne grotki – spermatydy wydłużone; kontrola negatywna – wstawka w E i G; skala = 10 μm .

W nabłonku nasiennym nornic immunoekspresję białek DLL1 i DLL4 stwierdzono w komórkach Sertoliego oraz w komórkach plemnikotwórczych: DLL1 w spermatogoniach i spermatocytach, natomiast DLL4 także w okrągłych i wydłużonych spermatydach (**Tablica 9C-H**). Po ekspozycji nornic KD na FSH obserwowano niewielki wzrost intensywności reakcji DLL1 w przypadkowej części kanalika (**D**), który był porównywalny do intensywności sygnału w jądrach nornic DD (**E**). Intensywność i lokalizacja barwienia na obecność DLL4 była podobna we wszystkich badanych grupach (**F-H**). W kontroli negatywnej notowano brak sygnału dla tych białek (**wstawki w E i G**).

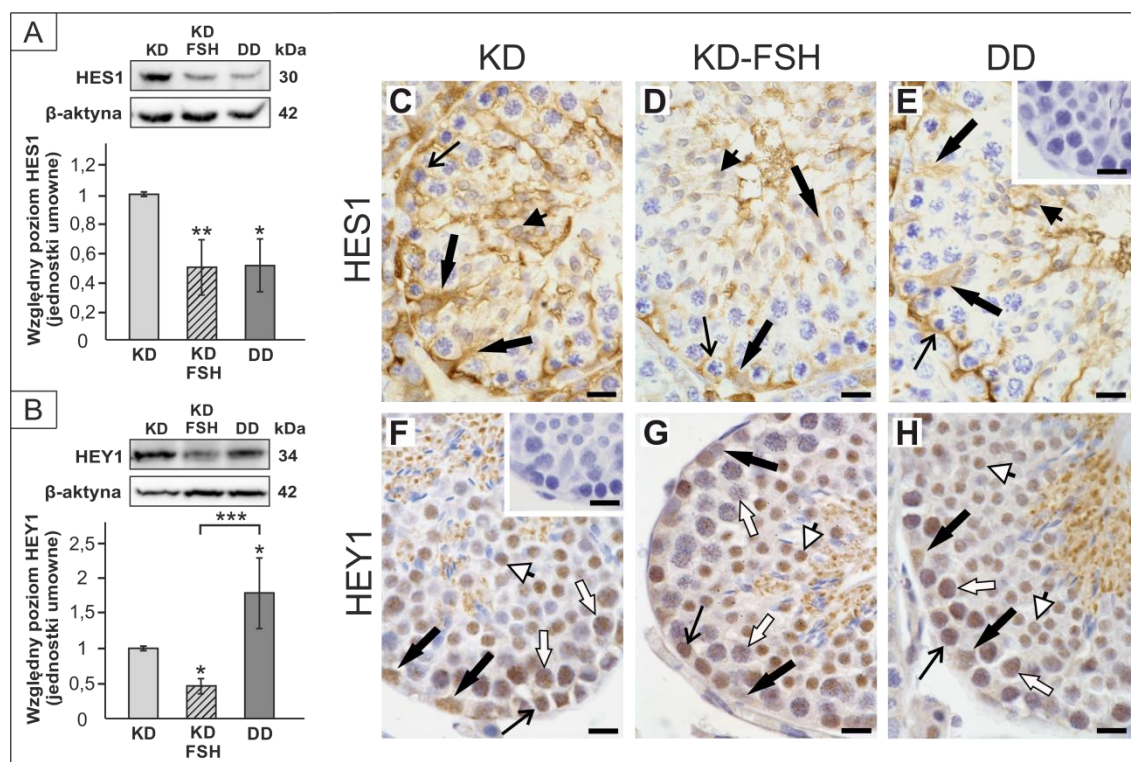
Wyniki analizy western blot wykazały wzrost ekspresji aktywnej formy białka Notch1 (N1ICD) w jądrach nornic KD po ekspozycji na FSH (**Tablica 10A**; $P < 0,05$). Ekspresja ta osiągnęła poziom porównywalny z osobnikami DD ($P < 0,05$).

Immunoekspresję N1ICD wykazano we wszystkich grupach nornic w komórkach Sertoliego oraz komórkach plemnikotwórczych: głównie w spermatogoniach i spermatydach wydłużonych (**Tablica 10B-D**). Ekspozycja nornic KD na FSH spowodowała niewielki wzrost intensywności reakcji N1ICD w komórkach Sertoliego i spermatogoniach (**C**). Brak reakcji dla tego białka notowano w kontroli negatywnej (**wstawka w B**).



Tablica 10. Ekspresja aktywnej formy białka Notch1 (N1ICD; **A**) oraz jego immunohistochemiczna lokalizacja (**B-D**) w jądrach nornic hodowanych w warunkach: krótkiego fotoperiodu (KD), krótkiego fotoperiodu z ekspozycją na FSH (KD-FSH) lub długiego fotoperiodu (DD). (**A**) Analiza western blot ekspresji białka N1ICD oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β-aktyny; n = 10/każda grupa, $x \pm SD$, * $P < 0,05$ (test Tukeya). (**B-D**) Lokalizacja N1ICD w jądrach nornic grup: KD (**B**), KD-FSH (**C**) oraz DD (**D**). Czarne strzałki – komórki Sertoliego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatocyty, białe grotki – spermatydy okrągłe, czarne grotki – spermatydy wydłużone; kontrola negatywna - wstawka w B; skala = 10 μm .

Analiza western blot wykazała istotny spadek ekspresji białka HES1 w jądrach nornic KD po ekspozycji na FSH, do poziomu porównywalnego do nornic DD (**Tablica 11A**; $P < 0,05$; $P < 0,01$). Ekspozycja na FSH przyczyniła się także do obniżenia ekspresji białka HEY1 w gonadzie nornic KD (**B**; $P < 0,05$). Natomiast w jądrach nornic DD ekspresja HEY1 była wyraźnie wyższa niż w pozostałych grupach zwierząt ($P < 0,05$; $P < 0,001$).



Tablica 11. Ekspresja (A, B) oraz immunohistochemiczna lokalizacja (C-H) białek HES1 (A, C-E) i HEY1 (B, F-H) w jądrach nornic hodowanych w warunkach: krótkiego fotoperiodu (KD), krótkiego fotoperiodu z ekspozycją na FSH (KD-FSH) lub długiego fotoperiodu (DD). (A, B) Analiza western blot ekspresji białek HES1 i HEY1 oraz histogramy przedstawiające ich poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; $n = 10$ /każda grupa, $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$ (test Kruskala-Wallis). (B-F) Lokalizacja HES1 i HEY1 w jądrach nornic grup: KD (B, F), KD-FSH (D, G) oraz DD (E, H). Czarne strzałki – komórki Sertoliego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatocyty, białe grotty – spermatydy okrągłe, czarne grotty – spermatydy wydłużone; kontrola negatywna – wstawka E i F; skala = 10 μ m.**

Analiza immunohistochemiczna uwidoczniała obecność białka HES1 w komórkach Sertoliego, spermatogoniach oraz spermatydach wydłużonych (**Tablica 11C-E**), zaś HEY1 dodatkowo w spermatocytach oraz w spermatydach okrągłych we wszystkich badanych grupach nornic (**F-H**). Sygnał białka HES1 widoczny był w jądrach i cytoplazmie komórek, natomiast białko HEY1 wykazywało głównie lokalizację jądrową. Po podaniu FSH stwierdzono wyraźny spadek intensywności sygnału HES1

w nabłonku plemnikotwórczym, do poziomu zbliżonego do nornic DD (**D**). Ekspozycja na FSH nornic KD wywołała również spadek immunokreacji HEY1, przede wszystkim w komórkach Sertoliego (**G**). W kontroli negatywnej notowano brak sygnału dla tych białek (wstawki w **E i F**).

4.1.3. Wpływ FSH oraz wyciszenia receptora FSH na ekspresję komponentów szlaku Notch w komórkach Sertoliego

W celu precyzyjnego wyjaśnienia udziału FSH oraz jego receptora w kontroli ekspresji komponentów szlaku Notch w komórkach Sertoliego, poddano analizie ekspresję DLL1, DLL4, Notch1/N1ICD, HES1 i HEY1 po zastosowaniu FSH oraz po wyciszeniu ekspresji receptora FSH (FSHR) z użyciem specyficznego siRNA.

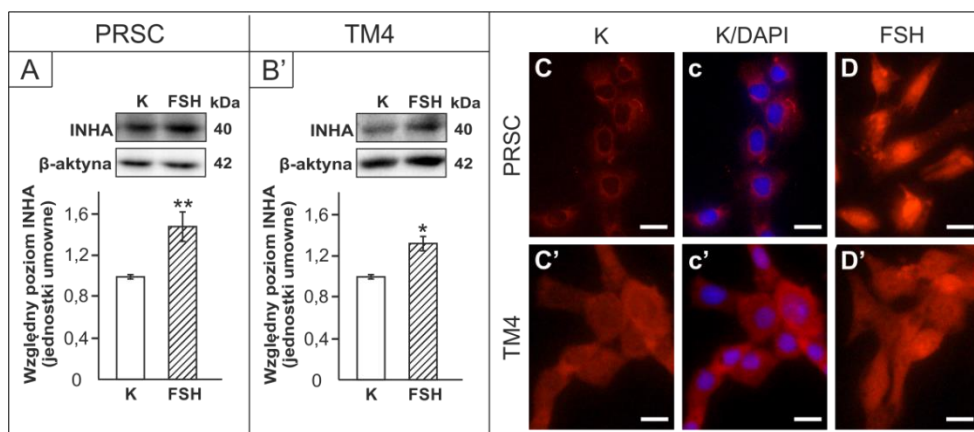
Skuteczność aktywacji sygnalizacji FSH w szczurzych komórkach Sertoliego w hodowli pierwotnej (PRSC) oraz w linii komórek Sertoliego TM4 przez rekombinowany FSH w stężeniach 70 i 100 ng/ml potwierdzono w oparciu o pomiar poziomu cAMP w pożywce (**Tabela 5**). Stwierdzono istotny wzrost stężenia cAMP po zastosowaniu FSH w obu modelach komórkowych ($P < 0,01$; $P < 0,001$). Do dalszych eksperymentów wykorzystano stężenie 100 ng/ml FSH, ponieważ miało silniejszy wpływ na odpowiedź komórek na FSH.

Tabela 5. Stężenie cAMP w hodowli szczurzych komórek Sertoliego (PRSC) oraz komórek linii TM4 po ekspozycji na FSH.

Grupa badawcza	cAMP (pmol/mL)	
	PRSC	TM4
K	0,61 ± 0,12	3,29 ± 0,09
FSH 70 ng/ml	8,72 ± 0,97 **	13,01 ± 1,42 **
FSH 100 ng/ml	48,94 ± 1,79 ***	25,60 ± 2,55 ***

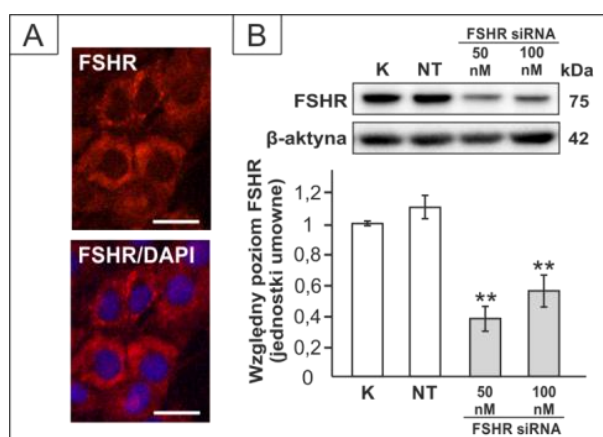
Stężenie cAMP względem komórek kontrolnych (K); wyniki uzyskano w oparciu o cztery niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (test Dunnetta).

Następnie wykazano wpływ stymulacji 100 ng/ml FSH na aktywność komórek Sertoliego poprzez ocenę ekspresji INHA (**Tablica 12A, B**). Wyniki analizy western blot wykazały wzrost poziomu białka INHA w komórkach PRSC oraz TM4 po zastosowaniu FSH w porównaniu do komórek kontrolnych ($P < 0,05$; $P < 0,01$). Analiza immunofluorescencyjna uwidoczniała pozytywny sygnał dla INHA w obu modelach komórkowych (**C-D'**). Po ekspozycji komórek na FSH intensywność reakcji wzrosła w porównaniu do kontroli (**D, D'**). Szczególnie wyraźne nasilenie sygnału stwierdzono w komórkach PRSC.



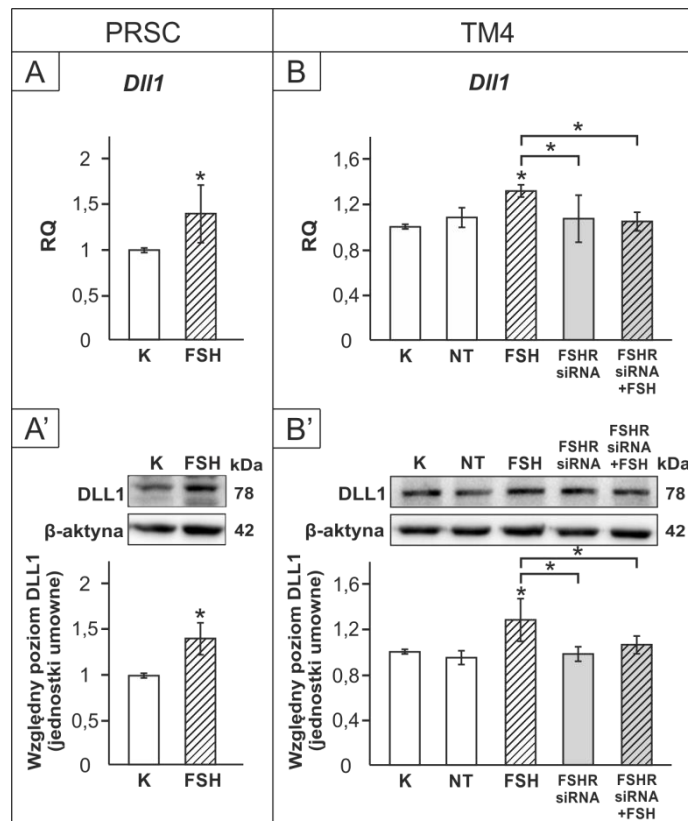
Tablica 12. Ekspresja białka INHA (A, B) oraz jego immunofluorescencyjna lokalizacja (C-D') w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, C-D) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, C'-D') po ekspozycji na FSH. (A, B) Analiza western blot ekspresji białka INHA oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o cztery niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,01$; ** $P < 0,01$ (test U-Manna Whitney). (C-D') Lokalizacja INHA w komórkach kontrolnych (K; C, C') lub hodowanych w obecności 100 ng/ml FSH (D, D'). Zdjęcia K/DAPI (c, c') przedstawiają złożenie sygnału INHA (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

Barwienie immunofluorescencyjne wykazało pozytywny sygnał na obecność receptora FSH (FSHR) w komórkach Sertoliego linii TM4 (**Tablica 13A**). Skuteczność wyciszenia FSHR w tych komórkach potwierdzono z wykorzystaniem analizy western blot (B). W wyniku transfekcji komórek 50 nM siRNA nastąpił spadek poziomu białka FSHR o około 60 % ($P < 0,01$). Transfekcja komórek 100 nM siRNA nie zwiększyła efektywności wyciszenia, dlatego do dalszych eksperymentów wykorzystano stężenie 50 nM FSHR siRNA.



Tablica 13. Immunofluorescencyjna detekcja białka FSHR (A) oraz analiza skuteczności wyciszenia ekspresji FSHR (B) w komórkach linii TM4. (A) Lokalizacja FSHR w komórkach TM4. Zdjęcia FSHR/DAPI przedstawiają złożenie sygnału FSHR (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe). Skala = 10 μ m. (B) Inkubacja komórek z kontrolnym siRNA (NT), 50 nM lub 100 nM FSHR siRNA przez 48 godzin. Analiza western blot ekspresji białka FSHR oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o cztery niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$; ** $P < 0,01$; (test Dunnetta).

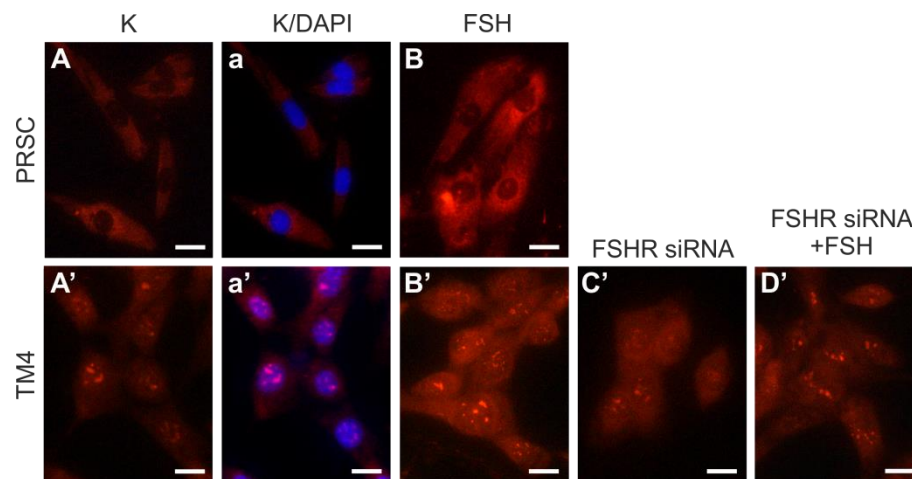
Wyniki analiz RT-qPCR oraz western blot wykazały wzrost ekspresji mRNA i białka DLL1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC) oraz komórkach Sertoliego linii TM4 po ekspozycji na FSH w porównaniu do komórek kontrolnych (**Tablica 14A-B'**; $P < 0,05$). W komórkach TM4 wyciszenie ekspresji FSHR skutkowało zahamowaniem stymulującego wpływu FSH na ekspresję mRNA i białka DLL1 (**B, B'**).



Tablica 14. Ekspresja DLL1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, A') oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, B') po ekspozycji na FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR (FSHR siRNA). (A, B) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Dll1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*B2m*, *Gapdh*, *Actb*), RQ - względna liczba kopii genu. (A', B') Analiza western blot ekspresji białka DLL1 oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o cztery niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; (test U-Manna Whitneya; test Tukeya).

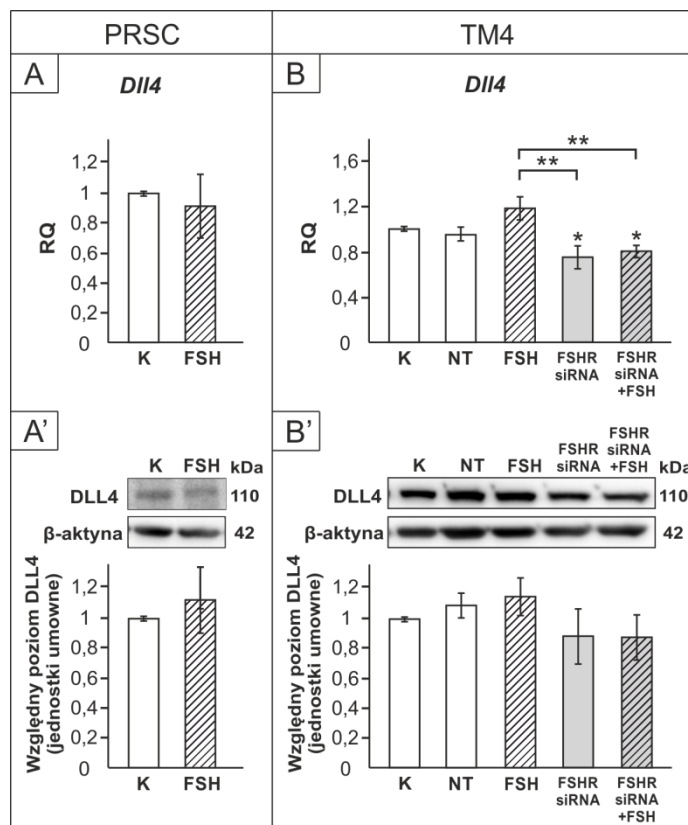
Barwienie immunofluorescencyjne komórek PRSC oraz TM4 wykazało pozytywny sygnał na obecność białka DLL1 (**Tablica 15A-D'**). Intensywność sygnału wyraźnie wzrosła po inkubacji komórek z FSH (**B, B'**). W komórkach TM4 z wyciszoną ekspresją FSHR poziom sygnału był zbliżony do komórek kontrolnych (**C'**). Po dodaniu FSH do komórek transfekowanych FSHR siRNA intensywność reakcji utrzymywała się na poziomie kontroli (**D'**). We wszystkich komórkach w kontroli negatywnej notowano brak pozytywnego sygnału DLL1 reakcji immunofluorescencyjnej (nie pokazano).

Wyniki te potwierdzają, że w komórkach Sertoliego ekspresja DLL1 pozostaje pod kontrolą sygnalizacji FSH-FSHR.



Tablica 15. Immunofluorescencyjna lokalizacja DLL1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-B) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 po ekspozycji na FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR (FSHR siRNA) (A'-D'). Lokalizacja DLL1 w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: FSH (B, B'), FSHR siRNA (C') oraz FSHR siRNA + FSH (D'). Zdjęcia K/DAPI (a-a') przedstawiają złożenie sygnału DLL1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

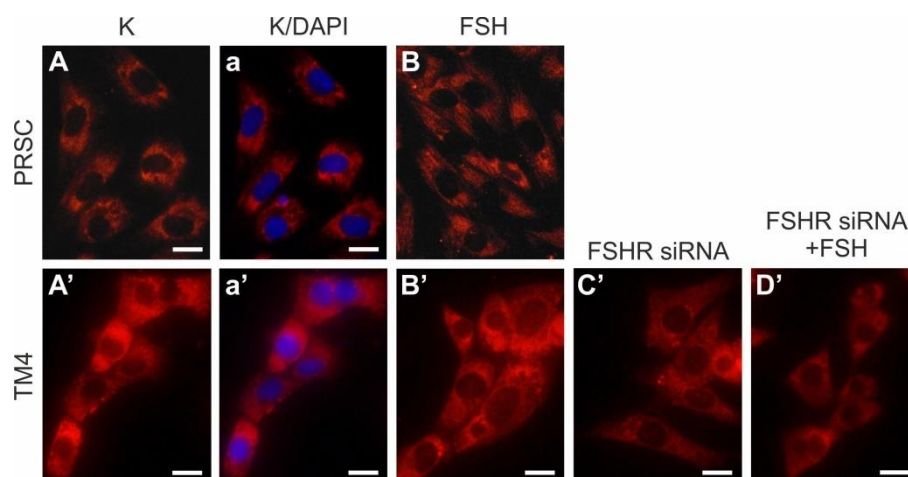
W komórkach PRSC oraz TM4 poddanych działaniu FSH nie stwierdzono zmian ekspresji mRNA i białka DLL4 w porównaniu do komórek kontrolnych (**Tablica 16A-B'**). Wyciszenie FSHR w komórkach TM4 obniżyło ekspresję *Dll4* tylko na poziomie mRNA i efekt ten utrzymywał się w obecności FSH (**B**; $P < 0,05$), natomiast nie miało wpływu na ekspresję białka DLL4.



Tablica 16. Ekspresja DLL4 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, A') oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, B') po ekspozycji na FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR (FSHR siRNA). (A, B) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Dll4* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*B2m*, *Gapdh*, *Actb*), RQ - względna liczba kopii genu. (A', B') Analiza western blot ekspresji białka DLL4 oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o cztery niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $\bar{x} \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; (test U-Manna Whitneya; test Tukeya).

Barwienie immunofluorescencyjne wykazało cytoplazmatyczną lokalizację białka DLL4 w obu modelach komórkowych (Tablica 17A-D'). Nie obserwowano zmian intensywności reakcji w komórkach PRSC oraz TM4 po zastosowaniu FSH (B, B'), natomiast wyciszenie FSHR w komórkach TM4 skutkowało niewielkim spadkiem natężenia fluorescencji w porównaniu do kontroli, które utrzymywało się po dodaniu FSH do transfekowanych komórek (C', D'). Brak pozytywnego sygnału dla DLL4 notowano w kontroli negatywnej (nie pokazano).

Powyższe obserwacje sugerują, że sygnalizacja z udziałem FSHR ma nieznaczny wpływ na ekspresję DLL4 w komórkach Sertoliego.

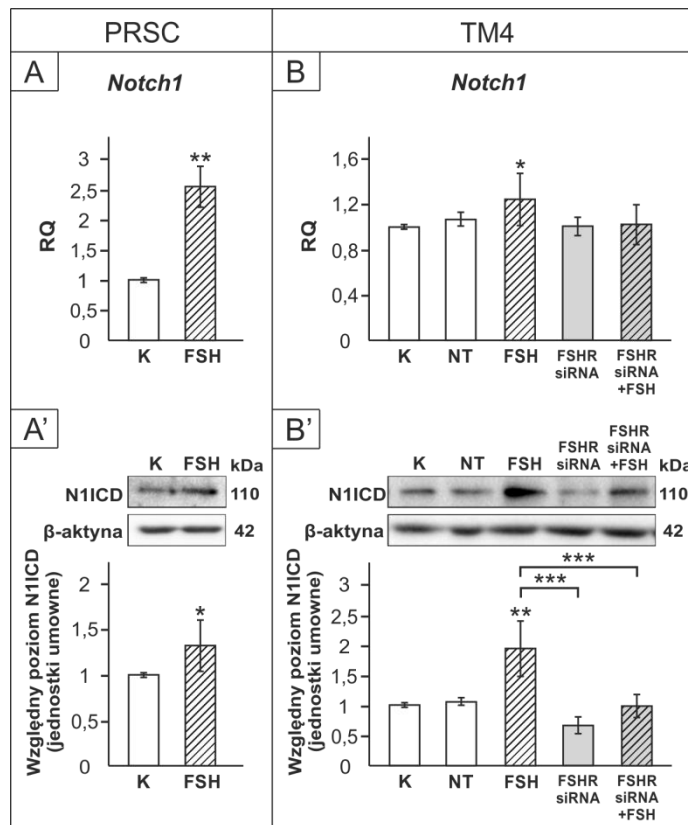


Tablica 17. Immunofluorescencyjna lokalizacja DLL4 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-B) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 po ekspozycji na FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR (FSHR siRNA) (A'-D'). Lokalizacja DLL4 w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: FSH (B, B'), FSHR siRNA (C') oraz FSHR siRNA + FSH (D'). Zdjęcia K/DAPI (a-a') przedstawiają złożenie sygnału DLL4 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

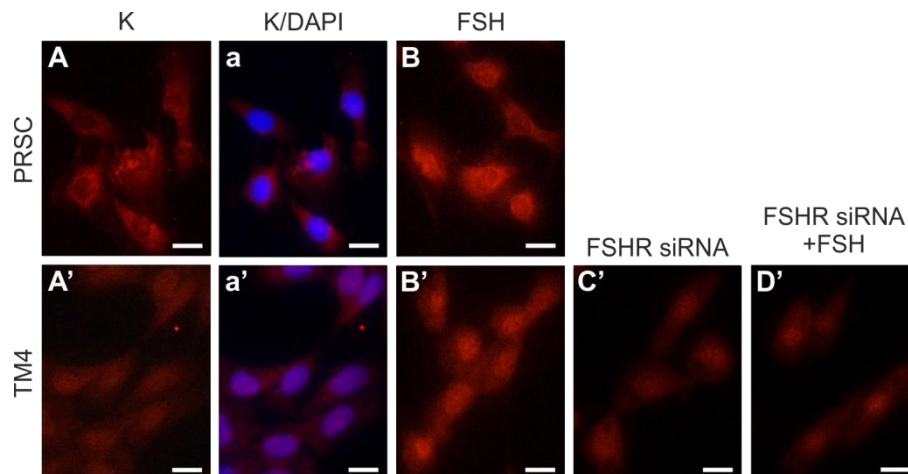
Komórki PRSC oraz TM4 inkubowane z FSH charakteryzował wzrost ekspresji mRNA *Notch1* oraz aktywnej formy białka (N1ICD) w porównaniu do komórek kontrolnych (Tablica 18A-B'; $P < 0,05$, $P < 0,01$). Transfekcja komórek FSHR siRNA zniósła wpływ FSH na ekspresję mRNA *Notch1* oraz białka N1ICD ($P < 0,001$).

Barwienie immunofluorescencyjne wykazało cytoplazmatyczny oraz jądrowy sygnał białka N1ICD (Tablica 19A-D'). W komórkach PRSC i TM4 poddanych działaniu FSH obserwowano wyraźny wzrost intensywności sygnału (B, B'). Wyciszenie ekspresji FSHR nie wpłynęło na intensywność reakcji w komórkach TM4 w porównaniu do kontroli (C'). Także po ekspozycji na FSH komórek transfekowanych FSHR siRNA sygnał N1ICD utrzymywał się na poziomie charakterystycznym dla komórek kontrolnych (D'). We wszystkich komórkach w kontroli negatywnej notowano brak pozytywnego sygnału N1ICD reakcji immunofluorescencyjnej (nie pokazano).

Uzyskane wyniki sugerują, że FSH bierze udział w regulacji ekspresji receptora *Notch1* w komórkach Sertoliego.

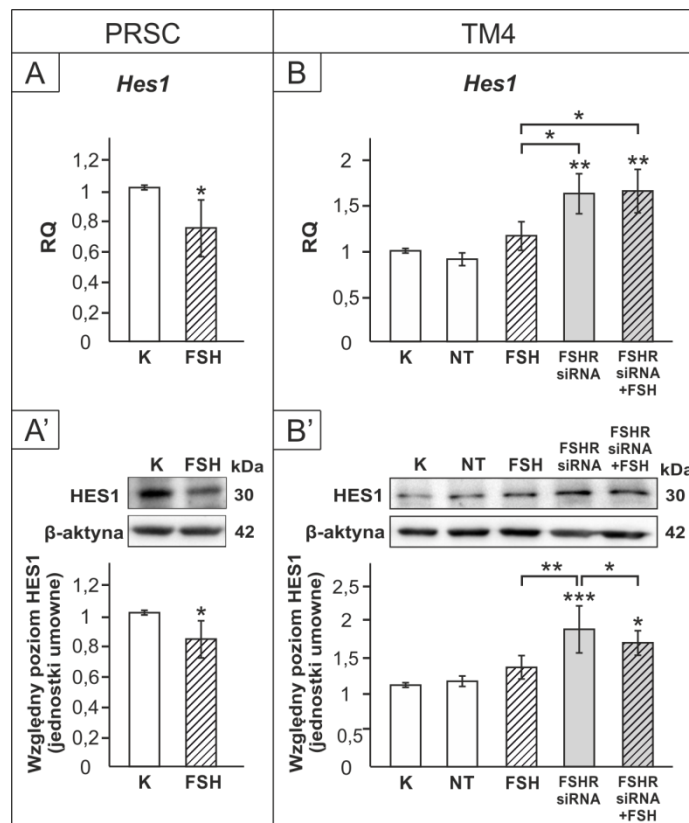


Tablica 18. Ekspresja mRNA *Notch1* i aktywnej formy białka Notch1 (N1ICD) w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, A') oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, B') po ekspozycji na FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR (FSHR siRNA). (A, B) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Notch1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*B2m*, *Gapdh*, *Actb*), RQ - względna liczba kopii genu. (A', B') Analiza western blot ekspresji białka N1ICD oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o cztery niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, *P < 0,05; P** < 0,01; ***P < 0,001 (test U-Manna Whitney; test Tukeya).



Tablica 19. Immunofluorescencyjna lokalizacja N1ICD w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-B) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 po ekspozycji na FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR (FSHR siRNA) (A'-D'). Lokalizacja N1ICD w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: FSH (B, B'), FSHR siRNA (C') oraz FSHR siRNA + FSH (D'). Zdjęcia K/DAPI (a-a') przedstawiają złożenie sygnału N1ICD (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

W wyniku inkubacji komórek PRSC z FSH nastąpił istotny spadek ekspresji mRNA i białka HES1 w porównaniu do komórek kontrolnych (**Tablica 20A, A'**; $P < 0,05$). W komórkach TM4 nie obserwowano zmian w poziomie HES1 po zastosowaniu FSH, jednakże wykazano znaczny wzrost ekspresji tego białka po transfekcji komórek FSHR siRNA (**B, B'**; $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Podwyższona ekspresja mRNA i białka HES1 utrzymywała się w komórkach z wyciszoną ekspresją FSHR inkubowanych w obecności FSH ($P < 0,05$).

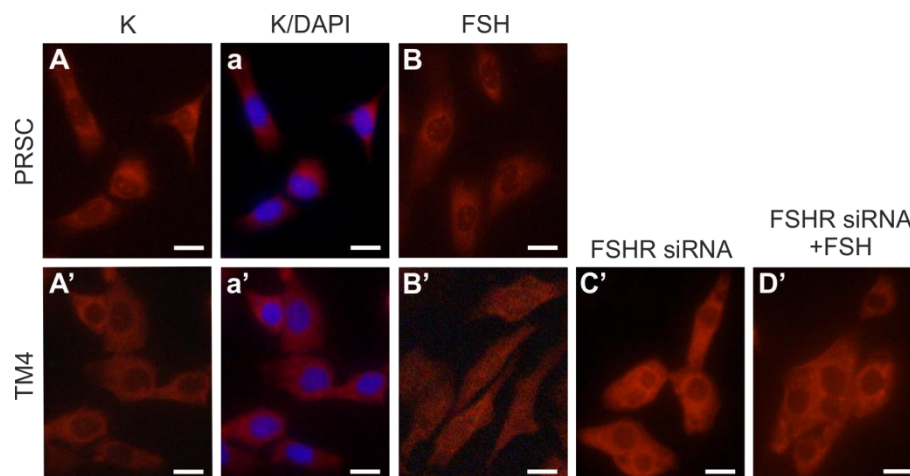


Tablica 20. Ekspresja HES1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, A') oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, B') po ekspozycji na FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR (FSHR siRNA). (A, B) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Hes1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*B2m*, *Gapdh*, *Actb*), RQ - względna liczba kopii genu. (A', B') Analiza western blot ekspresji białka HES1 oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o cztery niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach $x \pm SD$, * $P < 0,05$; (test U-Manna Whitneya; test Tukeya).

Barwienie immunofluorescencyjne potwierdziło wyniki uzyskane w analizie western blot (**Tablica 21**). Ekspozycja komórek PRSC na FSH skutkowała niewielkim spadkiem intensywności reakcji HES1 w porównaniu do kontroli (**B**). Nie obserwowano natomiast wyraźnych zmian w poziomie sygnału tego białka po inkubacji komórek

TM4 z FSH (**B'**). Widoczny wzrost intensywności immunofluorescencji HES1 wykazano po wyciszeniu ekspresji FSHR (**C'**, **D'**). Brak sygnału dla HES1 notowano w kontroli negatywnej (nie pokazano).

Wyniki te wskazują, że ekspresja HES1 jest regulowana przez sygnalizację z udziałem FSH-FSHR w komórkach Sertoliego.

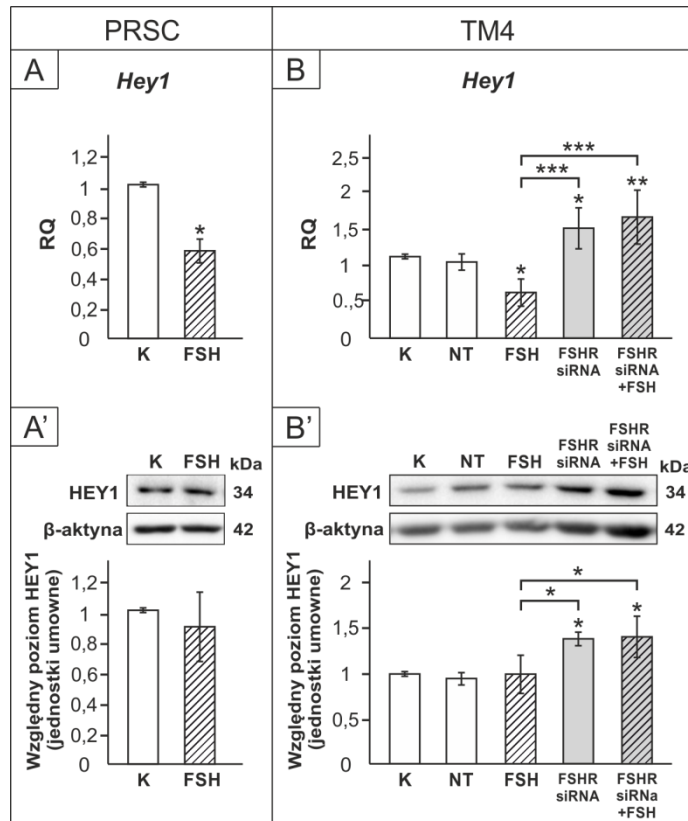


Tablica 21. Immunofluorescencyjna lokalizacja HES1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-B) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 po ekspozycji na FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR (FSHR siRNA) (A'-D'). Lokalizacja HES1 w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: FSH (B, B'), FSHR siRNA (C') oraz FSHR siRNA + FSH (D'). Zdjęcia K/DAPI (a-a') przedstawiają złożenie sygnału HES1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 µm.

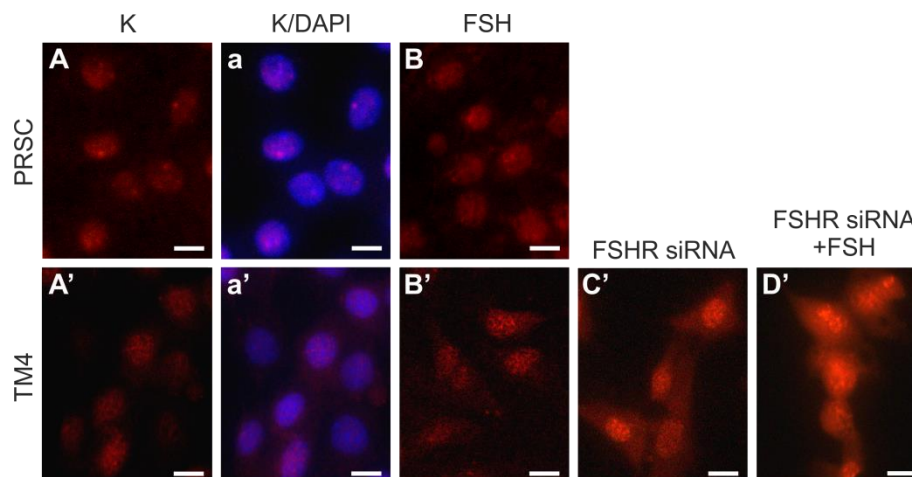
Ekspozycja komórek PRSC oraz TM4 na FSH skutkowała istotnym spadkiem ekspresji *Hey1* tylko na poziomie mRNA w porównaniu z komórkami kontrolnymi (**Tablica 22A, B**; $P < 0,05$). Natomiast w komórkach TM4 transfekowanych FSHR siRNA wykazano wzrost poziomu mRNA oraz białka HEY1 (**B, B'**; $P < 0,05$; $P < 0,01$), który utrzymywał się w obecności FSH.

Barwienie immunofluorescencyjne wykazało jądrowy sygnał HEY1 w komórkach PRSC oraz TM4 (**Tablica 23A-D'**). Nie obserwowano zmian intensywności reakcji w komórkach hodowanych w obecności FSH w porównaniu do kontroli (**B, B'**). Natomiast wyciszenie ekspresji FSHR skutkowało wyraźnym wzrostem intensywności immunoreakcji, który utrzymywał się także w obecności FSH (**D'**). Brak pozytywnego sygnału dla HEY1 notowano w kontroli negatywnej (nie pokazano).

Podsumowując, sygnalizacja FSH-FSHR reguluje ekspresję HEY1 w komórkach Sertoliego.



Tablica 22. Ekspresja HEY1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, A') oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, B') po ekspozycji na FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR (FSHR siRNA). (A, B) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Hey1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*B2m*, *Gapdh*, *Actb*), RQ - względna liczba kopii genu. (A', B') Analiza western blot ekspresji białka HEY1 oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o cztery niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $\bar{x} \pm SD$, * $P < 0,05$; (test U-Manna Whitneya; test Tukeya).

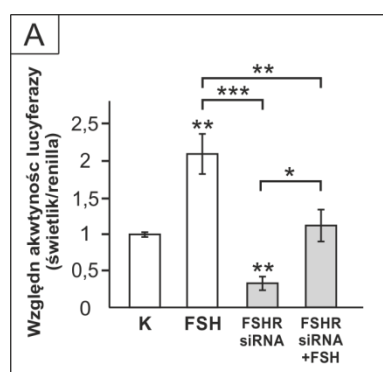


Tablica 23. Immunofluorescencyjna lokalizacja HEY1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-B) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 po ekspozycji na FSH lub wyciszeniu ekspresji FSHR (FSHR siRNA) (A'-D'). Lokalizacja HEY1 w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: FSH (B, B'), FSHR siRNA (C') oraz FSHR siRNA + FSH (D'). Zdjęcia K/DAPI (a-a') przedstawiają złożenie sygnału HEY1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

4.1.4. Wpływ FSH oraz wyciszenia receptora FSH na aktywność czynnika transkrypcyjnego RBP-J w komórkach Sertoliego

Aby potwierdzić udział FSH w regulacji szlaku sygnałowego Notch, przeprowadzono analizę aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J w komórkach inkubowanych z FSH oraz po wyciszeniu ekspresji FSHR.

Pomiar aktywności lucyferazy wykazał, że w komórkach Sertoliego linii TM4 hodowanych w obecności FSH nastąpił wzrost aktywności czynnika RBP-J (**Tablica 24A**, $P < 0,01$). Spadek aktywności czynnika RBP-J widoczny był w komórkach z wyciszoną ekspresją receptora FSHR. Po ekspozycji na FSH komórek z wyciszoną ekspresją FSHR aktywność RBP-J utrzymywała się na poziomie kontroli.



Tablica 24. Wpływ FSH lub wyciszenia ekspresji FSHR na aktywność czynnika transkrypcyjnego RBP-J w komórkach Sertoliego linii TM4. (A) Komórki transfekowano reporterem Cignal RBP-J łącznie z FSHR siRNA. Po 24 godzinach do hodowli dodano FSH lub nośnik. Zmiany aktywności lucyferazy analizowano w odniesieniu do komórek kontrolnych. Wyniki uzyskano w oparciu o cztery niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (test Tukeya).

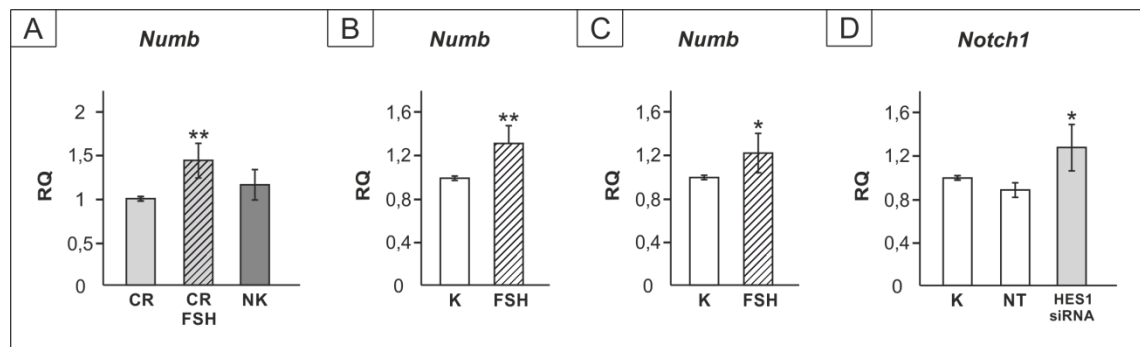
4.1.5. Wpływ FSH na ekspresję *Numb* oraz wpływ wyciszenia *HES1* na ekspresję receptora Notch1 w komórkach Sertoliego

W celu ustalenia możliwej przyczyny spadku ekspresji genów efektorowych *Hes1* i *Hey1* w odpowiedzi na działanie FSH mimo utrzymywania się podwyższonego poziomu i aktywacji Notch1/N1ICD zbadano: i) wpływ FSH na ekspresję mRNA endocytarnego białka adaptorowego NUMB, które może brać udział w stabilizacji aktywnej formy receptora Notch1 (Luo i wsp. 2020), w jądrach szczurów oraz komórkach Sertoliego PRSC i TM4; ii) udział *HES1* w kontroli ekspresji mRNA Notch1 w komórkach TM4.

W jądrach szczurów CR poddanych działaniu FSH wykazano wzrost ekspresji mRNA *Numb* w porównaniu do szczurów CR (**Tablica 25A**; $P < 0,01$). Podobnie po

inkubacji komórek PRSC oraz TM4 z FSH stwierdzono wzrost poziomu mRNA *Numb* w porównaniu do komórek kontrolnych (B, C; $P < 0,05$), co wskazuje na udział FSH regulacji ekspresji genu *Numb* w komórkach Sertoliego.

Analiza RT-qPCR wykazała wzrost ekspresji mRNA *Notch1* w komórkach Sertoliego linii TM4 po transfekcji komórek HES1 siRNA (Tablica 2 A; $P < 0,05$). Wyniki te mogą wskazywać na hamujący wpływ czynnika HES1 na ekspresję receptora Notch1 w komórkach Sertoliego.



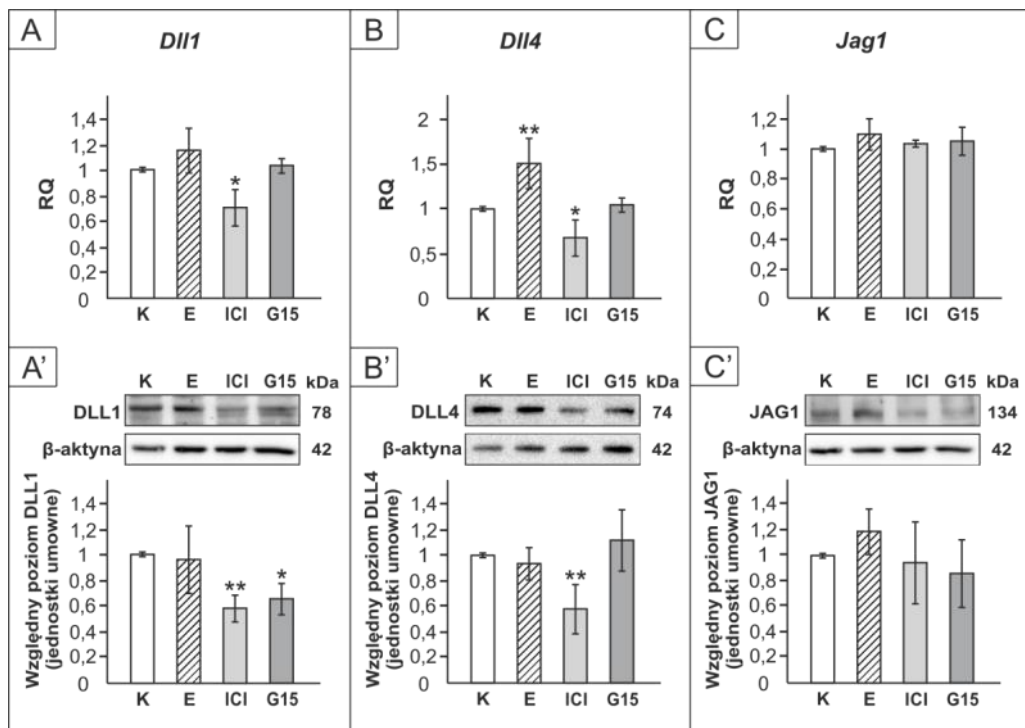
Tablica 25. Ekspresja mRNA *Numb* (A-C) w jądrach szczurów w okresie dojrzewania płciowego po ekspozycji na cetroreliks (CR), cetroreliks i FSH (CR-FSH) lub 0,9% NaCl (NK); w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; B) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (C) po ekspozycji na FSH. Ekspresja mRNA *Notch1* (D) w komórkach Sertoliego linii TM4 po wyciszeniu ekspresji HES1 (HES1 siRNA). (A-C) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Numb* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*B2m*, *Gapdh*, *Actb*), RQ - względna liczba kopii genu. (D) Inkubacja komórek z kontrolnym siRNA (NT) lub 50 nM HES1 siRNA przez 48 godzin. Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogram przedstawiający poziom mRNA *Notch1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Hprt1*, *Pgk1*, *Actb*), RQ - względna liczba kopii genu. (A) sześć osobników/każda grupa, (B-D) cztery niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (test Tukeya; test U-Manna Whitneya; test Dunnetta).

4.2. Rola sygnalizacji estrogenowej w kontroli aktywności i ekspresji komponentów szlaku Notch w gonadzie męskiej

4.2.1. Wpływ stymulacji lub zablokowania sygnalizacji estrogenowej na ekspresję komponentów szlaku Notch w jądrach szczurów

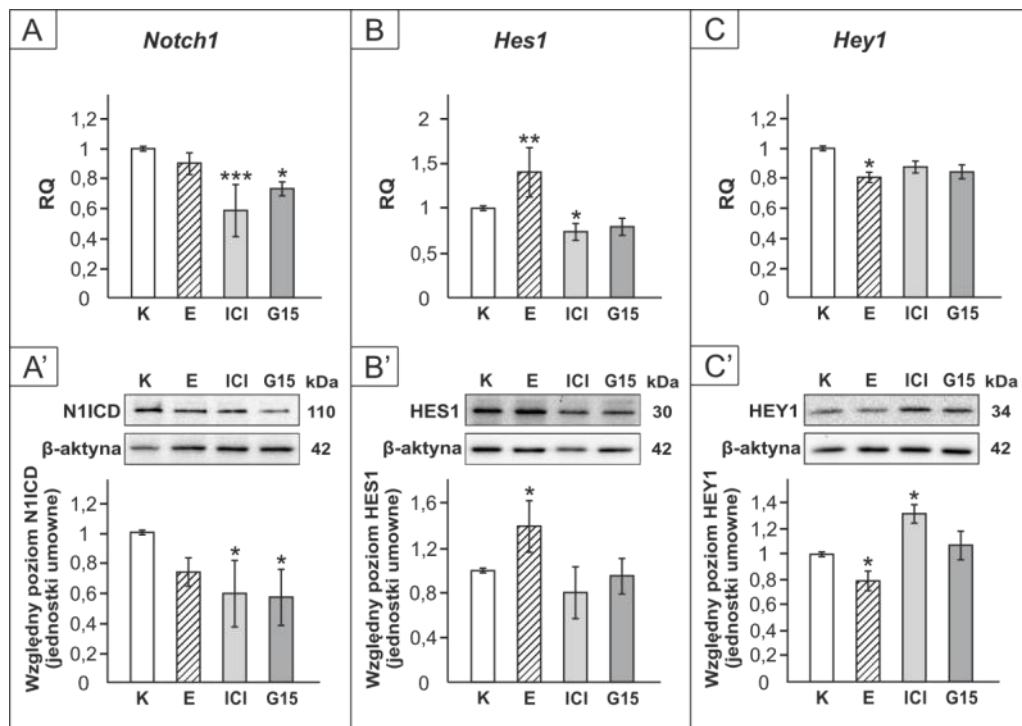
W celu ustalenia czy sygnalizacja estrogenowa bierze udział w regulacji szlaku sygnałowego Notch w gonadzie męskiej, eksplanty jąder szczurów inkubowano przez 24 h w obecności 17 β -estradiolu oraz antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780 lub G15).

Ekspozycja eksplantów jąder na 17 β -estradiol przyczyniła się do wzrostu ekspresji mRNA *Dll4* (Tablica 26B; $P < 0,01$). Nie spowodowała natomiast istotnej zmiany ekspresji ligandów DLL1 i JAG1 (A, A', C, C'). Po inkubacji z ICI 182,780 wykazano spadek poziomu mRNA i białka DLL1 i DLL4 w porównaniu do eksplantów kontrolnych (A, B'; $P < 0,05$; $P < 0,01$). Zastosowanie G15 skutkowało jedynie obniżeniem ekspresji białka DLL1 (A', $P < 0,05$). Nie wykazano istotnych zmian ekspresji JAG1 po zastosowaniu antagonistów receptorów estrogenowych (C, C').



Tablica 26. Wpływ 17 β -estradiolu (E), ICI 182,780 (ICI) i G15 na ekspresję DLL1 (A, A'), DLL4 (B, B') i JAG1 (C, C') w eksplantach jąder szczurów. (A-C) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Dll1* (A), *Dll4* (B) i *Jag1* (C) znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*B2m*, *Gapdh*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (A'-C') Analiza western blot ekspresji białek DLL1 (A'), DLL4 (B') i JAG1 (C') oraz histogramy przedstawiające ich poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (test Dunnetta).

W eksplantach inkubowanych z 17 β -estradiolem nie wykazano zmian ekspresji mRNA receptora Notch1 oraz aktywnej formy tego białka (N1ICD) w porównaniu do eksplantów kontrolnych (**Tablica 27 A, A'**). Natomiast ekspozycja zarówno na ICI 182,780, jak i na G15 skutkowały spadkiem poziomu mRNA i białka Notch1/N1ICD ($P < 0,05$, $P < 0,001$). Poziom ekspresji HES1 wzrósł w eksplantach po ekspozycji na 17 β -estradiol (**B, B'**; $P < 0,05$, $P < 0,01$). Tylko po zastosowaniu ICI 182,780 widoczny był istotny spadek ekspresji *Hes1* mRNA ($P < 0,05$). W przeciwieństwie do HES1, ekspresja HEY1 uległa obniżeniu po inkubacji eksplantów z 17 β -estradiolem (**C, C'**; $P < 0,05$), a obecność ICI 182,780 spowodowała wzrost ekspresji tego białka ($P < 0,05$). Nie obserwowano zmian ekspresji HES1 i HEY1 w eksplantach inkubowanych w obecności G15.

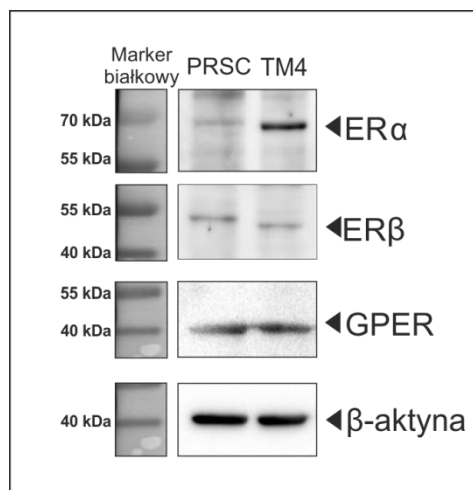


Tablica 27. Wpływ 17 β -estradiolu (E), ICI 182,780 (ICI) i G15 na ekspresję Notch1/N1ICD (A, A'), HES1 (B, B') i HEY1 (C, C') w eksplantach jąder szczurów. (A-C) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Notch1* (A), *Hes1* (B) i *Hey1* (C) znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*B2m*, *Gapdh*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (A'-C') Analiza western blot ekspresji białek N1ICD (A'), HES1 (B') i HEY1 (C') oraz histogramy przedstawiające ich poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$ (test Dunnetta).**

4.2.2. Sygnalizacja estrogenowa a ekspresja ligandów szlaku Notch w komórkach Sertoliego

4.2.2.1 Wpływ estradiolu oraz antagonistów receptorów estrogenowych na ekspresję *DLL1*, *DLL4* i *JAG1*

Obecność jądrowych receptorów estrogenowych ER α i ER β oraz błonowego receptora estrogenowego GPER zarówno w szczurzych komórkach Sertoliego z hodowli pierwotnej (PRSC), jak i w komórkach Sertoliego linii TM4 potwierdzono z wykorzystaniem analizy western blot (**Tablica 28**). Analiza ta wykazała ponadto, że poziom białka ER α jest niższy w komórkach PRSC niż w komórkach TM4, podczas gdy poziom ekspresji ER β oraz GPER są porównywalne w obu badanych modelach komórkowych.

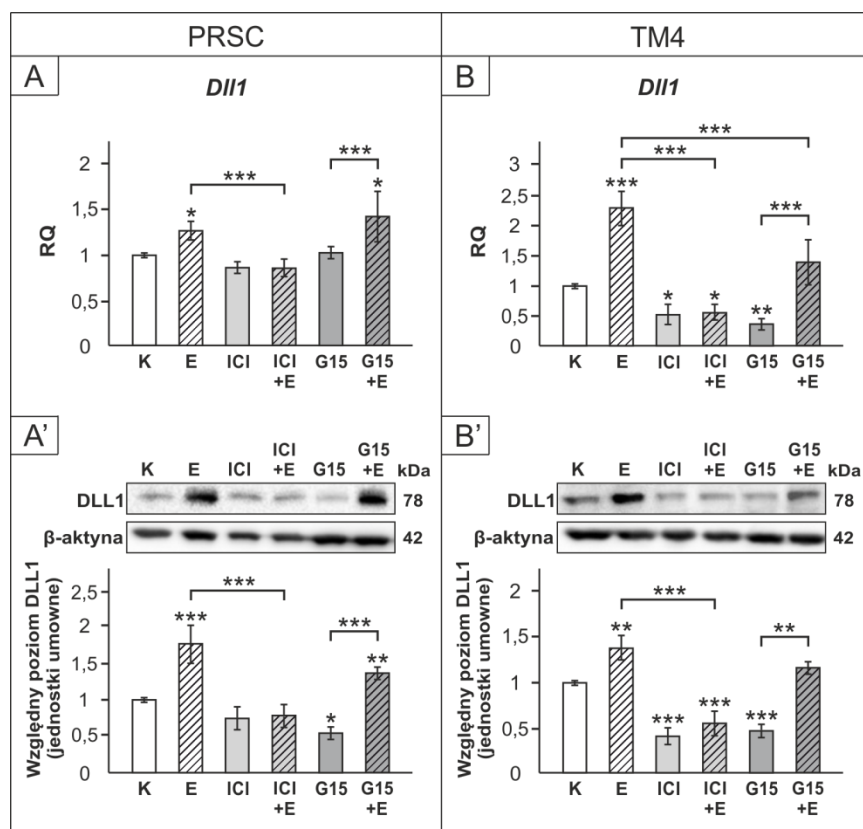


Tablica 28. Analiza western blot ekspresji białek ER α , ER β , GPER i β -aktyny w szczurzych komórkach Sertoliego z hodowli pierwotnej (PRSC) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4. Rozdział elektroforetyczny białek wzorcowych (marker białkowy) przeprowadzono na tym samym żelu, co rozdział próbek. Obrazowanie markera białkowego przeprowadzono niezależnie, poprzez detekcję kolorymetryczną.

W celu wyjaśnienia udziału estrogenów i ich receptorów w kontroli ekspresji ligandów szlaku Notch w komórkach Sertoliego, poddano analizie ekspresję *DLL1*, *DLL4* oraz *JAG1* po zastosowaniu 17 β -estradiolu oraz antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780; G15).

Analizy RT-qPCR oraz western blot wykazały wzrost ekspresji mRNA i białka *DLL1* w szczurzych komórkach Sertoliego PRSC oraz komórkach Sertoliego linii TM4 po ekspozycji na 17 β -estradiol w porównaniu do komórek kontrolnych (**Tablica 29A-B'**; $P < 0,05$, $P < 0,01$; $P < 0,001$). Inkubacja komórek z ICI 182,780 spowodowała istotny spadek ekspresji *DLL1* tylko w przypadku komórek linii TM4 (**B, B'**; $P < 0,05$;

$P < 0,001$). W obu modelach komórkowych zastosowanie ICI 182,780 zniósło efekt działania 17β -estradiolu na ekspresję mRNA i białka DLL1 (**A-B'**; $P > 0,001$). Zastosowanie G15 obniżyło ekspresję białka DLL1 w komórkach PRSC (**A'**, $P < 0,05$) oraz skutkowało spadkiem ekspresji tego liganda na poziomie mRNA i białka w komórkach TM4 (**B, B'**; $P < 0,01$; $P < 0,001$). W komórkach PRSC podanie G15 nie zahamowało stymulującego wpływu 17β -estradiolu na ekspresję mRNA i białka DLL1, a w komórkach linii TM4 stwierdzono ograniczenie wpływu tego hormonu tylko na ekspresję mRNA *Dll1* (**B, B'**, $P < 0,001$).

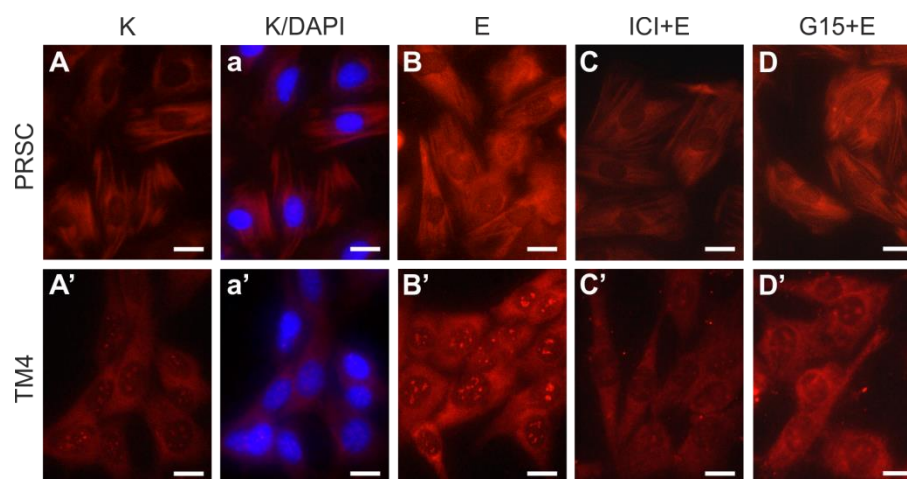


Tablica 29. Ekspresja DLL1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; **A, A'**) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (**B, B'**) po ekspozycji na 17β -estradiol (**E**), ICI 182,780 (**ICI**) i G15. (**A, B**) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Dll1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (**A', B'**) Analiza western blot ekspresji białka DLL1 oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (test Tukeya).

W komórkach PRSC oraz TM4 barwienie immunofluorescencyjne wykazało pozytywny sygnał na obecność białka DLL1 (**Tablica 30A-D'**). W komórkach kontrolnych obserwowano głównie cytoplazmatyczną lokalizację tego białka (**A, A'**).

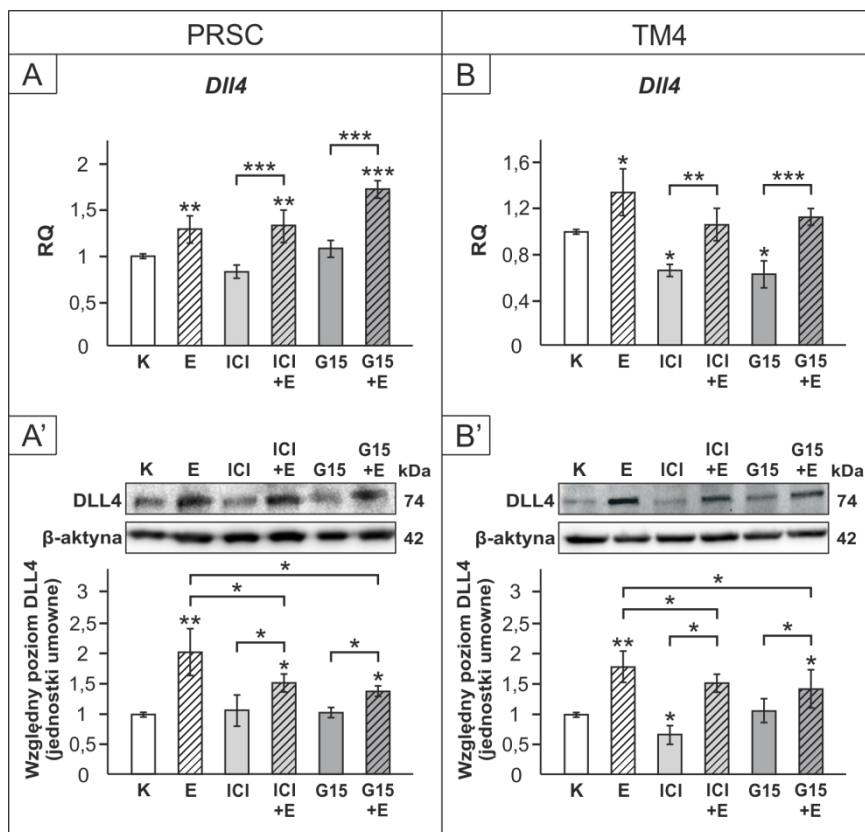
Intensywność reakcji wyraźnie wzrosła po inkubacji komórek z 17 β -estradiolem (**B**, **B'**). Spadek sygnału obserwowany był w komórkach po dodaniu ICI 182,780 w porównaniu do komórek inkubowanych z samym 17 β -estradiolem (**C**, **C'**). W komórkach hodowanych w obecności 17 β -estradiolu i G15, intensywność sygnału była porównywalna do obserwowanej w komórkach inkubowanych z samym 17 β -estradiolem (**D**, **D'**).

Wyniki te świadczą, że jedynie ICI 182, 780 skutecznie hamował działanie 17 β -estradiolu na ekspresję DLL1 w obu modelach doświadczalnych, co sugeruje dominującą rolę jądrowych receptorów estrogenowych w regulacji DLL1 w komórkach Sertoliego.



Tablica 30. Immunofluorescencyjna lokalizacja DLL1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-D) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (A'-D'). Lokalizacja DLL1 w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: 17 β -estradiolu (E; B, B'), ICI 182,780 + E (ICI + E; C, C') oraz G15 + E (D, D'). Zdjęcia K/DAPI (a, a') przedstawiają złożenie sygnału DLL1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

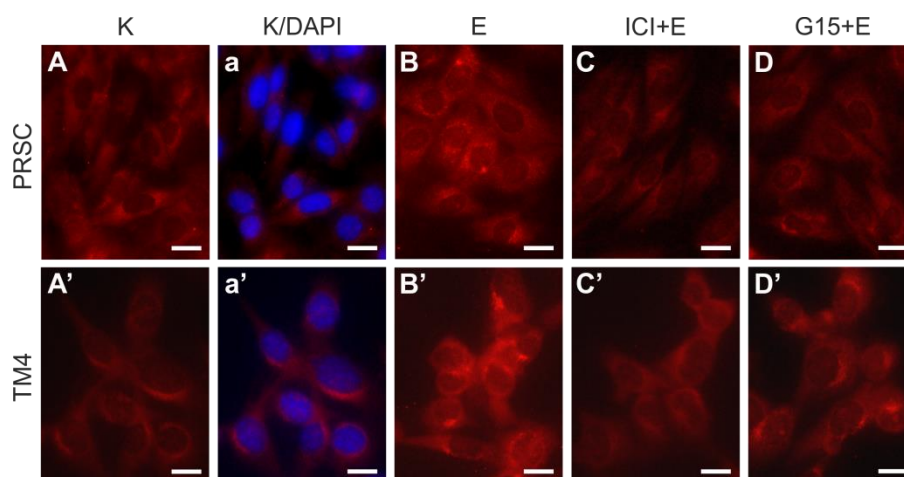
Komórki PRSC oraz TM4 inkubowane z 17 β -estradiolem charakteryzował wzrost ekspresji DLL4 zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w porównaniu do komórek kontrolnych (**Tablica 31A-B'**; $P < 0,05$; $P < 0,01$). Ekspozycja na ICI 182,780 spowodowała spadek ekspresji mRNA i białka DLL4, a zastosowanie G15 obniżyło ekspresję mRNA tego liganda tylko w komórkach linii TM4 (**B**, **B'**; $P < 0,05$). W obu modelach komórkowych zastosowanie antagonistów receptorów estrogenowych w obecności 17 β -estradiolu nie miało wpływu na stymulujące działanie tego hormonu na poziom ekspresji *Dll4* mRNA (**A**, **B**), natomiast częściowo zniosło wpływ estradiolu na ekspresję białka DLL4 (**A'**, **B'**; $P < 0,05$).



Tablica 31. Ekspresja DLL4 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, A') oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, B') po ekspozycji na 17β-estradiol (E), ICI 182,780 (ICI) i G15. (A, B) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Dll4* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (A', B') Analiza western blot ekspresji białka DLL4 oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β-aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$ (test Tukeya).**

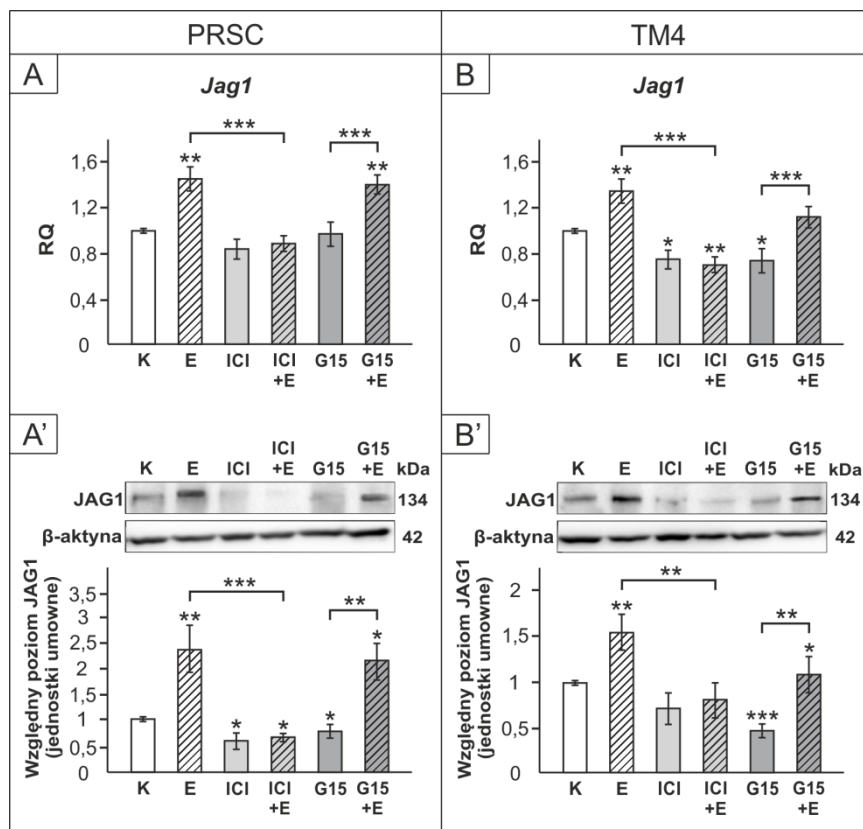
W komórkach PRSC oraz TM4 barwienie immunofluorescencyjne wykazało przede wszystkim cytoplazmatyczny sygnał na obecność białka DLL4 (Tablica 32A-D'). Wyraźny wzrost sygnału obserwowany był w komórkach po inkubacji z 17β-estradiolem (B, B'). W komórkach hodowanych w obecności 17β-estradiołu zarówno ICI 182,780, jak i G15 przyczynił się do spadku intensywności reakcji w porównaniu do komórek inkubowanych z samym 17β-estradiolem (C-D').

Wyniki te wskazują na zaangażowanie obydwu typów receptorów estrogenowych w regulację ekspresji białka DLL4 w komórkach Sertoliego gryzoni.



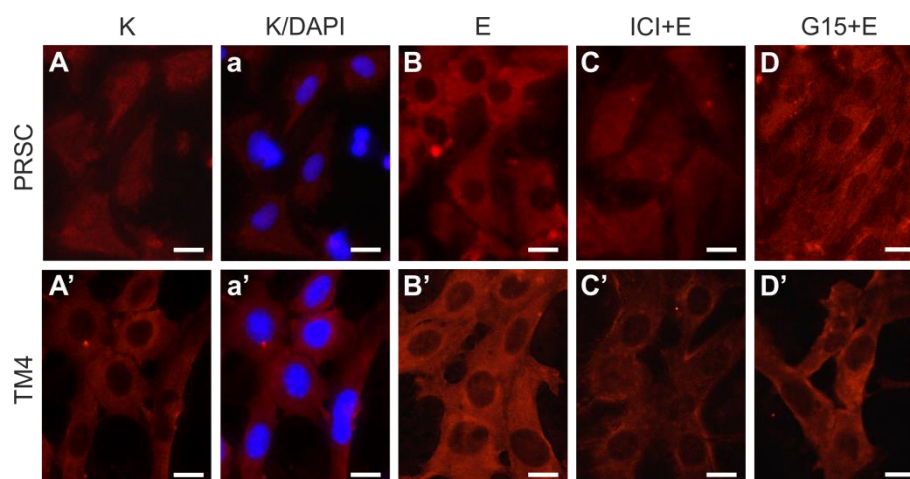
Tablica 32. Immunofluorescencyjna lokalizacja DLL4 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-D) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (A'-D'). Lokalizacja DLL4 w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: 17β-estradolu (E; B, B'), ICI 182,780 + E (ICI + E; C, C') oraz G15 + E (D, D'). Zdjęcia K/DAPI (a, a') przedstawiają złożenie sygnału DLL4 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μm.

W komórkach PRSC oraz TM4 inkubowanych z 17β-estradolem stwierdzono istotny wzrost ekspresji mRNA i białka JAG1 w porównaniu do komórek kontrolnych (**Tablica 33A-B'**; $P < 0,01$). Ekspozycja na ICI 182,780 spowodowała obniżenie ekspresji JAG1 w komórkach PRSC na poziomie białka oraz w komórkach linii TM4 na poziomie mRNA (**A', B'**; $P < 0,05$). W obu modelach komórkowych ICI 182,780 zniosło wpływ 17β-estradolu na ekspresję mRNA i białka JAG1 (**A-B'**; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Zastosowanie G15 skutkowało spadkiem ekspresji JAG1 na poziomie białka w przypadku komórek PRSC (**A'**; $P < 0,05$) oraz obniżeniem ekspresji mRNA i białka tego liganda w komórkach TM4 (**B, B'**; $P < 0,05$; $P < 0,001$). G15 nie wpłynął natomiast na stymulowaną 17β-estradolem ekspresję mRNA i białka JAG1 – jej poziom zbliżony był do obserwowanego w komórkach eksponowanych na sam 17β-estradol (**A-B'**).



Tablica 33. Ekspresja JAG1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, A') oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, B') po ekspozycji na 17β-estradiol (E), ICI 182,780 (ICI) i G15. (A, B) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Jag1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (A', B') Analiza western blot ekspresji białka JAG1 oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β-aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, *P < 0,05; **P < 0,01; *P < 0,001 (test Tukeya).**

Barwienie immunofluorescencyjne komórek PRSC oraz TM4 uwidocznilo cytoplazmatyczną lokalizację białka JAG1 (Tablica 34A-D'). Po ekspozycji komórek na 17β-estradiol intensywność sygnału wzrosła w porównaniu do komórek kontrolnych (B, B'). W komórkach inkubowanych z 17β-estradiolem i ICI 182,780 obserwowano osłabienie sygnału w porównaniu do komórek traktowanych samym 17β-estradiolem (C, C'). W obecności G15 i 17β-estradiolu intensywność sygnału była porównywalna do obserwowanej w komórkach po ekspozycji na sam 17β-estradiol (D, D'). Brak pozytywnego sygnału dla JAG1 notowano w kontroli negatywnej (nie pokazano). Wyniki te wskazują, że poziom JAG1 pozostaje pod kontrolą sygnalizacji estrogenowej z udziałem receptorów jądrowych.

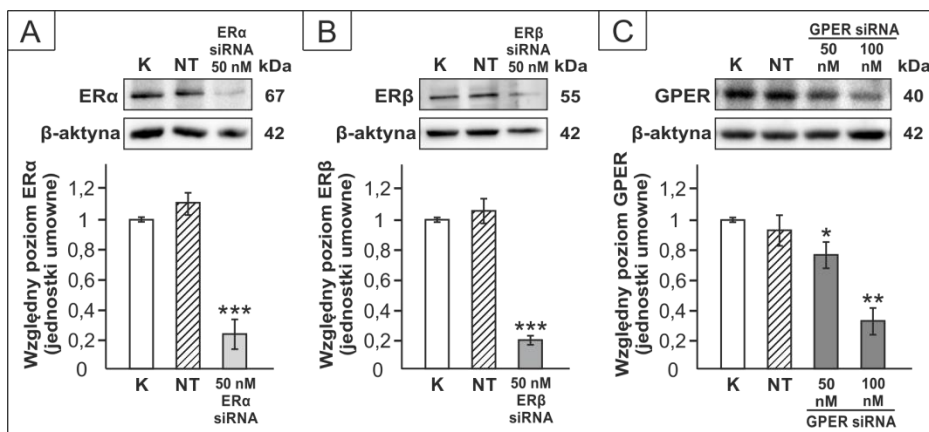


Tablica 34. Immunofluorescencyjna lokalizacja JAG1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-D) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (A'-D'). Lokalizacja JAG1 w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: 17β-estradiolu (E; B, B'), ICI 182,780 + E (ICI + E; C, C') oraz G15 + E (D, D'). Zdjęcia K/DAPI (a, a') przedstawiają złożenie sygnału JAG1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μm.

4.2.2.2. Wpływ wyciszenia receptorów estrogenowych na ekspresję *DLL1*, *DLL4* i *JAG1*

Aby potwierdzić rolę każdego z jądrowych receptorów estrogenowych ($ER\alpha$, $ER\beta$) oraz błonowego receptora estrogenowego (GPER) w kontroli ekspresji ligandów szlaku Notch, w komórkach Sertoliego linii TM4, wyciszono ekspresję tych receptorów poprzez transfekcję specyficznymi siRNA, a następnie poddano analizie ekspresję *DLL1*, *DLL4* i *JAG1*.

Skuteczność wyciszenia receptorów $ER\alpha$, $ER\beta$ oraz GPER wykazano z wykorzystaniem analizy western (**Tablica 35 A-C**). Stwierdzono czterokrotny spadek poziomu ekspresji białek $ER\alpha$ i $ER\beta$ po transfekcji komórek 50 nM siRNA w porównaniu do kontroli (**A, B**; $P < 0,001$). W przypadku białka GPER transfekcja komórek 50 nM specyficznym siRNA skutkowała obniżeniem ekspresji jedynie o około 20% (**C**; $P < 0,05$), natomiast zastosowanie stężenia 100 nM siRNA spowodowało trzykrotny spadek poziomu tego białka ($P < 0,01$). Do dalszych eksperymentów wybrano wyższe stężenie GPER siRNA, ponieważ skuteczniej hamowało ekspresję receptora GPER.

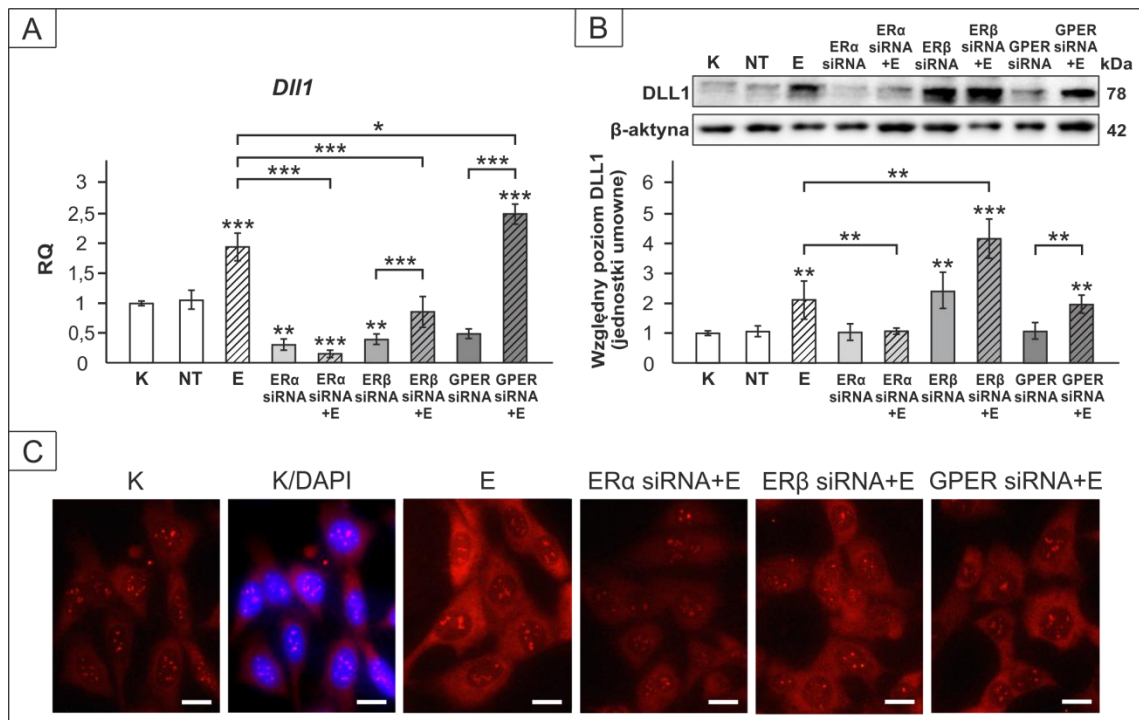


Tablica 35. Analiza skuteczności wyciszenia ekspresji ER α (A), ER β (B) lub GPER (C) w komórkach linii TM4. Inkubacja komórek z kontrolnym siRNA (NT), 50 nM lub 100 nM ER α siRNA, ER β siRNA lub GPER siRNA przez 48 godzin. (A-C) Analiza western blot ekspresji białek ER α , ER β i GPER oraz histogramy przedstawiające ich poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $\bar{x} \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (test Dunnetta).

Wyciszenie ekspresji ER α skutkowało istotnym spadkiem ekspresji mRNA *Dll1* (Tablica 36A; $P < 0,01$) i zahamowaniem stymulującego wpływu 17 β -estradiolu na ekspresję mRNA i białka DLL1 (A, B; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Chociaż po transfekcji komórek ER β siRNA nastąpił spadek poziomu mRNA *Dll1*, stwierdzono wzrost ekspresji białka DLL1 ($P < 0,001$). Wyciszenie ekspresji ER β zniosło efekt 17 β -estradiolu tylko na ekspresję mRNA *Dll1*, natomiast ekspresja białka DLL1 utrzymywała się na podwyższonym poziomie (A; $P < 0,01$). Wyciszenie receptora GPER nie wpłynęło na ekspresję DLL1, ani nie ograniczyło stymulującego wpływu 17 β -estradiolu na ekspresję tego liganda.

Analiza immunofluorescencyjna potwierdziła wyniki uzyskane w analizie western blot. Wyraźny spadek intensywności reakcji obserwowano w komórkach transfekowanych ER α siRNA hodowanych w obecności 17 β -estradiolu w porównaniu do komórek inkubowanych z samym 17 β -estradiolem (Tablica 36C). W komórkach stymulowanych 17 β -estradiolem z wyciszoną ekspresją ER β oraz GPER poziom sygnału był zbliżony do komórek po ekspozycji na sam 17 β -estradiał.

Powyższe wyniki sugerują, że ER α odgrywa dominującą rolę w kontroli DLL1 w komórkach TM4.



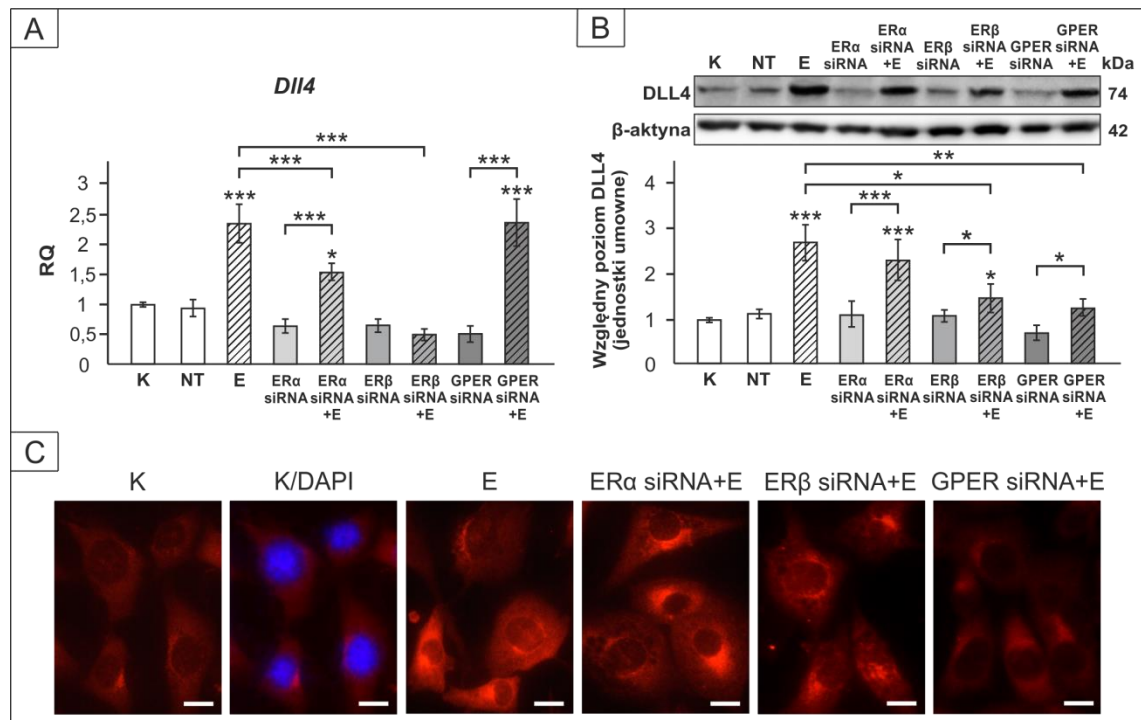
Tablica 36. Ekspresja (A, B) oraz immunofluorescencyjna lokalizacja (C) DLL1 w komórkach Sertoliego linii TM4 po wyciszeniu ekspresji ER α (ER α siRNA), ER β (ER β siRNA) lub GPER (GPER siRNA). (A) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogram przedstawiający poziom mRNA *Dll1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (B) Analiza western blot ekspresji białka DLL1 oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$ (test Tukeya). (C) Lokalizacja DLL1 w komórkach kontrolnych (K), hodowanych w obecności: 17 β -estradiolu (E), ER α siRNA + E, ER β siRNA + E oraz GPER siRNA + E. Zdjęcie K/DAPI przedstawia złożenie sygnału DLL1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.**

Po wyciszeniu ekspresji poszczególnych receptorów estrogenowych w komórkach TM4 nie stwierdzono zmian poziomu mRNA i białka DLL4 w porównaniu do kontroli (Tablica 37A, B). Transfekcja komórek ER α siRNA nie miała wpływu na stymulujące działanie 17 β -estradiolu na ekspresję białka DLL4, a jedynie częściowo obniżyła ekspresję mRNA *Dll4* (A, $P < 0,001$). Transfekcja komórek ER β siRNA całkowicie zniósł stymulowany 17 β -estradiolem wzrost ekspresji mRNA i, częściowo, białka DLL4 (A, B). Wyciszenie ekspresji GPER nie zniósł wpływu 17 β -estradiolu na ekspresję mRNA *Dll4*, ale częściowo zahamowało działanie tego hormonu na ekspresję białka DLL4 (A'; $P < 0,01$).

W komórkach z zahamowaną ekspresją ER α hodowanych w obecności 17 β -estradiolu wykazano wzrost intensywności sygnału białka DLL4, który osiągnął poziom charakterystyczny dla komórek traktowanych samym 17 β -estradiolem (Tablica

37C). W wyniku wyciszenia ekspresji ER β oraz GPER w komórkach inkubowanych z 17 β -estradiolem nastąpił spadek immunoreakcji DLL4 w porównaniu do komórek inkubowanych z 17 β -estradiolem. Efekt ten był szczególnie widoczny w komórkach transfekowanych GPER siRNA.

Podsumowując powyższe obserwacje, receptory ER β oraz GPER wydają się pośredniczyć w regulacji ekspresji białka DLL4 przez 17 β -estradiol.



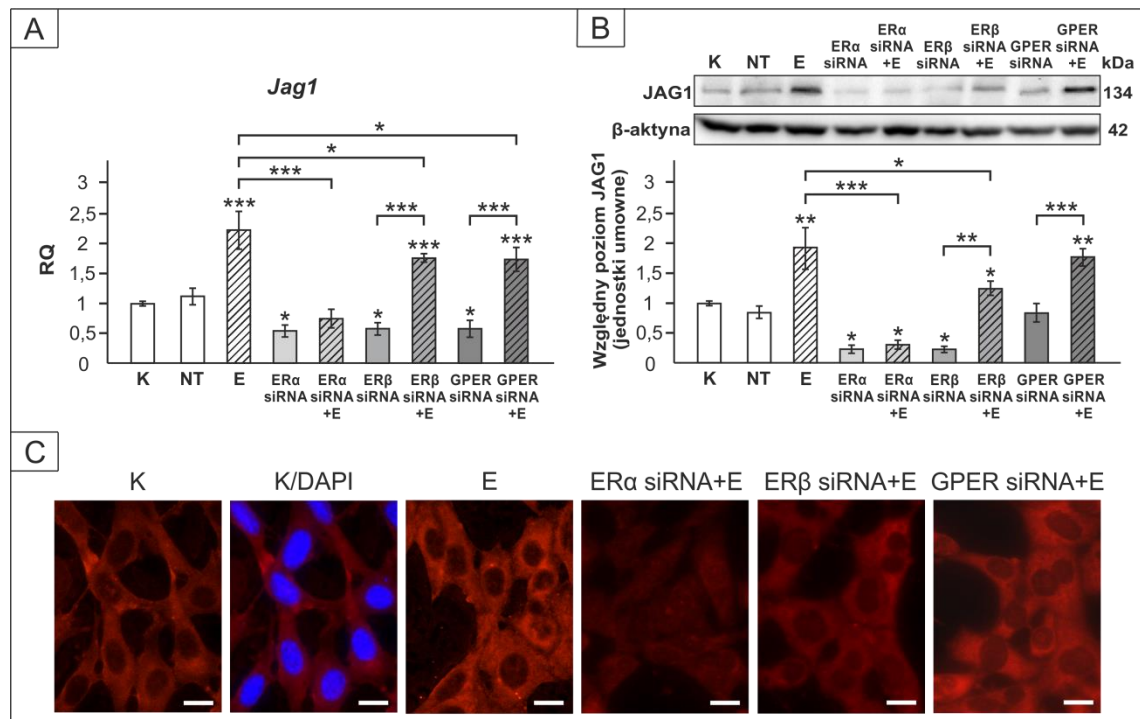
Tablica 37. Ekspresja (A, B) oraz immunofluorescencyjna lokalizacja (C) DLL4 w komórkach Sertoliego linii TM4 po wyciszeniu ekspresji ER α (ER α siRNA), ER β (ER β siRNA) lub GPER (GPER siRNA). (A) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogram przedstawiający poziom mRNA *Dll4* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (B) Analiza western blot ekspresji białka DLL4 oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, *P < 0,05; **P < 0,01; *P < 0,001 (test Tukeya). (C) Lokalizacja DLL4 w komórkach kontrolnych (K), hodowanych w obecności: 17 β -estradiolu (E), ER α siRNA + E, ER β siRNA + E oraz GPER siRNA + E. Zdjęcie K/DAPI przedstawia złożenie sygnału DLL4 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.**

Analizy RT-qPCR oraz western blot wykazały spadek poziomu mRNA oraz białka JAG1 w komórkach z zahamowaną ekspresją ER α i efekt ten utrzymywał się w obecności 17 β -estradiolu (Tablica 38A, B; P < 0,05). W komórkach transfekowanych ER β siRNA nastąpił spadek ekspresji JAG1 (P < 0,05), ale dodanie 17 β -estradiolu spowodowało wzrost ekspresji mRNA i białka JAG1 w porównaniu do

kontroli ($P < 0,05$, $P < 0,001$). Również transfekcja komórek GPER siRNA nie zahamowała stymulującego wpływu 17β -estradiolu na ekspresję mRNA i białka JAG1 ($P < 0,01$; $P < 0,001$).

W komórkach transfekowanych $ER\alpha$ siRNA oraz $ER\beta$ siRNA hodowanych w obecności 17β -estradiolu obserwowano spadek intensywności immunofluorescencji JAG1 w porównaniu do komórek traktowanych samym 17β -estradiolem (Tablica 38C). Po ekspozycji komórek na GPER siRNA oraz 17β -estradiole intensywność sygnału JAG1 była porównywalna do obserwowanej w komórkach inkubowanych z samym 17β -estradiolem.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że ekspresja JAG1 w komórkach Sertoliego jest regulowana przez estrogeny głównie za pośrednictwem receptora $ER\alpha$, natomiast $ER\beta$ ma mniejsze znaczenie w tej kontroli.



Tablica 38. Ekspresja (A, B) oraz immunofluorescencyjna lokalizacja (C) JAG1 w komórkach Sertoliego linii TM4 po wyciszeniu ekspresji $ER\alpha$ ($ER\alpha$ siRNA), $ER\beta$ ($ER\beta$ siRNA) lub GPER ($GPER$ siRNA). (A) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogram przedstawiający poziom mRNA *Jag1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (B) Analiza western blot ekspresji białka JAG1 oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$ (test Tukeya). (C) Lokalizacja JAG1 w komórkach kontrolnych (K), hodowanych w obecności: 17β -estradiolu (E), $ER\alpha$ siRNA + E, $ER\beta$ siRNA + E oraz GPER siRNA + E. Zdjęcie K/DAPI przedstawia złożenie sygnału JAG1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.**

4.2.3. Sygnalizacja estrogenowa a ekspresja receptora Notch1 i genów efektorowych szlaku Notch w komórkach Sertoliego

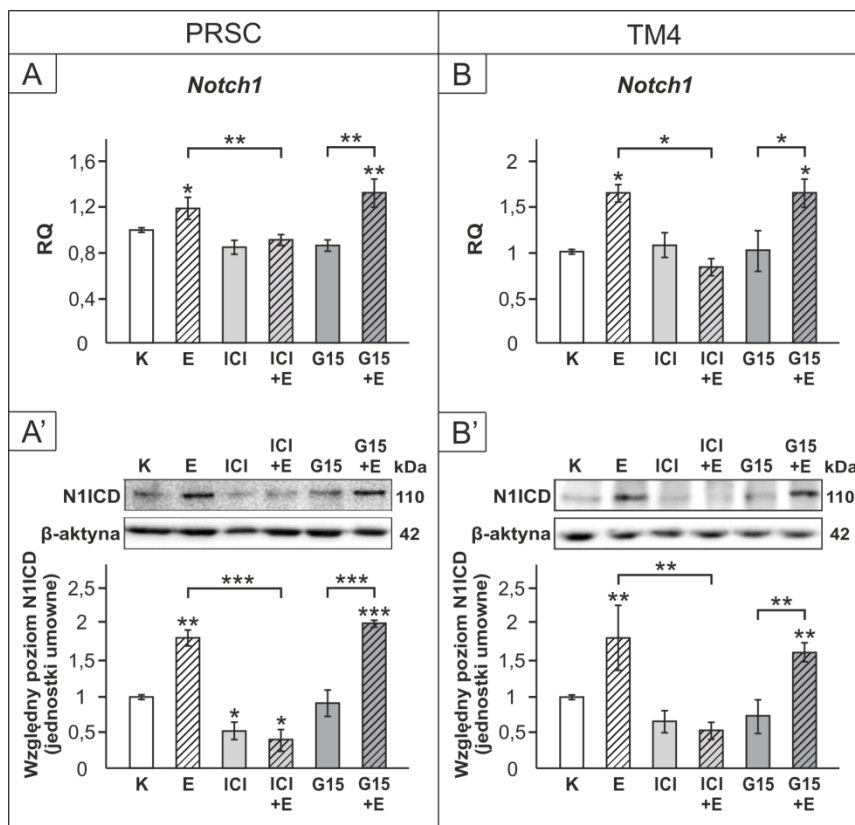
4.2.3.1. Wpływ estradiolu oraz antagonistów receptorów estrogenowych na ekspresję *Notch1/N1ICD*, *HES1* i *HEY1*

W celu wyjaśnienia, czy aktywność szlaku Notch w komórkach Sertoliego podlega regulacji przez estrogeny z udziałem receptorów wewnątrzkomórkowych ($ER\alpha$ i $ER\beta$) i/lub błonowego receptora estrogenowego (GPER), analizie poddano ekspresję *Notch1* mRNA i aktywną formę białka Notch1 (N1ICD) oraz ekspresję mRNA i białek genów efektorowych *Hes1* oraz *Hey1* po zastosowaniu 17β -estradiolu oraz antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780 lub G15).

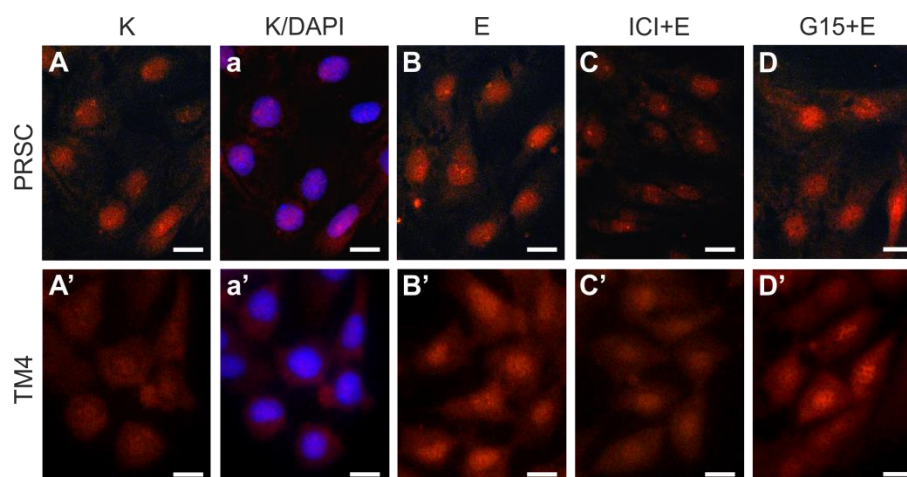
Analizy RT-qPCR oraz western blot wykazały odpowiednio wzrost ekspresji mRNA *Notch1* oraz białka N1ICD w komórkach PRSC oraz TM4 po ekspozycji na 17β -estradiol (**Tablica 39A-B'**; $P < 0,05$; $P < 0,01$). Inkubacja komórek PRSC z ICI 182,780 przyczyniła się do istotnego obniżenia poziomu N1ICD (**A'**; $P < 0,05$). ICI 182,780 zniosło wpływ 17β -estradiolu na ekspresję zarówno mRNA *Notch1*, jak i białka N1ICD (**A-B'**; $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$). W obu modelach komórkowych ekspozycja na G15 nie zahamowała stymulowanego 17β -estradiolem wzrostu poziomu mRNA i aktywnej formy białka Notch1.

Barwienie immunofluorescencyjne uwidocznilo głównie jądrową lokalizację białka N1ICD (**Tablica 40A-D'**). Wzrost intensywności reakcji obserwowano w komórkach PRSC oraz TM4 po inkubacji z 17β -estradiolem (**B, B'**). W komórkach hodowanych w obecności ICI 182,780 i 17β -estradiolu nastąpił spadek immunoreakcji w porównaniu do komórek po ekspozycji na sam estradiol (**C, C'**). Po dodaniu G15 do hodowli komórek inkubowanych w obecności 17β -estradiolu intensywność sygnału miała poziom zbliżony do komórek traktowanych samym estradiolem (**D, D'**).

Dane te wskazują, że 17β -estradiol reguluje ekspresję Notch1 oraz poziom aktywnej formy tego receptora za pośrednictwem jądrowych receptorów estrogenowych.

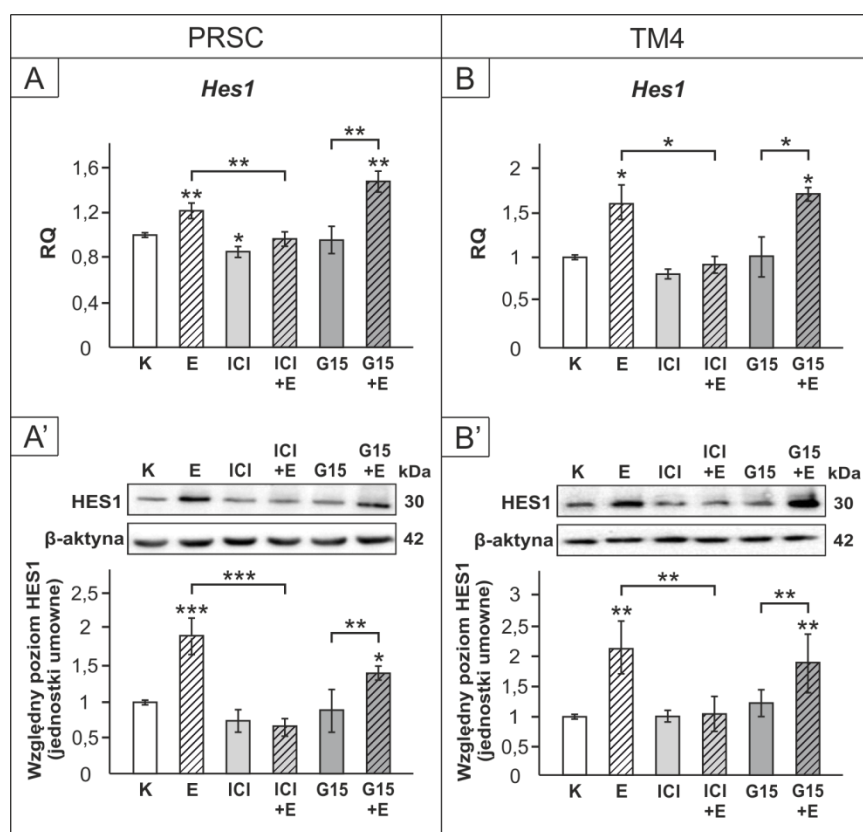


Tablica 39. Ekspresja mRNA *Notch1* i aktywnej formy białka Notch1 (N1ICD) w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, A') oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, B') po ekspozycji na 17 β -estradiol (E), ICI 182,780 (ICI) i G15. (A, B) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Notch1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (A', B') Analiza western blot ekspresji białka N1ICD oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (test Tukeya).



Tablica 40. Immunofluorescencyjna lokalizacja N1ICD w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-D) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (A'-D'). Lokalizacja N1ICD w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: 17 β -estradolu (E; B, B'), ICI 182,780 + E (ICI + E; C, C') oraz G15 + E (D, D'). Zdjęcia K/DAPI (a, a') przedstawiają złożenie sygnału N1ICD (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

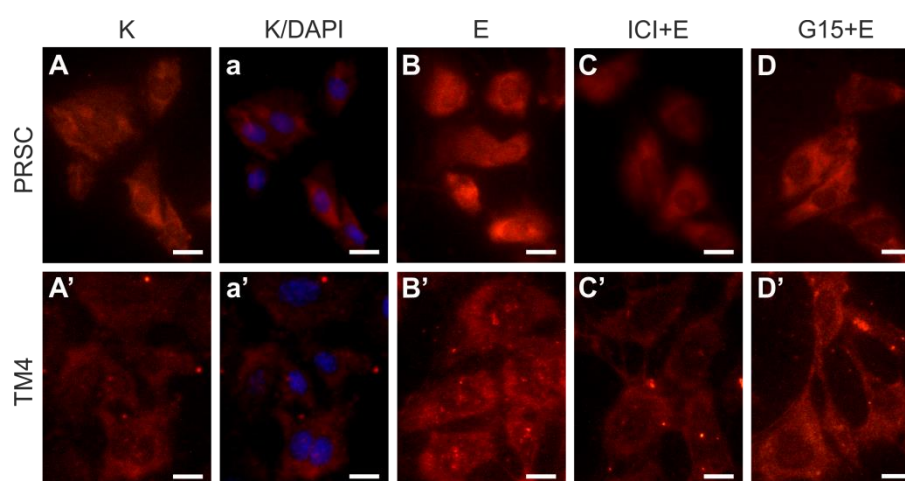
Komórki PRSC oraz TM4 inkubowane z 17 β -estradiolem charakteryzował wzrost ekspresji mRNA oraz białka HES1 w porównaniu do komórek kontrolnych (**Tablica 41A-B'**; $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Ekspozycja komórek PRSC na ICI 182,780 spowodowała spadek ekspresji HES1 tylko na poziomie mRNA (**A**; $P < 0,05$). Zastosowanie ICI 182,780 nie miało wpływu na poziom mRNA i białka HES1 w komórkach TM4. W obu modelach komórkowych hodowanych w obecności 17 β -estradiolu i ICI 182,780 ekspresja HES1 utrzymywała się na poziomie obserwowanym w komórkach kontrolnych, co wskazuje, że ICI 182,780 skutecznie zablokował działanie 17 β -estradiolu (**A-B'**, $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Zastosowanie G15 nie wywołało zmiany ekspresji HES1 w komórkach PRSC oraz TM4 oraz nie wpłynęło na stymulowaną 17 β -estradiolem ekspresję HES1 w tych komórkach.



Tablica 41. Ekspresja HES1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, A') oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, B') po ekspozycji na 17 β -estradiol (E), ICI 182,780 (ICI) i G15. (A, B) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Hes1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (A', B') Analiza western blot ekspresji białka HES1 oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$ (test Tukeya).**

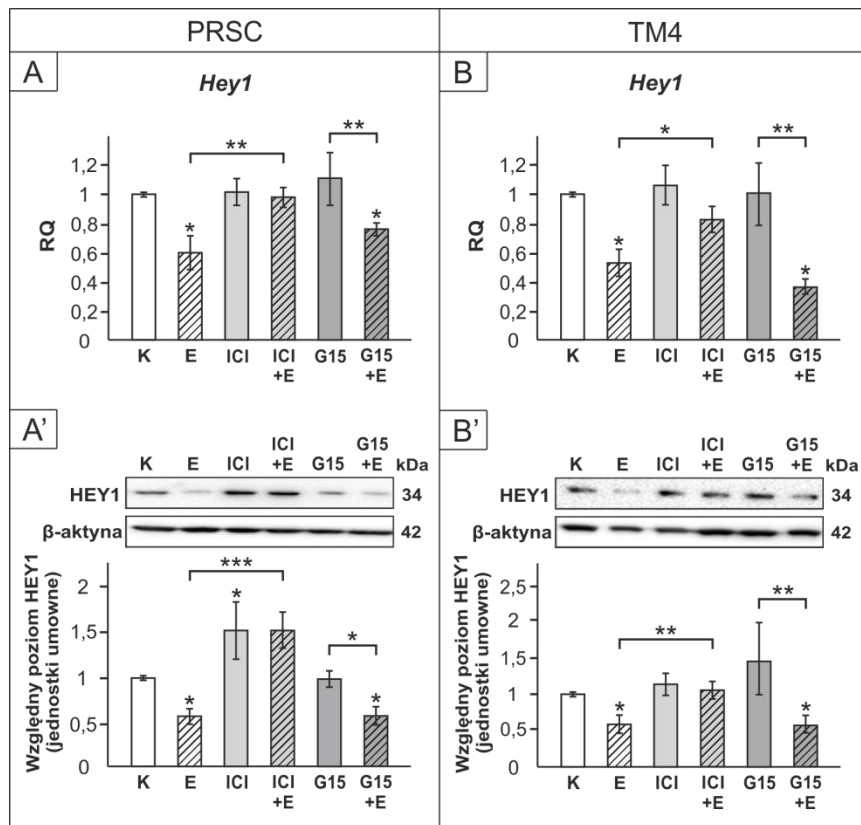
Barwienie immunofluorescencyjne wykazało cytoplazmatyczny i jądrowy sygnał HES1 zarówno w komórkach PRSC, jak i komórkach linii TM4 (**Tablica 42 A-D'**). Inkubacja komórek z 17 β -estradiolem wywołała znaczny wzrost intensywności reakcji w porównaniu do kontroli (**B, B'**). W komórkach poddanych działaniu 17 β -estradiolu w obecności ICI 182,780 lub G15 intensywność sygnału była niższa niż w komórkach inkubowanych z samym 17 β -estradiolem (**C-D'**), jednak w przypadku komórek eksponowanych na ICI 182,780 spadek ten był bardziej wyraźny (**D, D'**).

Obserwacje te wskazują, że regulacja HES1 w komórkach Sertoliego przez 17 β -estradiol odbywa się z udziałem jądrowych receptorów estrogenowych.



Tablica 42. Immunofluorescencyjna lokalizacja HES1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-D) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (A'-D'). Lokalizacja HES1 w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: 17 β -estradiolu (E; B, B'), ICI 182,780 + E (ICI + E; C, C') oraz G15 + E (D, D'). Zdjęcia K/DAPI (a, a') przedstawiają złożenie sygnału HES1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

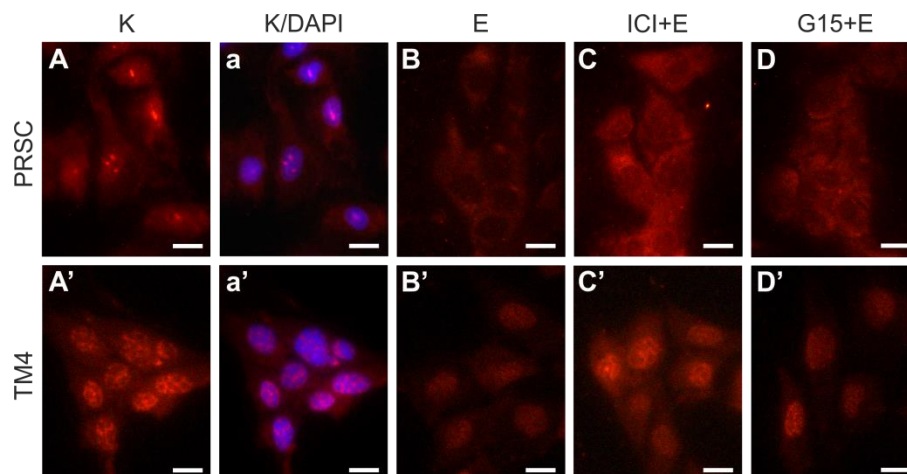
W przeciwieństwie do HES1, inkubacja komórek PRSC oraz TM4 z 17 β -estradiolem przyczyniła się do spadku ekspresji HEY1 na poziomie mRNA i białka w porównaniu do komórek kontrolnych (**Tablica 43A-B'**; $P < 0,05$). Ekspozycja komórek PRSC na ICI 182,780 nie wpłynęła na poziom mRNA *Hey1*, ale skutkowała wzrostem poziomu białka HEY1 (A'; $P < 0,05$). W obu modelach komórkowych inkubacja z ICI 182,780 zniosła hamujące działanie 17 β -estradiolu na ekspresję mRNA i białka HEY1 (A-B'; $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Po inkubacji komórek z G15 nie stwierdzono zmian w poziomie HEY1, a hamujące działanie 17 β -estradiolu na ekspresję mRNA i białka HEY1 utrzymywało się w obecności tego antagonisty ($P < 0,05$).



Tablica 43. Ekspresja HEY1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A, A') oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (B, B') po ekspozycji na 17 β -estradiol (E), ICI 182,780 (ICI) i G15. (A, B) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiające poziom mRNA *Hey1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (A', B') Analiza western blot ekspresji białka HEY1 oraz histogramy przedstawiające jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$ (test Tukeya).**

W komórkach PRSC i TM4 barwienie immunofluorescencyjne wykazało głównie jądrowy oraz cytoplazmatyczny sygnał na obecność białka HEY1 (Tablica 44A-D'). Intensywność reakcji spadła po inkubacji komórek z 17 β -estradiolem w porównaniu do komórek kontrolnych (B, B'). Poddanie komórek działaniu ICI 182,780 przyczyniło się do wyraźnego wzrostu immunoreakcji – przede wszystkim w cytoplazmie – w porównaniu do komórek inkubowanych z samym 17 β -estradiolem (C, C'). Po ekspozycji na G15 komórek hodowanych w obecności 17 β -estradiolu obserwowano spadek natężenia fluorescencji, który osiągnął poziom charakterystyczny dla komórek traktowanych samym 17 β -estradiolem (D, D').

Powyższe wyniki sugerują, że ekspresja HEY1 w komórkach Sertoliego pozostaje pod kontrolą sygnalizacji estrogenowej z udziałem jądrowych receptorów estrogenowych.



Tablica 44. Immunofluorescencyjna lokalizacja HEY1 w szczurzych komórkach Sertoliego (PRSC; A-D) oraz w komórkach Sertoliego linii TM4 (A'-D'). Lokalizacja HEY1 w komórkach kontrolnych (K; A, A'), hodowanych w obecności: 17 β -estradiolu (E; B, B'), ICI 182,780 + E (ICI + E; C, C') oraz G15 + E (D, D'). Zdjęcia K/DAPI (a, a') przedstawiają złożenie sygnału HEY1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

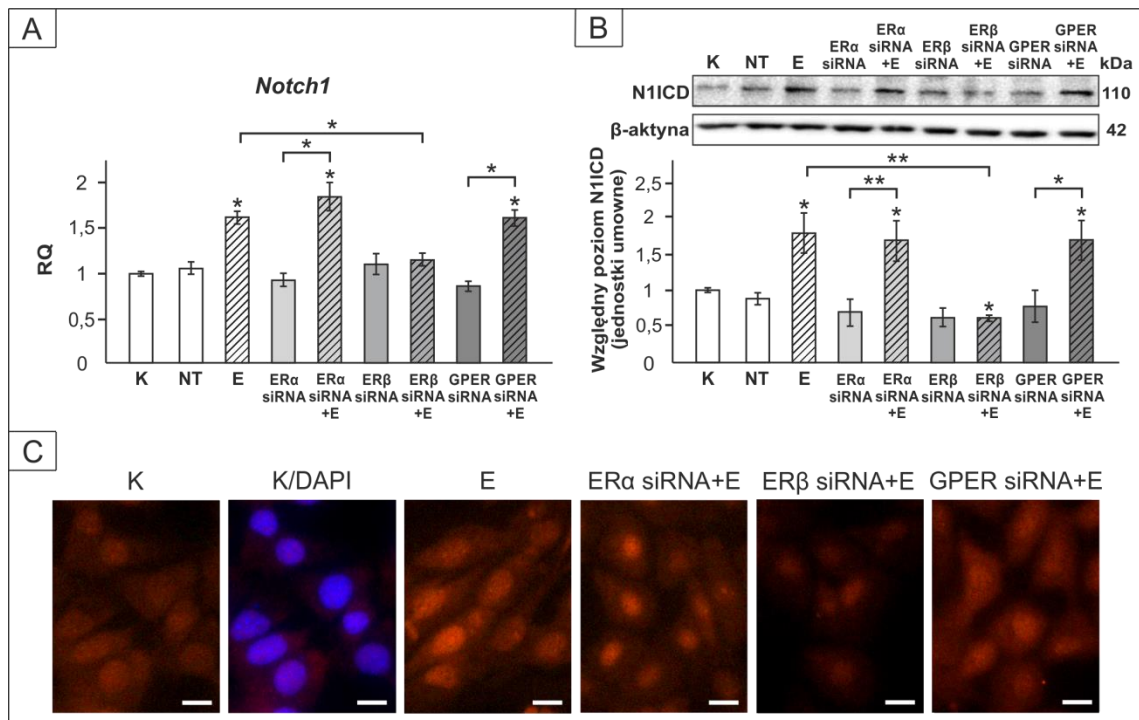
4.2.3.2. Wpływ wyciszenia receptorów estrogenowych na ekspresję *Notch1/N1ICD*, *HES1* i *HEY1*

W celu potwierdzenia roli receptorów ER α , ER β oraz GPER w kontroli ekspresji *Notch1* oraz genów efektorowych szlaku Notch, w komórkach Sertoliego TM4 wyciszono ekspresję tych receptorów poprzez transfekcję specyficznymi siRNA, a następnie poddano analizie ekspresję *Notch1/N1ICD*, *HES1* i *HEY1*.

Wyciszenie ekspresji receptora ER α , ER β czy GPER nie wpłynęło na poziom mRNA *Notch1* oraz aktywnej formy receptora *Notch1* (Tablica 45A, B). Ekspozycja na 17 β -estradiole komórek transfekowanych zarówno ER α siRNA, jak i GPER siRNA skutkowało osiągnięciem poziomu ekspresji *Notch1* zbliżonego do komórek inkubowanych z samym 17 β -estradiolem ($P < 0,05$; $P < 0,01$). Natomiast wyciszenie receptora ER β zniosło wpływ 17 β -estradiolu na ekspresję *Notch1/N1ICD*.

W komórkach TM4 transfekowanych ER α siRNA oraz GPER siRNA w obecności 17 β -estradiolu obserwowano wzrost intensywności immunofluorescencji *N1ICD*, która osiągnęła poziom charakterystyczny dla komórek inkubowanych z samym 17 β -estradiolem (Tablica 45C). Wyciszenie ekspresji ER β wywołało spadek intensywności sygnału *N1ICD* w porównaniu do komórek inkubowanych z samym 17 β -estradiolem.

Wyniki te wskazują na udział receptora ER β w regulacji ekspresji *Notch1/N1ICD* przez 17 β -estradiole w komórkach Sertoliego.



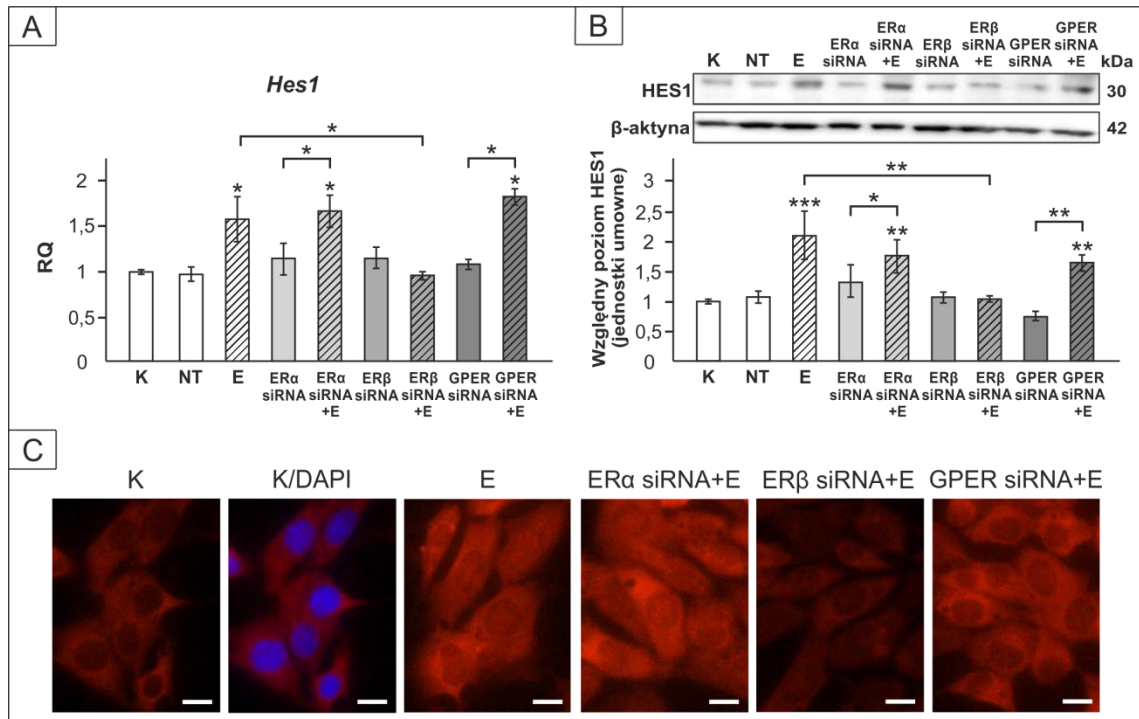
Tablica 45. Ekspresja mRNA *Notch1* (A) i aktywnej formy białka Notch1 (N1ICD) (B) oraz immunofluorescencyjna lokalizacja N1ICD (C) w komórkach Sertoliego linii TM4 po wyciszeniu ekspresji ER α (ER α siRNA), ER β (ER β siRNA) lub GPER (GPER siRNA). (A) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogram przedstawiający poziom mRNA *Notch1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (B) Analiza western blot ekspresji białka N1ICD oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (test Tukeya). (C) Lokalizacja N1ICD w komórkach kontrolnych (K), hodowanych w obecności: 17 β -estradiolu (E), ER α siRNA + E, ER β siRNA + E oraz GPER siRNA + E. Zdjęcie K/DAPI przedstawia złożenie sygnału N1ICD (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

Podobnie jak w przypadku receptora Notch1 wyciszenie ekspresji ER α , ER β oraz GPER nie wpłynęło na poziom ekspresji HES1 (Tablica 46A, B). Ekspozycja na 17 β -estradiał komórek z wyciszoną ekspresją ER α lub GPER przyczyniła się do wzrostu ekspresji mRNA i białka HES1 do poziomu obserwowanego w komórkach inkubowanych z samym 17 β -estradiolem ($P < 0,05$; $P < 0,01$). Natomiast zahamowanie ekspresji ER β zniosło stymulujący wpływ 17 β -estradiolu na ekspresję mRNA i białka HES1.

Zgodnie z wynikami analiz western blot, wyciszenie ekspresji ER α oraz GPER, a następnie inkubacja komórek z 17 β -estradiolem spowodowała wzrost natężenia fluorescencji HES1 do poziomu charakterystycznego dla komórek stymulowanych samym 17 β -estradiolem (Tablica 46C). Natomiast ekspozycja na estradiol komórek

transfekowanych ER β siRNA przyczyniła się do spadku intensywności reakcji HES1 w porównaniu do komórek po ekspozycji na sam 17 β -estradiol.

Wyniki te sugerują, że w komórkach Sertoliego ekspresja HES1 jest regulowana przez 17 β -estradiol za pośrednictwem receptora ER β .

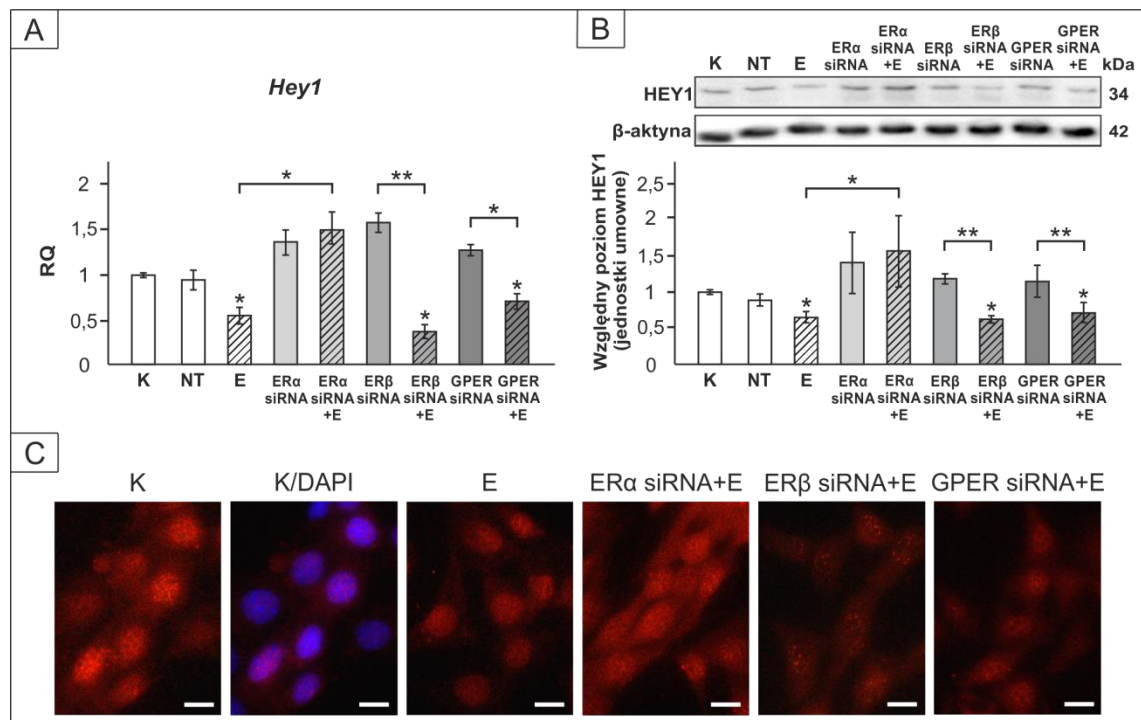


Tablica 46. Ekspresja (A, B) oraz immunofluorescencyjna lokalizacja (C) HES1 w komórkach Sertoliego linii TM4 po wyciszeniu ekspresji ER α (ER α siRNA), ER β (ER β siRNA) lub GPER (GPER siRNA). (A) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogram przedstawiający poziom mRNA *Hes1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (B) Analiza western blot ekspresji białka HES1 oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$ (test Tukeya). (C) Lokalizacja HES1 w komórkach kontrolnych (K), hodowanych w obecności: 17 β -estradiolu (E), ER α siRNA + E, ER β siRNA + E oraz GPER siRNA + E. Zdjęcie K/DAPI przedstawia złożenie sygnału HES1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.**

Wyciszenie ekspresji ER α , ER β oraz GPER nie wpłynęło na ekspresję HEY1 w komórkach TM4 (Tablica 47A, B). Inkubacja komórek w obecności 17 β -estradiolu spowodowała spadek poziomu mRNA i białka HEY1 ($P < 0,05$). Po ekspozycji na 17 β -estradiol komórek z wyciszonym ER α ekspresja mRNA i białka HEY1 utrzymywała się na poziomie kontroli ($P < 0,05$). Inkubacja w obecności 17 β -estradiolu komórek transfekowanych ER β siRNA lub GPER siRNA prowadziła do spadku ekspresji mRNA i białka HEY1 w porównaniu do kontroli ($P < 0,05$).

Po ekspozycji na 17 β -estradiol komórek z wyciszoną ekspresją ER α nastąpił wzrost intensywności reakcji HEY1 w porównaniu do komórek eksponowanych na sam 17 β -estradiol (**Tablica 47C**). Podanie 17 β -estradiolu komórkom transfekowanym ER β siRNA lub GPER siRNA skutkowało natomiast spadkiem immunoreakcji HEY1 do poziomu obserwowanego w komórkach traktowanych samym 17 β -estradiolem.

Powyższe wyniki wskazują zatem na udział jedynie ER α w regulacji ekspresji HEY1 przez 17 β -estradiol w komórkach Sertoliego.



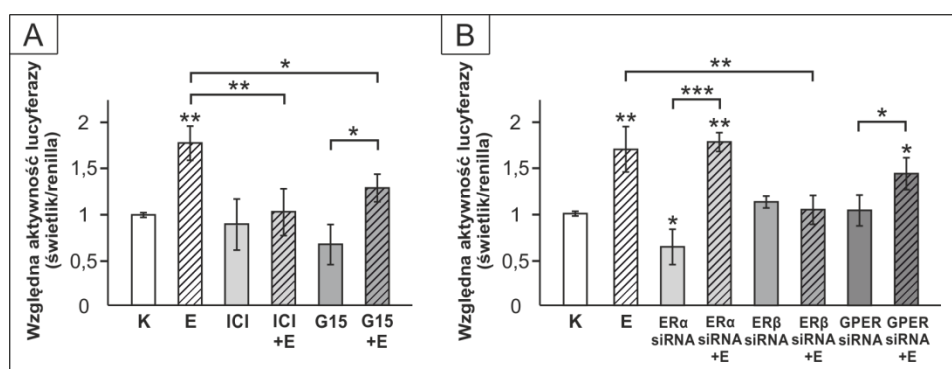
Tablica 47. Ekspresja (A, B) oraz immunofluorescencyjna lokalizacja (C) HEY1 w komórkach Sertoliego linii TM4 po wyciszeniu ekspresji ER α (ER α siRNA), ER β (ER β siRNA) lub GPER (GPER siRNA). (A) Względna ekspresja mRNA określona przy pomocy analizy RT-qPCR. Histogram przedstawiający poziom mRNA *Hey1* znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Hprt1*, *Rpl13a*), RQ - względna liczba kopii genu. (B) Analiza western blot ekspresji białka HEY1 oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny; NT- kontrola negatywna. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (test Tukeya). (C) Lokalizacja HEY1 w komórkach kontrolnych (K), hodowanych w obecności: 17 β -estradiolu (E), ER α siRNA + E, ER β siRNA + E oraz GPER siRNA + E. Zdjęcie K/DAPI przedstawia złożenie sygnału HEY1 (czerwony) oraz DAPI (niebieski; jądra komórkowe) w komórkach kontrolnych. Skala = 10 μ m.

4.2.4. Wpływ sygnalizacji estrogenowej na aktywność czynnika transkrypcyjnego RBP-J w komórkach Sertoliego

Aby potwierdzić udział estrogenów w aktywacji szlaku sygnałowego Notch, przeprowadzono analizę aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J w komórkach

inkubowanych z 17 β -estradiolem, antagonistami receptorów estrogenowych oraz po wyciszeniu ekspresji ER α , ER β i GPER.

Pomiar aktywności lucyferazy wykazał, że w komórkach Sertoliego linii TM4 hodowanych w obecności 17 β -estradiolu nastąpił wzrost aktywności czynnika RBP-J (Tablica 48A, B; P < 0,01). Po zablokowaniu receptorów estrogenowych z użyciem ICI 182,780 oraz G15 nie stwierdzono istotnych zmian w aktywności tego czynnika w porównaniu do komórek kontrolnych. Zastosowanie ICI 182,780 zniosło natomiast wpływ 17 β -estradiolu na aktywność RBP-J (A, P < 0,01). W komórkach hodowanych z 17 β -estradiolem po ekspozycji na G15 wykazano obniżenie aktywności czynnika RBP-J w porównaniu do poziomu obserwowanego w komórkach inkubowanych z samym 17 β -estradiolem (P < 0,05).



Tablica 48. Wpływ 17 β -estradiolu lub zahamowania sygnalizacji estrogenowej na aktywność czynnika transkrypcyjnego RBP-J w komórkach Sertoliego linii TM4 (A, A'). (A) Komórki transfekowano reporterem Cignal RBP-J. Po 24 godzinach do hodowli dodano nośnik (DMSO; K), 17 β -estradiol (E), ICI 182,780 (ICI), ICI + E, G15 lub G15 + E (B) Komórki transfekowano reporterem Cignal RBP-J łącznie z ER α siRNA, ER β siRNA lub GPER siRNA. Po 24 godzinach do hodowli dodano E lub nośnik. Zmiany aktywności lucyferazy analizowano w odniesieniu do komórek kontrolnych. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w trzech powtórzeniach; $x \pm SD$, *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 (test Tukeya).

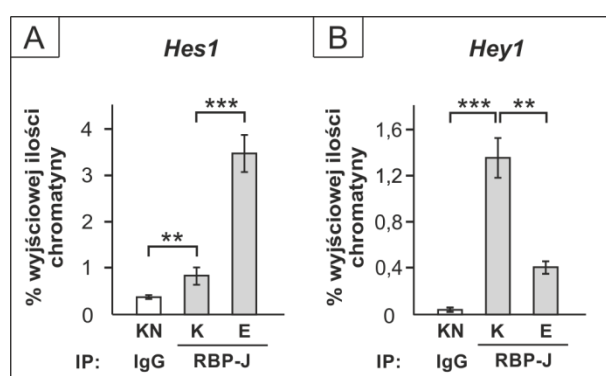
Spadek aktywności czynnika RBP-J widoczny był w komórkach z wyciszoną ekspresją receptora ER α (B; P < 0,05), ale dodanie 17 β -estradiolu do tych komórek skutkowało całkowitym przywróceniem wpływu tego hormonu na aktywność RBP-J. Transfekcja komórek ER β siRNA lub GPER siRNA nie spowodowała zmian w aktywności RBP-J. Stymulowany 17 β -estradiolem wzrost aktywności czynnika RBP-J został jednak całkowicie zniesiony w komórkach z zahamowaną ekspresją receptora ER β (P < 0,01). Natomiast w komórkach z wyciszoną ekspresją GPER 17 β -estradiol przyczynił się do wzrostu aktywności RBP-J, do poziomu zbliżonego do komórek poddanych działaniu samego 17 β -estradiolu (P < 0,05).

Uzyskane wyniki sugerują, że 17 β -estradiol reguluje aktywność czynnika RBP-J w komórkach Sertoliego przede wszystkim z udziałem receptora ER β .

4.2.5. Wpływ sygnalizacji estrogenowej na wiązanie czynnika transkrypcyjnego RBP-J z promotorami genów efektorowych szlaku Notch w komórkach Sertoliego

Wcześniejsze badania wykazały wiązanie RBP-J z sekwencją C/TGTGGGAA obecną w promotorach i enhancerach mysich genów *Hes1* i *Hey1* (Maier i wsp. 2000; Castel i wsp. 2013). W celu wyjaśnienia czy sygnalizacja estrogenowa wpływa na interakcję czynnika transkrypcyjnego RBP-J z regionami promotorowymi genów *Hes1* oraz *Hey1*, przeprowadzono immunoprecypitację chromatyny z wykorzystaniem przeciwciała anti-RBP-J, a następnie reakcję qPCR z zastosowaniem par starterów umożliwiających amplifikację rejonów okalających miejsca wiązania RBP-J z promotorami *Hes1* i *Hey1*.

Wyniki przeprowadzonej analizy wykazały, że w komórkach TM4 inkubowanych z 17 β -estradiolem nastąpił wzrost wiązania RBP-J z promotorem genu *Hes1* (Tablica 49A; $P < 0,001$), a spadek wiązania tego czynnika z promotorem genu *Hey1* (B; $P < 0,01$). Powyższe obserwacje są zgodne z wynikami analiz western blot i RT-qPCR (rozdział 4.2.2.) oraz wskazują, że czynnik RBP-J bierze udział w zależnej od 17 β -estradiolu regulacji badanych genów efektorowych szlaku sygnałowego Notch.



Tablica 49. Wpływ 17 β -estradiolu (E) na wiązanie RBP-J do regionów promotorowych genów *Hes1* (A) oraz *Hey1* (B) w komórkach Sertoliego linii TM4. (A, B) Procent wyjściowej ilości chromatyny określony przy pomocy analizy qPCR po immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) z zastosowaniem przeciwciała anti-RBP-J. Kontrolę ujemną (KN) stanowiły próbki otrzymane poprzez immunoprecypitację chromatyny z użyciem przeciwciała IgG. Wyniki uzyskano w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w dwóch powtórzeniach; $x \pm SD$, ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$ (test U-Manna Whitney).**

5. DYSKUSJA

5.1. Rola sygnalizacji FSH w regulacji szlaku Notch w komórkach Sertoliego

W niniejszej pracy w badaniach roli FSH w regulacji szlaku sygnalizacyjnego Notch *in vivo* wykorzystane zostały dwa modele doświadczalne oparte o farmakologiczną oraz fizjologiczną redukcję stężenia FSH, a następnie substytucję tego hormonu.

W celu farmakologicznego zahamowania wydzielania gonadotropin z przysadki mózgowej stosowani są m.in. antagoniści GnRH. Liczne badania wykazały zdolność tych związków do obniżania stężeń krążących FSH i LH, a w konsekwencji do ograniczenia funkcji jąder (Huhtaniemi i wsp. 1984; Shetty i wsp. 2001; McCabe i wsp. 2010). Jednym z szerzej wykorzystywanych antagonistów GnRH jest cetroreliks, syntetyczny deka-peptyd, który wiąże się z receptorami GnRH w przysadce mózgowej, nie wykazując jednocześnie aktywności agonistycznej (Reissmann i wsp. 2000). Początkowo był on stosowany w leczeniu raka prostaty, a obecnie jest używany w celu zapobiegania przedwczesnej owulacji u kobiet poddawanych procedurze zapłodnienia *in vitro* (IVF) (Gonzalez-Barcena i wsp. 1995; Shrestha i wsp. 2015). Związek ten znalazł także zastosowanie w badaniach doświadczalnych dotyczących mechanizmów hormonalnej regulacji spermatogenezy (Pareek i wsp. 2007; Walczak-Jędrzejowska i wsp. 2011; Walker i wsp. 2012; Toocheck i wsp. 2016). W prezentowanej pracy skuteczność ekspozycji samców szczurów na cetroreliks została potwierdzona w oparciu o ocenę masy i morfologii gonad – u zwierząt poddanych działaniu antagonisty GnRH (grupa CR) stwierdzono znaczny spadek masy jąder wywołany zahamowaniem spermatogenezy na etapie podziału mejotycznego.

Fizjologiczna supresja wydzielania gonadotropin występuje u gryzoni o rozrodzie sezonowym. U zwierząt tych aktywność rozrodcza zależna jest od czynników środowiskowych, z których najważniejszym jest dostępność światła (długość fotoperiodu) (Beltrán-Frutos i wsp. 2022). W warunkach laboratoryjnych sezonowe zmiany fotoperiodu w ciągu roku można naśladować poprzez odpowiednie dostosowanie oświetlenia. Wcześniejsze badania wykazały, że u sezonowo rozmnażających się chomików dzungarskich długi fotoperiod indukował szczytowe stężenia FSH w okresie dojrzewania płciowego, natomiast utrzymywanie tych zwierząt w warunkach krótkiego dnia, hamowało wydzielanie FSH (Yellon i Goldman 1984). Analogiczne efekty uzyskano u dojrzałych płciowo samców, które zostały przeniesione

do krótkiego fotoperiodu (Chandrashekar i wsp. 1994). Lerch i wsp. (1993) dowiedli z kolei, że u chomików hodowanych w warunkach krótkiego fotoperiodu stymulacja FSH skutkuje zwiększeniem liczby spermatogoniów oraz przywróceniem podziałów mejotycznych. Późniejsze badania potwierdziły, że FSH działając niezależnie od testosteronu, powoduje reinicjację różnicowania się komórek rozrodczych u samców eksponowanych na krótki fotoperiod (Meachem i wsp. 2005b). Stwierdzono ponadto, że podawanie FSH samcom chomików hodowanym w warunkach krótkiego dnia skutkowało reorganizacją białek połączeń ścisłych w obrębie bariery krew-jądro do fenotypu morfologicznie opowiadającemu lokalizacji tych białek u osobników hodowanych w długim fotoperiodzie (Tarulli i wsp. 2006; Tarulli i wsp. 2008). Wyniki te sugerują, że u gryzoni rozmnażających się sezonowo FSH jest kluczowym hormonem wpływającym na wznowienie spermatogenezy. Co istotne, manipulowanie długością fotoperiodu wpływa na oś podwzgórze-przysadka-gonady i indukuje fizjologiczne zmiany w nabłonku plemnikotwórczym bez zakłócania funkcji układu hormonalnego. Takie wywołane fotoperiodem przejście pomiędzy różnymi fazami aktywności rozrodczej umożliwia badanie hormonalnie regulowanych procesów związanych z inicjacją i kontrolą spermatogenezy.

W niniejszej pracy wykorzystano samce sezonowo rozmnażającego się gryzonia, nornicy rudej (*Myodes glareolus*), u którego stała ekspozycja na krótki fotoperiod (6 godzin światła/18 godzin ciemności) prowadzi do redukcji wydzielania gonadotropin, co skutkuje ograniczeniem steroidogennej i plemnikotwórczej funkcji gonad. Nornica ruda hodowana w warunkach krótkiego dnia świetlnego może zatem służyć jako fizjologiczny model niedoboru gonadotropin (Tähkä i wsp. 1993; Hejmej i wsp. 2011; Hejmej i wsp. 2013, Kotula-Balak i wsp. 2014). W prezentowanych badaniach skuteczność supresji osi podwzgórze-przysadka-gonady u nornic hodowanych przez 3 miesiące w warunkach krótkiego dnia (grupa KD) potwierdzono poprzez wykazanie niższego stężenia FSH w osoczu i osłabienia spermatogenezy, w porównaniu do nornic hodowanych w warunkach długiego fotoperiodu (18 godzin światła/6 godzin ciemności; DD). Należy zaznaczyć, że poza skróceniem ekspozycji na światło, pozostałe warunki hodowli nornic KD (temperatura, wilgotność i dostępność pokarmu) były takie same jak nornic DD, stąd też u nornic KD nie doszło do całkowitej regresji spermatogenezy (Kotula-Balak i wsp. 2014).

Skuteczność zastosowanej stymulacji FSH w obu modelach doświadczalnych *in vivo*, jak również w modelach komórkowych *in vitro*, potwierdzono w oparciu o analizę

ekspresji podjednostki α inhibiny (INHA), która jest białkiem podlegającym regulacji przez FSH w komórkach Sertoliego (Abel i wsp. 2009). Obecność INHA uwidoczniono w komórkach Sertoliego i w komórkach plemnikotwórczych, co jest zgodne z wynikami wcześniejszych badań lokalizacji tego białka w jądrze ssaków (Vannelli i wsp. 1992; Anderson i wsp. 1998; Weng i wsp. 2006; Sheng i wsp. 2008). Ekspozycja na FSH zarówno szczurów CR, jak i nornic KD prowadziła do wzrostu ekspresji INHA, a na podstawie analizy immunohistochemicznej wykazano, że wzrost ten pochodził głównie z komórek Sertoliego.

Wzrost ekspresji INHA widoczny był także po ekspozycji szczurzych komórek Sertoliego (PRSC) i komórek linii TM4 na FSH. Stymulacja tych komórek skutkowałą też wzrostem poziomu cAMP, szczególnie wyraźnym w komórkach PRSC. Dane te są zgodne z wynikami Crépieux i wsp. (2001), którzy wykazali, że skuteczność indukowanej przez FSH produkcji cAMP wzrasta podczas rozwoju postnatalnego do okresu dojrzewania.

Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy z wykorzystaniem modeli *in vivo* oraz w układzie *in vitro* dowiodły, że sygnalizacja FSH bierze udział w regulacji szlaku Notch w komórkach Sertoliego gryzoni.

Analiza immunohistochemiczna wykazała ekspresję liganda DLL1 w komórkach Sertoliego oraz komórkach plemnikotwórczych szczura i nornicy rudej: spermatogoniach, spermatocytach i wydłużonych spermatydach, potwierdzając wyniki wcześniejszych badań lokalizacji tego białka w gonadzie gryzoni (Murta i wsp. 2013; Kamińska i wsp. 2020b). Ekspozycja szczurów CR na FSH skutkowałą wzrostem ekspresji *Dll1* tylko na poziomie transkryptu. Natomiast ekspozycja nornic KD na FSH przyczyniła się do wzrostu ekspresji białka DLL1, który widoczny był w przypodstawnej części nabłonka. Stymulujący wpływ FSH na ekspresję tego białka w komórkach Sertoliego potwierdziły wyniki analiz western blot i immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem komórek PRSC i TM4. Wcześniejsze badania wykazały, że FSH nasila ekspresję genu *DLL1* także w komórkach raka jajnika (Gera i wsp. 2018). Wykorzystanie w niniejszej pracy komórek TM4 z wyciszoną ekspresją receptora FSH (FSHR) pozwoliło na potwierdzenie bezpośredniego udziału sygnalizacji FSHR w regulacji DLL1 w komórkach Sertoliego.

Chociaż mechanizm i znaczenie aktywacji sygnalizacji Notch w komórkach plemnikotwórczych nie są dokładnie poznane, to dotychczasowe badania wskazują na obecność w tych komórkach receptorów Notch 1-4 (Mori i wsp. 2003; Sahin i wsp.

2005; Murta i wsp. 2013; Kamińska i wsp. 2020b). Wzrost ekspresji liganda DLL1 w komórkach Sertoliego w odpowiedzi na FSH wykazany w niniejszej pracy sugeruje zatem możliwość istnienia zależnego od szlaku Notch mechanizmu pośredniej regulacji funkcjonowania komórek plemnikotwórczych przez FSH. Na występowanie pośredniej kontroli aktywności szlaku Notch w komórkach płciowych przez FSH wskazują też wyniki naszych ostatnich badań, które dowiodły, że ekspozycja na ten hormon miała wpływ na poziom aktywnej formy receptora Notch3 (ulegającego ekspresji w nabłonku nasiennym jedynie w komórkach plemnikotwórczych) w jądrze szczura i nornicy rudej, a także w kokulturach szczurzych komórek plemnikotwórczych i komórek Sertoliego (Lustofin i wsp. 2022).

W jądrach szczurów oraz nornic wykazano lokalizację białka DLL4 w komórkach Sertoliego oraz we wszystkich stadiach komórek plemnikotwórczych. Ekspresja *Dll4*/DLL4 zarówno u szczurów CR, jak i nornic KD po ekspozycji na FSH nie uległa zmianie, co potwierdziła analiza immunohistochemiczna. Nie stwierdzono też zmian ekspresji i immunolokalizacji *Dll4*/DLL4 po zastosowaniu FSH, ani po wyciszeniu FSHR w modelach komórkowych. Sugeruje to, że sygnalizacja FSH-FSHR w komórkach Sertoliego ma nieznaczny wpływ na ekspresję DLL4.

Warto zauważyć natomiast, że w jądrach szczurów NK obserwowano wyraźnie wyższą ekspresję białek DLL1 oraz DLL4, która – szczególnie w przypadku DLL4 – mogła wynikać z obecności komórek pomejotycznych, a w konsekwencji innego składu nabłonka plemnikotwórczego w porównaniu z grupami CR i CR-FSH.

Notch1 jest receptorem, który ulega ekspresji i aktywacji w dojrzałych komórkach Sertoliego, a także w komórkach plemnikotwórczych w nabłonku nasiennym gryzoni (Murta i wsp. 2013; Kamińska i wsp. 2020b). W jądrach szczurów CR aktywna forma tego receptora (N1ICD) została zlokalizowana w komórkach Sertoliego, spermatogoniach oraz w spermatocytach. U szczurów NK oraz nornic N1ICD wykryto ją też w okrągłych i wydłużonych spermatydach, zgodnie z wcześniej opisaną dystrybucją tego białka. Zarówno u szczurów CR, jak i nornic KD ekspozycja na FSH prowadziła do wzrostu poziomu N1ICD w jądrach, a analiza immunohistochemiczna wskazała, że wzrost ten dotyczył głównie komórek Sertoliego. Udział FSH w kontroli ekspresji i aktywacji receptora Notch1 potwierdziły wyniki badań *in vitro*. Analizy RT-qPCR, western blot i immunofluorescencyjne wykazały wzrost mRNA *Notch1* i białka N1ICD po ekspozycji komórek PRSC oraz TM4 na FSH. Nasilenie ekspresji mRNA i białka Notch1 po stymulacji FSH stwierdzono wcześniej także w linii komórek

raka jajnika SK-OV-3 (Park i wsp. 2010). Zahamowanie ekspresji FSHR w komórkach TM4 zniosło stymulujące działanie FSH na ekspresję Notch1, dowodząc, że ekspresja tego receptora w komórkach Sertoliego jest regulowana przez sygnalizację FSH-FSHR.

W ostatnich latach Luo i wsp. (2020) dowiedli, że białko NUMB może stabilizować aktywną formę Notch1 poprzez regulację systemu ubikwityna-proteasom. W niniejszej pracy wykazano wzrost ekspresji mRNA *Numb* w komórkach PRSC oraz TM4 traktowanych FSH, jak również w jądrach szczurów CR-FSH. Wyniki te sugerują, że mechanizm zależny od białka NUMB może również wpływać na utrzymywanie się podwyższonego poziomu Notch1 oraz jego nasilonej aktywacji w komórkach Sertoliego stymulowanych FSH.

Warto zaznaczyć, że w jądrach danio pręgowanego w odpowiedzi na FSH wzrastała ekspresja *Lfng*, genu kodującego glikozylotransferazę, która poprzez modyfikację zewnątrzkomórkowej domeny Notch1 może m. in. wzmacniać zależną od DLL1 *trans*-aktywację tego receptora (Hicks i wsp. 2000; Ladi i wsp. 2005; Crespo i wsp. 2016), co sugeruje udział FSH nie tylko w bezpośredniej regulacji aktywności szlaku Notch, ale również możliwe działanie poprzez wpływ na LFNG. Potwierdzenie takiego mechanizmu u ssaków wymaga jednak dalszych badań.

W ślad za wzrostem N1ICD w komórkach Sertoliego po zastosowaniu FSH, nastąpiło nasilenie aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J, który bierze udział w kanonicznym szlaku sygnalizacyjnym Notch w tych komórkach (Garcia i wsp. 2014). Wzrost aktywności czynnika RBP-J po ekspozycji na FSH wykazano wcześniej w komórkach raka jajnika (Gera i wsp. 2018). W komórkach TM4 z wyciszoną ekspresją FSHR nastąpił wyraźny spadek aktywności tego czynnika, co potwierdza udział sygnalizacji FSHR w kontroli aktywacji kanonicznego szlaku Notch w komórkach Sertoliego. Częściowe przywrócenie aktywności RBP-J w komórkach z wyciszoną ekspresją *Fshr* po podaniu FSH mogło mieć natomiast związek z niecałkowitym wyciszeniem receptora FSHR w komórkach TM4 – jego ekspresja po transfekcji komórek specyficznym siRNA spadła bowiem o około 60%.

W przeciwieństwie do stymulującego wpływu na receptor Notch1 i aktywność RBP-J, ekspozycja na FSH *in vivo* wywołała obniżenie ekspresji mRNA i/lub białek docelowych genów szlaku Notch, *Hey1* i *Hes1* w obu modelach zwierzęcych. Głównym miejscem ekspresji HES1 w nabłonku plemnikotwórczym obu gatunków są komórki Sertoliego, ale obecność tego białka wykazano również w komórkach plemnikotwórczych: spermatogoniach i wydłużonych spermatydach. U szczurów CR

oraz normie KD po podaniu FSH stwierdzono obniżoną ekspresję HES1, przede wszystkim w komórkach Sertoliego. Uzyskane wyniki zostały poparte badaniami *in vitro*, które wykazały spadek ekspresji HES1 w komórkach PRSC po zastosowaniu FSH. Chociaż efekt ten nie był widoczny w komórkach TM4, to wyciszenie ekspresji receptora FSHR skutkowało znaczącym wzrostem ekspresji mRNA i białka HES1, wskazując na hamujący wpływ sygnalizacji FSH-FSHR na ekspresję tego efektora szlaku Notch.

Wyjaśnieniem obniżonej ekspresji HES1 pomimo utrzymywania się podwyższonego poziomu Notch1/NIICD w odpowiedzi na działanie FSH w nabłonku plemnikotwórczym gryzoni, może być mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, transfekcja egzogennym *Hes1* prowadzi do znacznego spadku aktywności promotora *Notch1* (Agrawal et al. 2009). Jest zatem prawdopodobne, że indukowany przez FSH spadek ekspresji *Hes1* w komórkach Sertoliego, zniósł hamujące działanie tego czynnika na ekspresję Notch1. Taką możliwość potwierdzają uzyskane w niniejszej pracy wyniki, wskazujące na wzrost ekspresji Notch1 w komórkach Sertoliego TM4 po wyciszeniu ekspresji HES1. Podobną zależność stwierdzono w jądrach myszy z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego NKAPL, u których poziom mRNA *Hes1* i *Hes5* był znacznie obniżony, pomimo zwiększonej ekspresji Notch1 (Okuda et al. 2015). Ostatnie badania Li i wsp. (2022) wykazały również, że w bydlęcych komórkach granulocy FSH stymulował ekspresję *HES1*, chociaż poziom ekspresji mRNA *NOTCH2* ulegał obniżeniu.

Dane literaturowe wskazują także na możliwość niezależnej od szlaku Notch regulacji ekspresji *Hes1* (Curry i wsp. 2006; Zheng i wsp. 2017). Nie można zatem wykluczyć, że w kontrolę ekspresji *Hes1* w komórkach Sertoliego zaangażowane są dodatkowo także inne regulowane przez FSH czynniki/szlaki sygnałowe. Wykazano na przykład wpływ FSH na ekspresję czynnika NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) (Nascimento i wsp. 2016), który jak dowodzą ostatnie badania – bierze udział w kontroli ekspresji HES1 w komórkach Sertoliego (Di Persio i wsp. 2021).

W nabłonku plemnikotwórczym szczura białko HEY1 było obecne głównie w komórkach Sertoliego, jak opisano wcześniej (Kamińska i wsp. 2018; Kamińska i wsp. 2020b). Natomiast u samców nornicy rudej wykryto także silny sygnał w komórkach plemnikotwórczych, głównie spermatocytach, co może świadczyć

o różnicach międzygatunkowych w ekspresji tego białka. Ekspozycja szczurów CR na FSH skutkowałą spadkiem poziomu *Hey1* mRNA, a u nornic KD po podaniu FSH stwierdzono obniżenie ekspresji białka HEY1. Analiza immunohistochemiczna wykazała, że w jądrach obu gatunków gryzoni spadek ten dotyczył głównie komórek Sertoliego, a u nornicy rudej także spermatocytów. Wyniki doświadczeń w układzie *in vitro* potwierdziły hamujący wpływ FSH na ekspresję mRNA *Hey1* w komórkach Sertoliego. Chociaż poziom białka HEY1 w komórkach TM4 nie zmieniał się po ekspozycji na FSH, to wyciszenie ekspresji FSHR spowodowało wzrost ekspresji i nasilenie sygnału immunofluorescencji HEY1, co przemawia za rolą sygnalizacji FSHR w kontroli ekspresji tego białka. Wcześniejsze badania wykazały dynamiczne zmiany ekspresji mRNA *Hey1* w jądrach hypogonadalnych myszy (*hpg*) po stymulacji FSH lub aktywacji szlaku cAMP/PKA w pierwotnych mysich komórkach Sertoliego (Sadate-Ngatchou i wsp. 2004). Wzrost ekspresji obserwowany był po 4 godzinach od podania FSH myszom *hpg*, po kolejnych 4 godzinach poziom *Hey1* mRNA obniżał się, a następnie stabilizował na poziomie kontroli. Sugeruje to możliwość regulacji aktywności genu *Hey1* przez mechanizm auto-inhibicji.

Warto jednocześnie zaznaczyć, że u nornic DD poziom HEY1 był znacznie wyższy niż u osobników z grup KD i KD-FSH. Chociaż więc FSH hamuje ekspresję HEY1 u tego gatunku, to inne czynniki mogą odgrywać dominującą rolę w regulacji tego białka podczas zmiany aktywności rozrodczej związanej z długością fotoperiodu. W oparciu o wyniki wcześniejszych badań, które ujawniły wpływ sygnalizacji androgenowej na regulację HEY1 w komórkach Sertoliego gryzoni (Kamińska i wsp. 2020a, Kamińska i wsp. 2020b), nie można wykluczyć przeważającego udziału androgenów w kontroli tego genu efektorowego u nornicy rudej.

Zmiany poziomu analizowanych białek szlaku Notch w jądrach szczurów po stymulacji hormonalnej (CR-FSH vs. CR) były w znacznej mierze zdeterminowane przez zmiany poziomów odpowiednich transkryptów. Analizując ekspresję mRNA i białka HEY1 w jądrach szczurów NK w porównaniu do grupy CR stwierdzono natomiast odwrotną zależność. W jądrach szczurów NK ekspresja mRNA *Hey1* była niższa, zaś ekspresja białka HEY1 była znacznie wyższa w porównaniu z samcami CR. Może to wskazywać na ograniczenie translacji lub zwiększenie degradacji tego białka u szczurów CR. Wykazano na przykład, że ligaza ubikwityny FBW7 (ang. *F-box and WD repeat containing protein 7*) zaangażowana w proces ubikwitynacji i proteosomalnej degradacji białek szlaku Notch jest ujemnie regulowana przez

androgeny (Tsunematsu i wsp. 2004; Khatun i wsp. 2018), których stężenia są wyraźnie obniżone po ekspozycji na antagonistów GnRH (Roth i wsp. 2000; Shetty i wsp. 2001). Istnienie takich zależności może leżeć u podłoża nasilenia procesu degradacji białek u szczurów CR. Sygnalizacja androgenowa reguluje także aktywność eukariotycznego czynnika inicjującego translację 4E (eIF4E, ang. *eukaryotic translation initiation factor 4E*) (Xie i wsp. 2021). Można zatem postulować występowanie różnic w regulacji procesów transkrypcji lub translacji między zwierzętami traktowanymi nośnikiem i zwierzętami z zahamowaną osią HPG. Analizując wyniki ekspresji HEY1 należy także uwzględnić obecność komórek pomejotycznych w grupie NK, a tym samym inny komórkowy skład ich nabłonka nasiennego w porównaniu z grupą CR i CR-FSH.

Chociaż zarówno *Hes1*, jak i *Hey1* są początkowo pozytywnie regulowane przez receptor Notch1, aktywacja pętli auto-inhibicji i wzajemnego hamowania się tych genów może skutkować ich różnymi i dynamicznie zmieniającymi się profilami ekspresji. W zależności od kontekstu fizjologicznego, np. od typu liganda, który aktywuje receptor Notch, ekspresja *Hey1* może być albo stale hamowana przez *Hes1*, albo może wykazywać charakter oscylacyjny (Henrique i Schweisguth 2019).

Jak wspomniano w **rozdziale 1.4**, FSH stymuluje ekspresję GDNF w komórkach Sertoliego (Tadokoro i wsp. 2002; Ding i wsp. 2011). Z kolei Garcia i wsp. (2017) wykazali, że HES1 i HEY1 hamują ekspresję tego czynnika poprzez bezpośrednie oddziaływanie z promotorem *Gdnf*. Hamowanie transkrypcji przez białka HES1 i HEY1 może zachodzić z udziałem różnych mechanizmów. Białka te mogą działać zarówno jako homodimery, ale także poprzez tworzenie heterodimerów z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, m.in. z czynnikami bHLH oraz GATA (ang. *GATA binding protein*) i hamować ich aktywność (Iso i wsp. 2003; Takata i Ishikawa 2003; Fischer i wsp. 2005). Antagonistyczna rola FSH względem HES1/HEY1 w kontroli ekspresji *Gdnf* wspiera uzyskane w niniejszych badaniach wyniki dotyczące negatywnej regulacji ekspresji *Hes1* i *Hey1* w komórkach Sertoliego przez FSH. Uzyskane wyniki sugerują zatem, że FSH stymuluje produkcję GDNF nie tylko poprzez bezpośredni szlak z udziałem cAMP (Lamberti i Vicini 2014), ale również poprzez ograniczenie hamującego efektu zależnego od HES1/HEY1. Niemniej jednak konieczne są dalsze badania w celu potwierdzenia tej hipotezy.

Warto zaznaczyć, że u rebusów w okresie dojrzewania płciowego stymulacja gonadotropinami nie miała wpływu ani na ekspresję mRNA receptorów Notch, ani na mRNA *HES1*, ale obniżyła poziom mRNA *HEY1* w jądrach (Ramaswamy i wsp. 2017).

Jednak w tym modelu doświadczalnym należy wziąć pod uwagę możliwe efekty działania testosteronu, którego wydzielanie było stymulowane poprzez podanie hormonu luteinizującego. Wyniki naszych badań wskazują bowiem, że w mysich i szczurzych komórkach Sertoliego androgeny regulują aktywność szlaku Notch w sposób przeciwny do FSH (Kamińska i wsp. 2020a; Kamińska i wsp. 2020b).

Podsumowując wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy wskazują na regulację aktywności szlaku Notch i ekspresji jego komponentów przez FSH w komórkach Sertoliego gryzoni (**Rycina 12**). Interakcja między sygnalizacją FSH a szlakiem Notch w komórkach Sertoliego może być zaangażowana w zmiany aktywności nabłonka plemnikotwórczego występujące w okresie dojrzewania płciowego lub zmiany aktywności gonad u gryzoni o rozrodzie sezonowym. Ponadto, podobny charakter zmian ekspresji białek szlaku Notch w odpowiedzi na stymulację FSH po okresie zmniejszonej aktywności osi HPG w obu modelach doświadczalnych *in vivo* oraz po wyciszeniu receptora FSH *in vitro* wskazuje na wspólny mechanizm działania FSH w kontroli szlaku Notch podczas pierwszej fali, jak również wznowienia i przebiegu spermatogenezy.

5.2. Rola sygnalizacji estrogenowej w regulacji szlaku Notch w komórkach Sertoliego

Badania roli sygnalizacji estrogenowej w kontroli aktywności szlaku Notch zostały wykonane z wykorzystaniem modeli *ex vivo* oraz *in vitro*. Zastosowanie modelu *ex vivo*, jaki stanowią hodowle narządowe, pozwala na poznanie molekularnych aspektów funkcjonowania komórek gonady męskiej z zachowaniem struktury tego narządu, ale z wyłączeniem wpływu czynników pozagonadalnych, w tym hormonów osi podwzgórze-przysadka-jądro. Zaletą takich hodowli jest utrzymanie fizjologicznych oddziaływań pomiędzy poszczególnymi populacjami komórek w gonadzie męskiej i możliwość oceny bezpośredniego, ogólnego wpływu badanego hormonu na te interakcje. Modele te pozwalają również na ograniczenie liczby zwierząt wykorzystanych do badań oraz skrócenie czasu prowadzonych eksperymentów. Doświadczenia w układzie *in vitro* z wykorzystaniem monokultur komórek Sertoliego umożliwiają zweryfikowanie uzyskanych wyników w odniesieniu do wybranych populacji komórek (Dores i wsp. 2012; Goldstein i wsp. 2016).

Uzyskane w przedstawionej pracy wyniki dowiodły po raz pierwszy, że sygnalizacja estrogenowa zaangażowana jest w kontrolę ekspresji ligandów, receptorów oraz genów efektorowych szlaku Notch w komórkach Sertoliego.

Chociaż ekspozycja eksplantów jąder szczura na 17β -estradiol nie wywołała zmian ekspresji DLL1, to w szczurzych komórkach Sertoliego PRSC oraz linii TM4 17β -estradiol spowodował wzrost ekspresji mRNA i białka tego liganda, wykazany w oparciu o analizy RT-qPCR, western blot i immunofluorescencyjne. Podobny efekt działania estradiolu obserwowano w macicy myszy oraz w komórkach raka piersi linii MCF-7 (Nakamura i wsp. 2012; Kumar i wsp. 2019). Przeciwnie, spadek ekspresji mRNA *Dll1* pod wpływem 17β -estradiolu wykazano w komórkach nabłonkowych jajowodów, natomiast hormon ten nie miał wpływu na ekspresję białka DLL1 w ludzkich komórkach śródbłonna żyły pępowinowej linii HUVEC (Caliceti i wsp. 2013; Zhu i wsp. 2019). Regulacja ekspresji tego liganda przez estradiol jest zatem zależna od typu tkanki lub komórek.

Wykorzystanie antagonisty jądrowych receptorów estrogenowych ICI 182,780 lub antagonisty błonowego receptora estrogenowego G15, a także komórek z wyciszoną ekspresją ER α , ER β lub GPER, pozwoliło na wyjaśnienie roli receptorów estrogenowych w regulacji ekspresji DLL1 przez 17β -estradiol w komórkach Sertoliego. Ekspozycja eksplantów jąder na ICI 182,780 lub G15 skutkowała spadkiem poziomu mRNA i/lub białka DLL1. Z kolei tylko zahamowanie aktywności wewnątrzkomórkowych receptorów estrogenowych przez ICI 182,780 w komórkach PRSC i TM4 oraz wyciszenie ekspresji ER α w komórkach TM4 zniosło całkowicie efekt działania 17β -estradiolu na ekspresję mRNA i białka DLL1. Wyniki te sugerują, że receptor ER α odgrywa dominującą rolę w kontroli DLL1 w komórkach Sertoliego. Wyciszenie ER α w komórkach raka piersi linii MCF-7 także prowadziło do znacznego obniżenia poziomu białka DLL1, nie obserwowano natomiast zmian ekspresji mRNA *DLL1* (Kumar i wsp. 2019). Można zatem sądzić, że w komórkach Sertoliego ograniczenie działania ER α może zmniejszyć poziom DLL1 nie tylko poprzez nasilenie ubikwitynacji i degradacji białka, jak wykazano w komórkach MCF-7, ale także przez wpływ na ekspresję mRNA *Dll1*.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że sygnalizacja przez ER α kontroluje poziom DLL1 w komórkach Sertoliego, natomiast aktywacja GPER może być zaangażowana w regulację ekspresji tego liganda w innych populacjach komórek gonady. Wcześniejsze badania wykazały bowiem obecność liganda DLL1 w komórkach

Leydiga (Murta i wsp. 2013; Lu i wsp. 2019), a w niniejszej pracy uwidocznił immunoekspresję DLL1 w spermatogoniach i spermatocytach. Jednocześnie wiadomo, iż funkcjonowanie tych komórek podlega regulacji przez sygnalizację GPER (Kotula-Balak i wsp. 2018; Chimento i wsp. 2020). Warto ponadto zaznaczyć, że spadek poziomu mRNA i białka DLL1 w eksplantach jąder poddanych działaniu antagonistów receptorów estrogenowych, mimo braku wyraźnego wpływu egzogenego 17 β -estradiolu na ekspresję DLL1 w tych eksplantach, wskazuje na decydującą rolę estrogenów produkowanych lokalnie przez komórki gonady męskiej w regulacji ekspresji *Dll1*.

Analiza RT-qPCR wykazała wzrost poziomu mRNA *Dll4* w eksplantach jąder po ekspozycji na 17 β -estradiol. Stymulujący wpływ tego hormonu na ekspresję mRNA, a także białka DLL4 w komórkach PRSC i TM4, potwierdziły analizy western blot i immunofluorescencyjne. Zwiększoną ekspresję mRNA *DLL4* w odpowiedzi na estradiol opisano wcześniej w ludzkich komórkach linii HUVEC (Caliceti i wsp. 2013). Warto zauważyć, że bezpośrednia ekspozycja na ksenoestrogen – bisfenol A, także nasiliła ekspresję DLL4 w eksplantach jąder szczura (Kamińska i wsp. 2018). Przeciwnie, obniżenie ekspresji *Dll4* po zastosowaniu 17 β -estradiolu zaobserwowano w komórkach pochwy i macicy (Nakamura i wsp. 2012). Wyniki te wskazują na zależny od tkanki wpływ estrogenów na ekspresję DLL4.

W eksplantach jąder obniżenie ekspresji DLL4 obserwowano tylko po zastosowaniu ICI 182,780. W komórkach PRSC i TM4 natomiast ekspozycja na ICI 182,780 i G15, oraz wyciszenie ekspresji ER β i GPER, całkowicie lub częściowo zahamowało wpływ 17 β -estradiolu na ekspresję DLL4. Uzyskane wyniki wykazały zatem, że estradiol reguluje DLL4 w komórkach Sertoliego przy udziale jądrowego receptora ER β oraz błonowego receptora GPER. Warto zauważyć, że wyciszenie GPER w komórkach TM4 spowodowało znaczące zahamowanie wpływu estradiolu na ekspresję DLL4 tylko na poziomie białka, co sugeruje, że aktywność nieklasycznej sygnalizacji estrogenowej może być zaangażowana w potranslacyjną regulację DLL4. Na możliwość taką wskazują też wyniki badań Boscaro i wsp. (2020), którzy wykazali niezależną od aktywacji transkrypcji rolę GPER w regulacji śródbłonkowego transportera glukozy 1. W przeciwieństwie do monokultur komórek Sertoliego, w eksplantach jąder nie stwierdzono zmian ekspresji DLL4 po ekspozycji na G15. Rozbieżność ta może wynikać ze zróżnicowanego udziału GPER w kontroli DLL4 w różnych populacjach komórek jądra. Należy bowiem zauważyć, że białko DLL4

wykazuje wyższą ekspresję w komórkach pomejotycznych oraz komórkach Leydiga niż w komórkach Sertoliego (Murta i wsp. 2013; Kamińska i wsp. 2020b).

Pomimo, że po zastosowaniu 17 β -estradiolu nie stwierdzono zmian ekspresji JAG1 w eksplantach jąder, to ekspozycja na estradiol komórek PRSC i TM4 prowadziła do wzrostu poziomu mRNA i białka JAG1. Przeciwnie, w ludzkich komórkach śródbłonna estradiol obniżał ekspresję białka JAG1 (Caliceti i wsp. 2013).

Ekspozycja na ICI 182,780 nie wywołała zmian ekspresji JAG1 w eksplantach jąder, ale wpływ 17 β -estradiolu na ekspresję JAG1 został zniesiony przez tego antagonistę w komórkach Sertoliego *in vitro*, co wskazuje na zaangażowanie jądrowych receptorów estrogenowych w regulację ekspresji tego liganda. Podobną zależność wykazano w ludzkich komórkach raka piersi linii MCF-7 (Soares i wsp. 2004). Wyciszenie ER α zahamowało całkowicie, zaś wyciszenie ER β tylko częściowo, stymulujący wpływ estradiolu na ekspresję JAG1. Stąd też receptor ER α wydaje się odgrywać główną rolę w tej regulacji. Wcześniejsze badania dowiodły, że ludzki promotor *JAG1* zawiera elementy odpowiedzi na estrogeny (ERE), których wiązanie przez ER α w odpowiedzi na estradiol nasila ekspresję *JAG1* (Soares i wsp. 2004; Li i wsp. 2018). Warto również zauważyć, że wyciszenie ekspresji tego liganda w komórkach raka piersi skutkowało zahamowaniem ekspresji ER α , co świadczy o istnieniu mechanizmu regulacyjnego opartego na wzajemnym oddziaływaniu tych białek (Buckley i wsp. 2013).

Brak wyraźnego wpływu stymulacji lub zahamowania sygnalizacji estrogenowej na ekspresję JAG1 w eksplantach jąder szczura może wynikać z dominującej obecności tego liganda w komórkach plemnikotwórczych (Kamińska i wsp. 2020b) oraz zależnej od typu komórek regulacji ekspresji *Jag1* przez estrogeny. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak dalszych badań.

Należy zauważyć, że w komórkach TM4 udział ER β w regulacji ekspresji JAG1 i DLL1 przez 17 β -estradiol był mniej wyraźny niż rola ER α . W niniejszej pracy wykazano jednak znacznie wyższą ekspresję ER α w komórkach TM4 niż w PRSC, dlatego nie można wykluczyć, że w PRSC równie istotny jest również udział ER β w regulacji tych ligandów. Ostatnie badania wykazały bowiem, że DLL1 podlega kontroli przez sygnalizację estrogenową z udziałem ER β w komórkach nabłonkowych jajowodów (Zhu i wsp. 2019).

Podsumowując, zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki dowodzą, że estrogeny regulują ekspresję ligandów szlaku Notch w komórkach Sertoliego, działając głównie

przez jądrowe receptory estrogenowe, ale udział sygnalizacji estrogenowej przez receptor błonowy GPER w tej regulacji również został wykazany. Wyniki wcześniejszych badań sugerują, że GPER może też wpływać na fizjologię tkanek docelowych, wchodząc w interakcje z receptorami ER α oraz ER β (Silva i wsp. 2010).

Dane literaturowe jednoznacznie wskazują na kluczowe znaczenie równowagi między poszczególnymi ligandami receptorów Notch dla prawidłowej aktywacji tego szlaku w kontaktujących się ze sobą komórkach (Henrique i Schweisguth 2019). Murta i wsp. (2014) stwierdzili, że zahamowanie kanonicznego szlaku Notch w jądrach dorosłych szczurów skutkowało zaburzeniem wzorów ekspresji komponentów szlaku Notch, w tym liganda DLL4 w komórkach Sertoliego. Towarzyszyły temu nieprawidłowości morfologiczne komórek plemnikotwórczych oraz wzmożona apoptoza w nabłonku nasiennym. Z kolei wyniki badań Adamah i wsp. (2006) sugerują, że zaburzenia związane z aktywacją szlaku Notch w komórkach rozrodczych mogą prowadzić do nieprawidłowości w ich rozwoju i inicjować proces nowotworzenia. Można zatem postulować, iż kontrola ekspresji ligandów szlaku Notch w komórkach Sertoliego przez estrogeny stanowi istotny czynnik utrzymania homeostazy nabłonka plemnikotwórczego, zapewniając prawidłowy przebieg spermatogenezy.

Badania przedstawione w niniejszej pracy dowiodły, że sygnalizacja estrogenowa zaangażowana jest również w kontrolę ekspresji i aktywności receptora Notch1 oraz genów efektorowych szlaku Notch w komórkach Sertoliego. Zastosowanie 17 β -estradiolu nie spowodowało zmian ekspresji receptora Notch1 w eksplantach jąder, ale skutkowało wzrostem ekspresji mRNA Notch1 oraz aktywnej formy tego receptora N1ICD w komórkach PRSC i TM4. Analiza immunofluorescencyjna potwierdziła wzrost poziomu N1ICD w jądrach komórek Sertoliego. Wzrost ekspresji oraz aktywności Notch1 wykazano wcześniej w liniach komórek raka piersi MCF-7 oraz śródbłonna HUVEC poddanych działaniu estrogenów (Soares i wsp. 2004; Caliceti i wsp. 2013).

Ekspozycja eksplantów jąder zarówno, na ICI 182,780, jak i na G15 spowodowała spadek ekspresji transkryptu Notch1 oraz aktywnej formy białka, a zahamowanie sygnalizacji estrogenowej w komórkach PRSC i TM4 przez ICI 182,780 oraz poprzez wyciszenie ekspresji ER β całkowicie zniosło wpływ 17 β -estradiolu na ekspresję mRNA Notch1 i białka N1ICD. Wyniki te dowodzą, że w kontroli tego receptora przez estrogeny w komórkach Sertoliego bierze udział ER β . Fan i wsp. (2014) również wykazali zahamowanie stymulującego wpływu estradiolu na ekspresję Notch1

w komórkach macierzystych szpiku kostnego po zastosowaniu ICI 182,780. Wcześniejsze badania potwierdziły obecność ERE w promotorze genu *Notch1* (Soares i wsp. 2004; Li i wsp. 2018). Fortini i wsp. (2017) dowiedli zależnej od ER β aktywacji *Notch1* w komórkach śródbłonna. Wyniki badań Shen i wsp. (2019) wykazały natomiast, że estradiol działając przez ER α nasila aktywność szlaku sygnałowego Notch poprzez wiązanie z promotorem *NOTCH1* w komórkach raka prostaty linii PC3.

Spadek ekspresji *Notch1* po ekspozycji eksplantów na G15 stwierdzony w niniejszej pracy, może świadczyć o roli sygnalizacji za pośrednictwem GPER w kontroli ekspresji tego receptora w innych komórkach gonady męskiej, w których również opisano obecność *Notch1* (Huang i wsp. 2013; Murta i wsp. 2013; Kamińska i wsp. 2020). Na możliwy udział GPER w regulacji aktywności receptora *Notch1* wskazują wyniki badań Pupo i wsp. (2014), którzy dowiedli, że sygnalizacja estrogenowa z udziałem tego receptora indukowała aktywację *Notch1* i białka efektorowego szlaku Notch – HES1 w komórkach raka piersi linii MCF-7 oraz SkBr3.

W ślad za zmianami w ekspresji *Notch1* i poziomu N1ICD po aktywacji lub zahamowaniu sygnalizacji estrogenowej, nastąpiły zmiany ekspresji efektor szlaku Notch – HES1. Stwierdzono, że ekspozycja na 17 β -estradiol skutkowała wzrostem ekspresji mRNA i białka HES1 w eksplantach jąder. Ponieważ białko HES1 w gonadzie męskiej zlokalizowane jest przede wszystkim w komórkach Sertoliego, obserwowany efekt wynika głównie z aktywacji sygnalizacji estrogenowej w tych komórkach. Potwierdziły to wyniki doświadczeń *in vitro*, wskazujące na zwiększoną ekspresję HES1 i nasilenie sygnału immunofluorescencyjnego w komórkach PRSC i TM4 po ekspozycji na 17 β -estradiol, co uwidoczono również w analizie immunofluorescencyjnej.

Zahamowanie sygnalizacji wewnątrzkomórkowych receptorów estrogenowych przez ICI 182, 780 w eksplantach jąder szczura przyczyniło się do obniżenia poziomu *Hes1* mRNA. Ekspozycja na ICI 182,780 komórek PRSC i TM4 oraz wyciszenie ekspresji receptora ER β , całkowicie zniosło wpływ 17 β -estradiolu na ekspresję mRNA i białka HES1, co dowodzi udziału receptora ER β w kontroli tego genu efektorowego w komórkach Sertoligo, podobnie jak miało to miejsce w przypadku *Notch1*/N1ICD. Podobnie, Varshney i wsp. (2017) wykazali, że w neuronalnych komórkach progenitorowych pochodzących od myszy z nokautem genu *Esr2*, nastąpiło obniżenie ekspresji mRNA *Hes1*. Gao i wsp. (2019) opisali spadek ekspresji *Notch1*, jego aktywnej formy oraz HES1 po ekspozycji komórek raka płuc PC9 na ICI 182,780 oraz

po wyciszeniu ekspresji zarówno ER α , jak i ER β . Zależna od ER α regulacja HES1 została natomiast wykazana w linii komórek raka piersi MCF-7 (Müller i wsp. 2009). Autorzy tych badań zidentyfikowali obecność ERE w promotorze genu *HES1* oraz wykazali wiązanie ER α z tą sekwencją.

W przeciwieństwie do wpływu na ekspresję białka efektorowego HES1, ekspozycja eksplantów jąder oraz komórek PRSC i TM4 na 17 β -estradiol prowadziła do obniżenia ekspresji mRNA i białka HEY1. Nakamura i wsp. (2012) stwierdzili przeciwstawne efekty działania estradiolu na ekspresję *Hey1* w narządach żeńskiego układu rozrodczego: w pochwie obserwowano spadek mRNA *HEY1*, natomiast wzrost ekspresji nastąpił w macicy po ekspozycji na ten hormon. Zwiększenie ekspresji *Hey1* wykazano również w linii komórkowej cementoblastów (Liao i wsp. 2016), co świadczy o tkankowo-zależnej regulacji ekspresji tego genu efektorowego przez estrogeny.

Zahamowanie sygnalizacji estrogenowej przez ICI 182,780 w eksplantach jąder skutkowało wyraźnym wzrostem ekspresji białka HEY1. W komórkach PRSC i TM4 ekspozycja na ICI 182, 780 zablokowała działanie 17 β -estradiolu na ekspresję HEY1. Wpływ estradiolu zniosło także wyciszenie ekspresji ER α , co świadczy o dominującej roli tego receptora w regulacji HEY1 w komórkach Sertoliego. Hamujący wpływ ICI 182,780 na ekspresję HEY1 obserwowany był też w liniach komórek raka piersi (Simões i wsp. 2015). W hodowli pierwotnej ludzkich keratynocytów stwierdzono natomiast związek pomiędzy nasileniem ekspresji ER β a indukcją sygnalizacji Notch1/HEY1 (Brooks i wsp. 2014).

Zmianę aktywności sygnalizacji receptora Notch1 w komórkach Sertoliego w odpowiedzi na stymulację estrogenową potwierdzono z wykorzystaniem układu reporterowego lucyferazy. Przeprowadzone analizy wykazały wzrost aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J w komórkach TM4 eksponowanych na 17 β -estradiol. Zahamowanie sygnalizacji estrogenowej przez ICI 182,780, a także wyciszenie ekspresji ER β zniosło wpływ estradiolu na aktywność RBP-J. Analiza ChIP-qPCR wykazała, że ekspozycja na 17 β -estradiol komórek TM4 skutkuje zwiększeniem wiązania czynnika RBP-J z promotorem genu *Hes1*, ale spadkiem wiązania RBP-J z promotorem *Hey1*, co potwierdza uzyskane w analizach RT-qPCR i western blot dane, dotyczące przeciwstawnego wpływu estradiolu na ekspresję badanych genów efektorowych szlaku Notch.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują zatem, że estrogeny działając w komórkach Sertoliego przez receptor ER β stymulują aktywność kanonicznego szlaku Notch1-RBP-J/HES1. Hao i wsp. (2010) wykazali, że elementy wiążące RBP-J są zlokalizowane w pobliżu sekwencji ERE w genomach człowieka i gryzoni. Co więcej, dowiedli, że kompleksy Notch1/RBP-J oddziałują fizycznie z ER α , tworząc wspólny kompleks związany z DNA. Umożliwia to zależną od ER α aktywację sygnalizacji z udziałem Notch1 w komórkach raka piersi. Nie można wykluczyć udziału podobnego mechanizmu regulacyjnego z zaangażowaniem ER β w kontroli funkcji innych hormono-zależnych komórek, w tym także komórek Sertoliego.

Hamujący wpływ estradiolu na ekspresję *Hey1* może natomiast wynikać z niezależnej od kanonicznego szlaku Notch regulacji transkrypcji tego genu. Na podstawie wcześniejszych badań, wiadomo, że niekanoniczne szlaki sygnalizacji Notch mogą być aktywowane bez udziału receptorów Notch (Curry i wsp. 2006; Doetzlhofer i wsp. 2009). Na przykład Zhang i wsp. (2014) wykazali interakcję ER α z czynnikiem transkrypcyjnym RBP-J w mysich komórkach endometrium macicy, jednocześnie dowodząc, że ograniczenie aktywności szlaku Notch nie zniosło hamującego wpływu nadekspresji *Rbp-j* na ekspresję genów zależnych od ER α , co potwierdziło niezależną od Notch regulację aktywacji RBP-J w tych komórkach.

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że estrogeny są regulatorami aktywności szlaku Notch i ekspresji jego komponentów w komórkach Sertoliego gryzoni. Wykazano, że hormony te działając głównie przez ER α , regulują ekspresję ligandów DLL1 i JAG1 oraz genu efektorowego szlaku Notch – *Hey1*. Z kolei ekspresja liganda DLL4, a także aktywność receptora Notch1, czynnika RBP-J i ekspresja genu efektorowego *Hes1* są kontrolowane przez estrogeny przy udziale ER β . Chociaż nie stwierdzono roli GPER w regulacji aktywności szlaku Notch w komórkach Sertoliego, to sygnalizacja za pośrednictwem tego receptora ma istotny wpływ na ekspresję liganda DLL4. Przedstawione w niniejszej pracy dane wskazują zatem na współdziałanie sygnalizacji jądrowych i błonowych receptorów estrogenowych w kontroli prawidłowej ekspresji białek szlaku Notch w komórkach Sertoliego, a tym samym ujawniają jeden z mechanizmów oddziaływania estrogenów na utrzymanie homeostazy nabłonka nasiennego, a tym samym przebieg spermatogenezy.

6. WNIOSKI

Wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły nowych informacji dotyczących roli FSH oraz estrogenów w regulacji sygnalizacji Notch w komórkach Sertoliego gryzoni. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Zmiany ekspresji komponentów szlaku Notch w gonadzie szczura i nornicy rudej po doświadczalnym ograniczeniu produkcji gonadotropin, a następnie substytucji FSH, świadczą o wspólnym mechanizmie działania FSH na sygnalizację Notch w komórkach Sertoliego podczas inicjacji oraz wznowienia spermatogenezy u gryzoni.
2. Wpływ ekspozycji na FSH oraz wyciszenia ekspresji receptora FSHR na ekspresję liganda DLL1, ekspresję i aktywność receptora Notch1, aktywność transkrypcyjną czynnika RBP-J oraz ekspresję genów efektorowych *Hes1* i/lub *Hey1* w komórkach Sertoliego gryzoni, dowodzi znaczenia sygnalizacji FSH-FSHR jako regulatora komunikacji jukstakrynowej z udziałem szlaku Notch w nabłonku plemnikotwórczym.
3. Zakłócona ekspresja komponentów szlaku Notch wskutek zahamowania sygnalizacji estrogenowej w eksplantach jąder szczura przemawia za rolą estrogenów w regulacji sygnalizacji Notch w gonadzie męskiej gryzoni.
4. Ograniczenie aktywacji ER α w komórkach Sertoliego gryzoni hamuje działanie 17 β -estradiolu na ekspresję DLL1 oraz JAG1, natomiast zablokowanie sygnalizacji ER β i GPER zaburza ekspresję DLL4, co świadczy o znaczeniu zarówno jądrowych, jak i błonowych receptorów estrogenowych w regulacji ligandów szlaku Notch w komórkach Sertoliego.
5. Estradiol, działając przez ER β , przyczynia się do nasilenia aktywacji receptora Notch1, aktywności transkrypcyjnej RBP-J i ekspresji genu efektorowego *Hes1*, natomiast wiążąc się z ER α , obniża ekspresję genu efektorowego *Hey1*, co wskazuje na odmienne mechanizmy kontroli tych genów w komórkach Sertoliego przez estrogeny.

7. STRESZCZENIE

Kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowego przebiegu spermatogenezy odgrywają somatyczne komórki nabłonka plemnikotwórczego – komórki Sertoliego. Jednym z głównych regulatorów funkcji tych komórek jest przysadkowy hormon folikulotropowy (FSH), który stymuluje produkcję czynników parakrynych i składników odżywczych niezbędnych do prawidłowego rozwoju komórek plemnikotwórczych. Dotychczasowe badania wskazują, że również estrogeny – hormony powstające w procesie aromatyzacji androgenów – wpływają na funkcjonowanie komórek Sertoliego, działając poprzez jądrowe receptory estrogenowe α i β (ER α , ER β) oraz za pośrednictwem błonowego receptora estrogenowego (GPER). Aktywność komórek Sertoliego kontrolowana jest także z udziałem zależnej od kontaktu komunikacji międzykomórkowej. Jednym z typów takiej komunikacji jest szlak sygnałowy Notch, opierający się na interakcji między ligandami i receptorami zlokalizowanymi w błonach sąsiadujących komórek w nabłonku plemnikotwórczym.

Założeniem prezentowanej pracy było wyjaśnienie znaczenia FSH oraz estrogenów w regulacji ekspresji ligandów, receptora i genów efektorowych szlaku Notch oraz aktywności tego szlaku w komórkach Sertoliego gryzoni.

W celu poznania roli FSH w kontroli szlaku Notch przeprowadzono doświadczenia w układzie *in vivo* z wykorzystaniem okołopokwitaniowych samców szczurów Wistar oraz dojrzałych płciowo samców nornicy rudej, odpowiednio po farmakologicznym lub fizjologicznym zahamowaniu produkcji gonadotropin, a następnie substytucji FSH. Do wykazania udziału sygnalizacji estrogenowej w regulacji szlaku Notch w gonadzie męskiej wykorzystano model *ex vivo* – eksplanty jąder szczurów, inkubowane w obecności 17 β -estradiolu i antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780; G15). Badania w układzie *in vitro* przeprowadzono z użyciem hodowli pierwotnej szczurzych komórek Sertoliego oraz linii komórek Sertoliego TM4. W celu potwierdzenia udziału FSH oraz jego receptora (FSHR) w kontroli szlaku Notch, komórki Sertoliego stymulowano FSH lub wyciszano ekspresję FSHR. Aby określić rolę receptorów estrogenowych, komórki Sertoliego inkubowano z 17 β -estradiolem lub/i antagonistami receptorów estrogenowych (ICI 182,780; G15), lub wyciszono ekspresję receptorów ER α , ER β i GPER. Zmiany ekspresji komponentów szlaku Notch na poziomie mRNA i białka wykazano z zastosowaniem, odpowiednio, analizy RT-qPCR i western blot. Do określenia lokalizacji badanych białek wykorzystano

analizę immunohistochemiczną i immunofluorescencyjną. Do oceny stężenia FSH oraz cAMP posłużyły testy immunoenzymatyczne. Aktywność czynnika transkrypcyjnego RBP-J oraz jego wiązanie z promotorami genów efektorowych szlaku Notch określono z wykorzystaniem, odpowiednio, układu reporterowego lucyferazy i immunoprecypitacji chromatyny.

Analizy qRT-PCR, western blot i immunohistochemiczna wykazały, że u szczurów i nornic po doświadczalnym ograniczeniu produkcji gonadotropin, podanie FSH powodowało wzrost ekspresji liganda DLL1 oraz aktywności receptora Notch1, a spadek ekspresji genów efektorowych *Hes1* i *Hey1* na poziomie mRNA i/lub białka. Podobne zmiany ekspresji komponentów szlaku Notch u obu gatunków wskazują na wspólny mechanizm działania FSH na sygnalizację Notch w komórkach Sertoliego podczas inicjacji oraz wznowienia spermatogenezy u gryzoni. Badania w układzie *in vitro* dowiodły bezpośredniego udziału sygnalizacji FSH-FSHR w regulacji komponentów oraz aktywności szlaku Notch w komórkach Sertoliego gryzoni.

Analizy RT-qPCR i western blot wykazały, że ekspozycja na ICI 182,780 lub G15 obniżyła ekspresję mRNA i/lub białka DLL1, DLL4, Notch1, HES1, a zwiększyła poziom HEY1 w eksplantach jąder szczura. Wyniki doświadczeń w układzie *in vitro* dowiodły, że estrogeny, działając głównie poprzez ER α , regulują ekspresję ligandów DLL1 i JAG1, natomiast ER β oraz GPER są zaangażowane w kontrolę DLL4. Wykazano ponadto, iż 17 β -estradiol, wiążąc się z ER α , obniża ekspresję genu efektorowego *Hey1*, natomiast działając przez ER β , nasila aktywację receptora Notch1, aktywność transkrypcyjną RPB-J i ekspresję *Hes1*. Uzyskane wyniki dowodzą zatem roli estrogenów w kontroli sygnalizacji Notch w gonadzie męskiej oraz współdziałania receptorów ER α , ER β i GPER w specyficznej regulacji komponentów szlaku Notch w komórkach Sertoliego.

Podsumowując, wyniki przedstawionych badań wskazują na udział FSH i estrogenów w regulacji szlaku sygnalizacyjnego Notch w komórkach Sertoliego. Interakcja między sygnalizacją hormonalną a szlakiem Notch może zatem stanowić molekularny mechanizm kontrolujący funkcje komórek Sertoliego, a w konsekwencji zapewniający prawidłowy przebieg procesu spermatogenezy.

SUMMARY

Sertoli cells, the somatic cells of the seminiferous epithelium, play the key role in the proper course of spermatogenesis in mammals. One of the main regulators of Sertoli cells is pituitary follicle-stimulating hormone (FSH), which stimulates the production of paracrine factors and nutrients necessary for germ cell development. Previous studies indicate that also estrogens – hormones produced by androgen aromatization – affect Sertoli cell function, acting through both the nuclear estrogen receptors (ER α , ER β) and the membrane estrogen receptor (GPER). Moreover, Sertoli cell activity is controlled by contact-dependent intercellular communication. One type of such communication is the Notch signaling pathway triggered by the interaction between transmembrane ligands and receptors located in the neighboring cells of the seminiferous epithelium.

The aim of the presented work was to explain the importance of FSH and estrogens in the regulation of the expression of Notch pathway ligands, receptor and effector genes and the activity of this pathway in rodent Sertoli cells.

To elucidate the role of FSH in the control of Notch signaling, *in vivo* experiments were performed using peripubertal male Wistar rats and sexually mature male bank voles after pharmacological and physiological inhibition of gonadotropin production, respectively, followed by FSH substitution. To demonstrate the role of estrogen signaling in the regulation of Notch pathway in the male gonad, rat testis explants (*ex vivo* model) incubated in the presence of 17 β -estradiol and estrogen receptor antagonists (ICI 182,780; G15) were used. *In vitro* studies were conducted using primary rat Sertoli cells and the TM4 Sertoli cell line. To confirm the involvement of FSH and its receptor (FSHR) in the control of Notch pathway, Sertoli cells were either stimulated with FSH or silencing of FSHR expression was performed. To determine the role of estrogen receptors, Sertoli cells were incubated with 17 β -estradiol and/or estrogen receptor antagonists (ICI 182,780; G15), or ER α , ER β , and GPER silencing was carried out. Changes in the expression of Notch pathway components at the mRNA and protein level were demonstrated by RT-qPCR and western blot analyses, respectively. Immunohistochemical and immunofluorescence analyses were used to determine the localization of the studied proteins. Enzymatic immunoassays were carried out to assess FSH and cAMP levels. The activity of the RBP-J transcription factor and its binding to the promoters of Notch pathway effector genes were

determined using the luciferase reporter assay and chromatin immunoprecipitation, respectively.

RT-qPCR, western blot and immunohistochemistry analyses showed that in rats and bank voles after gonadotropin suppression, FSH administration caused an increase in the expression of the DLL1 ligand and the activity of the Notch1 receptor, and a decrease in the expression of *Hes1* and *Hey1* effector genes at mRNA and/or protein level. Similar changes in the expression of Notch pathway components in both species indicate a common mechanism of FSH action on Notch signaling in Sertoli cells during the initiation and recrudescence of spermatogenesis in rodents. *In vitro* studies demonstrated direct involvement of FSH-FSHR signaling in the regulation of Notch pathway components and activity in rodent Sertoli cells.

RT-qPCR and western blot analyses revealed that exposure to ICI 182,780 or G15 decreased mRNA and/or protein expression of DLL1, DLL4, Notch1, HES1 and increased HEY1 expression in rat testis explants. The results of *in vitro* experiments demonstrated that estrogens regulate the expression of DLL1 and JAG1 ligands, acting mainly through ER α , while ER β and GPER are involved in the control of DLL4. It was also found that 17 β -estradiol by binding to ER α reduces the expression of the effector gene *Hey1*, whereas 17 β -estradiol action through ER β increases the activation of the Notch1 receptor, the transcriptional activity of RPB-J and the expression of *Hes1*. The obtained data provide evidence for the role of estrogens in the control of Notch signaling in the male gonad and point out the interaction of ER α , ER β and GPER receptors in the specific regulation of Notch pathway components in Sertoli cells.

In conclusion, the results of the presented studies indicate the involvement of FSH and estrogens in the regulation of Notch signaling pathway in Sertoli cells. The interplay between hormonal signaling and Notch pathway may therefore be a molecular mechanism controlling the function of Sertoli cells, and consequently, providing the proper course of spermatogenesis.

8. LITERATURA

1. Abe K, Shen LS, Takano H (1991) The cycle of the seminiferous epithelium and stages in spermatogenesis in dd-mice. *Hokkaido Igaku Zasshi* 66: 286–299.
2. Abel MH, Baban D, Lee S, Charlton HM, O'Shaughnessy PJ (2009) Effects of FSH on testicular mRNA transcript levels in the hypogonadal mouse. *J Mol Endocrinol* 42: 291–303.
3. Abel MH, Baker PJ, Charlton HM, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Guillou F, O'Shaughnessy PJ (2008) Spermatogenesis and Sertoli cell activity in mice lacking Sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology* 149: 3279–3285.
4. Adamah DJ, Gokhale PJ, Eastwood DJ, Rajpert De-Meyts E, Goepel J, Walsh JR, Moore HD, Andrews PW (2006) Dysfunction of the mitotic:meiotic switch as a potential cause of neoplastic conversion of primordial germ cells. *Int J Androl* 29: 219–227.
5. Agrawal S, Archer C, Schaffer DV (2009) Computational models of the Notch network elucidate mechanisms of context-dependent signalling. *PLoS Comput Biol* 5: e1000390.
6. Akingbemi BT, Ge R, Rosenfeld CS, Newton LG, Hardy DO, Catterall JF, Lubahn DB, Korach KS, Hardy MP (2003) Estrogen receptor-alpha gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell. *Endocrinology* 144: 84–93.
7. Anahara R, Toyama Y, Maekawa M, Yoshida M, Kai M, Ishino F, Toshimori K, Mori C (2006) Anti-estrogen ICI 182.780 and anti-androgen flutamide induce tyrosine phosphorylation of cortactin in the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids in the mouse testis. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 276–280.
8. Anderson RA, Irvine DS, Balfour C, Groome NP, Riley SC (1998) Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. *Hum Reprod* 13: 920–926.
9. Andersson ER, Lendahl U (2014) Therapeutic modulation of Notch signalling – are we there yet? *Nat Rev Drug Discov* 13: 357–378.
10. Andrawes MB, Xu X, Liu H, Ficarro S, Marto J, Aster J, Blacklow S (2013) Intrinsic selectivity of Notch 1 for Delta-like 4 over Delta-like 1. *J Biol Chem* 288: 25477–25489.
11. Andreone L, Ambao V, Pellizzari EH, Loreti N, Cigorraga SB, Campo S (2017) Role of FSH glycan structure in the regulation of Sertoli cell inhibin production. *Reproduction* 154: 711–721.
12. Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M (2008) Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2433–2438.
13. Ascoli M, Narayan P (2014) The gonadotropin hormones and their receptors, w: Yen Jaffe's Reproductive Endocrinology (red.) Strauss JF, Barbieri RL. *Elsevier* 27–44.
14. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC (2017) The varied roles of Notch in cancer. *Annu Rev Pathol* 12: 245–275.

15. Baines H, Nwagwu MO, Hastie GR, Wiles RA, Mayhew TM, Ebling FJ (2008) Effects of estradiol and FSH on maturation of the testis in the hypogonadal (hpg) mouse. *Reprod Biol Endocrinol* 6: 4.
16. Banerjee AA, Mahale SD (2015) Role of the extracellular and intracellular loops of follicle-stimulating hormone receptor in its function. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6: 110.
17. Barakat R, Oakley O, Kim H, Jin J, Ko CJ (2016) Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB Rep* 49: 488–496.
18. Beltrán-Frutos E, Seco-Rovira V, Martínez-Hernández J, Ferrer C, Serrano-Sánchez MI, Pastor LM (2022) Cellular modifications in spermatogenesis during seasonal testicular regression: an update review in mammals. *Animals (Basel)* 12: 1605.
19. Benedito R, Roca C, Sörensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M, Adams RH (2009) The Notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 137: 1124–1135.
20. Bernardino RL, Carrageta DF, Silva AM, Calamita G, Alves MG, Soveral G, Oliveira PF (2018) Estrogen modulates glycerol permeability in sertoli cells through downregulation of aquaporin-9. *Cells* 7: 153.
21. Bernardino RL, Costa AR, Martins AD, Silva J, Barros A, Sousa M, Sá R, Alves MG, Oliveira PF (2016) Estradiol modulates Na⁽⁺⁾-dependent HCO₃⁽⁻⁾ transporters altering intracellular pH and ion transport in human Sertoli cells: A role on male fertility? *Biol Cell* 108: 179–188.
22. Bernardino RL, Martins AD, Jesus TT, Sá R, Sousa M, Alves MG, Oliveira PF (2015) Estrogenic regulation of bicarbonate transporters from SLC4 family in rat Sertoli cells. *Mol Cell Biochem* 408: 47–54.
23. Björnström L, Sjöberg M (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19: 833–842.
24. Bois C, Delalande C, Nurmio M, Parvinen M, Zanatta L, Toppari J, Carreau S (2010) Age- and cell-related gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. *J Mol Endocrinol* 45: 147–159.
25. Bonini JA, Anderson SM, Steiner DF (1997) Molecular cloning and tissue expression of a novel orphan G protein-coupled receptor from rat lung. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 190–193.
26. Bortolussi M, Zanchetta R, Belvedere P, Colombo L (1990) Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotropin receptors in rat testis from birth to puberty. *Cell Tissue Res* 260: 185–191.
27. Boscaro C, Carotti M, Albiero M, Trenti A, Fadini GP, Trevisi L, Sandonà D, Cignarella A, Bolego C (2020) Non-genomic mechanisms in the estrogen regulation of glycolytic protein levels in endothelial cells. *FASEB J* 34: 12768–12784.
28. Bouraïma-Lelong H, Vanneste M, Delalande C, Zanatta L, Wolczynski S, Carreau S (2010) Aromatase gene expression in immature rat Sertoli cells: age-related changes in the FSH signalling pathway. *Reprod Fert Dev* 22: 508–515.
29. Bray SJ (2016) Notch signalling in context. *Nat Rev Mol* 17: 722–735.

30. Brooks YS, Ostano P, Jo SH, Dai J, Getsios S, Dziunycz P, Hofbauer GF, Cervený K, Chiorino G, Lefort K, Dotto GP (2014) Multifactorial ER β and NOTCH1 control of squamous differentiation and cancer. *J Clin Invest* 124: 2260–2276.
31. Buckley NE, Nic An tSaoir CB, Blayney JK, Oram LC, Crawford NT, D'Costa ZC, Quinn JE, Kennedy RD, Harkin DP, Mullan PB (2013) BRCA1 is a key regulator of breast differentiation through activation of Notch signalling with implications for anti-endocrine treatment of breast cancers. *Nucleic Acids Res* 41: 8601–8614.
32. Caliceti C, Aquila G, Pannella M, Morelli MB, Fortini C, Pinton P, Bonora M, Hrelia S, Pannuti A, Miele L, Rizzo P, Ferrari R (2013) 17 β -estradiol enhances signalling mediated by VEGF-A-Delta-like ligand 4-Notch1 axis in human endothelial cells. *PLoS One* 8: e71440.
33. Carreau S, Hess RA (2010) Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: 1517-35.
34. Castel D, Mourikis P, Bartels SJ, Brinkman AB, Tajbakhsh S, Stunnenberg HG (2013) Dynamic binding of RBPJ is determined by Notch signaling status. *Genes Dev* 27: 1059–1071.
35. Chandrashekar V, Majumdar SS, Bartke A (1994) Assessment of the role of follicle-stimulating hormone and prolactin in the control of testicular endocrine function in adult djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) exposed to either short or long photoperiod. *Biol Reprod* 50: 82–87.
36. Chimento A, De Luca A, Nocito MC, Avena P, La Padula D, Zavaglia L, Pezzi V (2020) Role of GPER-mediated signaling in testicular functions and tumorigenesis. *Cells* 9: 2115.
37. Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Ruggiero C, Maggiolini M, Andò S, Pezzi V (2012) 17 β -Estradiol activates GPER- and ESR1-dependent pathways inducing apoptosis in GC-2 cells, a mouse spermatocyte-derived cell line. *Mol Cell Endocrinol* 355: 49–59.
38. Chimento A, Sirianni R, Delalande C, Silandre D, Bois C, Andò S, Maggiolini M, Carreau S, Pezzi V (2010) 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. *Mol Cell Endocrinol* 320: 136–144.
39. Cooke PS, Nanjappa MK, Ko C, Prins GS, Hess RA (2017) Estrogens in Male Physiology. *Physiol Rev* 97: 995–1043.
40. Costagliola S, Urizar E, Mendive F, Vassart G (2005) Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors. *Reproduction* 130: 275–281.
41. Crépieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, Guillou F, Reiter E (2001) The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene* 20: 4696–4709.
42. Crespo D, Assis LHC, Furmanek T, Bogerd J, Schulz RW (2016) Expression profiling identifies Sertoli and Leydig cell genes as Fsh targets in adult zebrafish testis. *Mol Cell Endocrinol* 437: 237–251.

43. Curry CL, Reed LL, Nickoloff BJ, Miele L, Foreman KE (2006) Notch-independent regulation of Hes-1 expression by c-Jun N-terminal kinase signaling in human endothelial cells. *Lab Invest* 86: 842–852.
44. De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lécureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G (2004) A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1327–1332.
45. De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18: 6653–6665.
46. Di Persio S, Starace D, Capponi C, Saracino R, Fera S, Filippini A, Vicini E (2021) TNF- α inhibits GDNF levels in Sertoli cells, through a NF- κ B-dependent, HES1-dependent mechanism. *Andrology* 9: 956–964.
47. Dias JA, Cohen BD, Lindau-Shepard B, Nechamen CA, Peterson AJ, Schmidt A (2002) Molecular, structural, and cellular biology of follitropin and follitropin receptor. *Vitam Horm* 64: 249–322.
48. Ding LJ, Yan GJ, Ge QY, Yu F, Zhao X, Diao ZY, Wang ZQ, Yang ZZ, Sun HX, Hu YL (2011) FSH acts on the proliferation of type A spermatogonia via Nur77 that increases GDNF expression in the Sertoli cells. *FEBS Lett* 585: 2437–2444.
49. Dirami G, Ravindranath N, Achi MV, Dym M (2001) Expression of Notch pathway components in spermatogonia and Sertoli cells of neonatal mice. *J Androl* 22: 944–952.
50. Doetzlhofer A, Basch ML, Ohyama T, Gessler M, Groves AK, Segil N (2009) Hey2 regulation by FGF provides a Notch-independent mechanism for maintaining pillar cell fate in the organ of Corti. *Dev Cell* 16: 58–69.
51. Dores C, Alpaugh W, Dobrinski I (2012) From *in vitro* culture to *in vivo* models to study testis development and spermatogenesis. *Cell Tissue Res* 349: 691–702.
52. D'Souza B, Meloty-Kapella L, Weinmaster G (2010) Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr Top Dev Biol* 92: 73–129.
53. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127: 4277–4291.
54. Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS, (1996) Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137: 4796–4805.
55. Fagotto F, Gumbiner BM (1996) Cell contact-dependent signaling. *Dev Biol* 180: 445–454.
56. Fan JZ, Yang L, Meng GL, Lin YS, Wei BY, Fan J, Hu HM, Liu YW, Chen S, Zhang JK, He QZ, Luo ZJ, Liu J (2014) Estrogen improves the proliferation and differentiation of hBMSCs derived from postmenopausal osteoporosis through notch signaling pathway. *Mol Cell Biochem* 392: 85–93.

57. Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, Ni X, Wang Y, Ball D, Brat DJ, Perry A, Eberhart CG (2004) Notch1 and Notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* 64: 7787–7793.
58. Fietz D, Bergmann M, Hartmann K (2016) In situ hybridization of estrogen receptors α and β and GPER in the human testis. *Methods Mol Biol* 1366: 189–205.
59. Fietz D, Ratzenböck C, Hartmann K, Raabe O, Kliesch S, Weidner W, Klug J, Bergmann M (2014) Expression pattern of estrogen receptors α and β and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis. *Histochem Cell Biol* 142: 421–432.
60. Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P (2007) Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148: 3236–3245.
61. Filipiak E, Suliborska D, Laszczynska M, Walczak-Jedrzejska R, Oszukowska E, Marchlewska K, Kula K, Slowikowska-Hilczler J (2013) Estrogen receptor alpha localization in the testes of men with normal spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol* 50: 340–345.
62. Fischer A, Gessler M (2007) Delta-Notch – and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res* 35: 4583–4596.
63. Fischer A, Klattig J, Kneitz B, Diez H, Maier M, Holtmann B, Englert C, Gessler M (2005) Hey basic helix-loop-helix transcription factors are repressors of GATA4 and GATA6 and restrict expression of the GATA target gene ANF in fetal hearts. *Mol Cell Biol* 25: 8960–8970.
64. Fleming RJ (2020) Ligand-Induced Cis-Inhibition of Notch Signaling: The role of an extracellular region of serrate. *Adv Exp Med Biol* 1227: 29–49.
65. Fortini F, Vieceli Dalla Sega F, Caliceti C, Aquila G, Pannella M, Pannuti A, Miele L, Ferrari R, Rizzo P (2017) Estrogen receptor β -dependent Notch1 activation protects vascular endothelium against tumor necrosis factor α (TNF α)-induced apoptosis. *J Biol Chem* 292: 18178–18191.
66. França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD (2016) The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4: 189–212
67. Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y (2006) G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 904–910.
68. Gallagher S, Desjardins P (2008) Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Curr Protoc Protein Sci* 4: 3.
69. Gao X, Cai Y, Wang Z, He W, Cao S, Xu R, Chen H (2019) Estrogen receptors promote NSCLC progression by modulating the membrane receptor signaling network: a systems biology perspective. *J Transl Med* 17: 308.
70. Gao Y, Xiao X, Lui WY, Lee WM, Mruk D, Cheng CY (2016) Cell polarity proteins and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 59: 62–70.
71. Garcia TX, DeFalco T, Capel B, Hofmann MC (2013) Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence. *Dev Biol* 377: 188–201.

72. Garcia TX, Farmaha JK, Kow S, Hofmann MC (2014) RBPJ in mouse Sertoli cells is required for proper regulation of the testis stem cell niche. *Development* 141: 4468–4478.
73. Garcia TX, Parekh P, Gandhi P, Sinha K, Hofmann MC (2017) The NOTCH ligand JAG1 regulates GDNF expression in Sertoli cells. *Stem Cells Dev* 26: 585–598.
74. George JW, Dille EA, Heckert LL (2011) Current concepts of follicle-stimulating hormone receptor gene regulation. *Biol Reprod* 84: 7–17.
75. Gera S, Kumar S S, Swamy SN, Bhagat R, Vadaparty A, Gawari R, Bhat R, Dighe RR (2018) Follicle-stimulating hormone is an autocrine regulator of the ovarian cancer metastatic niche through Notch signaling. *J Endocr Soc* 3: 340–357.
76. Gibson DA, Saunders PT (2012) Estrogen dependent signaling in reproductive tissues – a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Mol Cell Endocrinol* 348: 361–372.
77. Goldstein KM, Seyler DE, Durand P, Perrard MH, Baker TK (2016) Use of a rat *ex-vivo* testis culture method to assess toxicity of select known male reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 60: 92–103.
78. Gonzalez-Barcena D, Vadillo-Buenfil M, Cortez-Morales A, Fuentes-Garcia M, Cardenas-Cornejo I, Comaru-Schally AM, Schally AV (1995) Luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix as primary single therapy in patients with advanced prostatic cancer and paraplegia due to metastatic invasion of spinal cord. *Urology* 45: 275–281.
79. Griswold MD (2018) 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biol Reprod* 99: 87–100.
80. Grover A, Sairam MR, Smith CE, Hermo L (2004) Structural and functional modifications of Sertoli cells in the testis of adult follicle-stimulating hormone receptor knockout mice. *Biol Reprod* 71: 117–129.
81. Guentchev M, McKay RD (2006) Notch controls proliferation and differentiation of stem cells in a dose-dependent manner. *Eur J Neurosci* 23: 2289–2296.
82. Hansson V, Weddington SC, French FS, McLean W, Smith A, Nayfeh SN, Ritzén EM, Hagenäs L (1976) Secretion and role of androgen-binding proteins in the testis and epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* (24 suppl): 17–33.
83. Hao L, Rizzo P, Osipo C, Pannuti A, Wyatt D, Cheung LW, Sonenshein G, Osborne BA, Miele L (2010) Notch-1 activates estrogen receptor-alpha-dependent transcription via IKKalpha in breast cancer cells. *Oncogene* 29: 201–213.
84. Hayashi T, Gust KM, Wyatt AW, Goriki A, Jäger W, Awrey S, Li N, Oo HZ, Altamirano-Dimas M, Buttyan R, Fazli L, Matsubara A, Black PC (2016) Not all NOTCH is created equal: the oncogenic role of NOTCH2 in bladder cancer and its implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 22: 2981–2992.
85. Hayashi T, Kegeyama Y, Ishizaka K, Xia G, Kihara K, Oshima H (2001) Requirement of Notch 1 and its Ligand Jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. *J Androl* 22: 999–1011.

86. Heckert LL, Griswold MD (1991) Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testis and Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 5: 670–677.
87. Hejmej A, Gorazd M, Kosiniak-Kamysz K, Wiszniewska B, Sadowska J, Bilińska B (2005) Expression of aromatase and oestrogen receptors in reproductive tissues of the stallion and a single cryptorchid visualised by means of immunohistochemistry. *Domest Anim Endocrinol* 29: 534–547.
88. Hejmej A, Kotula-Balak M, Chojnacka K, Kuras P, Lydka-Zarzycka M, Bilinska B (2013) Photoperiod-dependent effects of 4-tert-octylphenol on adherens and gap junction proteins in bank vole seminiferous tubules. *Int J Endocrinol* 2013: 134589.
89. Hejmej A, Kotula-Balak M, Galas J, Bilińska B (2011) Effects of 4-tert-octylphenol on the testes and seminal vesicles in adult male bank voles. *Reprod Toxicol* 31: 95–105.
90. Henrique D, Schweisguth F (2019) Mechanisms of Notch signalling: a simple logic deployed in time and space. *Development* 146: dev172148.
91. Hess RA (2000) Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev Reprod* 5: 84–92.
92. Hewitt SC, Korach KS (2018) Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. *Endocr Rev* 39: 664–675.
93. Hicks C, Johnston SH, diSibio G, Collazo A, Vogt TF, Weinmaster G (2000) Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biol* 2: 515–520.
94. Hofmann MC, McBeath E (2022) Sertoli Cell-Germ Cell Interactions Within the Niche: Paracrine and Juxtacrine Molecular Communications. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 897062.
95. Holdcraft RW, Braun RE (2004) Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 131: 459–467.
96. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 107.
97. Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S (2013) Notch signaling at a glance. *J Cell Sci* 126: 2135–2140.
98. Huang Z, Rivas B, Agoulnik AI (2013) NOTCH1 gain of function in germ cells causes failure of spermatogenesis in male mice. *PLoS One* 8: e71213
99. Huhtaniemi IT, Eskola V, Pakarinen P, Matikainen T, Sprengel R (1992) The murine luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor genes: Transcription initiation sites, putative promoter sequences and promoter activity. *Mol Cell Endocrinol*, 88: 55–66.
100. Huhtaniemi IT, Stewart JM, Channabasavaiah K, Fraser HM, Clayton RN (1984) Effect of treatment with GnRH antagonist, GnRH antiserum and bromocriptine on pituitary-testicular function of adult rats. *Mol Cell Endocrinol* 34: 127–135.

101. Inano K, Curtis SW, Korach KS, Omata S, Horigome T (1994) Heat shock protein 90 strongly stimulates the binding of purified estrogen receptor to its responsive element. *J Biochem* 116: 759-766.
102. Iso T, Kedes L, Hamamori Y (2003) HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signalling pathway. *J Cell Physiol* 194: 237–255.
103. James AC, Szot JO, Iyer K, Major JA, Pursglove SE, Chapman G, Dunwoodie SL (2014) Notch4 reveals a novel mechanism regulating Notch signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1843: 1272–1284.
104. Jan SZ, Hamer G, Repping S, de Rooij DG, van Pelt AM, Vormer TL (2012) Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1822: 1838–1850.
105. Jannini EA, Ulisse S, Cecconi S, Cironi L, Colonna R, D'Armiento M, Santoni A, Cifone MG (1994) Follicle-stimulating hormone-induced phospholipase A2 activity and eicosanoid generation in rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 51: 140–145.
106. Jiang X, Liu H, Chen X, Chen PH, Fischer D, Sriraman V, Yu HN, Arkininstall S, He X (2012) Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 12491–12496.
107. Joseph A, Hess RA, Schaeffer DJ, Ko C, Hudgin-Spivey S, Chambon P, Shur BD (2010) Absence of estrogen receptor alpha leads to physiological alterations in the mouse epididymis and consequent defects in sperm function. *Biol Reprod* 82: 948–957.
108. Kamińska A, Marek S, Pardyak L, Brzoskwinia M, Bilińska B, Hejmej A (2020a) Crosstalk between androgen-ZIP9 signaling and Notch Pathway in rodent Sertoli cells. *Int J Mol Sci*, 21: 8275.
109. Kamińska A, Marek S, Pardyak L, Brzoskwinia M, Pawlicki P, Bilińska B, Hejmej A (2020b) Disruption of androgen signaling during puberty affects Notch pathway in rat seminiferous epithelium. *Reprod Biol Endocrinol*, 18: 30.
110. Kamińska A, Pardyak L, Marek S, Górowska-Wójtowicz E, Kotula-Balak M, Bilińska B, Hejmej A (2018) Bisphenol A and dibutyl phthalate affect the expression of juxtacrine signaling factors in rat testis. *Chemosphere* 199: 182–190.
111. Kamińska A, Pardyak L, Marek S, Wróbel K, Kotula-Balak M, Bilińska B, Hejmej A (2020c) Notch signaling regulates nuclear androgen receptor AR and membrane androgen receptor ZIP9 in mouse Sertoli cells. *Andrology* 8: 457–472.
112. Kangasniemi M, Kaipia A, Mali P, Toppari J, Huhtaniemi I, Parvinen M (1990) Modulation of basal and FSH-dependent cyclic AMP production in rat seminiferous tubules staged by an improved transillumination technique. *The Anatomical Record* 227: 62–76.
113. Khatun A, Shimozawa M, Kito H, Kawaguchi M, Fujimoto M, Ri M, Kajikuri J, Niwa S, Fujii M, Ohya S (2018) Transcriptional repression and protein degradation of the Ca²⁺-activated K⁺ channel KCa1.1 by androgen receptor inhibition in human breast cancer cells. *Front Physiol* 9: 312.
114. Kotula-Balak M, Grzmil P, Chojnacka K, Andryka K, Bilinska B (2014) Do photoperiod and endocrine disruptor 4-tert-octylphenol effect on spermatozoa of bank vole (*Clethrionomys glareolus*)? *Gen Comp Endocrinol* 201: 21–29.

115. Kotula-Balak M, Pawlicki P, Milon A, Tworzydło W, Sekula M, Pacwa A, Gorowska-Wojtowicz E, Bilinska B, Pawlicka B, Wiater J, Zarzycka M, Galas J (2018) The role of G-protein-coupled membrane estrogen receptor in mouse Leydig cell function-*in vivo* and *in vitro* evaluation. *Cell Tissue Res* 374: 389–412.
116. Kumar A, Dumasia K, Gaonkar R, Sonawane S, Kadam L, Balasinor NH (2015) Estrogen and androgen regulate actin-remodeling and endocytosis-related genes during rat spermiation. *Mol Cell Endocrinol* 404: 91–101.
117. Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, Singh R, Bhasin S, Jasuja R (2011) The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids* 2011: 812540.
118. Kumar S, Srivastav RK, Wilkes DW, Ross T, Kim S, Kowalski J, Chatla S, Zhang Q, Nayak A, Guha M, Fuchs SY, Thomas C, Chakrabarti R (2019) Estrogen-dependent DLL1-mediated Notch signaling promotes luminal breast cancer. *Oncogene* 38: 2092–2107.
119. Kuroda T, Lee MM, Haqq CM, Powell DM, Manganaro TF, Donahoe PK (1990) Mullerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle-stimulating hormone in the rat testes. *Endocrinology* 127: 1825–1832.
120. Ladi E, Nichols JT, Ge W, Miyamoto A, Yao C, Yang LT, Boulter J, Sun YE, Kintner C, Weinmaster G (2005) The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol* 170: 983–992.
121. Lamberti D, Vicini E (2014) Promoter analysis of the gene encoding GDNF in murine Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 394: 105–114.
122. Lampa J, Hoogerbrugge JW, Baarends WM, Stanton PG, Perryman KJ, Grootegoed JA, Robertson DM (1999) Follicle-stimulating hormone and testosterone stimulation of immature and mature Sertoli cells *in vitro*: inhibin and N-cadherin levels and round spermatid binding. *J Androl* 20: 399–406.
123. Leblond CP, Clermont Y (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci* 55: 548–573.
124. Lee NP, Mruk D, Lee WM, Cheng CY (2003) Is the cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis? *Biol Reprod* 68: 489–508
125. Lee VWK, de Kretser DM, Hudson B, Wang C (1975) Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. *J Reprod Fertil* 42: 121–126.
126. Lerchl A, Sotiriadou S, Behre HM, Pierce J, Weinbauer GF, Kliesch S, Nieschlag E (1993) Restoration of spermatogenesis by follicle-stimulating hormone despite low intratesticular testosterone in photoinhibited hypogonadotropic Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Biol Reprod* 49: 1108–1116.
127. Levallet J, Bilinska B, Mittre H, Genissel C, Fresnel J, Carreau S (1998) Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod* 58: 919–26.
128. Li JCH, Lee WM, Mruk DD, Cheng CY (2001) Regulation of Sertoli cell myotubularin (rMTM) expression by germ cells *in vitro*. *J Androl* 22: 266–277.

129. Li N, Zhang L, Li Q, Du Y, Liu H, Liu Y, Xiong W (2018) Notch activity mediates oestrogen-induced stromal cell invasion in endometriosis. *Reproduction* 157: 371–381.
130. Li Y, Jing J, Dang W, Jia K, Guo X, Kebreab E, Lyu L, Zhao J (2022) Cross-talk between NOTCH2 and BMP4/SMAD signaling pathways in bovine follicular granulosa cells. *Theriogenology* 187: 74–81.
131. Liao J, Zhou Z, Huang L, Li Y, Li J, Zou S (2016) 17 β -estradiol regulates the differentiation of cementoblasts via Notch signaling cascade. *Biochem Biophys Res Commun* 477: 109–114.
132. Lin X, Tirichine L, Bowler C (2012) Protocol: Chromatin immunoprecipitation (ChIP) methodology to investigate histone modifications in two model diatom species. *Plant Methods* 8: 48.
133. Lindzey J, Wetsel WC, Couse JF, Stoker T, Cooper R, Korach KS (1998) Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* 139: 4092–4101.
134. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402–408.
135. Loveland KL, Hedger MP (2015). Activins and inhibins, w: Sertoli cell biology (red.) Griswold MD. *Elsevier* 201–232.
136. Lu E, Feng F, Wen W, Tong X, Li X, Xiao L, Li G, Wang J, Zhang C (2019) Notch signaling inhibition induces G0/G1 arrest in murine Leydig cells. *Andrologia* 51: e13413.
137. Lucas TF, Pimenta MT, Pisolato R, Lazari MF, Porto CS (2011) 17 β -estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. *Spermatogenesis* 1: 318–324.
138. Lucas TF, Royer C, Siu ER, Lazari MF, Porto CS (2010) Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 83: 307–317.
139. Lucas TF, Siu ER, Esteves CA, Monteiro HP, Oliveira CA, Porto CS, Lazari MF (2008) 17beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 78: 101–14.
140. Lucas TFG, Lazari MFM, Porto CS (2014) Differential role of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 on the regulation of proteins involved with proliferation and differentiation of Sertoli cells from 15-day-old rats. *Mol Cell Endocrinol* 382: 84–96.
141. Lustofin S, Kamińska A, Parzyk L, Pawlicki P, Brzoskwinia M, Szpręgiel I, Bilińska B, Hejmej A (2022) Follicle-stimulating hormone regulates Notch signalling in seminiferous epithelium of continuously and seasonally breeding rodents. *Reprod Fertil Dev* 34: 560–575
142. Luo Z, Mu L, Zheng Y, Shen W, Li J, Xu L, Zhong B, Liu Y, Zhou Y (2020) NUMB enhances Notch signaling by repressing ubiquitination of NOTCH1 intracellular domain. *J Mol Cell Biol* 12: 345–358.
143. Macheroni C, Lucas TFG, Porto CS (2020) The role of estrogen receptors in rat Sertoli cells at different stages of development. *Heliyon* 6: e05363.

144. Maier MM, Gessler M (2000) Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 652–660.
145. Mašek J, Andersson ER (2017) The developmental biology of genetic Notch disorders. *Development* 144: 1743–1763.
146. Mather JP (1980) Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines. *Biol Reprod* 23: 243–252.
147. Mattes B, Scholpp S (2018) Emerging role of contact-mediated cell communication in tissue development and diseases. *Histochem Cell Biol* 150: 431–442.
148. McCabe MJ, Tarulli GA, Meachem SJ, Robertson DM, Smooker PM, Stanton PG (2010) Gonadotropins regulate rat testicular tight junctions *in vivo*. *Endocrinology* 151: 2911–2922.
149. McLachlan RI, Wreford NG, de Kretser DM, Robertson DM (1995) The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology* 136: 4035–4043.
150. McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, DE Kretser DM, Robertson DM (1996) The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol* 148: 19.
151. Meachem SJ, McLachlan RI, Stanton PG, Robertson DM, Wreford NG (1999) FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats. *J Androl* 20: 756–762;
152. Meachem SJ, Ruwanpura SM, Ziolkowski J, Ague JM, Skinner MK, Loveland KL (2005a) Developmentally distinct *in vivo* effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *J Endocrinol* 186: 429–46.
153. Meachem SJ, Stanton PG, Schlatt S (2005b) Follicle-stimulating hormone regulates both Sertoli cell and spermatogonial populations in the adult photoinhibited Djungarian hamster testis. *Biol Reprod* 72: 1187–1193.
154. Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorruga SB (2002) Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: Possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/ protein kinase b pathway. *J Endocrinol* 174: 195–204.
155. Miłoś A, Kaczmarczyk M, Pawlicki P, Bilinska B, Duliban M, Gorowska-Wojtowicz E, Tworzydło W, Kotula-Balak M (2019) Do estrogens regulate lipid status in testicular steroidogenic Leydig cell? *Acta Histochem* 121: 611–618.
156. Mohr OL (1919) Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in *Drosophila*. *Genetics* 4: 275–282.
157. Mori S, Kadokawa Y, Hoshinaga K, Marunouchi T (2003) Sequential activation of Notch family receptors during mouse spermatogenesis. *Dev Growth Differ* 45: 7–13.
158. Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H, Miyazono K (2011) ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Res* 39: 8712–8127.

159. Mruk DD, Cheng CY (2004) Sertoli–Sertoli and Sertoli–germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 25: 747–806.
160. Mruk DD, Cheng CY (2011a) An *in vitro* system to study Sertoli cell blood-testis barrier dynamics. *Methods Mol Biol* 763: 237–252.
161. Mruk DD, Cheng CY (2011b) Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis* 1: 121–122.
162. Mruk DD, Cheng CY (2015) The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. *Endocr Rev* 36: 564–591.
163. Mullaney BP, Skinner MK (1992) Basic fibroblast growth factor (bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule: Follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. *Endocrinology* 131: 2928–2934.
164. Murta D, Batista M, Silva E, Trindade A, Henrique D, Duarte A, Lopes-da-Costa L (2013) Dynamics of Notch pathway expression during mouse testis post-natal development and along the spermatogenic cycle. *PLoS One* 8: e72767.
165. Murta D, Batista M, Trindade A, Silva E, Henrique D, Duarte A, Lopes-da-Costa L (2014) *In vivo* notch signaling blockade induces abnormal spermatogenesis in the mouse. *PLoS One* 9: e113365.
166. Müller P, Merrell KW, Crofts JD, Rönnlund C, Lin CY, Gustafsson JA, Ström A (2009) Estrogen-dependent downregulation of hairy and enhancer of split homolog-1 gene expression in breast cancer cells is mediated via a 3' distal element. *J Endocrinol* 200: 311–319.
167. Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Sato T, Iguchi T, Ohta Y (2012) Sequential changes in the expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina and uterus of ovariectomized mice after estrogen exposure. *In Vivo* 26: 899–906.
168. Nandagopal N, Santat LA, Elowitz MB (2019) *Cis*-activation in the Notch signaling pathway. *Elife* 8: e37880.
169. Nandagopal N, Santat LA, LeBon L, Sprinzak D, Bronner ME, Elowitz MB (2018) Dynamic ligand discrimination in the Notch signaling pathway. *Cell* 172: 869–880.
170. Nanjappa MK, Hess RA, Medrano TI, Locker SH, Levin ER, Cooke PS (2016) Membrane-localized estrogen receptor 1 is required for normal male reproductive development and function in mice. *Endocrinology* 157: 2909–2919.
171. Nascimento AR, Macheroni C, Lucas TF, Porto CS, Lazari MF (2016) Crosstalk between FSH and relaxin at the end of the proliferative stage of rat Sertoli cells. *Reproduction* 152: 613–628.
172. Nicol L, McNeilly JR, Stridsberg M, Crawford JL, McNeilly AS (2002) Influence of steroids and GnRH on biosynthesis and secretion of secretogranin II and chromogranin A in relation to LH release in LbetaT2 gonadotroph cells. *J Endocrinol* 174: 473–483.

173. Noguchi YT, Nakamura M, Hino N, Nogami J, Tsuji S, Sato T, Zhang L, Tsujikawa K, Tanaka T, Izawa K, Okada Y, Doi T, Kokubo H, Harada A, Uezumi A, Gessler M, Ohkawa Y, Fukada SI (2019) Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: HeyL requires Hes1 to bind diverse DNA sites. *Development* 146: dev163618.
174. O'Donnell L (2015) Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis* 4: e979623.
175. O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22: 289–318.
176. O'Donnell L, Smith LB, Rebourcet (2022) Sertoli cells as key drivers of testis function. *Semin Cell Dev Biol* 121: 2–9.
177. Oduwole OO, Peltoketo H, Huhtaniemi IT (2018) Role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 763.
178. Okuda H, Kiuchi H, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, Nonomura N, Miyata H, Okabe M, Ikawa M, Kawakami Y, Goshima N, Wada M, Tanaka H (2015) A novel transcriptional factor Nkapl is a germ cell-specific suppressor of Notch signaling and is indispensable for spermatogenesis. *PLoS One* 10: e0124293.
179. Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA (1988) Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122: 787–794.
180. Orth JM (1982) Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203: 485–492.
181. O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Abel MH (2010) Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction* 139: 177–184.
182. Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Choor M, Vonk R, Fritzemeier KH (2009) GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biol Reprod* 80: 34–41.
183. Pareek TK, Joshi AR, Sanyal A, Dighe RR (2007) Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis* 12: 1085–1100.
184. Park Y-H, Kim SJ, Jeong B-H, Herzog TJ, Wright J, Kitajewski J, Rhim CC, Jang PR, Kang JB, Kim SJ (2010) Follicular stimulating hormone enhances Notch 1 expression in SK-OV-3 ovarian cancer cells. *J Gynecol Oncol* 21: 119–124.
185. Petersen C, Soder O (2006) The Sertoli cell – a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 66: 153–161
186. Petrovic J, Formosa-Jordan P, Luna-Escalante JC, Abelló G, Ibañes M, Neves J, Giraldez F (2014) Ligand-dependent Notch signaling strength orchestrates lateral induction and lateral inhibition in the developing inner ear. *Development* 141: 2313–2324.
187. Pupo M, Pisano A, Abonante S, Maggiolini M, Musti AM (2014) GPER activates Notch signaling in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs). *Int J Biochem Cell Biol* 46: 56–67.

188. Rago V, Maggiolini M, Vivacqua A, Palma A, Carpino A (2004) Differential expression of estrogen receptors (ERalpha/ERbeta) in testis of mature and immature pigs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 281: 1234–1239.
189. Ramaswamy S, Walker WH, Aliberti P, Sethi R, Marshall GR, Smith A, Nourashrafeddin S, Belgorosky A, Chandran UR, Hedger MP, Plant TM (2017) The testicular transcriptome associated with spermatogonia differentiation initiated by gonadotrophin stimulation in the juvenile rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Hum Reprod* 32: 2088–2100.
190. Ramaswamy S, Weinbauer G (2014) Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis* 4: e996025
191. Rannikko A, Penttilä TL, Zhang FP, Toppari J, Parvinen M, Huhtaniemi I (1996) Stage-specific expression of the FSH receptor gene in the prepubertal and adult rat seminiferous epithelium. *J Endocrinol* 151: 29–35.
192. Rato L, Alves MG, Socorro S, Carvalho RA, Cavaco JE, Oliveira PF (2012a) Metabolic modulation induced by oestradiol and DHT in immature rat Sertoli cells cultured *in vitro*. *Biosci Rep* 32: 61–69.
193. Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF (2012b) Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol* 9: 330–338.
194. Rato L, Socorro S, Cavaco J, Oliveira P (2010) Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: Ion transporters and aquaporins in Sertoli cells. *J Membr Biol* 236: 215–224.
195. Regueira M, Artagaveytia SL, Galardo MN, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Meroni SB, Riera MF (2015) Novel molecular mechanisms involved in hormonal regulation of lactate production in Sertoli cells. *Reproduction* 150: 311–321.
196. Reissmann T, Schally AV, Bouchard P, Riethmiiller H, Engel J (2000) The LHRH antagonist cetrorelix: a review. *Hum Reprod Update* 6: 322–331.
197. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn J., Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307: 1625–1630.
198. Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER (1999) Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp 19*) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7986–7991.
199. Robertson KM, Simpson ER, Lacham-Kaplan O, Jones ME (2001) Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. *J Androl* 22: 825–830.
200. Rochira V, Zirilli L, Genazzani AD, Balestrieri A, Aranda C, Fabre B, Antunez P, Diazz C, Carani C, Maffei L (2006) Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in two men with aromatase deficiency: Evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. *Eur J Endocrinol* 155: 513–522.
201. Rossi P, Sette C, Dolci S, Geremia R (2000) Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J Endocrinol Invest* 23: 609–615.
202. Roth C, Leonhardt S, Seidel C, Lakomek M, Wuttke W, Jarry H (2000) GnRH antagonist cetrorelix prevents sexual maturation of peripubertal male rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108: 358–363.

203. Royer C, Lucas TF, Lazari MF, Porto CS (2012) 17beta-estradiol signaling and regulation of proliferation and apoptosis of rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 86: 108.
204. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Stanton PG, Loveland KL, Meachem SJ (2008) Pathways involved in testicular germ cell apoptosis in immature rats after FSH suppression. *J Endocrinol* 197: 35–43.
205. Sadate-Ngatchou PI, Pouchnik DJ, Griswold MD (2004) Follicle-stimulating hormone induced changes in gene expression of murine testis. *Mol Endocrinol* 18: 2805–2816.
206. Safe S, Kim K (2008) Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 41:263–275.
207. Sahin Z, Bayram Z, Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Seval Y, Erdogru T, Ustunel I, Baykara M, Demir R (2005) Effect of experimental varicocele on the expressions of Notch 1, 2, and 3 in rat testes: an immunohistochemical study. *Fertil Steril* 83: 86–94.
208. Schnorr JA, Bray MJ, Veldhuis JD (2001) Aromatization mediates testosterone's short-term feedback restraint of 24-hour endogenously driven and acute exogenous gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in young men. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2600–2606.
209. Sever R, Glass CK (2013) Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a016709.
210. Shah W, Khan R, Shah B, Khan A, Dil S, Liu W, Wen J, Jiang X (2021) The Molecular Mechanism of Sex Hormones on Sertoli Cell Development and Proliferation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 648141.
211. Sharma G, Hu C, Brigman JL, Zhu G, Hathaway HJ, Prossnitz ER (2013) GPER deficiency in male mice results in insulin resistance, dyslipidemia, and a proinflammatory state. *Endocrinology* 154: 4136–4145.
212. Sharma TP, Blache D, Blackberry MA, Martin GB (1999) Role of peripheral and central aromatization in the control of gonadotrophin secretion in the male sheep. *Reprod Fertil Dev* 11: 293–302.
213. Shen Y, Cao J, Liang Z, Lin Q, Wang J, Yang X, Zhang R, Zong J, Du X, Peng Y, Zhang J, Shi J (2019) Estrogen receptor α -NOTCH1 axis enhances basal stem-like cells and epithelial-mesenchymal transition phenotypes in prostate cancer. *Cell Commun Signal* 17: 50.
214. Sheng X, Zhang H, Zhang W, Song M, Zhang M, Li B, Weng Q, Watanabe G, Taya K (2008) Seasonal changes in spermatogenesis and immunolocalization of inhibin/activin subunits in the wild male ground squirrel (*Citellus dauricus Brandt*). *J Reprod Dev* 54: 460–464.
215. Shetty G, Wilson G, Huhtaniemi I, Boettger-Tong H, Meistrich ML (2001) Testosterone inhibits spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion mice. *Endocrinology* 142: 2789–2795.
216. Shrestha D, La X, Feng HL (2015) Comparison of different stimulation protocols used in *in vitro* fertilization: a review. *Ann Transl Med* 3: 137.

217. Siebel C, Lendahl U (2017) Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiol Rev* 97: 1235–1294.
218. Siegel ET, Kim HG, Nishimoto HK, Layman LC (2013) The molecular basis of impaired follicle-stimulating hormone action: evidence from human mutations and mouse models. *Reprod Sci* 20: 211–233.
219. Silva E, Kabil A, Kortenkamp A (2010) Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways – distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 245: 160–170.
220. Simões BM, O'Brien CS, Eyre R, Silva A, Yu L, Sarmiento-Castro A, Alférez DG, Spence K, Santiago-Gómez A, Chemi F, Acar A, Gandhi A, Howell A, Brennan K, Rydén L, Catalano S, Andó S, Gee J, Ucar A, Sims AH, Marangoni E, Farnie G, Landberg G, Howell SJ, Clarke RB (2015) Anti-estrogen resistance in human breast tumors is driven by JAG1-NOTCH4-dependent cancer stem cell activity. *Cell Rep* 12: 1968–1977.
221. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: Biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 18: 739–773.
222. Sirianni R, Chimento A, Ruggiero C, De Luca A, Lappano R, Ando S, Maggiolini M, Pezzi V (2008) The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology* 149: 5043–5051.
223. Skinner MK (2005) Sertoli Cell Secreted Regulatory Factors, w: Sertoli cell biology (red.) Griswold MD. *Elsevier* 107–120.
224. Sluka P, O'Donnell L, Bartles JR, Stanton PG (2006) FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells *in vitro* and *in vivo*. *J Endocrinol* 189: 381–395.
225. Soares R, Balogh G, Guo S, Gärtner F, Russo J, Schmitt F (2004) Evidence for the Notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. *Mol Endocrinol* 18: 2333–2343.
226. Soffientini U, Rebourcet D, Abel MH, Lee S, Hamilton G, Fowler PA, Smith LB, O'Shaughnessy PJ (2017) Identification of Sertoli cell-specific transcripts in the mouse testis and the role of FSH and androgen in the control of Sertoli cell activity. *BMC Genomics* 18: 972.
227. Sprengel R, Braun T, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH (1990) The testicular receptor for follicle stimulating hormone: Structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol* 4: 525–530.
228. Sprinzak D, Lakhanpal A, Lebon L, Santat LA, Fontes ME, Anderson GA, Garcia-Ojalvo J, Elowitz MB (2010) *Cis*-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* 465: 86–90.
229. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif* 3: 9–16
230. Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y (2002) Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev* 113: 29–39.

231. Takata T, Ishikawa F (2003) Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1 and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 250–257.
232. Tao K, Sun Y, Chao Y, Xing L, Leng L, Zhou D, Zhu W, Fan L (2021) β -estradiol promotes the growth of primary human fetal spermatogonial stem cells via the induction of stem cell factor in Sertoli cells. *J Assist Reprod Genet* 38: 2481–2490.
233. Tarulli GA, Meachem SJ, Schlatt S, Stanton PG (2008) Regulation of testicular tight junctions by gonadotrophins in the adult Djungarian hamster *in vivo*. *Reproduction* 135: 867–877.
234. Tarulli GA, Stanton PG, Lerchl A, Meachem SJ (2006) Adult Sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: Effect of FSH on proliferation and junction protein organization. *Biol Reprod* 74: 798–806.
235. Tähkä KM, Fröysa B, Tähkä S, Söder O (1993) Hormonal and photoperiod-induced changes in testicular interleukin-1-like factor in bank voles, *Clethrionomys glareolus*. *J Reprod Fertil* 97: 469–474.
236. Tetsuka M, Matsui M, Shimizu T (2018) Follicle stimulating hormone receptor (FSHR), w: encyclopedia of signaling molecules (red.) Choi S. *Springer*, 1812–1821.
237. Tilbrook AJ, Clarke IJ (2001) Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod* 64: 735–742.
238. Toocheck C, Clister T, Shupe J, Crum C, Ravindranathan P, Lee TK, Ahn JM, Raj GV, Sukhwani M, Orwig KE, Walker WH (2016) Mouse spermatogenesis requires classical and nonclassical testosterone signaling. *Biol Reprod* 94: 11.
239. Tsunematsu R, Nakayama K, Oike Y, Nishiyama M, Ishida N, Hatakeyama S, Bessho Y, Kageyama R, Suda T, Nakayama KI (2004) Mouse Fbw7/ Sel-10/Cdc4 is required for notch degradation during vascular development. *J Biol Chem* 279: 9417–9423.
240. Tvrda E, Peer R, Sikka SC, Agarwal A (2015) Iron and copper in male reproduction: A double-edged sword. *J Assist Reprod Genet* 32; 3–16.
241. Ulloa-Aguirre A, Uribe A, Zariñán T, Bustos-Jaimes I, Pérez-Solis MA, Dias J (2007) Role of the intracellular domains of the human FSH receptor in G(alphaS) protein coupling and receptor expression. *Mol Cell Endocrinol* 260-262: 153–162.
242. Vannelli GB, Barni T, Forti G, Negro-Vilar A, Vale W, Serio M, Balboni GC (1992) Immunolocalization of inhibin alpha-subunit in the human testis. A light- and electron-microscopy study. *Cell Tissue Res* 269: 221–227.
243. Varshney MK, Inzunza J, Lupu D, Ganapathy V, Antonson P, Rüegg J, Nalvarte I, Gustafsson JÅ (2017) Role of estrogen receptor beta in neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E10428-E10437.
244. Vaucher L, Funaro MG, Mehta A, Mielnik A, Bolyakov A, Prossnitz ER, Schlegel PN, Paduch DA (2014) Activation of GPER-1 estradiol receptor downregulates production of testosterone in isolated rat Leydig cells and adult human testis. *PLoS One* 9: e92425.

245. Vicini E, Loiarro M, Di Agostino S, Corallini S, Capolunghi F, Carsetti R, Chieffi P, Geremia R, Stefanini M, Sette C (2006) 17-beta-estradiol elicits genomic and non-genomic responses in mouse male germ cells. *J Cell Physiol* 206: 238–245.
246. Waghulde H, Cheng X, Galla S, Mell B, Cai J, Pruett-Miller SM, Vazquez G, Patterson A, Vijay Kumar M, Joe B (2018) Attenuation of microbial dysbiosis and hypertension in a CRISPR/Cas9 gene ablation rat model of GPER1. *Hypertension* 72: 1125–1132.
247. Walczak-Jędrzejowska R, Forma E, Oszukowska E, Bryś M, Marchlewska K, Kula K, Słowikowska-Hilczer J (2022) Expression of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) in whole testicular tissue and laser-capture microdissected testicular compartments of men with normal and aberrant spermatogenesis. *Biology (Basel)* 11: 373.
248. Walczak-Jędrzejowska R, Kula K, Oszukowska E, Marchlewska K, Kula W, Słowikowska-Hilczer J (2011) Testosterone and oestradiol in concert protect seminiferous tubule maturation against inhibition by GnRH-antagonist. *Int J Androl* 34: e378–e385.
249. Walczak-Jędrzejowska R, Słowikowska-Hilczer J, Marchlewska K, Kula K (2008) Maturation, proliferation and apoptosis of seminal tubule cells at puberty after administration of estradiol, follicle stimulating hormone or both. *Asian J Androl* 10: 585–592.
250. Walker WH, Cheng J (2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130: 15–28.
251. Walker WH, Shupe J, Puri P, Toocheck C, Raj G (2012) Regulation of spermatogenesis by non-classical testosterone signaling. *Biol Reprod* 87: 582.
252. Wang H, Masironi B, Eriksson H, Sahlin L (1999) A comparative study of estrogen receptors alpha and beta in the rat uterus. *Biol Reprod* 61: 955–964.
253. Wang JM, Li ZF, Yang WX, Tan FQ (2022) Follicle-stimulating hormone signaling in Sertoli cells: A licence to the early stages of spermatogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 20: 97.
254. Wang RS, Yeh S, Chen LM, Lin HY, Zhang C, Ni J, Wu CC, di Sant'Agnese PA, deMesy-Bentley KL, Tzeng CR, Chang C (2006) Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* 147:5624–5633.
255. Warren DW, Huhtaniemi I, Tapanainen J, Dufau M L, Catt KJ (1984) Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. *Endocrinology* 114: 470–476.
256. Washburn RL, Hibler T, Kaur G, Dufour JM (2022) Sertoli cell immune regulation: A double-edged sword. *Front Immunol* 13: 913502.
257. Weber JE, Russell LD, Wong V, Peterson RN (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli–Sertoli and Sertoli–germ-cell relationships. *Am J Anat* 167: 163–179.
258. Weng Q, Medan MS, Xu M, Tsubota T, Watanabe G, Taya K (2006) Seasonal changes in immunolocalization of inhibin/activin subunits and testicular activity in wild male raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*). *J Reprod Dev* 52: 503–510.

259. Wersinger SR, Haisenleder DJ, Lubahn DB, Rissman EF (1999) Steroid feedback on gonadotropin release and pituitary gonadotropin subunit mRNA in mice lacking a functional estrogen receptor alpha. *Endocrine* 11: 137–143.
260. Wreford NG, Rajendra Kumar T, Matzuk MM, de Kretser DM (2001) Analysis of the testicular phenotype of the follicle-stimulating hormone beta-subunit knockout and the activin type II receptor knockout mice by stereological analysis. *Endocrinology* 142: 2916–2920.
261. Xi H, Ren F, Li Y, Xian M, Wang L, Hu J (2022) FSH inhibits autophagy and lysosomal biogenesis to regulate protein degradation in cultured goat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*, 540: 111505.
262. Xie J, Kusnadi EP, Furic L, Selth LA (2021) Regulation of mRNA translation by hormone receptors in breast and prostate cancer. *Cancers* 13: 3254.
263. Yang J, Singleton DW, Shaughnessy EA, Khan SA (2008) The F-domain of estrogen receptor-alpha inhibits ligand induced receptor dimerization. *Mol Cell Endocrinol* 295: 94–100.
264. Yang WR, Zhu FW, Zhang JJ, Wang Y, Zhang JH, Lu C, Wang XZ (2017) PI3K/Akt activated by GPR30 and Src regulates 17 β -estradiol-induced cultured immature boar Sertoli cells proliferation. *Reprod Sci* 24: 57–66.
265. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M (2016) Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol* 16: 4–20.
266. Yellon SM, Goldman BD (1984) Photoperiod control of reproductive development in the male Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 114: 664–670.
267. Yu W, Zheng H, Lin W, Tajima A, Zhang Y, Zhang X, Zhang H, Wu J, Han D, Rahman NA, Korach KS, Gao GF, Inoue I, Li X (2014) Estrogen promotes Leydig cell engulfment by macrophages in male infertility. *J Clin Invest* 124: 2709–2721.
268. Zhang S, Kong S, Wang B, Cheng X, Chen Y, Wu W, Wang Q, Shi J, Zhang Y, Wang S, Lu J, Lydon JP, DeMayo F, Pear WS, Han H, Lin H, Li L, Wang H, Wang YL, Li B, Chen Q, Duan E, Wang H (2014) Uterine Rbpj is required for embryonic-uterine orientation and decidual remodeling via Notch pathway-independent and -dependent mechanisms. *Cell Res* 24: 925–942.
269. Zheng X, Narayanan S, Zheng X, Luecke-Johansson S, Gradin K, Catrina SB, Poellinger L, Pereira TS (2017) A Notch-independent mechanism contributes to the induction of Hes1 gene expression in response to hypoxia in P19 cells. *Exp Cell Res* 358: 129–139.
270. Zhu M, Iwano T, Takeda S (2019) Estrogen and EGFR pathways regulate Notch signaling in opposing directions for multi-ciliogenesis in the fallopian tube. *Cells* 8: 933.