

## STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

---

Komórki Leydiga są głównym źródłem androgenów w gonadzie męskiej, z których w procesie aromatyzacji produkowane są estrogeny. Estrogeny pełnią kluczową rolę w regulacji funkcji rozrodczych samca. Utrzymanie właściwej równowagi pomiędzy produkcją estrogenów i androgenów ma fundamentalne znaczenie, a jakiegokolwiek zaburzenie tego balansu może prowadzić do różnych nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu rozrodczego, w tym do rozwoju nowotworów. Co więcej, oprócz endogennych estrogenów zidentyfikowano również tak zwane ksenoestrogeny, które mogą zaburzać funkcjonowanie układu endokrynnego. Ksenoestrogeny mogą być pochodzenia naturalnego np. fitoestrogeny oraz syntetycznego np. polichlorowane bifenyle (PCB). Estrogeny, jak również ksenoestrogeny, działają na komórki docelowe poprzez wiązanie z receptorami estrogenowymi, zarówno klasycznymi (ER) jak i nieklasycznymi. Receptory pokrewne receptorom estrogenowym (ERR) należą do nadrodziny receptorów jądrowych i wykazują wysoki stopień homologii z receptorami ER. Receptory ERR wykazują istotne znaczenie w wielu procesach biologicznych, m.in. w regulacji metabolizmu energetycznego, jednakże ich rola w fizjologii i patologii układu rozrodczego jest nadal słabo poznana.

Celem pracy doktorskiej było zatem określenie roli receptorów ERR, z włączeniem estrogenów, w prawidłowych i nowotworowych komórkach Leydiga, z uwzględnieniem procesów zachodzących na poziomie komórkowym, molekularnym i epigenetycznym.

Materiał do badań stanowiły pierwotne komórki Leydiga izolowane z jąder nornic rudych oraz mysie komórki Leydiga linii nowotworowej MA-10. Aby określić wpływ PCB na aktywność receptorów ERR w komórkach Leydiga, komórki traktowano mieszaniną PCB, z zastosowaniem dwóch kongenerów (d103 i d106), w różnych dawkach. Kolejne etapy badań polegały na wyciszeniu ekspresji genów kodujących receptory ERR w komórkach Leydiga metodą transfekcji siRNA oraz/lub podaniu estrogenów, a następnie ocenie ultrastruktury, morfologii (z włączeniem proliferacji i migracji) oraz funkcji steroidogennej prawidłowych i nowotworowych komórek Leydiga.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że w prawidłowych komórkach Leydiga receptor  $ERR\gamma$  kontroluje morfologię, natomiast receptory  $ERR\alpha$  i  $ERR\gamma$  nie są włączone w kontrolę funkcji steroidogennej [Milon i wsp. 2019, Publikacja 3]. Z kolei w nowotworowych komórkach Leydiga receptory ERR wraz z estradiolem regulują

morfolożię oraz aktywność migracyjną i proliferacyjną. Wyciszenie ekspresji genów kodujących receptory ERR w nowotworowych komórkach Leydiga wpływa także na poziom hormonów steroidowych, błonowy potencjał mitochondrialny oraz poziom drugorzędowych przekaźników. Ponadto receptory ERR wykazują interakcje z receptorami steroidowymi oraz cząsteczkami sygnalizacyjnymi regulującymi funkcje nowotworowych komórek Leydiga [Kotula-Balak, Milon i wsp. 2018, Publikacja 2]. Badania potwierdziły, że ekspresja receptorów ERR w nowotworowych komórkach Leydiga modulowana jest przez PCB i estrogeny. Co więcej, PCB w badanych komórkach wpływają na poziom hormonów steroidowych oraz ultrastrukturę mitochondriów, bez wpływu na błonowy potencjał mitochondrialny [Milon i wsp. 2017, Publikacja 1]. Sygnalizacja estrogenowa z udziałem receptorów ERR oddziałuje na molekularne i epigenetyczne procesy zachodzące w pierwotnych i nowotworowych komórkach Leydiga. Procesy te związane są z modulacją aktywności cząsteczek wytwarzających i regulujących działanie miRNA, a także zmianami poziomu metylacji DNA. Nie stwierdzono natomiast zmian poziomu deacetylacji histonów, zarówno w pierwotnych jak i nowotworowych komórkach Leydiga [Milon i wsp. 2019, Publikacja 3].

Przeprowadzone badania wskazują na istotną rolę receptorów ERR w regulacji funkcjonowania komórek Leydiga gryzoni na poziomie morfologii, ultrastruktury oraz molekularnym i epigenetycznym, zarówno w stanie fizjologicznym jak i patologicznym. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia regulacji steroidogennej w komórkach Leydiga z udziałem receptorów ERR, co w przyszłości może mieć zastosowanie w diagnostyce i terapii zaburzeń m.in. nowotworów estrogenozależnych tkanki interstycjalnej.

## STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

---

Leydig cells are the main source of androgens in the male gonad, from which estrogens are produced in the process of aromatization. Estrogens are essential for the regulation of reproductive functions, thus ensuring male fertility. A proper balance between estrogens and androgens is fundamental and any change in the ratio of sex steroids can lead to various abnormalities throughout the reproductive system, including tumors. Moreover, xenoestrogens have been also identified as substances affecting function of the endocrine system. There are many natural xenoestrogens e.g. phytoestrogens or synthetic e.g. polychlorinated biphenyls (PCB). Estrogens as well as xenoestrogens act on target cells by binding to canonical estrogen receptors (ER) and non-canonical ones. Estrogen-related receptors (ERR) belong to the nuclear receptor family and share a high degree of homology with ER. These receptors are essential for many biological processes, e.g. the regulation of energy metabolism, however the role and regulation of ERR in physiology and pathology of reproduction is still not fully discovered.

Therefore, the aim of the doctoral dissertation was to investigate the role of ERR including estrogens in healthy and tumor Leydig cells, taking into account cellular, molecular and epigenetic processes.

The research material consisted of primary bank vole Leydig cells and tumor mouse Leydig cell line MA-10. To characterize the effect of PCB on ERR activity in Leydig cells, the cells were treated with PCB congeners, delor 103 (d103) and delor 106 (d106), in different doses. In further research, ERR in Leydig cells were silenced *via* siRNA and/or treated with estrogens and then the examination of the ultrastructure, morphology (including proliferation and migration) and steroidogenic function of healthy and tumor Leydig cells was performed.

The results showed that in primary Leydig cells ERR $\gamma$  controls morphology, while ERR $\alpha$  and ERR $\gamma$  are not responsible for regulation of steroidogenic functions [Milon et al. 2019, Publication 3]. On the other hand, in tumor Leydig cells ERR with estradiol regulate morphology as well as migratory and proliferative activity. Silencing of ERR in tumor Leydig cells also affects the level of steroid hormones, mitochondrial membrane potential and signaling *via* second messengers. In addition, ERR interacts with the steroid receptors and signaling molecules that regulate tumor Leydig cell function [Kotula-Balak, Milon et al. 2018, Publication 2]. The studies have shown that the expression of ERR is modulated by

PCB and estrogens in tumor Leydig cells. Moreover, PCB affect steroid secretion, mitochondria ultrastructure, but not mitochondrial membrane potential [Milon et al. 2017, **Publication 1**]. Estrogen signaling and ERR impact on the molecular and epigenetic processes occurring in primary and tumor Leydig cells. These processes are associated with the modulation of the activity of molecules synthesizing and regulating miRNAs, as well as with changes in the level of DNA methylation. No changes in histone deacetylation level in ERR-silenced both primary and tumor Leydig cells take place [Milon et al. 2019, **Publication 3**].

The findings indicate the important role of ERR in control the functioning of rodent Leydig cells at cellular, ultrastructural as well as molecular and epigenetical levels, both in physiological and pathological states. The results may contribute to a better understanding of steroidogenic regulation in Leydig cells with the participation of ERR, which in the future may be used in the diagnosis and therapy of estrogen-dependent interstitial tissue disorders e.g. cancers.

Milon - Balala