

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 RBP-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.