

STRESZCZENIE

Komunikacja jukstakrynowa jest formą interakcji między komórkami, polegającą na oddziaływaniu między receptorem i jego ligandem zlokalizowanymi w błonach sąsiadujących komórek. Ostatnie badania wskazują, że komunikacja jukstakrynowa z udziałem szlaku sygnałowego Notch pełni istotną rolę w gonadzie męskiej gryzoni regulując spermatogenezę. Inicjacja i utrzymanie plemnikotwórczej funkcji gonady męskiej pozostają jednocześnie pod kontrolą androgenów, które poprzez aktywację jądrowego (AR) i błonowego (ZIP9) receptora androgenowego w komórkach Sertoliego, wpływają na ekspresję wielu genów, w tym genów kodujących białka bariery krew-jądro, kładyny. Wykazano, że interakcje między szlakiem Notch a sygnalizacją androgenową kontrolują funkcje androgenozależnych tkanek, takich jak mięśnie szkieletowe oraz rozwój nowotworów prostaty, natomiast nie zostały one dotąd scharakteryzowane w nabłonku plemnikotwórczym. Celem prezentowanej pracy było zbadanie wzajemnego oddziaływania między komunikacją jukstakrynową a sygnalizacją androgenową w jądrach gryzoni, ze szczególnym uwzględnieniem udziału komórek Sertoliego oraz wyjaśnienie, czy aktywność szlaku Notch może podlegać zaburzającemu działaniu środowiskowych substancji hormonalnie czynnych.

Badania w układzie *in vitro* przeprowadzono na liniach mysich komórek Sertoliego TM4 i 15P-1, hodowli pierwotnej szczurzych komórek Sertoliego oraz eksplantach jąder szczurów szczepu Wistar. W celu zahamowania sygnalizacji Notch zastosowano inhibitor γ -sekreazy, DAPT, oraz wyciszono ekspresję genu *Rbp-j* poprzez transfekcję komórek Sertoliego specyficznym siRNA, natomiast do aktywacji sygnalizacji Notch użyto immobilizowanych ligandów (JAG1, DLL1, oraz DLL4). W celu określenia roli receptorów androgenowych w regulacji szlaku Notch, komórki Sertoliego inkubowano z testosteronem lub/i antyandrogenami (hydroksyflutamidem i bikalutamidem), lub wyciszono ekspresję genów *Ar* i *Zip9*. Do wykazania wpływu środowiskowych substancji hormonalnie czynnych na szlak Notch wykorzystano eksplanty jąder szczurów inkubowane w obecności bisfenolu A (BPA) i ftalanu dibutyli (DBP). Doświadczenia *in vivo* przeprowadzono na samcach szczurów Wistar, u których w okresie dojrzewania płciowego lub dorosłości ograniczono dostępność androgenów poprzez zastosowanie flutamidu lub etanodimetanosulfonianu (EDS). W celu wykazania zmian ekspresji receptorów androgenowych, kładyn i komponentów szlaku Notch na poziomie mRNA i białka zastosowano odpowiednio metody qRT-PCR i Western blot. Lokalizację badanych białek określono wykorzystując analizę immunohistochemiczną lub immunofluorescencyjną. Aktywność szlaku Notch określono z zastosowaniem układu

reporterowego lucyferazy. Do oceny stężenia testosteronu oraz cAMP posłużyła metoda immunoenzymatyczna.

Analizy qRT-PCR, Western blot i immunofluorescencyjna wykazały, że zahamowanie szlaku Notch w komórkach Sertoliego oraz eksplantach jąder prowadzi do wzrostu ekspresji AR i ZIP9, a w ślad za tym do wzrostu stężenia cAMP i nasilenia ekspresji kładyny 11 oraz kładyny 5. Aktywacja szlaku Notch poprzez ekspozycję komórek Sertoliego na ligand DLL1 przyczyniła się do spadku ekspresji AR oraz kładyny 11, natomiast ligand JAG1 obniżał poziom ZIP9 i kładyny 5. Wyniki te wskazują, że w komórkach Sertoliego szlak Notch reguluje sygnalizację androgenową poprzez specyficzne działanie ligandów DLL1 i JAG1 odpowiednio na ekspresję AR i ZIP9.

Na podstawie analizy aktywności szlaku Notch, oraz analiz qRT-PCR, Western blot i immunofluorescencyjnej stwierdzono, że testosteron, działając zarówno przez AR, jak i ZIP9, nasila aktywność szlaku Notch w komórkach Sertoliego, natomiast ograniczenie sygnalizacji androgenowej prowadzi do spadku tej aktywności poprzez hamowanie ekspresji receptora Notch1/N1ICD oraz białek efektorowych HEY1 i HES1. Wykazano ponadto, że AR jest zaangażowany w regulację ekspresji HEY1, natomiast ZIP9 kontroluje ekspresję HES1 w komórkach Sertoliego. Badania w układzie *in vivo* dowiodły, że ograniczenie działania androgenów w okresie dojrzewania płciowego oraz dorosłości skutkuje obniżeniem ekspresji Notch1/N1ICD oraz HEY1 i HES1. Wpływ podania flutamidu lub EDS na ekspresję i lokalizację ligandów JAG1, DLL1 i DLL4 zależał od wieku szczurów. Uzyskane wyniki wskazują na rolę androgenów w kontroli sygnalizacji Notch w jądrze oraz udział AR i ZIP9 w specyficznej regulacji genów efektorowych szlaku Notch w komórkach Sertoliego.

Ekspozycja eksplantów jąder szczura na BPA lub DBP wywołała wzrost ekspresji Notch1, HEY1, JAG1 i DLL4, a obniżenie DLL1 na poziomie mRNA i białka. Poziom HES5 obniżył się głównie po podaniu BPA. Wyniki analizy immuohistochemicznej potwierdziły, że oba związki zaburzają ekspresję komponentów szlaku Notch w kanalikule plemnikotwórczym oraz tkance intersycjalnej, jednak ich wpływ na poszczególne typy komórek jest zróżnicowany.

Podsumowując, wyniki przedstawionych badań wskazują na dwukierunkową interakcję między komunikacją jukstakrynową a sygnalizacją androgenową w jądrze gryzoni. Współdziałanie tych szlaków może stanowić istotny czynnik regulujący fizjologię komórek Sertoliego, a jego zaburzenia skutkować zakłóceniem procesów kluczowych dla przebiegu spermatogenezy, takich jak ekspresja białek bariery krew-jądro. Uzyskane dane dowodzą ponadto, że komunikacja jukstakrynowa w gonadzie męskiej jest wrażliwa na bezpośrednie zaburzające działanie związków o aktywności hormonalnej.

Anna Hejny

Anna Kowalska

SUMMARY

Juxtacrine communication is a type of contact-dependent signaling, in which the ligand localized in the plasma membrane of inducing cell interacts with the receptor protein of adjacent responding cell. Recent studies provided evidence that juxtacrine communication mediated by the Notch pathway plays an important role in rodent testis by regulating spermatogenesis. Androgens are hormones crucial for initiation and maintenance of spermatogenesis. To control germ cell development androgens act predominantly through the nuclear (AR) and membrane (ZIP9) androgen receptors in Sertoli cells, regulating the expression of many genes including that of blood-testis barrier proteins, claudins. It has been shown that interactions between the Notch pathway and androgen signaling pathway regulate function of androgen-dependent tissues, such as skeletal muscle, and prostate tumor development. To date, however, such a crosstalk has not been explored in seminiferous epithelium. Therefore, the purpose of this study was to examine the interplay between Notch pathway and androgen signaling in rodent testis with special emphasis on Sertoli cells, and to clarify whether activity of the Notch pathway may be affected by environmental endocrine disrupting chemicals.

In vitro experiments were performed on murine Sertoli cell lines TM4, 15P-1, primary rat Sertoli cells and rat testis explants. Treatment with γ -secretase inhibitor (DAPT) and RBP-J silencing *via* siRNA transfection were employed to reduce Notch signaling, whereas immobilized ligands (JAG1, DLL1 and DLL4) were used to activate Notch pathway. To determine the specific role of androgen receptors in Notch pathway regulation, Sertoli cells were incubated with testosterone or / and antiandrogens (hydroxyflutamide and bicalutamide), or AR and ZIP9 silencing was performed. To investigate the effect of endocrine disrupting chemicals on Notch pathway, testis explants were incubated with bisphenol A (BPA) or dibutyl phthalate (DBP). *In vivo* experiments were performed on peripubertal or adult Wistar rats treated with flutamide or ethylene-dimethane sulphonate (EDS) to reduce androgen signaling. Gene and protein expressions of androgen receptors, claudins and components of Notch pathway were examined using real-time RT-PCR and Western blot analyzes, respectively. Immunohistochemistry or immunofluorescence was performed to detect protein localization. Notch pathway activity was determined using a luciferase reporter assay. Testosterone or cAMP concentrations were analyzed by ELISA.

Results of real-time RT-PCR, Western blot and immunofluorescence analyzes revealed that inhibition of Notch signaling increased the expression of AR and ZIP9 mRNA and proteins. Consequently, cAMP level as well as claudin-5 and claudin-11 were elevated in Notch-inhibited Sertoli cells and testis explants. Activation of Notch signaling by DLL1

ligand reduced AR and claudin-11 expression, while incubation with JAG1 reduced ZIP9 and claudin-5 level. These results indicate that Notch pathway regulates androgen signaling in Sertoli cells through the specific action of DLL1 and JAG1 ligands on AR and ZIP9 expression.

Notch pathway activity analysis, qRT-PCR, Western blot and immunofluorescence revealed that testosterone, acting through both AR and ZIP9, enhanced Notch pathway activity in Sertoli cells, while androgen signaling blockade led to a decrease in the expression of Notch1/N1ICD receptor as well as HEY1 and HES1 effector genes. The results of gene silencing experiments suggest that in Sertoli cells AR is involved in HEY1 regulation, whereas ZIP9 controls HES1 expression. *In vivo* studies demonstrated that disruption of androgen action during puberty and adulthood led to reduced expression of Notch1/N1ICD, HEY1 and HES1. The effect of flutamide or EDS exposure on the expression and localization of JAG1, DLL1 and DLL4 ligands depended on the age of the rats. These results indicate that androgens are involved in the control of Notch signaling in rodent testis and explain the specific role of AR and ZIP9 in the regulation of Notch pathway effector genes in Sertoli cells.

Exposure of testis explants to BPA and DBP caused upregulation of Notch1/N1ICD, HEY1, JAG1 and DLL4 and a decrease of DLL1 mRNA and proteins when compared to the control. HES5 expression decreased mainly after BPA treatment. The results of immunohistochemical analysis confirmed that both compounds disrupt the expression of Notch pathway components in the seminiferous tubules and interstitial tissue exerting differential effects on particular cell types.

Summing up, the results presented in the thesis indicate a bidirectional interaction between juxtacrine communication and androgen signaling in rodent testis. The crosstalk between these pathways may be an important factor regulating the physiology of Sertoli cells, and its disruption may affect key processes, such as the expression of blood-testis barrier proteins. Moreover, the obtained data provide evidence that juxtacrine communication in the male gonad is a target for endocrine disrupting chemicals.

Anne Hegmy

Alige Komisar