



Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za biologiju i ekologiju



Uloga insulinskih i IGF1 receptora u regulaciji steroidogeneze i mitohondrijalne biogeneze u Leydig-ovim ćelijama

- doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr Silvana Andrić

Kandidat: Sava Radović

Novi Sad, 2019.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici, prof. dr Silvana Andrić, koja je svojim znanjem i iskustvom učinila da izazovi tokom realizacije ove doktorske disertacije budu mnogo lakši. Hvala na prilici i ukazanom poverenju da postanem deo LaRES laboratorije i da ovu disertaciju uradim u jednoj novoj i izazovnoj oblasti. Hvala na svojoj pomoći, smernicama i savetima tokom prethodnih godina.

Veliko hvala prof. dr Tatjani Kostić koja je uvek bila voljna da sasluša, pomogne i posavetuje. Hvala na svim konstruktivnim idejama i sugestijama tokom prethodnih godina, a posebno tokom pisanja ove disertacije.

Najlepše se zahvaljujem prof. dr Gordani Matić, prof. dr Zvezdani Kojić i van. prof. dr Sonji Kaišarević na izuzetnoj efikasnosti i veoma korisnim sugestijama.

Veliko hvala mojim dragim kolegama sadašnjim ili bivšim članovima LaRES-a: Isidori, Saši, Mariji, Dijani, Dragani, Maji, Srđanu, Nataši, Mariji. Rad sa njima je sjajno iskustvo i bili su nezamenljiva podrška tokom prethodnih godina.

Veliko hvala ostalim dragim kolegama članovima Katedre za fiziologiju životinja, kao i svim sa kojima sam provodila vreme u laboratoriji, za svu kolegijalnost i lake dogovore.

Veliko hvala Marici, Olji i Vesni na podršci, divnoj saradnji i svojoj pomoći u radu sa laboratorijskim životinjama.

Veliko hvala prof. dr Danijeli Kojić uz koju sam napravila prve korake u svetu laboratorije i koja me je ohrabрила da uđem u svet nauke.

Hvala svim dragim kolegama zaposlenim na Departmanu za biologiju i ekologiju koji su na bilo koji način doprineli da rad na ovoj disertaciji bude lakši.

Veliko hvala prof. dr Dušanu Laloševiću, doc. dr Ivanu Čapu i dr Dejanu Miljkoviću sa Medicinskog fakulteta u Novom Sadu na velikoj pomoći u savladavanju imunocitohemije, elektronske mikroskopije i analize rezultata iz ove oblasti.

Veliko hvala prof. dr Douglas Stocco za donaciju antitela za STAR protein.

Na kraju zahvalnice, ali na početku po važnosti, neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici, svom Radoslavu i svojim prijateljima, na ljubavi, razumevanju, podršci i veri u mene.

Sava

**INFORMACIJE O MESTU IZRADE,
FINANSIRANJU DISERTACIJE I RADOVIMA**

Svi eksperimenti su dizajnirani i izvedeni u Laboratoriji za reproduktivnu endokrinologiju i signaling (<https://www.dbe.uns.ac.rs/en/nauka-eng/lares>), CeRES, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i odobreni su od strane lokalnog Etičkog komiteta Univerziteta u Novom Sadu (brojevi odobrenja: I-2011-02, III-2011-04).

PROJEKTI KOJIMA JE FINANSIRANA IZRADA DOKTORSKE DISERTACIJE:

- (1) SCOPES #IZ73Z0-128070 Švajcarske nacionalne fondacije: “*Investigating the role of the insulin receptor family in regulating testicular steroidogenesis*” (rukovodioci: prof. dr Serge Nef, prof. dr Silvana Andrić).
- (2) ON173057 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS: “*Molekularni mehanizmi i putevi signalne transdukcije uključeni u regulaciju steroidogeneze i adaptaciju Leydig-ovih ćelija na poremećenu homeostazu*“ (rukovodilac: prof. dr Tatjana Kostić)
- (3) APV0253, APV2397, APV2570, APV3417, APV1137, APV 2485 Pokrajinskog sekretarijata nauku i tehnološki razvoj Vojvodine: “*Da li su reproduktivni hormoni karika koja povezuje stres, metabolički sindrom i starenje*“ (rukovodilac: prof. dr Silvana Andrić).

RADOVI U KOJIMA SU OBJAVLJENI REZULTATI DOKTORSKE DISERTACIJE:

- (1) **Radovic SM**, Starovlah IM, Capo I, Miljkovic D, Nef S, Kostic TS, Andric SA (2019): Insulin/IGF1 signalling regulates the mitochondrial biogenesis markers in steroidogenic cells of prepubertal testis, but not ovary. *Biol Reprod* 100(1):253-267. **IF= 3.184**

RADOVI U KOJIMA ĆE BITI OBJAVLJENI REZULTATI DOKTORSKE DISERTACIJE:

- (2) **Radovic SM**, Starovlah IM, Miljkovic D, Drljača DM, Capo I, Nef S, Kostic TS, Andric SA (2019): Feminization of progenitor and mature adult Leydig cells lacking insulin and IGF1 receptors. *Rukopis rada je u završnoj fazi.*
- (3) **Radovic SM**, Starovlah IM, Miljkovic D, Capo I, Nef S, Kostic TS, Andric SA (2019): Insulin/IGF1 signalling is essential for development of different cells within the testis. *Rukopis rada je u pripremi.*

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 3 |
| 2.1. Tipovi, karakteristike i endokrina funkcija Leydig-ovih ćelija testisa | 4 |
| 2.1.1. Karakteristike i regulacija razvoja različitih tipova Leydig-ovih ćelija | 5 |
| 2.1.2. Steroidogeneza u Leydig-ovim ćelijama | 9 |
| 2.2. Mitohondrije i njihov značaj u steroidogenezi Leydig-ovih ćelija | 19 |
| 2.2.1. Glavni molekularni markeri mitohondrijalne biogeneze | 22 |
| 2.2.2. Glavni molekularni markeri mitohondrijalne fuzije/arhitekture | 25 |
| 2.2.3. Najmarkantniji mehanizmi regulacije mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture | 27 |
| 2.3. Receptori za članove familije insulinu sličnih faktora rasta | 30 |
| 2.3.1. Uloga insulina/IGF1 i njihovih receptora u razvoju i funkciji testisa | 32 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 34 |
| 4. MATERIJAL I METODE | 37 |
| 4.1. Hemikalije | 38 |
| 4.2. Eksperimentalne životinje | 40 |
| 4.3. Genotipizacija miševa – klasični PCR i agarozna gel elektroforeza | 43 |
| 4.4. Ekstrakcija steroida iz tkiva testisa | 45 |
| 4.5. Transmisiona elektronska mikroskopija testisa | 45 |
| 4.5.1. Morfometrijska analiza mitohondrija | 45 |
| 4.6. Priprema primarne kulture Leydig-ovih ćelija | 46 |
| 4.6.1. Određivanje aktivnosti enzima HSD3B pomoću NBT testa | 47 |
| 4.6.2. Imunocitohemijska analiza ćelijskog razmaza | 48 |
| 4.7. Priprema kulture seminifernih tubula | 49 |
| 4.8. Određivanje steroidogenog kapaciteta i steroidogene aktivnosti Leydig-ovih ćelija <i>ex vivo</i> produkcijom androgena i progesterona | 49 |
| 4.9. Određivanje aktivnosti aromatize <i>ex vivo</i> produkcijom estradiola | 49 |
| 4.10. Određivanje potencijala membrane mitohondrija ($\Delta\psi$) | 50 |
| 4.11. Određivanje relativnog broja mitohondrija (mitohondrijalne mase) | 50 |
| 4.12. Blokiranje IGF1R u primarnoj kulturi Leydig-ovih ćelija | 51 |
| 4.13. Tretman primarne kulture Leydig-ovih ćelija testosteronom tokom 24 h | 51 |
| 4.14. Merenje hormona | 52 |
| 4.15. Određivanje koncentracije cAMP u ćelijskom sadržaju Leydig-ovih ćelija | 53 |
| 4.16. Relativna kvantifikacija ekspresije transkripata | 54 |
| 4.16.1. Izolacija ukupne RNK i tretman DNazom I | 54 |
| 4.16.2. Reakcija reverzne transkripcije - sinteza komplementarne DNK (cDNK) | 55 |
| 4.16.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (real time PCR) | 55 |
| 4.17. Relativna kvantifikacija ekspresije protein | 62 |
| 4.17.1. Izolacija i merenje koncentracije proteina | 62 |
| 4.17.2. SDS-PAGE elektroforeza | 62 |
| 4.17.3. Western blot analiza | 63 |
| 5. REZULTATI | 67 |

| | |
|---|------------|
| 5.1. Fenotipske karakteristike muškog reproduktivnog sistema prepubertalnih (P21) i adultnih (P80) miševa sa kondicionalnom delecijom <i>Insr</i> i <i>Igf1r</i> gena u steroidogenim tkivima..... | 69 |
| 5.2. Efekat kondicionalne delecije <i>Insr</i> i <i>Igf1r</i> gena u steroidogenim tkivima na diferencijaciju i funkcionalne karakteristike Leydig-ovih ćelija prepubertalnih (P21) i adultnih (P80) miševa | 71 |
| 5.2.1. Odsustvo INSR i IGF1R utiče na broj Leydig-ovih ćelija izolovanih iz P21 i P80 miševa..... | 71 |
| 5.2.2. Odsustvo INSR/IGF1R narušava steroidogenezu u testisima smanjuje funkcionalnost Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa..... | 75 |
| 5.2.3. INSR/IGF1R regulišu transkripcioni profil gena za elemente steroidogene mašinerije i relevantne transkripcione faktore u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa | 79 |
| 5.2.4. Odsustvo INSR/IGF1R u steroidogenim tkivima povećava transkripciju gena za glavne steroidogene represore (<i>Arr19</i> i <i>Dax1</i>) specifično u Leydig-ovim ćelijama, ali ne i u seminiferim tubulama, P21 i P80 miševa | 84 |
| 5.2.5. INSR/IGF1R utiču na ekspresiju genskih markera matičnih ćelija u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa..... | 85 |
| 5.2.6. Odsustvo INSR/IGF1R menja transkripcioni profil gena za glavne markere razvoja pola u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa..... | 87 |
| 5.2.7. Odsustvo INSR/IGF1R povećava ekspresiju i aktivnost aromataze i smanjuje ekspresiju 5 α -reduktaze u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa | 90 |
| 5.3. Efekat kondicionalne delecije <i>Insr</i> i <i>Igf1r</i> gena u steroidogenim tkivima na glavne molekularne markere mitohondrijalne biogeneze i fuzije/aritekture u Leydig-ovim ćelijama prepubertalnih (P21) miševa | 92 |
| 5.3.1. INSR/IGF1R regulišu transkripciju markera mitohondrijalne biogeneze u steroidogenim ćelijama gonada P21 mužjaka, ali ne i ženki..... | 92 |
| 5.3.2. Odsustvo INSR/IGF1R utiče na ekspresiju markera mitohondrijalne fuzije/aritekture i mitohondrijalnu fazu steroidogeneza u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa... | 94 |
| 5.3.3. Odsustvo INSR i IGF1R menja morfologiju Leydig-ovih ćelija P21 miševa, kao i morfologiju i broj mitohondrija u njima | 95 |
| 5.3.4. Efekat <i>in vitro</i> blokade receptora za IGF1, samostalno ili u kombinaciji sa 5 μ M testosteronom na transkripcioni profil glavnog markera mitohondrijalne biogeneze i markera mitohondrijalne fuzije/aritekture..... | 98 |
| 5.3.5. INSR/IGF1R regulišu ekspresiju ključnih kinaza uključenih u IGF1R-signalizaciju, kao i aktivaciju PGC1, mitohondrijalne biogeneze i steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa..... | 101 |
| 5.3.6. Odsustvo INSR i IGF1R utiče na mitohondrijalnu fazu steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama, kao i na transkripcioni profil gena za steroidogene enzime u Leydig-ovim ćelijama, ovarijumima i nadbubrežnim žlezdama P21 miševa | 103 |
| 6. DISKUSIJA | 108 |
| 6.1. Receptori za insulin i IGF1 su uključeni u regulaciju razvoja fenotipa muških reproduktivnih organa | 109 |
| 6.2. Receptori za insulin i IGF1 su značajno uključeni u regulaciju diferencijacije i steroidogene funkcije Leydig-ovih ćelija..... | 110 |
| 6.2.1. Receptori za insulin i IGF1 su ključni u regulaciji regulaciji steroidogene funkcije Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa | 111 |
| 6.2.2. Receptori za insulin i IGF1 regulišu transkripciju molekularnih markera diferencijacije pola i uzrokuju tzv. „feminizaciju“ Leydig-ovih ćelija..... | 118 |
| 6.3. Delecija receptora za insulin i IGF1 menja transkripcioni profil markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/aritekture u Leydig-ovim ćelijama, kao i morfologiju ćelija prepubertalnih (P21) miševa | 123 |

| | |
|--|------------|
| 6.3.1. Delecija insulinskog i IGF1 receptora menja transkripcioni profil markera mitohondrijalne biogeneze u steroidogenim ćelijama testisima i ovarijuma | 126 |
| 6.3.2. Delecija insulinskog i IGF1 receptora menja transkripcioni profil markera mitohondrijalne arhitekturu/fuzije i mitohondrijalne faze steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama | 128 |
| 7. ZAKLJUČCI | 131 |
| 8. ZNAČAJ DOBIJENIH REZULTATA | 136 |
| 9. PRAVCI BUDUĆIH ISTRAŽIVANJA | 138 |
| 10. LITERATURA..... | 140 |

1. Uvod

Poremećaj reproduktivne funkcije je globalni problem. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, približno svaki četvrti par u zemljama u razvoju je pogođen problemom neplodnosti. Pored toga, sve je više podataka koji ukazuju na to da su ozbiljni zdravstveni problemi, kao što su kardiovaskularne bolesti, gojaznost, metabolički sindrom, insulinska rezistencija itd, često povezani sa smanjenom produkcijom i sekrecijom polnih hormona. U tom smislu, razumevanje mehanizama koji regulišu reproduktivnu funkciju na molekularnom nivou je jedan od ključnih aspekata očuvanja reproduktivnog, ali i opšteg zdravlja.

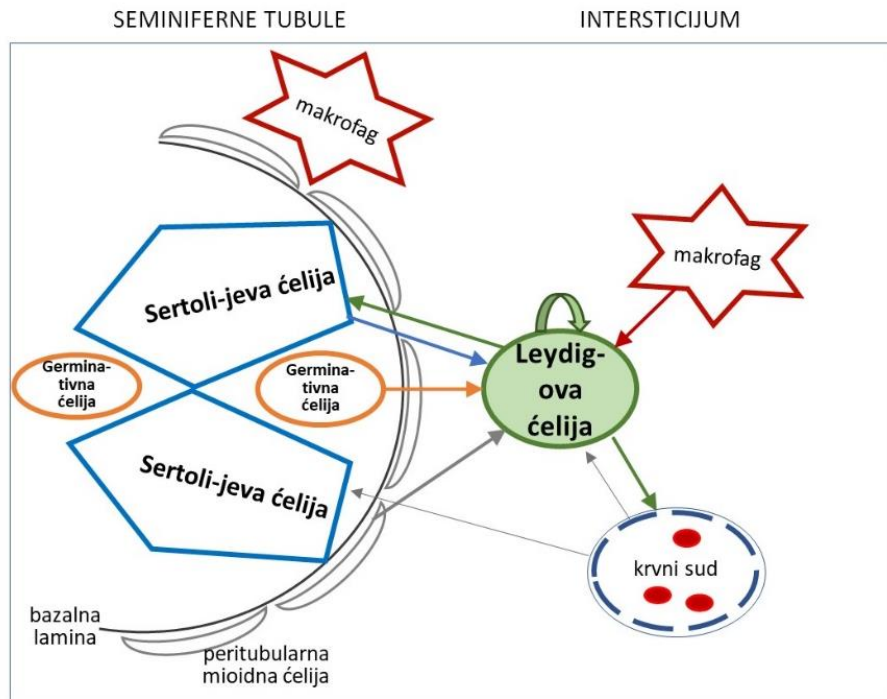
Insulin i insulinu sličan faktor rasta 1, IGF1 (*engl.* insulin like growth factor 1) su jedan od ključnih, široko rasprostranjenih faktora, koji regulišu specifični razvoj tkiva, metabolizam i dužinu života. U skladu sa tim, oni predstavljaju i važan deo regulacije razvoja gonada i sinteze i sekrecije polnih hormona. Uprkos tome, ulora receptora za insulin i IGF1 u regulaciji produkcije muških polnih hormona na molekularnom nivou, nije u potpunosti poznata.

Shodno svemu navedenom, istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su usmerena na karakterizaciju uloge receptora za insulin i IGF1 u regulaciji funkcije Leydig-ovih ćelija testisa koje proizvode testosteron, kao i dinamike mitohondrija u njima (organela sa ključnom ulogom u sintezi ovog hormona). Rezultati ovakvog israživanja mogu omogućiti bolje razumevanje molekularne osnove normalnog razvoja i fiziologije testisa, kao i poremećaja njihove endokrine funkcije, te posledica po globalno zdravlje organizma i populacije.

2. Pregled literature

2.1. Tipovi, karakteristike i endokrina funkcija Leydig-ovih ćelija testisa

Testisi su organi koji se sastoje od dva strukturalna i funkcionalna odeljka - seminifernih tubula i intersticijuma koji predstavlja rastresito vezivno tkivo koje sadrži različite tipove ćelija (Slika 2.1.1). U okviru tubularnog odeljka su smeštene Sertoli-jeve i germinativne ćelije, dok se u intersticijumu nalaze Leydig-ove ćelije, makrofazi, ćelije prirodne ubice, dendritske ćelije, limfociti, Th₁ i Th₂ populacije ćelija pomoćnica, peritubulne mioidne ćelije, fibroblasti i endotelne ćelije. Ovakva organizacija testisa omogućuje odvijanje egzokrine funkcije (spermatogeneza) u seminiferim tubulama i endokrine funkcije (produkcija steroidnih hormona, dominantno androgena) u intersticijumu (Hales 2002). Međućelijske veze i kontakti obezbeđuju adekvatnu komunikaciju kako ćelija seminifernih tubula, tako i intersticijuma, pa su ovi odeljci, iako anatomski razdvojeni, funkcionalno povezani, čime obezbeđuju efikasno funkcionisanje testisa. Tesne veze (*engl.* tight junctions) između Sertoli-jevih ćelija, zajedno sa bazalnom laminom tubula, čine krvno-testikularnu barijeru (*engl.* blood-testis barrier). Krvno-testikularna barijera je selektivno propustljiva za nutrijente, faktore rasta, jone i druge male molekule. Dve osnovne funkcije krvno-testikularne barijere su sprečavanje kompromitovanja spermatogeneze i zaštita intersticijuma od inflamacije (Vergouwen i sar. 1993). Kasnija istraživanja ukazuju i na značaj ektoplazmatskih specijalizacija, dezmozoma i pukotinastih veza (*engl.* gap junctions) (za reference pogledati Mruk i Cheng 2015), ali i na ulogu germinativnih ćelija - primarnih spermatocita u formiranju ove barijere (Li i sar. 2018). Ćelije testisa sekretuju biološki aktivne materije u ekstracelularnu tečnost nazvanu testikularni intersticijumski fluid, TIF (*engl.* testicular interstitial fluid), koja se formira procesima filtracije na nivou kapilarne mreže testisa i specifičnim načinom regulacije vazomotornih pokreta. Zapremina TIF-a je važna za funkciju testisa jer kontroliše koncentraciju signalnih molekula i hormona dopremljenih iz cirkulacije, kao i lokalno produkovanih autokrinih i parakrinih faktora (Sharpe i Cooper 1983; Tapanainen i sar. 1990).



Slika 2.1.1. Šematski prikaz kompleksne strukturne organizacije testisa sisara.

Endokrina funkcija testisa - produkcija muških polnih hormona je esencijalna za proces diferencijacije pola kao i razvoj muškog fenotipa (maskulinizaciju) i normalnu fertilitet tokom adultnog perioda. Intersticijalne ćelije testisa, Leydig-ove ćelije, su glavno mesto sinteze muških polnih hormona (androgena), dominantno testosterona, u testisima. Ove ćelije preko sinteze i sekrecije androgena imaju kritičnu ulogu u maskulinizaciji, spermatogenezi i metabolizmu uopšte (za reference pogledati Huhtaniemi i Teerds 2018).

2.1.1. Karakteristike i regulacija razvoja različitih tipova Leydig-ovih ćelija

Primarna funkcija Leydig-ovih ćelija intersticijuma testisa je produkcija muških polnih hormona androgena, dominantno testosterona, koji je esencijalan za razvoj i funkcionisanje muškog reproduktivnog sistema. Organizacija intersticijuma se razlikuje između vrsta što utiče i na broj Leydig-ovih ćelija. Kod većine sisara se razlikuju dve populacije Leydig-ovih ćelija - fetalna i adultna (za reference pogledati Shima i Morohashi 2017). Iako brojne studije ukazuju na to da su fetalne i adultne dve nezavisne ćelijske populacije Leydig-ovih ćelija, neka istraživanja sugeriraju da kod miševa oba tipa progenitornih ćelija, fetalne i adultne, nastaju tokom prenatalnog razvoja od iste progenitorne populacije. Ova hipoteza je potvrđena nedavno kada je u perivaskularnom prostoru fetalnog testisa identifikovana populacija

multipotentnih progenitornih ćelija od koje može nastati nekoliko tipova ćelija intersticijuma, uključujući fetalne i adultne Leydig-ove ćelije (Kumar i DeFalco 2018).

Fetalne Leydig-ove ćelije. Populacija **fetalnih Leydig-ovih ćelija, FLCs** (*engl. fetal Leydig cells*) u fetalnim testisima se javlja odmah nakon inicijalne diferencijacije pola i neophodna je za maskulinizaciju fetusa. Ova populacija ćelija se javlja kod miševa između 12.5. i 13. dana embrionalnog razvoja (E12.5-E13), jedan dan nakon Sertoli-jevih ćelija. Ekspresija gena za enzime koji sintetišu steroidogene hormone kod miševa počinje ubrzo nakon diferenciranja Leydig-ovih ćelija (oko E13-E14.5) (za reference pogledati Shima i Morohashi 2017). Za fetalne testise miševa karakteristična je ekspresija HSD17B3 u Sertoli-jevim ćelijama što omogućuje da se dominantni hormon produkovan u fetalnim Leydig-ovim ćelijama, **androstendion**, konvertuje u testosteron u Sertoli-jevim ćelijama (Shima i sar. 2013). Drugi važan produkt ovih ćelija je i **INSL3** (*engl. insulin like 3*), odgovoran za početnu fazu spuštanja testisa u skrotum i preživljavanje germinativnih ćelija nakon rođenja jer poseduje sposobnost da prolazi krvno-testikularnu barijeru (Ivell i sar. 2013). Do nedavno je dominiralo mišljenje da nakon rođenja populacija FLCs biva zamenjena populacijom ALCs, ali danas je potvrđeno prisustvo FLCs u postnatalnim testisima (za reference pogledati Shima i Morohashi 2018).

Adultne Leydig-ove ćelije. Tokom postnatalnog razvoja, adultna populacija Leydig-ovih ćelija nastaje aktivnom proliferacijom od matičnih ćelija intersticijuma testisa i prolazi kroz tri faze razvoja - progenitorne, nezrele i zrele adultne Leydig-ove ćelije (za reference pogledati Teerds i Huhtaniemi 2015; Shima i Morohashi 2018). Kao što je već navedeno, ALCs kao i FLCs vode poreklo od zajedničkog multipotentnog progenitora (Kumar i DeFalco 2018). **Matične adultne Leydig-ove ćelije, SLCs** (*engl. stem Leydig cells*) su identifikovane 7. postnatalnog dana (P7) kao vretenaste ćelije koje su smeštene u peritubularnim ili perivaskularnim nišama intersticijuma neonatalnog testisa. Kao glavni markeri ovih ćelija, navode se prisustvo PDGFR α (*engl. platelet derived growth factor receptor alpha*), kao i odsustvo LHCGR (*engl. luteinizing hormone/human choriogonadotropin receptor*) i HSD3B1 (*engl. hydroxysteroid 3-beta dehydrogenase*), specifičnih markera adultnih Leydig-ovih ćelija (Ge i sar. 2006). **Progenitorne adultne Leydig-ove ćelije, PLCs** (*engl. progenitor Leydig cells*) se javljaju između P10 i P14, sa manjim variranjima između vrsta, opredeljivanjem SLCs i početkom ekspresije LHCGR i HSD3B1. Dominantno su lokalizovane peritubularno i perivaskularno. PLCs su

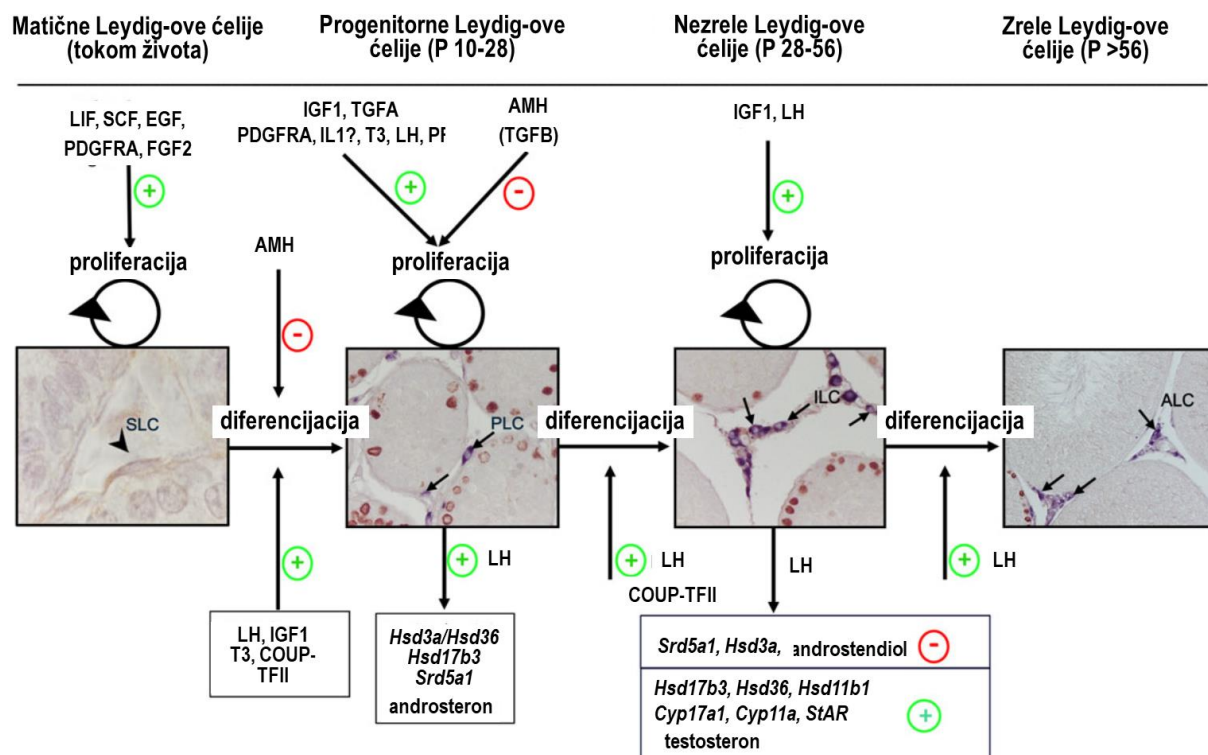
karakterističnog vretenastog oblika sa ograničenim brojem organela, pre svega neophodnih za produkciju steroida - glatki endoplazmatski retikulum (ER), tubulovezikularne mitohondrije i lipidne granule. Odlikuje ih prisustvo LHCGR receptora, androgenih receptora, mala produkcija testosterona, ali sposobnost da ga metabolišu. Nakon P15 evidentno je povećanje mitotičke aktivnosti koje je najizraženije oko P20 i smatra se da prestaje u šestoj nedelji. Kod pacova je pokazano da većina progenitornih ćelija migrira prema centru intersticijuma oko P28 kada i počinje diferencijacija u nezrele adultne ćelije. **Nezrele adultne Leydig-ove ćelije, ILCs (engl. immature Leydig cells)** se kod glodara javljaju oko P28. Okruglog/poligonalnog su oblika sa većim brojem lipidnih inkluzija i razvijenijim glatkim ER. Prisutne su do P56. Povećan nivo CYP11 (engl. cytochrome P450, family 11), CYP17 (engl. cytochrome P450, family 17) i HSD3B enzima, kao i povećan kapacitet, ne samo za metabolizam već i za produkciju testosterona, takođe su karakteristike ovog tipa ćelija. **Zrele adultne Leydig-ove ćelije, ALCs (engl. mature adult Leydig cells)** nastaju deobom i diferencijacijom ILCs pod uticajem luteinizirajućeg hormona (LH) tokom puberteta. Populacija zrelih adultnih ćelija javlja se oko P56 kada dolazi i do opadanja aktivnosti enzima za metabolisanje androgena. Na ovom stupnju se specifično ekspresuje HSD3B6. Glavni product steroidogeneze ALCs je **testosteron** (za reference pogledati Teerds i Huhtaniemi 2015; Chen i sar. 2017). Drugi važan product ALCs je **INSL3**, član familije hormona peptidne strukture (slične insulin ili insulinu sličnim faktorima rasta), koji se smatra biomarkerom Leydig-ovih ćelija koji ukazuje na nivo diferencijacije i brojnost ovih ćelija. INSL3 svoju funkciju ostvaruje vezivanjem za RXFP2 receptor (engl. relaxin family peptide receptor 2), ranije poznatog kao LGR8 (engl. leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 8) (Nef i Parada 1999; Ivell i sar. 2014).

Regulacija razvoja Leydig-ovih ćelija. Diferencijacija obe populacije Leydig-ovih ćelija, fetalne i adultne, je primarno pod kontrolom hormona i lokalno produkovanih parakrinih faktora (Slika 2.1.2). Iako potrebni za razvoj humanih FLCs, smatra se da gonadotropni hormoni nisu neophodni za razvoj FLCs miševa (Majdič i sar. 1998). Međutim, LH je neophodan za diferencijaciju prekursora ALCs, ali i za diferencijaciju ILCs u ALCs. Androgeni hormoni, sa druge strane, regulišu diferencijaciju i veličinu, kako FLCs, tako i ALCs populacije, u autokrinom i parakrinom maniru, preko svojih receptora na Leydig-ovim (Hardy i sar. 1990) i Sertoli-jevim ćelijama (Hazra i sar. 2013). IGF1 se, takođe, smatra veoma značajnim za proliferaciju i diferencijaciju PLCs i ILCs između P14 i P35 (Hu i sar. 2010).

Diferencijacija FLCs počinje veoma rano tokom prenatalnog razvoja, između E10 i E10.5, od embrionalnih matičnih ćelija ekspresovanjem Ad4BP/NR5A1/SF1 (*engl.* Ad4-binding protein/ nuclear receptor subfamily 5 group A member 1/steroidogenic factor1) (za reference pogledati Morohashi 1997). Još jedan ključni faktor je ekspresija SRY (*engl.* sex determining region Y), koji je kodiran genom na Y hromozomu, u somatskim ćelijama muškog genitalnog grebena, takođe oko E10-E10.5 kod miševa. Poznato je da SRY aktivira ekspresiju ciljnih gena kod miševa u kooperaciji sa GATA4 (*engl.* GATA-binding factor 4), WT1 (*engl.* Wilm's tumor 1) i SF1. Glavni ciljni gen za SRY je *Sox9* (*engl.* SRY-related box) čiju ekspresiju pozitivno reguliše, a SOX9 zatim aktivira *Fgf9* (*engl.* fibroblast growth factor 9) i inhibira gen *Wnt4* (*engl.* wingless-type MMTV integration site family, member 4) čime se sprečava razvoj ovarijuma i promoviše diferencijaciju Sertoli-jevih ćelija (Larney i sar. 2014). Sertoli-jeve ćelije produkuju faktore koji deluju u parakrinom maniru na razvoj FLC: PDGFA (*engl.* platelet-derived growth factor A), preko svojih receptora Ptch1 (*engl.* Patched1) i PDGFRA (*engl.* platelet-derived growth factor receptor A), DHH (*engl.* desert hedgehog) i COUP-TFII (*engl.* chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II) sa funkcijom transkripcionog faktora. Kako i za diferencijaciju pola uopšte, tako i za ovaj proces važani su i AMH (*engl.* anti-Mullerian hormon), hormone glikoproteinske prirode i član superfamilije TGF β (*engl.* transforming growth factor β) strukturno sličan inhibinima i aktivinima, koji inhibira razvoj ženskog reproduktivnog trakta, kao i DAX1 (*engl.* dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) (za reference pogledati Teerds i Huhtaniemi 2015; Shima i Morohashi 2017). Nedavno je identifikovana SF1-pozitivna populacija progenitornih ćelija prisutna pre diferencijacije pola koja može imati sposobnost vremenski specifične diferencijacije prvo u Sertoli-jeve, a potom u FLCs (Stevant i sar. 2018). Kao što je već navedeno, potvrđeno je i prisustvo zajedničkog progenitora za FLCs i ALCs čija se diferencijacija odvija pod kontrolom Notch-signalizacije (Kumar i DeFalco 2018).

Poznato je da je proliferativna aktivnost adultnih SLCs direktno stimulisana sledećim faktorima: EGF (*engl.* epidermal growth factor), LIF (*engl.* leukemia inhibitory factor), FGF2 (*engl.* fibroblast growth factor 2), c-kit ligand, PDGFA, PDGFB (*engl.* platelet-derived growth factor B), DHH, aktivini. Inhibitornu ulogu imaju: AMH, TGF β (*engl.* transforming growth factor β), androgeni (dihidrotestosteron) i PRKA (*engl.* protein kinase A). Njihova diferencijacija je direktno zavisna od LH, COUP-TF II, DHH, aktivina, IGF1 (*engl.* insulin like growth factor 1) i T3 (tri-jotironin), a negativno je regulisana od strane: TGF β , PDGFB,

FGF2, Notch i WNT (za reference pogledati Teerds i Huhtaniemi 2015; Chen i sar. 2017). COUP-TF II, pored uloge u razvoju FLCs, reguliše i diferencijaciju PLCs u ILCs kod miševa, ali ne i funkciju ALCs (Qin i sar. 2008). Značajni faktori u regulaciji diferencijacije i funkcije ALCs su i SOX9, 5 i 13 čija je ekspresija potvrđena i u ALCs (Daigle i sar. 2015). Pokazano je da su PCNA (*engl.* proliferating cell nuclear antigen) i TSP2 (*engl.* thrombospondin 2) važni markeri regeneracije Leydig-ovih ćelija (Hazra i sar. 2013; Wu i sar. 2017).



Slika 2.1.2. Razvoj i funkcionalne karakteristike adultne populacije Leydig-ovih ćelija.

Preuzeto iz Teerds i Huhtaniemi 2015, uz manje izmene.

2.1.2. Steroidogeneza u Leydig-ovim ćelijama

Steroidogeneza u Leydig-ovim ćelijama podrazumeva biosintezu muških polnih hormona (androgena), na prvom mestu testosterona. Kao i ostali steroidni hormoni, androgeni se sintetisu od prekursora, holesterola, pomoću steroidogene mašinerije u Leydig-ovim ćelijama testisa koju čine proteini za transport holesterola, steroidogeni enzimi i regulatorni molekuli.

2.1.2.1. Biosinteza androgena i osnovna steroidogena mašinerija u Leydig-ovim ćelijama

Steroidogeneza uključuje seriju supstrata, koji se aktivnošću steroidgenih enzima metabolišu u mitohondrijama i endoplazmatskom retikulumu (ER) do krajnjih produkata - hormona. Prvi među njima je holesterol. Holesterol kao supstrat za sintezu steroidnih hormona dospeva iz sledećih izvora: *de novo* sinteza, holesterol estari skladišteni u lipidnim kapima, egzogeni lipoproteini ili ćelijska membrana. *De novo* sintetisan holesterol dospeva do mitohondrija zahvaljujući kontaktu membrana ER-a i mitohondrija, MAM (*engl.* mitochondria-associated membranes) ili može biti skladišten u lipidnim kapima. Holesterol sadržan u lipoproteinima može biti usvojen (1) neselektivnim putem - preko receptora za lipoproteine male gustine, LDL (*engl.* low density lipoproteins) ili (2) selektivnim putem - direktnim transportom holesterola u lipoproteinima velike gustine, HDL (*engl.* high density lipoproteins) preko **SR-BI/SCARB1** (*engl.* scavenger receptors class B type 1) receptora lokalizovanih na plazma membrani. Najveći deo holesterola za steroidogenezu kod glodara se obezbeđuje selektivnim putem (za reference pogledati Rone i sar. 2009; Hu i sar. 2010). Holesterol unet u ćeliju na ovakav način, kao i onaj skladišten u lipidnim kapima, prevodi se do slobodnog aktivnošću enzima HSL (*engl.* hormon-senzitive lipase) čija aktivnost i regulacija su opisani u Leydig-ovim ćelijama miša (Manna i sar. 2013). PLCs i ILCs glodara koriste holesteril estere akumulirane u lipidnim kapima kao inicijalni izvor holesterola za steroidogenezu, dok su kod ALCs više zastupljeni drugi izvori holesterola: *de novo* sinteza ili serumski lipoproteini (za reference pogledati Teerds i Huhtaniemi 2015).

Holesterol može biti transportovan do mitohondrija vezikularnim transportom ili pomoću holesterol-vezujućih proteina sa START (*engl.* steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer) domenom. Ovaj domen se sastoji od oko 210 amino kiselina i formira hidrofobni tunel za transport sterola (Strauss i sar. 2003). Da bi holesterol bio transportovan od OMM (*engl.* outer mitochondrial membrane) do IMM (*engl.* inner mitochondrial membrane) kroz hidrofilni međumembranski prostor neophodan je 800-kDa kompleks proteina poznat kao **transduceozom**. Ključnu ulogu u ovom transportu ima **StAR protein** (*engl.* steroidogenic acute regulatory protein). StAR je prisutan u steroidogenim ćelijama kao prekursorska forma od 37 kDa, koja sadrži N-terminalnu mitohondrijalnu signalnu sekvencu koja se proteolitički kida nakon ulaska u mitohondrije, pri čemu nastaje nekoliko „zrelih“ izoelektričnih formi od 30 kDa (Stocco i Sodeman 1991; Clark i sar. 1994). U transduceozomskom kompleksu, StAR ostvaruje interakciju sa translokatorskim proteinom

veliĉine 18 kDa, TSPO (*engl.* translocator protein), ranije poznatim kao PBR (*engl.* peripheral-typebenzo diazepine receptor), i VDAC1 (*engl.* voltage-dependent anion chanel) koji se nalaze u OMM. Oni ĉine bioaktivno jezgro transduceozomskog kompleksa zajedno sa ATAD3A (*engl.* ATPase family AAA domain-containing protein 3A) proteinom u IMM i enzimom CYP11A1 (*engl.* cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1), koji je asociran sa IMM, ali je veĉim delom smešten u matriksu (Rone i sar. 2012). Osim njih, sastavni deo transduceozoma su: regulatorna subjedinica cAMP-zavisne protein kinaze A, PKAR1A (*engl.* protein kinase A subunit 1 α), PAP7/ACBD3 (*engl.* TSPO-associated protein 7), PRAX-1 (*engl.* peripheral benzodiazepine receptor-associated protein 1), Fdx (*engl.* ferredoxin) i FdxR (*engl.* ferredoxin reductase) (za reference pogledati Papadopoulous i Miller 2012). Kao vaŹni negativni regulatori komponenti transduceozomskog kompleksa, identifikovani su adaptorni proteini 14-3-3 γ (Aghazadeh i sar. 2012) i 14-3-3 ϵ (Aghazadeh i sar. 2014). Vezujuĉi motivi za 14-3-3 γ su identifikovani na komponentama transduceozoma, ukljuĉujuĉi i StAR (Ser-194) u okviru START domena (Aghazadeh i sar. 2012). 14-3-3 ϵ ostvaruje interakciju sa VADAC1 u OMM ĉime se ograniĉava dostupnost holesterola za steroidogenu (Aghazadeh i sar. 2014).

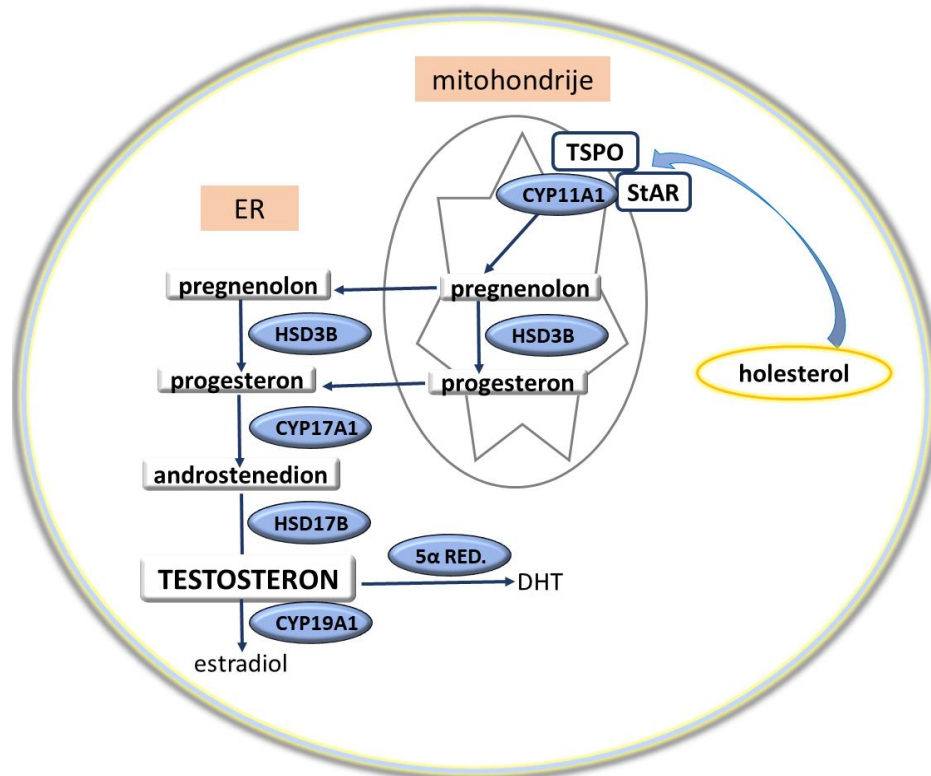
Nakon transporta holesterola u mitohondrije, konverzija do androgena se dešava aktivnošću dve familije enzima: (1) citohrom P450 oksidoreduktaze (CYP11A i CYP17A) i (2) hidrosisteroid dehidrogenaza (HSD3B i HSD17B). **CYP11A1** (*engl.* **cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1**) i **CYP17A1** (*engl.* **cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1**) su membranski proteini i funkcionišu kao monooksigenaze koje koriste redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) kao donor elektrona i katalizuju reakcije hidrosilacije steroidnih supstrata. Kao što je ranije navedeno, iako je najveĉim delom lokalizovan u matriksu mitohondrija, CYP11A1 je asociran i sa IMM. ZaduŹen je za isecanje boĉnog lanca holesterola i njegovu transformaciju u pregnenolon. Identifikovan je u testisima, ovarijumima, nedbubreŹnim Źlezdama i placenti. Pored bazalne, transkripcije gena za CYP11A1 je i hormonski regulisana. Za CYP17A1 je karakteristiĉno da ima dualnu funkciju 17 α - hidrosilaze i 17, 20 – lijaze. U Δ^4 putu steroidogeneze katalizuje 17 α -hidrosilaciju progesterona, koja je praĉena liaznom reakcijom tj. raskidanjem C17-20 veze, pri ĉemu nastaje androstendion. Lokalizovan u ER, a prisustvo ovog enzima je potvrđeno u testisima, teka ćelijama ovarijuma, nadbubreŹnim Źlezdama, placenti i mozgu. **HSD3B** (*engl.* **hydroxysteroid 3-beta dehydrogenase**) i **HSD17B** (*engl.* **hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase**) pripadaju superfamiliji alkohol dehidrogenaza kratkog lanca koje

katalizuju reakcije oksidacije i redukcije steroidnih hormona koje zahtevaju $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ kao akceptore, a njihove redukovane forme kao donore redukujućih ekvivalenata. HSD3B (Δ^5 - Δ^4 izomeraza) katalizuje enzimsku reakciju dehidrogenacije i izomerizacije Δ^5 - 3β -hidroksisteroida u Δ^4 -3-ketosteroide. U Δ^4 putu biosinteze testosterona u Leydig-ovim ćelijama ovaj enzim ima važnu ulogu u konverziji pregnenolona u progesteron. Subcelularno je lokalizovan u ER i u mitohondrijama. Identifikovane su različite forme, ali su u Leydig-ovim ćelijama miševa najdominantnije izoforme 1 i 6. HSD17B (zoforme 1, 3 i 7) je značajan za poslednji korak biosinteze aktivnih steroidnih hormona u ER. Do danas je okarakterisano jedanaest izoformi u gonadama, ali je u Leydig-ovim ćelijama identifikovan jedino HSD17B3 (za reference pogledati Payne i Hales 2004; Miller i Auchus 2011).

Poznato je da postoje dva puta sinteze androgena u testisima - Δ^4 i Δ^5 . Njihova zastupljenost u steroidogenim tkivima je specifičnost vrste. Δ^5 put je više zastupljen kod ljudi i viših primata, dok je kod glodara dominantan Δ^4 put (Slika 2.1.3). Prvi korak u nastanku androgena je konverzija C27 holesterola u C21 steroid, pregnenolon, katalizovana CYP11A1 enzimom. U Δ^5 putu delovanjem CYP17A1 od pregnenolona nastaje hidroksipregnenolon, a potom cepanjem bočnog niza dihidroepiandrosteron. Od njega nastaje androstendiol (reakcija katalisana HSD17B) čijom izomerizacijom (reakcija katalisana HSD3B) može nastati testosteron. Za razliku od ovog, u Δ^4 putu pregnenolon prelazi u progesteron (reakcija katalisana HSD3B) od kog nastaje Δ^4 -androstendion (reakcija katalisana CYP17A1), a on se zatim konvertuje u testosteron (reakcija katalisana HSD17B). C19 androgeni (androstendion i testosteron) mogu biti prevedeni u C18 estrogene (estron i estradiol) reakcijom koju katalizuje **CYP19A1** (*engl. cytochrome P450 family 19 subfamily A*) i posebno je značajna u delovima mozga gde nema receptora za ove androgene. Oko 70% produkovanog testosterona (T) se konvertuje u dihidrotestosteron u perifernim tkivima i oba hormona ostvaruju svoje efekte preko androgenih receptora, ARs (*engl. androgen receptors*). Ovaj proces je katalizovan enzimom **5 α -reduktazom, SRD5A1** (*engl. steroid 5-alpha reductase type 1*) (za reference pogledati Payne i Hales 2004; Miller i Auchus 2011).

Razlike u putevima steroidogeneze, prisustvu steroidogenih enzima i krajnjih produkata prisutne su među različitim tipovima (nivoima diferencijacije) Leydig-ovih ćelija. Iako su PLCs sposobne da produkuju androgene, profil ekspresije steroidogenih enzima se razlikuje u odnosu na ALCs od fetalnog do adultnog doba (*engl. developmental patterns of gene expression*). StAR, CYP11A1, CYP17A1, HSD3B6 i HSD17B3 u PLCs su ekspresovani u

manjoj meri tokom ranog postnatalnog razvoja, ali njihova ekspresija raste sa razvojem ćelija u pubertetu. Za razliku od njih, HD3B1 je ekspresovan jednako tokom postnatalnog razvoja (Baker i sar. 1999; O'Shaughnessy i sar. 2002a). Specifičan profil ekspresije steroidogenih enzima rezultuje sintezom androstendiona i androsterona kao glavnih produkata steroidogeneze u PLCs (za reference pogledati Teerds i Huhtaniemi 2015).



Slika 2.1.3. Šematski prikaz $\Delta 4$ puta steroidogeneze kod glodara.

2.1.2.2. Regulacija steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama

Steroidni hormoni regulišu esencijalne fiziološke procese i poremećaj nivoa ovih hormona povezan je sa različitim patološkim stanjima. Stoga je i biosinteza steroidnih hormona precizno regulisana. Biosinteza androgena u Leydig-ovim ćelijama je složeni proces koji je rezultat delovanja kompleksa nervnih, endokrinih, parakrinih i autokrinih signala (za reference pogledati Saez 1994; Tremblay 2015).

Pored endokrine, za optimalnu steroidogenezu je neophodna i adekvatna **nervna regulacija** koja podrazumeva postojanje hipotalamo-gonadalnog nervnog puta. Na ovaj način se, nezavisno od hipofize, reguliše funkcija Leydig-ovih ćelija preko autonomnih, primarno

simpatičkih testikularnih nerava čija tela se nalaze u kičmenoj moždini. Ova inervacija je odgovorna za posredovanje efekata stresom-indukovanih faktora i vazodilataciju. Za parasimpatičku inervaciju je zadužen nerv vagus (Lee i sar. 2002; Selvage i sar. 2006).

Endokrina regulacija prevashodno podrazumeva uspostavljanje hipotalamo-hipofizo-gonadalne, HPG (*engl.* hypothalamic-pituitary-gonadal axis), osovine koja predstavlja humoralnu komponentu komunikacije nervnog i endokrinog sistema. Produkcija androgena u Leydig-ovim ćelijama je stimulisana LH hormonom koji je sekretovan od strane gonadotropa hipofize i krvotokom dospeva do testisa (Dufau i sar. 1984a). Sekretacija ovog hormona regulisana je epizodičnom sekrecijom gonadotropin oslobađajućeg hormona hipotalamusa, GnRH (*engl.* growth hormone-releasing hormone), koji portnim krvotokom stiže do adenohipofize gde, preko svojih GPCR receptora (*engl.* G protein-coupled receptor superfamily), reguliše sekreciju gonadotropnih hormona - LH i folikulo-stimulišućeg hormona (FSH). Za regulaciju sekrecije GnRH odgovorna je familija neuropeptida koje sekretuju kisneuron i KND γ neuroni (*engl.* kisspeptin/neurokinin B/dynorphin neurons), poznata kao kispeptini (čija ekspresija je potvrđena i u samim Leydig-ovim ćelijama). Kispeptini se vezuju za GPR54 receptore (*engl.* G protein - coupled receptor 54) na GnRH neuronima (Dufau i sar. 1984b). Poznato je da neuropeptidi neurokinin B i dinorfin, produkovani od strane KND γ neurona, deluju kao tzv. „start“, odnosno tzv. „stop“ signal za sekreciju GnRH. Epizodična sekrecija GnRH je, takođe, i pod kontrolom norepinefrina, dopamina, serotonina, GABA (*engl.* gama-aminobuterna kiselina), glutamata, neuropeptide Y i galanina. Osim njih, važan regulator sekrecije GnRH je gonadotropin inhibirajući hormon GnIH (*engl.* gonadotropin-inhibitory hormone), koji koji može delovati uzvodno od GnRH, ali i na nivou samih gonada (za reference pogledati Karpara i Huhtaniemi 2017). Pored navedenih, u endokrinu regulaciju steroidogeneze su uključeni i trijodtironin (T3), glukokortikoidi, mineralokortikoidi (aldosteron), prolaktin, melatonin, EGF (*engl.* epidermal growth factor), IGF1 i insulin (za reference pogledati Tremblay 2015).

Optimalna steroidogeneza takođe zavisi i od **lokalne parakrine (kriptokrine i jukstakrine) regulacije** od strane ostalih ćelija testisa (Sertoli-jevih, germinativnih, makrofaga, peritubularnih mioidnih, endotelnih). Lokalana regulacija često zavisi od delovanja odgovarajućih hormona, kao i međućelijskih veza i kontakata. Važni produkti makrofaga koji regulišu steroidogenu funkciju Leydig-ovih ćelija su azot-monoksid (NO) i 25-OH holesterol (za reference pogledati Hales 2002). Poznato je i da bakterijski lipopolisaharidi i ROS (*engl.*

reactive oxygen species), uzrokuju disfunkciju Leydig-ovih ćelija (Allen i sar. 2004). Vaskularni endotelijalni factor rasta, VEGFs (*engl.* vascular endothelial growth factors), relaksinu-sličan factor rasta, retinol i retinoična kiselina se, takođe, smatraju važnim na ovom nivou regulacije steroidogeneze (za reference pogledati Haider 2004). Iako mehanizam još uvek nije poznat, smatra se da WT1 regulacijom ekspresije parakrinih faktora u seminiferim tubulama igra važnu ulogu u steroidogenezi Leydig-ovih ćelija (Chen i sar. 2014). Pored navedenih, niz drugih parakrinih faktora je uključeno u regulaciju steroidogeneze. Najvažniji faktori koji pozitivno regulišu funkciju Leydig-ovih ćelija su: IGF1, EGF, FGF9, activin A, PDGF. Sa druge strane, AMH, TGF β 1 (*engl.* transforming growth factor β 1), proinflamatorni citokini IL-1 i 6 (interleukin-1 i 6) i TNF (*engl.* tumor necrosis factor) su poznati kao inhibitori steroidogeneze (za reference pogledati Tremblay 2015).

Autokrino delovanje dva glavna produkta Leydig-ovih ćelija, T i INSL3, je esencijano za funkciju ovih ćelija. T, pored regulacije sopstvene produkcije na nivou HPG osovine, deluje i u parakrinom i autokrinom maniru. Poznato je da je signalizacija od ARs neophodna za razvoj i funkcionalnost ALCs (O'Shaughnessy i sar. 2002b). Farmakološke doze T smanjuju ekspresiju steroidogenih gena (Kostić i sar. 2011) i povećavaju stepen apoptoze (Janjić i sar. 2012). Sistemska blokada ARs sprečava T-indukovano smanjenje steroidogenog kapaciteta/aktivnost Leydig-ovih ćelija i smanjenu ekspresiju steroidogenih gena i menja ekspresiju elemenata cAMP signalnog puta (Bjelić i sar. 2014). *In vitro* istraživanja su potvrdila stimulatívni efekat INSL3 na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama, ali samo u slučaju njihove male gustine i niske produkcije INSL3 (Pathirana i sar. 2012).

Epigenetska kontrola je još jedan od važnih nivoa regulacije steroidogeneze koji ima uticaja na biosintezu, ali i aktivnost steroidnih hormona i funkciju njihovih receptora. Od ranije je poznato prisustvo gonadotropinima regulisane RNA helikaze, GRTH/DDX25 (*engl.* testis-specific member of the DEAD-box family of RNA helicases) u Leydig-ovim i germinativnim ćelijama (Tang i sar. 1999). Identifikovana je kao negativni autokrini molekularni regulator steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama. Smatra se da GRTH, preko negativne regulacije stabilnosti transkripta za StAR, reguliše nivo holesterola dostupnog za steroidogenezu na nivou mitohondrija (Fukushima i sar. 2011). Nedavno je identifikovana ekspresija miRNA 150 (miR-150) u Leydig-ovim ćelijama miševa za koju se smatra da je negativni regulator steroidogeneze, najverovatnije preko regulacije StAR-a (Geng i sar. 2017).

Endokrina funkcija Leydig-ovih ćelija podleže i promenama usled dnevno - noćnog ritma i **pod kontrolom je centralnog i perifernog molekularnog biološkog časovnika**. Poznato je da je protein BMAL1, kao komponenta molekularnog časovnika, uključen u regulaciju ekspresije StAR proteina i neophodan je za normalnu produkciju testosterona (Alvarez i sar. 2008). Pokazano je i da su promene ekspresije gena za elemente molekularnog časovnika tokom dana u korelaciji sa ekspresijom gena za neke od steroidogenih enzima i regulatora steroidogeneze (Baburski i sar. 2015).

Delovanje kompleksa nervnih, endokrinih, parakrinih i autokrinih signala koji regulišu biosintezu androgena u Leydig-ovim ćelijama, aktivira niz signalnih puteva i ciljnih transkripcione faktore u ovim ćelijama. Ovaj proces je dominantno pozitivno regulisan LH hormonom ili njegovim analogom humanim horionskim gonadotropinom, hCG (*engl.* human chorionic gonadotropin) i posledično pokretanjem signalnog puta **cikličnog adenozin monofosfata, cAMP** (*engl.* cyclic adenosine monophosphate) i protein kinaza zavisnih od cAMP (Winters i Dufau 1984). Pored toga, kompleksna mreža drugih signalnih puteva aktiviranih brojnim faktorima (EGF (*engl.* epidermal growth factor), IGF1, FGF9, TGF, MDFs (*engl.* macrophage driven factors), prolaktin, T3, hloridni i joni kalcijuma) uključeno je u regulaciju biosinteze androgena u Leydig-ovim ćelijama, zavisno ili nezavisno od cAMP i fosforilacije StAR proteina (za reference pogledati Stocco i sar. 2005; Tremblay 2015).

LH/hCG se vezuju za **LHCGR receptor** (*engl.* luteinising hormone/human chorionic gonadotropin receptor) na Leydig-ovim ćelijama koji pripada klasi GPCR receptora. Kao važni regulatori ekspresije ovih receptora identifikovani su: Sp1/Sp3 (*engl.* specific proteins/transcription factors 1 and 3), AP2 (*engl.* activating protein 2) i SF1. Takođe, potvrđena je i uloga kompleksa orfanskih nuklearnih receptora-EAR2 i EAR3, kao i HDAC1-HDAC2-mSin3A kompleksa histon deacetilaza u kooperaciji sa Sp1/Sp3 u regulaciji ekspresije ovih receptora (Ascoli i sar. 2002; Zhang i Dufau 2003a, b). Nakon vezivanja LH/hCG za LHCGR, posredstvom G proteina, dolazi do aktiviranja enzima **adenilat ciklaze, ADCY** (*engl.* adenylate cyclase) što za posledicu ima povećanu sintezu cAMP koji je zadužen za aktiviranje **protein kinaze A (PRKA)** (Dufau i sar. 1987). Da bi fiziološki efekat bio osiguran, aktivacija ovog signalnog puta/kinaza mora rezultovati fosforilacijom ciljnih proteina, pre svega StAR proteina, ili efektom na nivou ekspresije gena uključenih u biosintezu testosterona. Prilikom LH/hCG stimulacije pokreće se i ekspresija i fosforilacija StAR proteina. Ekspresija *Star* gena je niska u odsustvu ove hormonske stimulacije, a nakon

nje dolazi do značajnog povećanja. Pokretanje transkripcije se dešava posle incijalne stimulacije steroidogeneze, a *de novo* sinteza StAR-a je neophodna za kontinuiranu steroidogenu (Artemenko i sar. 2001). U okviru StAR proteina su identifikovana dva mesta na kojima dolazi do fosforilacije od strane PRKA na pozicijama Ser-56 i Ser-194, a mutacija Ser u Ala na ovim mestima je potvrdila značaj Ser-194 u biološkoj aktivnosti StAR-a u sintezi steroida (Manna i sar. 2013). Za prekidanje signala nastalog aktiviranjem cAMP signalnog puta, odgovorni su enzimi **fosfodiesteraze, PDEs** (*engl.* phosphodiesterases) koje katalizuju hidrolizu cAMP-a. U Leydig-ovim ćelijama glodara dobro su ekspresovane **PDE4, PDE8A i PDE8B**, specifične za cAMP, čija aktivnost vodi dramatičnom smanjenju biosinteze steroida. Smatra se da sva tri tipa deluju simultano u regulaciji steroidogeneze. Pokazano je da PDE8A i PDE8B, održavanjem niske koncentracije cAMP u Leydig-ovim ćelijama, inhibiraju steroidogenezu smanjujući aktivnost enzima HSL i ekspresije StAR proteina (Shimizu-Albergine i sar. 2012). PDE4 i PDE8 mogu regulisati steroidogenu i indirektno. Naime, kontrolišući nivo cAMP, one koordinišu mnoge ćelijske procese (transkripcija, ćelijski ciklus, vezikularni transport, metabolizam lipida i glukoze) preko kojih indirektno mogu uticati na vreme i intenzitet sekrecije testosterona u odgovoru na LH (Golkowski i sar. 2016).

Poznato je da je signalni put familije **MAPK/ERK kinaza** (*engl.* **mitogen-regulated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases**) neophodan za ranu LH-stimulisanu steroidogenezu. Potvrđeno je i da postoji međusobna komunikacija, tzv. „cross talk”, između GPCR i EGFR (*engl.* epidermal growth factor receptor) u Leydig-ovim ćelijama (Evaul i Hammes 2008). Pokazano je da ERK1/2 kinaza može biti aktivirana povećanjem koncentracije cAMP, što rezultuje maksimalnim porastom steroidogeneze usled fosforilacije StAR (Ser-232) u okviru D domena, sličnog supstratu za ERK (Poderoso i sar. 2009). Smatra se da ERK1/2 - signalni put koordiniše ekspresiju steroidogenih gena u Leydig-ovim ćelijama (Matzkin i sar. 2013). Važni negativni regulatori steroidogeneze su i MAPK fosfataze 1 i 2 (MKP1 i MKP) koje defosforilišu MAPK (Gómez i sar. 2013), Vezivanje LH za svoje receptore pored aktiviranja PRKA i MAPK/ERK, aktivira i **protein kinazu C (PRKC)**. Aktivacija PRKC utiče na povećanje transkripcije i translacije StAR, ali nema ulogu u fosforilaciji ovog proteina (Manna i sar. 2009b). Takođe, nakon aktivacije LHCGR, **fosfolipaza C (PLC)** hidrolizuje PIP2 (*engl.* phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), nastaje DAG (*engl.* diacylglycerol) koji aktivira PRKC, i IP₃ (*engl.* inositol 1,4,5-triphosphate) koji omogućuje oslobađanje Ca²⁺ iz ER (Jo i sar. 2005). Povećanjem intracelularne koncentracije

Ca²⁺ dolazi do aktiviranja **CaMK** (*engl.* Ca²⁺/calmodulin kinase) za koju se smatra da je uključena u regulaciju transkripcije StAR u kooperaciji sa NUR77 transkripcionim faktorom (Martin i sar. 2008).

Aktiviranjem NO - zavisnih solubilnih guanilat ciklaza, sGUCY (*engl.* soluble guanylyl cyclases), azot-monoksid, NO (*engl.* nitric oxide) u Leydig-ovim ćelijama vodi povećanju koncentracije **cikličnog guanozin monofosfata, cGMP** (*engl.* cyclic guanosine monophosphate). Povećanjem koncentracije cGMP dolazi do aktivacije **protein kinaza G (PRKG)**. Pokazano je da NO ima dualni efekat na steroidogenezu. Manje koncentracije NO stimulišu steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama aktivacijom cGMP signalizacije (Valenti i sar. 1999) i fosforilacijom StAR proteina (Andrić i sar. 2007). Pri višim koncentracijama NO ima inhibitorni efekat na steroidogenezu direktnim inhibiranjem steroidogenih enzima koji u svom sastavu sadrže hem, tj. nezavisno od cGMP signalizacije (Del Punta i sar. 1996).

Osteokalcin se smatra jednim od regulatora ekspresije enzima uključenih u sintezu testosterona, u skladu sa dugogodišnjim stavovima da su regulacija energetskeg metabolizma, koštane mase i reproduktivne funkcije koordinisane. Na Leydig-ovim ćelijama su identifikovani GPCR receptori za osteokalcin. Pokazano je da su glavni posrednici u ostvarivanju njegove funkcije transkripcioni faktori aktivirani porastom cAMP-a (Oury i sar. 2011). **ACSL4** (*engl.* acyl-CoA synthetase 4), enzim zadužen za kontrolu nivoa arahidonske kiseline, AA (*engl.* arachidonic acid), smatra se važnim regulatorom sinteze steroida u Leydig-ovim ćelijama. Kao još jedan važan faktor za funkciju Leydig-ovih ćelija navodi se i **COX-2** (*engl.* cyclooxygenase-2), ključni enzim za biosintezu prostaglandina u intersticijalnim ćelijama testisa (Frungeri i sar. 2006).

Da bi fiziološki efekat bio osiguran, pored direktne fosforilacije StAR proteina, aktivacija navedenih signalnih puteva reguliše steroidogenezu i aktivacijom odgovarajućih **transkripcionih faktora (aktivatora ili represora) i kofaktora** koji su odgovorni za regulaciju transkripcije glavnih steroidogenih gena. Ovi transkripcioni faktori mogu biti prisutni u ćeliji i aktivirati se posttranslacionim modifikacijama ili se mogu sintetisati *de novo*. Transkripcioni aktivatori steroidogeneze su: SF1 (NR5A1), CREB (*engl.* cAMP-response element-binding protein), CREM (*engl.* cAMP responsive element modulator), NUR77/NR4A1 (*engl.* nuclear receptor subfamily 4 group A member 1), GATA4 (*engl.* GATA binding protein 4), LRH1/NR5A2 (*engl.* liver receptor homolog 1/nuclear receptor subfamily 5 group A member 2), COUP-TFII/NR2F2 (*engl.* chicken ovalbumin upstream

promoter transcription factor 2/nuclear receptor subfamily 2 group F member 2), C/EBP β (*engl.* CCAAT enhancer binding protein beta) i MEF2 (*engl.* myocyte enhancer factor 2A). Transkripcioni steroidogeni represori su: DAX1/NR0B2, SHP/NR0B2 (*engl.* nuclear receptor subfamily 0 group B member 2), ARR19 (*engl.* androgen receptor corepressor of 19 kDa) i članovi AP1 familije (cFOS i cJUN) (za reference pogledati King i LaVoie 2012; Tremblay 2015).

DAX1 u Leydig-ovim ćelijama ostvaruju fizičku interakciju sa transkripcionim aktivatorima, na prvom mestu sa SF1, NUR77 i LRH1, i repseruju njihovu aktivnost (Manna i sar. 2009a). ARR19 ostvaruje svoju aktivnost ometanjem interakcije između NUR77 i njegovog koaktivatora SRC1 (Qamar i sar. 2010). Uočena je i kooperativnost/interakcija između ostalih transkripcinih faktora tokom vezivanja za promotore steroidogenih gena, pre svega *Star* gena: CREB i Fos/Jun, GATA4 i C/EBP β , CREB i SF1, SF1 and C/EBP β , SP1 i SF1, MEF2 i GATA4, cJUN i SF1, GATA4 i C/EBP β (za reference pogledati Tremblay 2015).

2.2. Mitohondrije i njihov značaj u steroidogenezi Leydig-ovih ćelija

Mitohondrije su organele koje imaju centralno mesto u ćelijskom metabolizmu jer se u njima odigrava niz ključnih procesa za ćeliju: respiracija, oksidativna fosforilacija - sinteza adenozin trifosfata (ATP), termogeneza, produkcije slobodnih kiseoničnih radikala, ROS (*engl.* reactive oxygen species) kao nusproizvoda tokom sinteze ATP, i katabolički procesi nutrijenata. Mitohondrije igraju značajnu ulogu u homeostazi i signalizaciji Ca²⁺, kontroli ćelijskog ciklusa, ćelijskoj diferencijaciji i apoptozi, kao i u biosintezi steroidnih hormona, što ukazuje na njihov značaj izvan bioenergetike ćelija (za reference pogledati Spinelli i Haigis 2018).

Mitohondrije su ključna kontrolna tačka za biosintezu i regulaciju steroida s obzirom na to da se neki od ključnih elemenata steroidogene mašinerije (TSPO, StAR, CYP11A1, HSD3B) lokalizovani u njima (Papadopoulos i Miller 2012). Mitohondrijalni protein, poznat kao AKAP 121 (*engl.* A-kinase anchoring protein 121), je identifikovan kao bitan faktor postranskripcione regulacije StAR proteina i smatra se da ubrzava translaciju StAR-a, ali i efikasniju fosforilaciju od strane PRKA i translokaciju u mitohondrije (Dyson i sar. 2008). Pokazano je da mitohondrijalni pH, potencijal mitohondrijalne membrane ($\Delta\psi_m$) i sinteza ATP-a imaju krucijalni značaj za akutnu (cAMP-om stimulisanu) biosintezu androgena u

Leydig-ovim ćelijama. Dakle, za optimalnu steroidogenezu neophodno je da mitohondrije budu (1) polarizovane, (2) aktivne u respiraciji i (3) da imaju normalan energetski metabolizam (Allen i sar. 2006). Mitohondrijalna sinteza ATP je važna za steroidogenezu i u tumorskim, i u primarnoj kulturi Leydig-ovih ćelija. Međutim, kod tumorskih ćelija promene $\Delta\psi_m$ minimalno utiču na sintezu ćelijskog ATP (jer alternativno nastaje u procesu glikolize), osim u slučaju direktne blokade lanca za transport elektrona (Midzak i sar. 2011). Potvrđen je i značaj dinamike mitohondrijalne mreže za optimalnu steroidogenezu. Akutna hormonska LH/hCG-stimulacija vodi povećanoj fuziji mitohondrija za koju se pretpostavlja da ima esencijalnu ulogu u formiranju transduceozomskog kompleksa za transport holesterola u mitohondrije, a time i za biosintezu steroidnih hormona (Duarte i sar. 2012). Mutacije mitohondrijalne DNK (mtDNK) uzrokuju smanjenje testisa za čak 85% i smanjenje broja spermatozoida kod miševa starih 25 nedelja (Shabalina i sar. 2015). Poznato je i da Leydig-ove ćelije razvijaju mehanizme koji podrazumevaju porast nastanka novih mitohondrija u cilju zaštite svoje primarne funkcije u uslovima stresa (Gak/Radović i sar. 2015).

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da su, kako funkcionalnost tako i fizička organizacija dinamične mreže mitohondrija, važne za produkciju androgena u Leydig-ovim ćelijama. Adekvatna funkcija mitohondrija se održava kroz usko povezane mehanizme nastanka novih i uklanjanja nefunkcionalnih mitohondrija, što rezultuje odgovarajućim brojem zdravih funkcionalnih organela u ćeliji. Ovi mehanizmi su važni za pravilnu segregaciju mtDNA, kontrolu nakupljanja slobodnih radikala, metabolizma kalcijuma i oksidativne fosforilacije i energetskog balansa uopšte (Palikaras i sar. 2015). Poznato je da mitohondrije ne nastaju *de novo* nego od postojećih, serijom događaja koji čine fuziju i fisiju mitohondrija i rezultuju specifičnom subcelularnom distribucijom ovih organela (Ploumi i sar. 2017). Svi procesi koji održavaju integritet i funkcionalnost mitohondrija zajedno čine **mitohondrijalnu dinamiku**, a to su: (1) mitohondrijalna fisija, (2) mitohondrijalna fuzija, (3) mitofagija, (4) mitohondrijalna biogeneza, (5) transduceozomski kompleks i (6) dinamika kretanja mitohondrija (za reference pogledati Palikaras i Tavernarakis 2014; Ploumi i sar. 2017; Wiedemann i Pfanner 2017).

Mitohondrijalna dinamika. Ciklus **mitofisije i mitofuzije** omogućuje odvajanje nefunkcionalnih od funkcionalnih (mitofisija) i spajanje funkcionalnih mitohondrija (mitofuzija) ostavljajući mrežu funkcionalnih organela u ćeliji. Ovi procesi su regulisani GTP-azama, enzimima koji hidrolizuju guanozin trifosfat (GTP), a pripadaju familiji

dinamina. Mitofisija je kontrolisana od strane GTP-aze Drp1 (*engl.* dynamin-related protein 1), mitohondrijalnog fisionog proteina 1, Fis-1 (*engl.* mitochondrial fission protein 1) i mitohondrijalnog fisionog faktora, MFF (*engl.* mitochondrial fission factor). Mitofuziju regulišu transmembranske GTP-aze: MFN1 (*engl.* mitofusin 1) i MFN2 (*engl.* mitofusin2) i OPA1 (*engl.* optic atrophy 1) (za reference pogledati Schrepfer i Scorrano 2016). **Mitofagija** je selektivna degradacija oštećenih mitohondrija u autofagozomima (*engl.* autophagosomal lysosomal pathway). Osnovu ove degradacije čini aktiviranje PINK1 kinaze (*engl.* PTEN induced putative kinase 1) od strane PTEN proteina (*engl.* phosphatase and tensin homolog) sa aktivnošću fosfataze za PIP3 (*engl.* phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate). Pored PINK1, aktivira se i PARKIN, E3 ubikvitin ligaze, koja ima kritičnu ulogu u obeležavanju proteina mitohondrija za degradaciju u proteazomima ili lizozomima. **Mitohondrijalna biogeneza** je proces nastajanja novih, zdravih i funkcionalnih, mitohondrija neophodan za povećanje mitohondrijalne mase u ćelijama. Ovaj proces je zavistan od mitofisije postojećih mitohondrija i krucijalan je za rast i oporavak postojeće mitohondrijalne mreže u ćelijama. Za nastanak novih mitohondrija je potrebna sinhronizacija ekspresije nuklearnih i mitohondrijalnih gena, kao i import proteina kodiranih nuklearnim genomom. Osim proteina kodiranih nuklearnim, mali broj mitohondrijalnih proteina je kodiran dvostrukom cirkularnom mtDNK (~16 kb). Ona nosi informacije za sintezu 13 proteina koji predstavljaju esencijalne subjedinice respiratornog kompleksa I, III, IV i V. Osim toga, mtDNK kodira još 2 rRNK i 22 tRNK potrebne za translaciju mitohondrijalnih proteina (za reference pogledati Scarpulla i sar. 2012; Palikaras i Tavernarakis 2014).

Smatra se da je ključni nivo koordinacije nuklerno-mitohondrijalne transkripcione aktivnosti vremenska koordinacija translacije mitohondrijalnog proteoma u citosolu i mitohondrijama (Couvillion i sar. 2016). Oko 99% od preko 1000 mitohondrijalnih proteina su kodirani nuklearnim genomom i sintetisani u citosolnim ribozomima. Za import proteina kodiranih nuklearnim genomom, zadužena je transportna mašinerija na membrani mitohondrija poznata kao **transduceozomski kompleks**. Ova mašinerija je deo velike mreže koja kontroliše mitohondrijalnu dinamiku i funkciju, kako u fiziološkim, tako i u nefiziološkim uslovima. Njenu osnovu čine translokaze spoljašnje i unutrašnje membrane mitohondrija, TOM (*engl.* translocase of the outer membrane) i TIM (*engl.* translocase of the inner membrane), PAM (*engl.* presequence translocase-associated motor) koji upravlja translokacijom proteina u matriks i peptidaza MPP (*engl.* mitochondrial processing peptidase) koja katališe odvajanje presekvenca. U ostvarivanju ove vrste transporta, tri segmenta unutrašnje mitohondrijalne

membrane se smatraju važnim: IBM (*engl.* inner boundary membrane), CJs (*engl.* cristae junctions) i same kriste (za reference pogledati Pernas i Scorrano 2016). Još uvek se ne može sa sigurnošću reći na koji način CJs povezuju kriste i IBM, ali se smatra da proteinski kompleks poznat kao MICOS (*engl.* mitochondrial contact site and cristae organizing system) može imati ulogu u tome. MICOS je kompleks od više sujednica, ali osnovu čine dve komponente - Mic10 i Mic60. Mic10 čini strukturnu bazu za CJs, dok je Mic60 ključan za ostvarivanje veze između unutrašnje i spoljašnje membrane, pa MICOS može biti organizacioni centar za mitohondrijalnu arhitekturu i biogenezu (za reference pogledati van der Laan i sar. 2016; Wiedemann i Pfanner 2017).

Mitohondrije često prelaze „dug put” da bi se našle na mestu metaboličkih zahteva ćelija. **Kretanje (transport) mitohondrija** i njihova precizna lokacija u ćeliji vezani su za mikrotubule i bazirani na aktivnosti motornih proteina, kinezina i dineina. Dva ključna proteina zadužena za uspostavljanje veze mitohondrija i motornih proteina su **Miro** (*engl.* mitochondrial Rho-GTPase), Ca^{2+} -vezujući protein lokalizovan u OMM, i **Milton** (poznat i kao TRAK), protein „adapter” koji omogućuje kontakt Miro proteina sa motornom subjedinicom kinezina. U ćelijama sisara su zastupljena dva ortologa Milton proteina (TRAK1 i TRAK2), kao i dva sveprisutna ortologa Miro proteina (Miro1 i Miro2). Uloga Miro2 proteina još uvek nije dovoljno istražena. Smatra se da Ca^{2+} ima ključnu ulogu u regulaciji transporta mitohondrija jer utiče na konfiguraciju mitohondrijalnog proteina Miro, kao i da je ovaj vid transporta prevashodno regulisan ekstracelularnim signalima koji modulišu citoplazmatski influx Ca^{2+} (za reference pogledati Niescier i sar. 2013; Melkov i Abdu 2018). Tokom ćelijske deobe, mitohondrije intereaguju sa mikrotubulama i bivaju transportovane prema ćerki ćeliji zahvaljujući interacijama Miro proteina i proteina **Cenp-F** (*engl.* centromeric protein F) povezanog sa citoskeletom. Ćelije lišene Cenp-F ili Miro proteina imaju narušenu mitohondrijalnu mrežu (nejednaku raspodelu mitohondrija) zbog odsustva transporta mitohondrija ka periferiji (Kanfer i sar. 2015).

2.2.1. Glavni molekularni markeri mitohondrijalne biogeneze

Osnova nuklearno-mitohondrijalne transkripcione aktivnosti koja je neophodna za mitohondrijalnu biogenezu je aktiviranje familije **PPARGC1** (*engl.* peroxisome proliferator-activated receptor - γ (PPAR γ) coactivator) tkivno specifičnih transkripcionih koaktivatora. PPAR γ je ligand zavisni nuklearni receptor, koji reguliše ekspresiju velikog

broja gena uključenih u ćelijsku diferencijaciju i održavanje energetskeg balansa ćelije i homeostaze lipida i glukoze. Familiju PPARGC1 koaktivatora čine PPARGC1 α , PPARGC1 β i PRC (*engl.* PGC-1-related coactivator). Njihova ekspresija je indukovana različitim promenama u spoljašnjoj sredini, uključujući promene temperature, manjak nutrijenata, vežbanje, NO i dr. Ciljni geni za transkripcione faktore aktivirane od strane PPARGC1 nalaze se u jedru i važni su za sintezu proteina mitohondrijalnog transducozoma, respiratornog lanca, replikaciju, transkripciju i translaciju mtDNK. Identifikovani su elementi mašinerije zadužene za bidirekcionu transkripciju mtDNK i proteina uključenih u njenu regulaciju kod sisara. Transkripcionu mašineriju mitohondrijalnog genoma čine: mitohondrijalna RNA polimeraza (POLRMT), pomoćni transkripcioni faktor B (mtTFB), mitohondrijalni transkripcioni faktor A (Tfam ili mtTFA), odgovoran za aktivaciju transkripcije, mitohondrijalni faktor elongacije (TEFM) i terminacioni faktor mTERF (TERFM), odgovoran za pravilan završetak ovog procesa (za reference pogledati Scarpulla 2012; Peralta i sar. 2012; Pluomi i sar. 2017). Translacija se najvećim delom odvija na strani IMM okrenutoj ka matriksu mitohondrija, sa kojom su povezani mitohondrijalni ribozomi posredstvom 21S rRNK i proteina Mba1 (AFG3). tRNK i mitohondrijalni faktori inicijacije translacije mIF2 i mIF3 (AIM23) su ključni regulatori translacije transkripata kodiranih mtDNK (za reference pogledati Pluomi i sar. 2017).

PPARGC1 α (*engl.* peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) coactivator α) je originalno identifikovan kao transkripcioni koaktivator čija aktivnost je bila visoko povećana u mrkom masnom tkivu pri izlaganju niskim temperaturama. Zajedno sa PPARGC1 β , dobro je ekspresovan u tkivima velikih energetskeg zahteva: mrko masno, srce i skeletna muskulatura. Takođe je prisutan u većoj meri u mozgu i bubrezima. U prilog činjenici da je ekspresija PPARGC1 α i mitohondrijalnih gena važnih za oksidativnu fosforilaciju u ovim tkivima neophodna, govore rezultati koji upućuju na njihovu smanjenu ekspresiju u uslovima patogeneze i hormonskeg promena (za reference pogledati Scarpulla 2012; Dominy i Puigserver 2013; Ploumi i sar. 2017).

Među najvažnije transkripcione faktore aktivirane od strane PPARGC1 α ubrajaju se: NRF1/NRF2 (*engl.* nuclear respiratory factor 1 and 2), Sp1 (*engl.* stimulatory protein 1), ERR α (*engl.* estrogen-related receptor α) i transkripcioni represor YY1 (*engl.* yin yang 1). Pored njih, važni za ostvarivanje aktivnosti ovog koaktivatora su i ciljni nuklearni receptori: PPAR α (*engl.* peroxisome proliferator-activated receptor- α), PPAR β (*engl.* peroxisome

proliferator-activated receptor- β), receptor za tiroidne hormone, retinoidni receptor, glukokortikoidni receptor, estrogenski receptor, HNF-4 (*engl.* hepatic nuclear factor-4), LXR (*engl.* liver X receptor). Za neke od ovih faktora je pokazano da PPAR γ nije samo njihov koaktivator, već i da pozitivno reguliše njihovu ekspresiju, kao što je ekspresija ERR α . Pored transkripcionih faktora koji regulišu biogenezu novih mitohondrija, PPAR γ reguliše i faktore uključene u regulaciju bioenergetske funkcije mitohondrija, preko stimulacije ekspresije UCP1 (*engl.* uncoupling protein 1) - glavnog regulatora termogeneze, koaktivacijom PPAR γ u mrkom masnom tkivu na niskim temperaturama (za reference pogledati Scarpulla 2012; Dominy i Puigserver 2013; Palikaras i Tavernarakis 2014).

PPARGC1 β je po svojoj molekularnoj strukturi i funkciji sličan PPAR γ , uključujući domene za vezivanje nuklearnih receptora. Takođe aktivira mitohondrijalnu biogenezu, ali je u većoj meri uključen u regulaciju respiracije i smatra se da ova dva faktora možda imaju različitu ulogu u finom regulisanju mitohondrijalnog metabolizma. Njegova ekspresija je detektovana u mnogim tkivima i veruje se da je mnogo šire ekspresovan od drugih članova PPAR γ familije. Zbog široke rasprostranjenosti i nepostojanja podataka o regulaciji na nivou transkripcije i translacije, što je karakteristika mnogih koaktivatora, pripisuju mu se brzi i opšti efekti u tkivu. Kao i PPAR γ , aktivira NRF1 i NRF2 transkripcione faktore (za reference pogledati Scarpulla 2012; Dominy i Puigserver 2013; Ploumi i sar. 2017).

PPARGC1 α i PPAR γ , pored navedenih funkcija, imaju ulogu u aktivaciji enzima za remodelovanje hromatina (enzimi za histonske modifikacije i remodelovanje nukleozoma). Poznato je da PPAR γ ostvaruje fizičku interakciju sa proteinima koji imaju aktivnost histon acetil transferaza što rezultuje stimulacijom ključnog koraka u transkripciji gena - acetilacijom histona i remodelovanjem hromatina čime se povećava pristup transkripcione mašinerije ciljnim genima (za reference pogledati Lin 2009).

TFAM ili mtTFA (mitohondrijalni transkripcioni faktor A) pripada familiji proteina koji sadrže HMG-box (*engl.* high mobility group box) - proteinski domen odgovoran za nespecifično vezivanje DNK. Kao takav ima sposobnost da vezuje, odmotava i savija DNK bez specifičnosti za određene sekvence. Kod sisara, ovaj protein primarno ima ulogu u transkripciji mtDNK. On je, takođe, glavna proteinska komponenta nukleoida, nukleoproteinskih formi u koje je organizovana mtDNK (mitohondrijalni hromozomi), pa na taj način ima ulogu u njenom pakovanju, stabilizaciji i održavanju strukture. Sekvenca koja kodira ovaj protein se nalazi u nuklearnoj DNA i njegova ekspresija je primarno pod

kontrolom NRF1 faktora, ali je pokazano da sadrži i sekvencu koju prepoznaje NRF2. Nakon sinteze, transportuje se u mitohondrije, gde se vezuje za promotorno mesto i interaguje sa POLRMT, čime ubrzava inicijaciju transkripcije. **TFBM ili mtTFB (mitohondrijalni transkripcioni faktor B)** je pomoćni transkripcioni faktor. Poznate su dve izoforme, TFB1M i TFB2M, zadužene za prepoznavanje promotorne sekvence u okviru mtDNK, ali se veruje da funkcionišu i kao metiltransferaze rRNK. Pokazano je da TFB2M ima jači efekat na stimulaciju transkripcije, a da je TFB1M više uključen u metiltransferaznu aktivnost (za reference pogledati Scarpulla 2008; Peralta i sar. 2012).

NRF1 i NRF2 (nuklearni respiratorni faktori 1 i 2) spadaju u grupu transkripcionih faktora koji deluju na nuklearne gene čiji su produkti važni za respiratornu funkciju mitohondrija. Pored toga, kontrolišu ekspresiju ključnih proteina odgovornih za mitohondrijalnu biogenezu, što ukazuje na to da igraju bitnu integrativnu ulogu u nuklearno-mitohondrijalnim interakcijama. Većina ciljnih gena za NRF1 kodira subjediniice respiratornih kompleksa, ali vezujuća mesta za NRF1 su pronađena i na genima za TFAM i TFBM. Vezujuća mesta za NRF1 su pronađena i na genima koji kodiraju proteine biosintetskog puta hema, jonske kanale, proteine transportne mašinerije mitohondrija (za reference pogledati Scarpulla 2008)

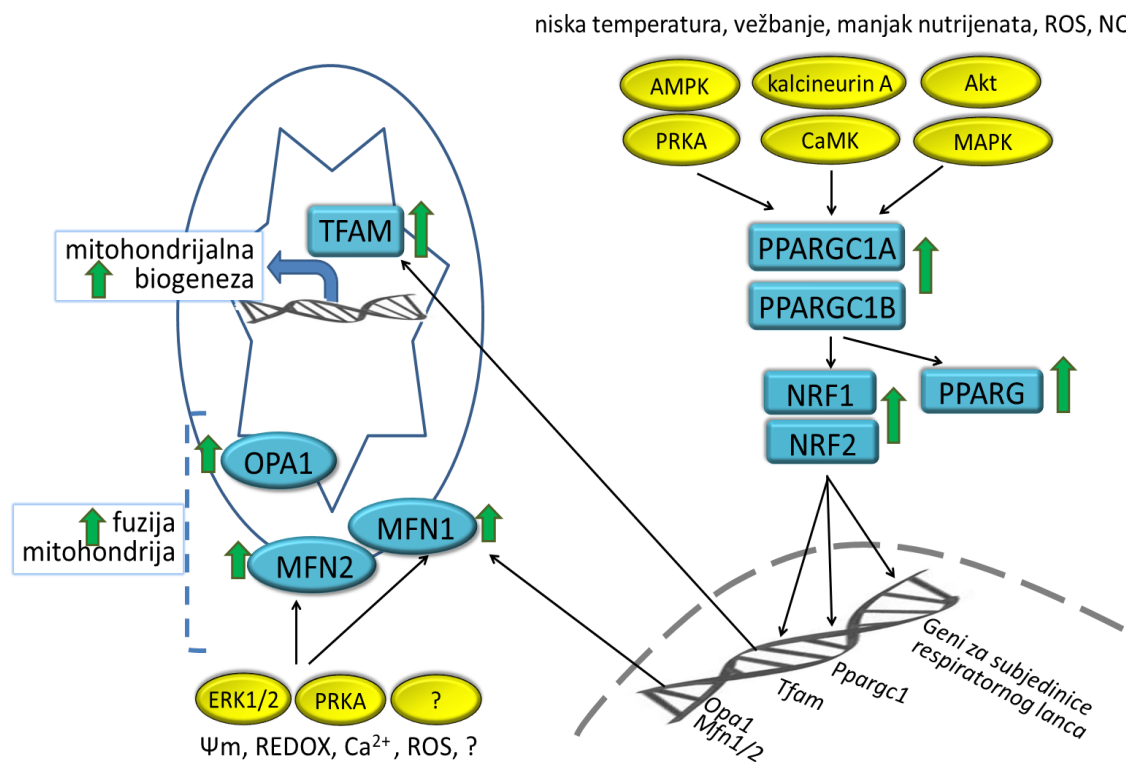
2.2.2. Glavni molekularni markeri mitohondrijalne fuzije/arhitekture

Mitohondrijalna fuzija je process koji se sastoji od dva odvojena, ali sinhronizovana, koraka koji rezultuju spajanjem OMM a potom i IMM. Mitohondrije moraju biti blisko pozicionirane da bi došlo do početka fuzije. To je visoko konzerviran process u svim eukariotskim ćelijama. Smatra se da oko 20% mitohondrijalnih kontakata rezultuje fuzijom i to učestalošću od 1 fuzije na 5-20 minuta po ćeliji. Sam proces traje manje od 2 minuta i omogućuje razmenu informacija - mtDNK, proteini, lipid i metaboliti. Pokazano je da citoskelet ima važnu ulogu za početak mitofuzije koja je usporena depolimerizacijom aktinskih filamenata. Dva molekularna markera i njihova sublokalizacija su odgovorni za ovaj process: MFN1 i MFN2, lokalizovani na OMM i OPA1, lokalizovan na IMM (za reference pogledati Parnas i Scorrano 2016).

MFN1 i MFN2 (engl. mitofusins 1 i 2) pripadaju familiji transmembranskih GTP-aza čija je ekspresija evolutivno konzervirana od kvasaca do čoveka. Sličnost između MFN1 i MFN2 je ~80% i to u okviru strukturnih motiva relevantnih za njihovu funkciju. Esencijalni N-

terminalni domen okrenut ka citosolu poseduje pet motiva i svaki od njih je važan za vezivanje i hidrolizu guanozin trifosfata, GTP-a (*engl.* guanosine triphosphate), a time i za pokretanje fuzije. Takođe, poseduju dva tzv. „coiled-coil” domena, poznata kao HR1 i HR2, kao i C-terminalni domen u OMM. Osim mitofuzije, ovi proteini imaju ulogu u procesima koji su direktno povezani sa energetske stanjem, metabolizmom, apoptozom, kontrolom ćelijske proliferacije i sudbine ćelije, pri čemu je izraženija uloga MFN2 (za reference pogledati Schrepfer i Scorrano 2016).

Pokazano je da nedostatak oba gena, *Mfn1* i *Mfn2*, nema uticaja na vijabilnost i fertilitnost kod heterozigotnih miševa, dok homozigoti nisu preživljavali embrionalni period. Deficit MFN1 i MFN2 menja mitohondrijalnu morfologiju i smanjuje fuziju. Ovi proteini svoju funkciju ostvaruju formirajući tri različita molekularna kompleksa: (1) homooligomera MFN1/MFN1 i MFN2/MFN2 i (2) heterooligomera MFN1/MFN2 (Chen i sar. 2003). Osim mitofuzije, ovi proteini imaju ulogu u procesima koji su direktno povezani sa energetske stanjem, metabolizmom, apoptozom, kontrolom ćelijske proliferacije i sudbine ćelije, pri čemu je izraženija uloga MFN2 (de Brito i Scorrano 2008).



Slika 2.2.1. Karakteristični markeri i regulatori mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u ćelijama sisara.

OPA1 (*engl. optic atrophy*) je mitohondrijalna GTP-aza koja je zadužena je za spajanje IMM tokom fuzije, ali takođe ima ulogu u remodelovanju kristi nezavisno od fuzije IMM. Kod sisara, postoji u više formi, različite molekulske mase, ali je forma od 86 kDa najdominantnija. Pokazalo se da je OPA1 prisutan u međumembranskom prostoru mitohondrija u neposrednoj blizini krista. Prekomerna ekspresija *Opal* gena povećava broj krista i redukuje njihovu širinu (za reference pogledati Parnas i Scorrano 2016).

2.2.3. Najmarkantniji mehanizmi regulacije mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture

Regulacija mitohondrijalne biogeneze. Iako do sada nema mnogo dostupnih saznanja o regulaciji nastanka novih mitohondrija u steroidogenim ćelijama, istraživanja na drugim tipovima tkiva i ćelija ukazuju na različite nive kontrole u ćelijama sisara koji omogućuju ćelijama da koordinišu aktivnost mitohondrijalne mreže u odgovoru na sredinske i fiziološke signale (promene temperature, manjak nutrijenata, vežbanje, oksidativni stress, NO i dr) (za reference pogledati Dominy i Puigserver 2013; Ventura-Clapier i sar. 2017), kao i u zavisnosti od starosti organizma (Madreiter-Sokolowski i sar. 2018). Mitohondrijalna masa i broj se uvećavaju tokom M faze ćelijskog ciklusa, međutim postoje indicije da ovi procesi nisu vezani isključivo za ćelijski ciklus. Stepem odgovora na navedene faktore često zavisi od *de novo* sinteze PPARCG1 proteina. Glavnu ulogu u regulaciji mitohondrijalne funkcije i biogeneze imaju signalni putevi koji regulišu ekspresiju i aktivnost PPARGC1 koji dalje, svojom koaktivatorskom aktivnošću, koordiniše aktivnost specifičnih transkripcionih faktora (Slika 2.2.1).

Među osnovne signalne puteve koji povećavaju ekspresiju i aktivnost PPARGC1 se ubrajaju sledeći: cAMP, AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK), Ca^{2+} , kalcineurin A i kalcijum/kalmodulin zavisna protein kinaza (CaMKK), mTOR (*engl. mechanistic target of rapamycin*) i NO - cGMP signalni put. **cAMP signalni put** je jedna od najdominantnijih signalnih kaskada koje regulišu mitohondrijalnu biogenezu i mitofagiju. Kao što je poznato, povećan unutarćelijski nivo cAMP vodi aktiviranju **PRKA**, a zatim CREB koji reguliše povećanu ekspresiju PPARGC1 α . U tkivima važnim za mitohondrijalnu termogenezu, PPARGC1 aktiviran cAMP signalnim putem, pozitivno reguliše UCP1, kao važan regulator adaptivne termogeneze. Intenzivna fizička aktivnost, koja vodi povećanoj potrebi organizma za energijom, indukuju aktivaciju PPARGC1 α preko MAPK i AMPK. **AMPK** može i

direktno fosforilisati i aktivirati PPARGC1 α . Smatra se da AMPK stimuliše mitohondrijalnu biogenezu i fosforilacijom epigenetskih faktora (Marin i sar. 2016). Kinaze čija je aktivnost povezana sa koncentracijom Ca²⁺, CaMK i p38MAPK, su ključni faktori koji mobilišu transkripcionu mašineriju i povećavaju proliferaciju mitohondrija. **mTOR** može regulisati mitohondrijalnu biogenezu nezavisno od transkripcije, direktnom stimulacijom respiracije, ili regulacijom transkripcije gena važnih za metabolizam masnih kiselina i mitohondrijanu biogenezu (pozitivnom regulacijom aktivnosti YY1). Poznato je da se mitohondrijalna biogeneza aktivira i u odgovoru na ROS i reaktivne vrste azota (retrogradni signaling putevi) preko aktiviranja **protein kinaze B (PKB/Akt)** koja stimuliše transkripcione faktore NRF1 i NRF2 (za reference pogledati Dominy i Puigserver 2013). Pokazano je da je stepen mitohondrijalne biogeneze u uslovima smanjenje produkcije NO (osustva endotelijalne NO sintaze, eNOS) bio značajno redukovano, što ukazuje na važnu ulogu **NO - cGMP** signalnog puta u kontroli mitohondrijalne biogeneze i energetskog balansa uopšte (Nisoli i sar. 2003). Novija istraživanja su potvrdila i ulogu IGF1 signalizacije u stimulaciji ovog procesa (Lyons i sar. 2017).

Sirtuini su grupa molekula važna za regulaciju aktivnost PPARGC1. Oni su po svojoj funkciji NAD-zavisne deacetilaze koje modulišu energetski metabolizam. U skeletenim mišićima, tokom gladovanja, sirtuin 1 (**SIRT1**) deacetiluje/aktivira PPARGC1 α i indukuje ekspresiju mitohondrijalnih gena. SIRT1 takođe aktivira mitofagiju čime sprečava nakupljanje oštećenih mitohondrija. AMPK, povećanjem koncentracije NAD, može stimulisati SIRT1 (za reference pogledati Dominy i Puigserver 2013). Histon-acetil transferaza GCN5 (*engl.* general control non-repressed protein 5) acetiluje PPARGC1 α i supresuje njegovu transkripcionu aktivnost, suprotno SIRT1. Insulin aktivira ciklin D1 - zavisnu kinazu (Cdk4) koja povećava aktivnost GCN5 čime se inhibira PPARGC1 α u regulaciji gena glukoneogeneze (Lee i sar. 2014). Neka od novijih istraživanja su pokazala da je NADPH oksidaza Nox4 (*engl.* NADPH oxidase 4) negativni regulator mitohondrijalne biogeneze i bioenergetike u fibroblastima pluća (Bernard i sar. 2017).

Pored navedenih signalnih puteva i transkripcionih faktora, ukazano je i na značaj epigenetske kontrole glavnih markera mitohondrijalne biogeneze. Nedavno je pokazano da microRNA-494-3p negativno reguliše nivo transkriptata za PGC1 α , TFAM i UCP1 u 3T3-L1 kulturi adipocita (Lemecha i sar. 2018), dok je za microRNA-29 pokazano da je, u

kooperaciji sa PGC1 α , od kritične važnosti za metaboličku kontrolu srčane funkcije (Caravia i sar. 2018).

Regulacija mitohondrijalne fuzije. Poznato je da se mitohondrijalna fuzija može odvijati bez učešća jedra i *de novo* translacije proteina pa se smatra da ima autonomnu regulaciju u odgovoru na specifične signale. Poznato je da povećanje nivoa cAMP-a u ćeliji i aktivacija **PRKA** značajno utiču na morfologiju mitohondrija (Gomes i sar. 2011). Pokazano je i da **ERK** fosforiliše MFN1 u okviru HR1 domena, čime reguliše mitohondrijalnu fuziju i oblik mitohondrija (Pyacurel i sar. 2015). Veruje se da citoplazmatsko okruženje diktira dešavanja vezana za fuziju čime se usklađuje funkcija mitohondrija sa potrebama ćelije. Svi važni faktori za morfologiju i funkciju mitohondrija kao što su **ROS, potencijal mitohondrijalne membrane** (za koji je poznato da je važan faktor za fuziju IMM), **Ca²⁺, respiratorna aktivnost, REDOX** (*engl.* reduction-oxidation) stanje, interakcija sa ER, mogu biti uključeni u regulaciju mitohondrijalne fuzije (za reference pogledati Parnas i Scorrano 2016).

Centralnim mehanizmom koji reguliše fuziju se smatra veza između konformacione **plastičnosti MFN2** i mitohondrijalne dinamike (Franco i sar. 2016). Pokazano je da dinamika mitofuzije u kardiomiocitima zavisi od Ca²⁺ oscilacija, kontraktilne aktivnosti i aktivnosti MFN1 (Eisner i sar. 2017). Novija istraživanja ukazuju na jedan od potencijalnih mehanizama **ubikvitin-zavisne regulacije mitofuzije**, posredovane ubikvitin-selektivnim šaperonom, Cdc48/p97. Smatra se da ovaj protein preko kaskade događaja vezanih za ubikvitinaciju, reguliše ubikvitinaciju Fzo1 (modulišući funkciju E3 ligaze i deubikvinaza, DUB, Ubp2 i 12) čime uspostavlja balans između aktivacije i represije fuzije, s obzirom na to da deubikvitinaza Ubp12 sprečava mitofuziju, dok je Ubp2 stimuliše preko regulacije ubikvitinacije mitofuzina (Simoes i sar. 2018). Poznato je da je važan nivo regulacije mitofuzije i arhitekture mitohondrija **regulacija aktivnosti OPA1 proteolitičkim delovanjem peptidaza u IMM**. Na ovaj način se održava balans između duge i kratke forme ovog proteina, tj. katalizuje nastanak S-OPA1 (*engl.* small OPA1) od L-OPA1 (*engl.* long OPA1) u matriksu (Ban i sar. 2017). Prvobitno su identifikovane dve peptidaze ove vrste: m-AAA (*engl.* adenosine triphosphate (ATP)-dependent matrix AAA) i AFG3L1 i 2 (*engl.* ATPase family member 3-like 1). Potvrđeno je i postojanje peptidaze nezavisne od ATP-a, poznate kao OMA1, koja katalizuje procesovanje OPA1 kada je aktivnost mitohondrija narušena usled pada potencijala mitohondrijalne membrane i poremećene sinteze ATP-a (Ehses i sar. 2009). Pretpostavlja se da S-OPA1, koji nastaje delovanjem navedenih

peptidaza, direktno uzrokuje fisiju IMM u uslovima narušene funkcionalnosti mitohondrija, kao i da stimuliše fisionu mašineriju na OMM (MacVicar i Langer 2016). Takođe, pokazano je da OPA1 ima sposobnost iniciranja fuzije dva lipozoma u IMM vezivanjem za jedan od njih i dalje preko interakcije sa fosfolipidom kardiolipinom na drugom (Liu i Chan 2017).

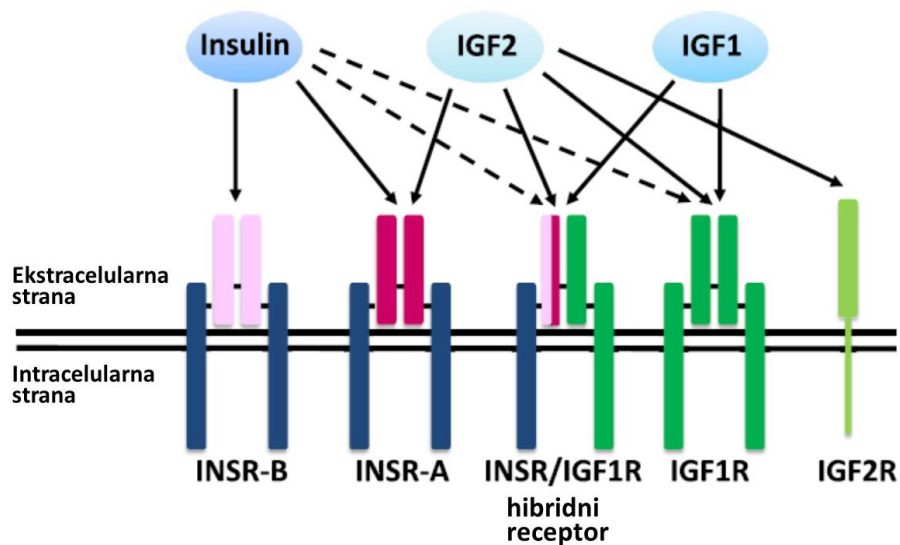
2.3. Receptori za članove familije insulinu sličnih faktora rasta

Iako u literaturi postoji više podela, smatra se da familiju insulinu sličnih faktora rasta u osnovi čine: insulin, dva faktora rasta IGF1 (*engl.* insulin growth factor 1) i IGF2 (*engl.* insulin growth factor 2), najmanje šest IGF - vezujućih proteina, IGFBP1 do 6 (*engl.* insulin growth factor binding protein 1 - 6) i više IGFBP proteinaza.

Insulin, IGF1 i IGF2 pripadaju familiji hormona peptidne strukture. Insulin je dimer A i B polipeptidnog lanca koji su povezani disulfidnim vezama, produkovan od strane β ćelija Langerhans-ovih ostrva pankreasa. Nastaje proteolitičkom obradom jednolančanih polipeptidnih prekursorskih formi: pre-proinsulin i proinsulina. Reguliše metabolizam ugljenih hidrata, masti i proteina promovišući apsorpciju ugljenih hidrata, naročito glukoze iz krvi u jetru, masno tkivo i ćelije skeletnih mišića. IGF1 i IGF2 su jednolanačani polipeptidi (oko 7,5 kDa) slični proinsulinu. Najveći deo IGF1 se produkuje u jetri pod kontrolom GH (*engl.* growth hormone), dok je ostatak produkovan u kostima, mioblastima, prekursorima eritrocita, ovarijumima, bubrezima i centralnom nervnom sistemu delimično pod kontrolom GH, a delimično pod kontrolom tkivno specifičnih parakrinih faktora. Deluje kao autokrini/parakrini faktor rasta, ali se smatra i endokrinim faktorom, tj. deluje i kao klasični hormon (za reference pogledati LeRoith i sar. 1995). Kao takav nalazi se u cirkulaciji gde je čak 99% ovog peptida vezano za transportne/vezujuće protein IGFBP (od kojih je najznačajniji IGFBP3) koji imaju važnu ulogu u transportu IGF faktora u različita tkiva i ekstravaskularni prostor (za reference pogledati Firth i Baxter 2002). Kod glodara, IGF1 ostvaruje svoje funkcije tokom embrionalnog i postnatalnog razvoja, dok je IGF2 predominantno značajan u toku embrionalnog razvoja (Baker i sar. 1993).

Familija insulinu sličnih faktora rasta svoje efekte ostvaruje vezivanjem za insulinski receptor (INSR) ili IGF1 receptor (IGF1R) na ciljnim ćelijama. Ovi receptori pripadaju grupi receptora sa intracelularnom tirozin-kinaznom aktivnošću. Postoje dve izoforme INSR, A i B, pri čemu je izoforma A predominantno ekspresovana tokom fetalnog, a B tokom

postnatalnog života. INSR i IGF1R su strukturno slični, heterotetramerni glikoproteini sa dve α (ekstracelularne) i dve β (transmembranske) subjedinice povezane disulfidnim mostovima. Oba receptora pokazuju visok stepen homologije (84% u tirozin-kinaznom domenu, 45% - 65% ligand - vezujućem domenu i preko 50% u sveukupnom aminokiselinskom sastavu) (za reference pogledati Sarfstein i Werner 2013). Primarno, insulin se vezuje za INSR, IGF1 za IGF1R, dok IGF2 svoje efekte ostvaruje preko IGF1R ili izoforme A INSR. Međutim, kompleksnosti insulin/IGF signalizacije doprinosi formiranje hibridnih receptora (Slika 2.3.1), tj. dimera subjedinica INSR i IGF1R - hemireceptora sa različitim afinitetom za insulin, IGF1 ili IGF2 (Griffeth i sar. 2014). Pokazano je da se IGF2 može vezivati za katjon-nezavistan manozna-6-fosfat/IGF2 receptor, M6P/IGF2R (*engl.* cation-independent mannose-6-phosphate/IGF2 receptor), ali ova forma nema aktivnost tirozin kinaze i pretpostavlja se da služi kao mehanizam za prepoznavanje cirkulišućeg IGF2, obeležavanje za degradaciju i regulisanje njegovog nivoa u organizmu (Ghosh i sar. 2003).



Slika 2.3.1. Različite forme receptora za insulin i IGF1 i 2.

Preuzeto iz Griffeth i sar. 2014, uz manje modifikacije.

Iako INSR i IGF1R imaju uglavnom zajedničke citoplazmatske medijatore, brojne eksperimentalne i kliničke studije ukazuju na to da aktivacija INSR predominantno rezultuje metaboličkim aktivnostima, dok aktivacija IGF1R vodi proliferaciji i diferencijaciji. Vizivanje liganada za α subjedinicu receptora vodi konformacionim promenama β subjedinice i aktivaciji samog receptora. Aktivirani receptori fosforilišu nekoliko supstrata, uključujući IRSs (*engl.* including insulin receptor substrates) i SHC (*engl.* Src homology collagen). Fosfotirozinske rezidue u ovim supstratima bivaju prepoznate od strane specifičnih

signalnih molekula koje sadrže SH2 (*engl.* Src homology 2) domen, a to su regulatorna subjedinica PI3K (*engl.* phosphatidylinositol 3-kinase), GRB2 (*engl.* growth factor receptor-bound 2) i SHP2/Syp (*engl.* SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2). Ovi događaju dalje mogu voditi aktiviranju dva signalna puta, PI₃K ili Ras/MAPK, koji dalje posreduju niz bioaktivnosti ovih faktora rasta (za reference pogledati Sarfstein i Werner 2013).

Pored aktiviranja navedenih signalnih puteva, istraživanja su pokazala da INSR nakon internalizacije, ima sposobnost translokacije u jedro (Podlecki i sar. 1987). Nešto kasnije, isto je pokazano i za IGF1R (Chen i sar. 1996). Smatra se da proteozomski, endocitotski i lizozomski putevi koji su uključeni u degradaciju ovih receptora imaju ulogu i u ovoj translokaciji. Pretpostavlja se da je važan preduslov za to njihova aktivacija u ligand-zavisnom maniru. Poznato je da se INSR i IGF1R mogu vezivati u regionu pojačivača gena kao transkripcioni aktivatori. Takođe, pokazano je da se IGF1R može vezivati za transkripcioni faktor LEF1 (*engl.* lymphoid enhancer-binding factor 1) koji je i jedan od ključnih regulatora polne determinacije. Do sada je pokazano da se na ovaj način regulišu geni za ciklin D, kao i za sam IGF1 (za reference pogledati Sarfstein i Werner 2013).

2.3.1. Uloga insulina/IGF1 i njihovih receptora u razvoju i funkciji testisa

Poznato je da familija insulinu sličnih faktora ima ključnu ulogu u determinaciji pola i razvoju gonada, kako tokom prenatalnog, tako i u postnatalnom životu. Receptori za ove faktore rasta prisutni su na hipofiznim gonadotropima, ali i na testikularnim Leydig-ovim i Sertoli-jevim ćelijama (Andreassen i sar. 2013). Brojna istraživanja zasnovana na modelima funkcionalne genomike kod miševa dobijenih pomoću Cre-LoxP sistema su dala procenu uloge receptora, liganda i signalnih molekula insulin/IGF1 signalnog puta i obezbedila više informacija koje potvrđuju nezaobilaznu ulogu ovog signalnog puta u različitim aspektima razvoja testisa i njihove funkcije tokom prenatalnog i postnatalnog razvoja. Poznato je da XY embrioni miševa sa delecijom receptora za insulin (*Insr*, *Insr*, *Igf1r*) razvijaju ovarijume, tj. dolazi do potpune konverzije pola (Nef i sar. 2003). Kod embriona miševa kojima nedostaju INSR i IGF1R redukovana je proliferacija somatskih progenitornih ćelija u gonadama oba pola (XX i XY) pre početka polne determinacije (Pitetti i sar. 2013b). Takođe, IGF1 je važan faktor koji reguliše delovanje FSH, broj Sertoli-jevih ćelija i veličinu testisa (Griffeth i sar. 2014). Miševi sa konstitutivnom delecijom *Igf1* gena su infertilne jedinke, manje telesne mase i sa 80% manjom produkcijom spermatozoida i testosterona u poređenju sa kontrolnim

životinjama (Baker i sar. 1996). Pored navedenih efekata, potvrđeno je da IGF1 smanjuje stepen apoptoze Leydig-ovih ćelija (Colon i sar. 2007).

Uloga IGF1 faktora rasta potvrđena je i na nivou regulacije steroidogeneze. Mehanizam delovanja IGF1 na steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama nije u potpunosti poznat, ali se zna da uključuje više signalnih puteva: MAPK/ERK1/2, PRKA i PRKC. Kao važni transkripcioni faktori u ovom procesu izdvajaju se CREB i ATF1 (aktivirajući transkripcioni factor 1) i cJun/JunD (za reference pogledati Stocco i sar. 2005). Nekoliko istraživanja je pokazalo da kinaze uključene u signalne puteve od INSR/IGF1R signalni put imaju važnu ulogu u regulaciji steroidogeneze Leydig-ovih ćelija. ERK1/2 je uključena u akutnu regulaciju hCG-om stimulisnu steroidogenu ILCs (Martinelle i sar. 2004). IGF1, i komponente signalizacije koju aktivira, reguliše ekspresiju StAR proteina u Leydig-ovim ćelijama miševa (Manna i sar. 2006). Molekularni mehanizmi Signalni put MEK (*engl.* mitogen-activated protein kinase kinase) i ERK imaju kritičnu ulogu u regulaciji funkcioonalnosti ALCs (Yamashita i sar. 2011). MEK1/2 pozitivno reguliše ekspresiju *Star*, *Hsd3b6*, *Cyp17a1* i *Hsd17b3* (Matzkin i sar. 2013).

Navedena istraživanja ukazuju na ulogu insulinske/IGF1 signalizacije u razvoju testisa, regulaciji steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama, kao i na neke aspekte mitohondrijalne dinamike, morfologiju i funkciju ovih organela. Međutim, sva dosadašnja istraživanja su zasnovana na *in vitro* istraživanjima ili *in vivo* istraživanjima na miševima sa konstitutivnom delecijom *Igf1*, *Insr* i/ili *Igf1r*. Zbog nedostataka ovih modela, uloga i mehanizmi delovanja INSR i IGF1R u regulaciji steroidogeneze i mitohondrijalne biogeneze/fuzije u Leydig-ovim ćelijama tokom postnatalnog razvoja u velikoj meri je nerazjašnjena.

3. Ciljevi istraživanja

Opšti cilj istraživanja ove disertacije je da okarakteriše *in vivo* ulogu INSR i IGF1R u regulaciji steroidogene funkcije i mitohondrijalne biogeneze/fuzije u Leydig-ovim ćelijama. U skladu sa opštim ciljem, postavljeni su specifični ciljevi ovog istraživanja:

(1) Okarakterisati ulogu INSR i IGF1R u regulaciji steroidogene funkcije Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa. Praćeni su:

- Nivo androgena u cirkulaciji.
- Steroidogeni kapacitet Leydig-ovih ćelija (nivo *ex vivo* produkovanih androgena u odgovoru na stimulaciju sa hCG).
- Steroidogena aktivnost Leydig-ovih ćelija (nivo *ex vivo* produkovanih androgena u prisustvu steroidnih supstrata).
- Nivo cAMP, glavnog signalnog molekula koji inicira steroidogenezu Leydig-ovih ćelija.
- Relativna ekspresija transkripata za elemente steroidogene mašinerije u Leydig-ovim ćelijama.
- Relativna ekspresija transkripata za signalne molekule uključene u regulaciju ili modulaciju regulacije steroidogeneze Leydig-ovih ćelija.

(2) Okarakterisati ulogu INSR i IGF1R u diferencijaciji sudbine Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa. Praćeni su:

- Relativna ekspresija transkripata za neke od markera diferencijacije i regeneracije ćelija (*Pdgfr1*, *Tsp1*, *Pcna*, *Lef1*) u Leydig-ovim ćelijama.
- Morfologija progenitorne populacije Leydig-ovih ćelija P21 miševa.

(3) Okarakterisati ulogu INSR i IGF1R u ekspresiji molekularnih markera diferencijacije pola u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa. Praćeni su:

- Relativna ekspresija transkripata za glavne molekularne markere razvoja ženskog i muškog pola u Leydig-ovim ćelijama, seminifernim tubulama i testisima.
- Relativna ekspresija transkripta za aromatazu (enzim koji konvertuje androgene u estrogene), kao i *in vitro* aktivnost aromataze u Leydig-ovim ćelijama.

(4) Okarakterisati ulogu INSR i IGF1R u regulaciji mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa, kao i definisati potencijalne razlike između polova. Praćeni su:

- Relativna ekspresija transkripata za glavne molekularne markere mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u Leydig-ovim ćelijama i ovarijumima.
- Broj i morfologija mitohondrija u Leydig-ovim ćelijama.
- Mitohondrijalna faza steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama (produkcija progesterona i ekspresija gena za proteine uključene u transport holesterola i steroidogene enzime, sa posebnim akcentom na one lokalizovane u mitohondrijama).

(5) Okarakterisati ulogu INSR i IGF1R u regulaciji ekspresije glavnih komponenti signalnog puta od INSR i IGF1R u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa. Praćeni su:

- Relativna proteinska ekspresija kinaza - glavnih medijatora signalizacije od INSR/IGF1R, koje su uključene i u regulaciju steroidogeneze, mitohondrijalne biogeneze i fuzije u Leydig-ovim ćelijama.

Kao model funkcionalne genomike korišćeni su prepubertalni (P21) i adultni (P80) miševi sa kondicionalnom delecijom *Insr* i *Igflr* gena u steroidogenim tkivima.

4. Materijal i metode

Svi eksperimenti su izvedeni u Laboratoriji za reproduktivnu endokrinologiju i signalizaciju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu (<http://www.dbe.uns.ac.rs/en/nauka-eng/lares>). Eksperimenti su odobreni od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu, broj I-2011-02, i izvedeni u skladu sa uputstvom o gajenju, čuvanju i upotrebi laboratorijskih životinja Nacionalnih instituta za zdravlje u USA (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; NIH Publications No. 80 23, revised 1996, 7th edition, <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats>).

4.1. Hemikalije

Hemikalije za genotipizaciju. Direct PCR (Tail) Lysis Reagent, pufer pomoću kog je lizirano tkivo i oslobođana genomska DNK, proizvod je Viagen Biotech Inc (Los Angeles, California, USA). Proteinaza K, liofilizovani prah koncentracije 30U/mg, kupljena je od Promega-e (Madison, USA), dok je za klasični PCR korišćen miks sa dodatkom boje za lodiranje, Platinum® Blue PCR SuperMix proizvođača Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Agaroz visokog procenta čistoće (#16550-100) i etidijum bromid (#15585-011, 10mg/ml) su takođe nabavljeni od Invitrogen-a.

Hemikalije za izolaciju Leydig-ovih ćelija. Medijum 199 za ćelijsku kulturu (M199, #M0393, sa Henksovim solima, L-glutaminom bez natrijum bikarbonata, u formi praha), medijum DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose, #D5648) sa 4500 mg/L glukoze i L-glutaminom, HEPES (#H3375, ≥99.5%), BSA (>96%, #A9647), enzim kolagenaza (Collagenase type I, #SCR103) izolovana iz *Clostridium histolyticum*, Percoll (#P4937) pH 8.5-9.5 (25 °C) kupljeni su od Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Tripan Blue Stain 0,4% (#17-942E) nabavljen je od LONZA BioWhittaker (Walkersville, MD USA).

Hemikalije za imunocitohemijske analize i NBT test. Za imunocitohemijske analize korišćen je etanol (Zorka Farm, Šabac, Srbija), dietil etar (Centrohema d.o.o, Srbija, #60-29-7) i ksilen - mešavina izoformi (Sigma Aldrich, #33871). Triton (Triton™ X-100, #T8787) i BSA (>96%, #A9647) su takođe proizvodi Sigma Aldrich. Paraformaldehid je nabavljen od proizvođača Merk-Chemicals (Merk Millipore), cat.br. #30525-89-4. Primarno antitelo za 3BHSD dobijeno je ljubaznošću Prof. dr J. Ian Masona sa Univerziteta u Edinburgu. Ostale

neophodne komponente su sastavni deo Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB kompleta za imunološke analize (#TL-015-QHD), proizvođača Thermo Scientific (Waltham, MA USA). B-nikotinamid adenin dinukleotid, čistoće 98% (#N-7004), kao i Nitrotetrazolium plavo (#N6876-50MG) kupljeni su od kompanije Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

Hemikalije za merenje koncentracije hormona. Za merenje nivoa testosteroe u serumu, ćelijskom medijumu i tkivnom ekstraktu korišćen je anti-testosteron serum (№250), dok je za merenje progesterone korišćen anti-progesteron serum (1,2,6,73H(N))-testosteron kupljeni od Perkin-Elmer Life Sciences (www.perkinelmer.com). Dekstran T-70 je nabavljen od Pharmacia (www.pfizer.com), a aktivni ugalj Norit A od kompanije Serva (www.serva.de). *Estradiol Parameter Assay Kit* (#KGE014), proizvođača RnD Systems (Minneapolis MNN, USA) korišćen je za merenje koncentracije estradiola u ćelijskom medijumu.

Hemikalije za izolaciju i merenje cikličnog adenozin monofosfata. 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, ≥99% (HPLC), powder, #I5879) kupljen je od Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), dok je komercijalni komplet za merenje koncentracije cikličnog adenozin monofosfata, cAMP (#581001) proizvod Cyman Chemical (Michigan, USA).

Hemikalije za izolaciju RNK, pravljenje cDNK i RQ-PCR. *RNAqueous-4PCR Total RNA Isolation Kit* je (AM1914) proizvod kompanije Ambion / ThermoFisher Scientific (Waltham, MA USA), *RNeasy Mini Kit* (#74104) kompanije Qiagen (Hilden, Germany), a *GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit* (# RTN70-1KT) kompanije Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (#4368814), kao i *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (#4367659) su kupljeni od kompanije Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific (Waltham, MA USA). Prajmeri za klasični i RQ-PCR su sintetisani od strane Invitrogen-a.

Hemikalije za izolaciju protein, merenje njihove koncentracije, SDS-PAGE elektroforezu i wester blot analizu. Etilendiamintetrasirćetna kiselina - EDTA (#EDS-100G), deterdžent za denaturaciju ćelijskih membrane Niaproof 4 Type 4 (#N1404), Acrylamide/N'N'-bis-methylene-acrylamide (#A3699), Sodium dodecyl sulfate - SDS (#L3771), Tris-HCl (#857645), ammonium persulfate (#A3678), glicin (#G8898), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine-TEMED (#T9281), TWEEN® 20 (#P5927) su nabavljeni od Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). PageRuler Prestained Protein Ladder, marker za SDS-PAGE elektroforezu (#26616), kao i supstrati za detekciju interakcije antigena i antitela,

Super Signal™ West Femto Maximal Sensitivity Substrate (#34095) i SuperSignal™ West Dura Chemiluminescent Substrate (#34075), nabavljeni su od Thermo Fisher Scientific-a. DTT-ditiotritol (#856126) i inhibitori proteinaza AEBSF (#193503) su proizvod MP Biomedicals LCC, dok je aprotinin (#613698) proizvod Calbiochem, a leupeptin (#151553) ICN Biomedicals. Inhibitor fosfataza, PhosSTOP easy pack, je nabavljen od kompanije Roche (Basel, Switzerland).

Sve metode su prethodno opisane i verifikovane od strane naučne javnosti (za reference videti Gak/Radović i sar. 2015).

4.2. Eksperimentalne životinje

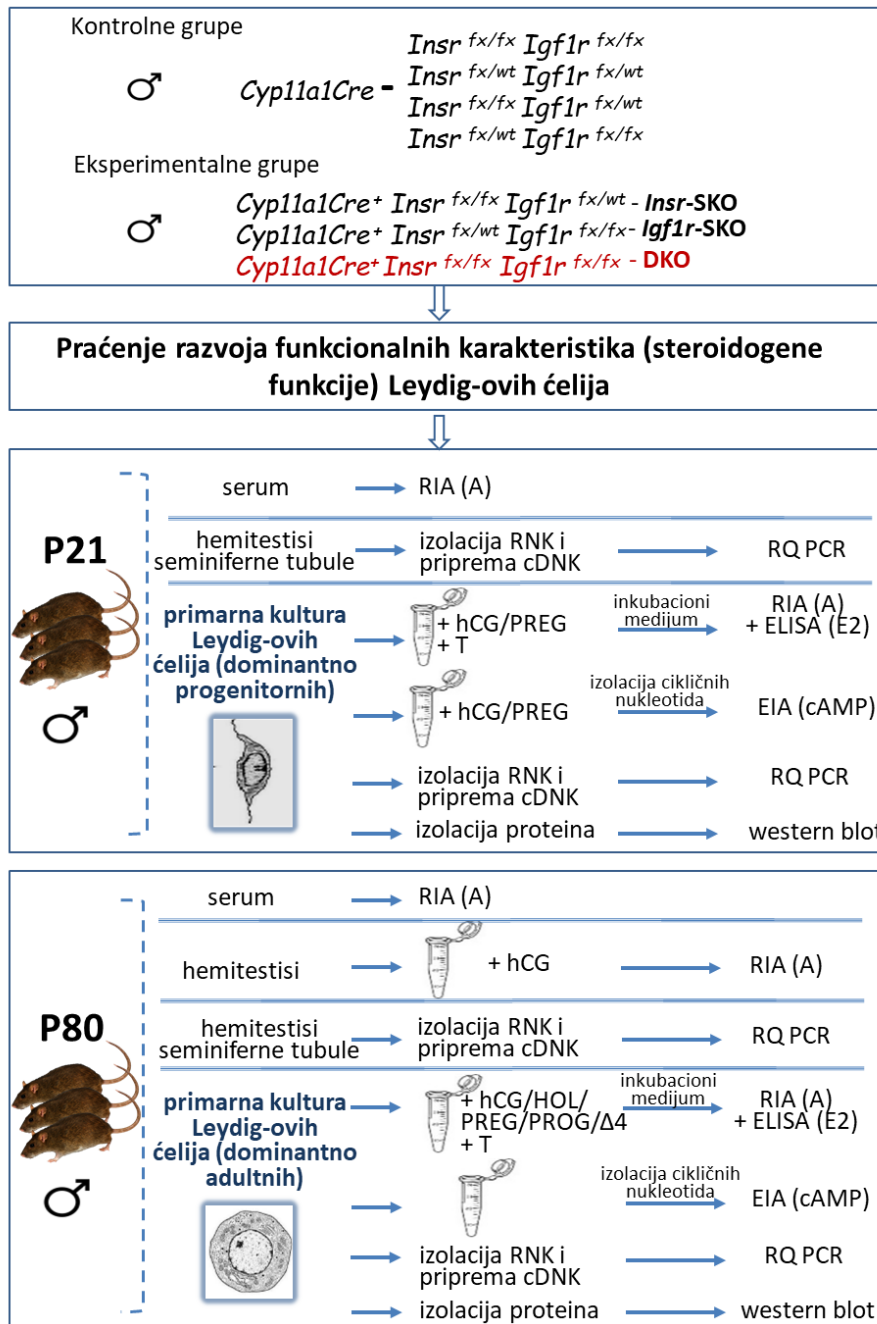
Svi eksperimenti su urađeni na C57BL/6J tzv. knockout miševima sa kondicionalnom delecijom gena za *Insr* i/ili *Igf1r* u steroidogenim tkivima. Miševi su obezbeđeni u okviru SCOPES projekta Švajcarske nacionalne fondacije (2009-2012, #IZ73Z0-128070), a nastali su u Laboratoriji prof. dr Serđa Nefa (Departman za genetičku medicinu i razvoj, Univerzitet u Ženevi, Švajcarska; <https://www.unige.ch/medecine/nef/>).

Životinje su gajene u kontrolisanim laboratorijskim uslovima sa fotoperiodom od 12h svetlosti i 12h mraka i temperaturom $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, u skladu sa pravilima Nacionalnih instituta za zdravlje u USA (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; NIH Publications No. 80 23, revised 1996, 7th edition) i prema propisima Nacionalnog Saveta za dobrobiti životinja i Nacionalnom zakonu o dobrobiti životinja (copyright mart 2009), uz odobrenje Etičke komisije za zaštitu oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu (broj odobrenja etičke komisije: I-2010-01). Miševi su obeležavani 21. postnatalnog dana (P21) metodom bušenja ušiju. Masa životinja je merena neposredno pre žrtvovanja. Žrtvovanje je vršeno dekapitovanjem bez anestezije. Individualni uzorci seruma su pripremani centrifugiranjem telesne krvi 15 min/700xg/4°C i čuvani na -70°C do merenja hormona.

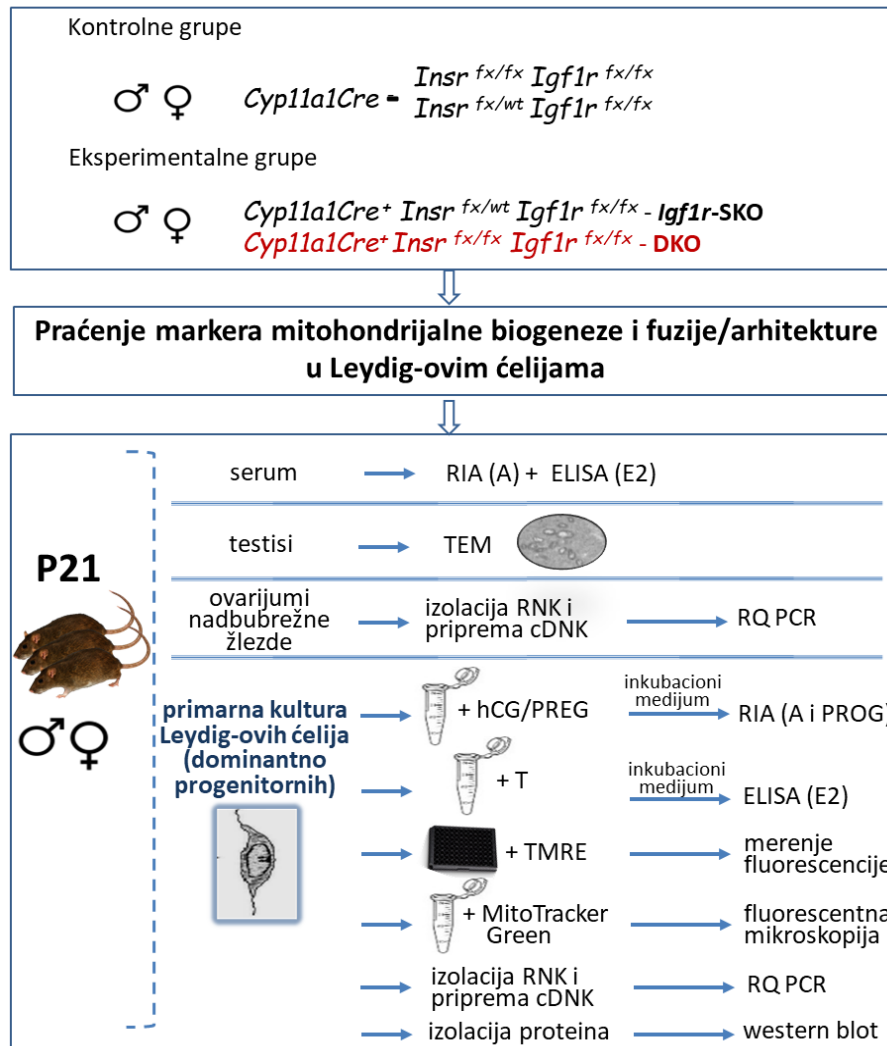
Eksperimentalni model – kondicionalna delecija *Insr* i *Igf1r* Cre-loxP tehnologijom. Kao eksperimentalni model funkcionalne genomike korišćeni su tzv. knockout miševi dobijeni Cre-loxP tehnologijom (Neirijnck i sar. 2018). Miševi koji imaju loxP sekvence vezane sa genima za *Insr* i *Igf1r* su napravljeni od strane R. Kahn, A. Efstratiadis, K.L. Parker, dok su miševi kod kojih je sekvenca za enzim CRE rekombinazu povezana sa enzimom *Cyp11a1*

(eng. Cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scc}) obezbeđeni od strane Meng-Chun Hu (Liu i sar. 1993; Taniguchi i sar. 2006; Wu i sar. 2007). Ukrštanjem ova dva soja dobijeni su tzv. knockout miševi sa kondicionalnom delecijom gena za *Insr* i/ili *Igf1r* u steroidogenim tkivima. Preciznije, da bi se pratili svi genotipovi, odnosno sve transgene kombinacije, miševa u čijem genomu su prisutni geni za *Insr* i *Igf1r* sa loxP sekvencama (floksirani geni) su ukrštane sa transgenim miševima koji u svom genomu ekspresuju Cre rekombinazu pod kontrolom promotora za *Cyp11a1* i istovremeno su heterozigoti za *Insr* i *Igf1r*, što znači da poseduju tzv. wild type (neizmenjeni alel) i floksirane alele za oba gena. Ukrštanjem ovih životinja, dobijeni su sledeći genotipovi: (1) kontrolna grupa – miševi koji su imali normalno funkcionalne INSR i IGF1R (*Cyp11a1Cre*^{-/-} *Insr*^{wt/fx} *Igf1r*^{fx/fx}, *Cyp11a1Cre*^{-/-} *Insr*^{fx/fx} *Igf1r*^{wt/fx} i *Cyp11a1Cre*^{-/-} *Insr*^{fx/fx} *Igf1r*^{fx/fx}); (2) SKO-*Insr* grupa - tzv. single knockout miševi sa delecijom *Insr* (*Cyp11a1Cre*⁺ *Insr*^{fx/fx} *Igf1r*^{wt/fx}), (3) SKO-*Igf1r* grupa - tzv. single knockout miševi sa delecijom *Igf1r* (*Cyp11a1Cre*⁺ *Insr*^{wt/fx} *Igf1r*^{fx/fx}), (4) DKO grupa - tzv. double knockout miševi sa delecijom *Insr* i *Igf1r* (*Cyp11a1Cre*⁺ *Insr*^{fx/fx} *Igf1r*^{fx/fx}).

Sve analize su urađene na dve uzrasne kategorije ovih miševa: miševima starosti 21 dan (21. postnatalni dan, P21) i 80 dana (80. postnatalni dan, P80) da bi se odgovorilo na postavljene ciljeve u ispitivanju steroidogene funkcije (Slika 4.2.1) Leydig-ovih ćelija ove dve uzrasne kategorije, kao i mitohondrijalne biogeneze (Slika 4.2.2) Leydig-ovih ćelija uzrasne kategorije P21.



Slika 4.2.1. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna za ispitivanje razvoja funkcionalnih karakteristika Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa.



Slika 4.2.2. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna za ispitivanje mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture Leydig-ovih ćelija P21 miševa.

4.3. Genotipizacija miševa – klasični PCR i agarozna gel elektroforeza

Tkivo za genotipizaciju je uzimano tokom obeležavanja miševa, a sama genotipizacija je rađena klasičnom lančanom reakcijom polimeraze (PCR) sa specifičnim prajmerima za Cre recombinazu, *Insr* i *Igf1r* (Pitetti i sar. 2013a, 2013b).

Genomska DNK je dobijena liziranjem komadića tkiva uha (veličine oko 1mm). Tkivo je lizirano pomoću *Direct PCR (Tail) Lysis reagensa* (Viagen Biotech Inc) u prisustvu 0.2 mg/ml liofilizovane *proteinaze K* (Promega). Liziranje je vršeno tokom noći na 56°C/500 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf). Reaktivnost *proteinaze K* zaustavljena je zagrevanjem uzoraka na 85°C/500 rpm tokom 45 min.

Klasična PCR metoda je rađena pomoću komercijalnog kompleta, *Ready Platinum® Blue PCR Super Mix* (Promega), koji sadrži sve komponente neophodne za PCR reakciju osim prajmera, prema uputstvu proizvođača (www.thermofisher.com). Karakteristike prajmera specifičnih za region X hromozoma koji determiniše pol, Cre rekombinazu, *Igflr* i *Insr* se nalaze u Tabeli 4.3.1. PCR reakcije su izvođene u aparatu Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) prema sledećem programu: (1) 94 °C/4 min; (2) 94 °C/ 30 sec; (3) 60 °C/ 30 sec (-1 °C/ pociklusu); (4) 67 °C/ 1 min; (5) 10 puta koraci od 2 do 4; (6) 94 °C/ 30 sec; (7) 52°C/ 30 sec;(8) 67 °C/ 1 min (+1 °C/ ciklusu); (9) 30x ponavljanje koraka 6 do 8; (10) 67 °C/ 5 min; (11) 4°C. PCR produkti su razdvajani horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu sa 0.5 µg/ml etidium-bromida za vizualizaciju, u 1xTAE puferu pri naponu od 100 V/1 h. Vizualizacija produkata je vršena pod UV svetlom u aparatu za slikanje gelova *myECL™ Imager* (ThermoFisher Scientific). Da bi se potvrdilo prisustvo Cre rekombinaze u samim Leydig-ovim ćelijama, genomska DNK je izolovana iz primarne ćelijske culture (25000 ćelija). Dalji postupak je bio isti kao tokom genotipizacije tkiva.

Tabela 4.3.1. Sekvence prajmera korišćenih za genotipizaciju tkiva i Leydig-ovih ćelija.

| Gen | Pristupni kod | Sekvenca prajmera | Dužina prajmera | Veličina produkta |
|------------------------------|--|--|-------------------------|---|
| <i>Sex</i> | NC_000086.7 | F: 5'-GATGATTTGAGTGGAAATGTGAGGTA -3' R: 5'-CTTATGTTTATAGGCATGCACCATGTA -3' | 26 bp 27 bp | muški alel 300 bp ženski alel 400 i 500 bp |
| <i>Insr</i> | NC_000074.6 | F: 5'-CTGAATAGCTGAGACCACAG -3' R: 5'-CACACACACACGCCTACAC -3' R: 5'-TCTCCCTACACCCACTCACA -3' | 20bp 19 bp 20 bp | wt alel 300 bp flox alel 450 bp Δ alel 250 bp |
| <i>Igflr</i> | NC_000073.6 | F: 5'-TGAGACGCGAGATTGCTGTA -3' F: 5'-CTTCCCAGCTTGCTACTCTAGG -3' R: 5-CAGGCTTGCAATGAGACATGGG-3' | 20 bp 22 bp 22 bp | wt alel 200 bp flox alel 240 bp Δ alel 280 bp |
| <i>Cyp11a1</i> <i>Cre</i> | Hu-Shui i sar., Genesis 2007; 45:59-65 | F: 5'-GGAGGAAGGACGTGAACAT -3' R: 5'-TCTGCACACAGACAGGAGCAT -3' | 19 bp 21 bp | 318 bp |

Prajmeri su dizajnirani u Laboratoriji za molekularnu i biologiju razvoja pola prof. Serđa Nefa (Departman za genetičku medicinu i razvoj, Univerzitet u Ženevi, Švajcarska, <http://www.unige.ch/medecine/nef/>). Za reference pogledati Pitetti i sar. 2009, 2013a, 2013b. F - direktni prajmer (*engl.* forward); R - reverzni prajmer (*engl.* reverse).

4.4. Ekstrakcija steroida iz tkiva testisa

Da bi se izmerila koncentracija polnih hormona u samim testisima, vršena je ekstrakcija steroida iz tkiva testisa (Stojkov i sar. 2013). Tkivo je najpre izmereno, a zatim mehanički homogenizovano u 1xPBS puferu (u odnosu 1:1 w/v; 1 mg tkiva:1 μ l pufera) u tubicama od 1,5 ml (Spectar, Čačak). Ekstrahovanje steroida rađeno je pomoću dietil etra kao organskog rastvarača. Određena zapremina homogenata je mešana sa 4 puta većom zapreminom dietil etra (1:4 v/v), izmešana pomoću vorteksa 30 sec i zamrznuta u suvom ledu. Donja faza se zamrzava u suvom ledu, dok gornja rastvorena u dietil etru ostaje tečna i preliva se u novu tubicu. Ovaj postupak je ponovljen tri puta. Nakon toga, vršeno je potpuno uparavanje rastvora tako da na dnu tubice ostane samo suvi talog u kome su steroidi. Ovako dobijen talog je rastvoren u odgovarajućoj zapremini osnovnog pufera za određivanje testosterona (T) radioimunološkom metodom, RIA (*engl.* radio-immuno assay).

4.5. Transmisiona elektronska mikroskopija testisa

U cilju praćenja ultrastrukturnih promena na nivou Leydig-ovih ćelija, izolovani su testisi kontrolnih i tzv. „knockout“ životinja odmah nakon žrtvovanja. Testisi su podeljeni na komadiće veličine oko 1 mm³ i fiksirani u 2.5% rastvoru glutaraldehida puferisanom sa 0.1M kakovitnim puferom. Nakon toga, urađena je postfiksacija u 1% rastvoru osmium tetroksida u istom puferu, dehidracija u seriji alkohola i kalupljenje u epoksi smoli *Araldite* (Fluka, Germany). Ukalupljeni uzorci su sečeni dijamantskim nožem (Diatome, Switzerland) na ultramikrotomu *Leica UC6* (Leica Microsystems, Germany), montirani na bakarne mrežice i kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom u aparatu za automatsko kontrastiranje *Leica EM STAIN* (Leica Microsystems). Mikroskopiranje je rađeno pomoću transmisionog elektronskog mikroskopa (Philips/FEI, The Netherlands) i *iTEM MegaView CCD* kamere (Gak/Radović i sar. 2015). Procedura nakon uzorkovanja i fiksiranja je izvedena u Centru za elektronsku mikroskopiju Univerziteta u Beogradu.

4.5.1. Morfometrijska analiza mitohondrija

U cilju analize mitohondrija u Leydig-ovim ćelijama, analizirani su sledeći parametri morfometrijskom metodom: (1) broj mitohondrija (numerička gustina) po μ m² citoplazme (N_{AMi}); (2) korigovani dijametar mitohondrija (\bar{D}_{Mi}) i (3) volume mitohondrija (V_{Mi}). Za ovu

analizu je izabrano 5-6 najreprezentativnijih mikrografija (dobijenih transmissionim elektronskim mikroskopom) za svaki genotip. Identifikovano je i analizirano 78 mitohondrija u kontrolnoj grupi i po 51 u ostalim eksperimentalnim grupama. Fotografije su analizirane pomoću *ImageJ 1.45* programa (www.imagej.nih.gov). N_{AMi} ($\text{No}/\mu\text{m}^2$) je izračunata deljenjem broja mitohondrija po Leydig-ovoj ćeliji sa srednjom vrednošću površine citoplazme. Dijametar mitohondrija je izračunat po formuli $d_{Mi} = \sqrt{ab}$, gde je (a) najveći, a (b) najmanji izmereni dijametar mitohondrija. Za određivanje korigovanog dijametra mitohondrija Fullman-ova formula ($\pi/2 * d_{Mi}$) zbog pretpostavke da su mitohondrije sferične structure. Volumen mitohondrija je izračunat po sledećoj formuli: $(4\pi/3) * (D_{iMi}/2)^3$.

4.6. Priprema primarne kulture Leydig-ovih ćelija

Primarna kultura Leydig-ovih ćelija izolovana je iz suspenzije intersticijalnih ćelija testisa. Izolacija se zasniva na gradijentnom centrifugiranju tokom kog se Leydig-ove ćelije specifično pozicioniraju shodno njihovoj specifičnoj gustini (za reference pogledati Gak/Radović i sar. 2015).

Nakon žrtvovanja životinje, testisi su brzo izolovani, dekapulirani, uklonjen je glavni krvni sud i stavljeni su u epruvetu zapremine 50 ml (Spektar, Čačak) sa rastvorom koleagenaze tipa I (0.25 mg/ml) u M199 sa dodatkom 1.5% BSA i 20 mM HEPES-a, sa 100 U penicilina i 0,1 mg streptomocina po ml (dva testisa od iste životinje po epruveti). Rastvor kolegenaze je čuvan na ledu do stavljanja uzoraka u vodeno kupatilo. Enzimsko razlaganje tkiva kolagenazom trajalo je 15 min na temperaturi od 34 °C i 120 obrtaja u minutu. U procesu razdvajanja intersticijalnih ćelija i seminiferne tubule primenjena su dva principa i oba su pokazala veoma sličan finalni broj ćelija i kvalitet izolacije. Prvobitno je reakcija kolagenaze zaustavljena sa 5 ml hladnog M199-0.5% BSA, a epruvete su ostavljene da se tokom 5 min seminiferne tubule istalože pod uticajem gravitacije. Nakon toga, supernatant je prenet u novu plastičnu epruvetu od 12 ml (Spektar, Čačak), a ceo postupak je ponovljen još dva puta. Drugi pristup je podrazumevao zaustavljanje reakcije kolagenaze sa 15 ml hladnog M199-0.5% BSA, filtriranje suspenzije kroz mrežice (No.100 Mesh, Sigma Aldrich) i ispiranje epruvete sa još 5 ml ovog medijuma. Na ovaj način je, u oba slučaja, dobijena suspenzija intersticijalnih ćelija testisa koje su istaložene 5 min na 250xg, a talog je resuspendovan u 1 ml DMEM/F12-0.1% BSA. Ovako dobijena suspenzija intersticijalnih ćelija je korišćena za izolaciju primarne kulture Leydig-ovih ćelija postupkom gradijentnog centrifugiranja

(Klinefelter i sar. 1987). 1 ml suspenzije intersticijalnih ćelija dodat je na gradijent Perkola koji se sastojao od tri sloja različite specifične gustine (po 1 ml): 1.080, 1.065 i 1.045 g/ml. Izotonični Perkol je mešan sa odgovarajućom zapreminom 10x koncentrovanog DMEM/F12 (sa 100 U/ml penicilina i 0,1 mg streptomicina/ml) obogaćenog sa 3% BSA i destilovane autoklavirane vode. Gradijenti su centrifugirani na 1200xg, 45 min na 4°C. Nakon centrifugiranja, Leydig-ove ćelije se nalaze na graničnim slojevima između 1.085/1.065 g/ml i 1.065/1.045 g/ml, odakle su sakupljene Pasterovom pipetom u plastične epruvete od 12 ml, dodato im je 12 ml M199-0.1% BSA i centrifugirane na 300xg, 5 min na sobnoj temperature. Na ovaj način se postiže ispiranje ćelija od zaostalog Perkola. Talog je resuspendovan u 500 µl DMEM/F12. Vijabilnost i broj ćelija u ovako dobijenoj kulturi određivan je *Trypan blue dye exclusion test* (Sigma Inc). Odgovarajuća zapremina ćelijske suspenzije (20 µl) je mešana sa 0,4 % *Trypan blue* bojom u odnosu 1:1. Vijabilnost je bila 96,7 - 98,5 % kod P21 miševa, dok je kod P80 bila 96,7 % - 97,18 %. Udeo Leydig-ovih ćelija u primarnoj kulturi određen je specifičnim imunološkim bojenjem na HSD3B i NBT (nitrotetrazolium plavo) testom.

Ovako dobijena primarna ćelijska kultura Leydig-ovih ćelija je korišćena za *ex vivo* produkciju androgena, progesterone ili estradiola, *in vitro* tretman testosteronom, *in vitro* blokadu IGF1Rβ ili su ćelije zamrznute na -70°C do momenta kada su korišćene za izolaciju RNK i protein.

4.6.1. Određivanje aktivnosti enzima HSD3B pomoću NBT testa

U cilju određivanja udela Leydig-ovih ćelija u primarnoj kulturi rađen je test sa nitro plavo tetrazolijumom (NBT) (Payne i sar. 1980). Ovaj test se zasniva na konverziji pregnenolona u progesteron aktivnošću enzima HSD3B. Tokom ove reakcije dolazi do redukcije NAD⁺ i oksidacije NBT-a, tj. stvaranja precipitata NBT-formazana koji je plavo-ljubičaste boje koja se može detektovati mikroskopski ili spektrofotometrijski.

250000-1.5 x10⁶ Leydig-ovih ćelija (u dva do četiri ponavljanja po životinji), izolovanih iz životinja starosti 21 i 80 dana, su inkubirane u suspenziju sa 10 µM pregnenolonom, 1 mg/ml NBT i 3 mg/ml β-NAD⁺. Inkubacija je vršena u tubicama od 1.5 ml (Spektar, Čačak) tokom 1.5 h, u prisustvu O₂ dodatog pre inkubacije, na 34 °C i 500 rpm (*Thermomixer comfort*, Eppendorf). Finalna zapremina suspenzije bila je 200µl (100 µl ćelijske suspenzije i 100 µl zajedničkog rastvora progesterone, NBT i β-NAD⁺). Na kraju inkubacionog vremena, suspenzija je centrifugirana 7 min/500xg. Supernatant je odliven dok je talog ćelija rastvoren

u kapi zaostalog supernatanta i prenet na predmetna stakla (dva preparata po tubici). Napravljen je razmaz i prekriven pokrovnim staklom. Mikroskopiranje je rađeno na uvećanju od 630x na *Leica DMLB 100T* mikroskopu. Za svaki preparat je našpravljeno deset fotografija pomoću *LeicaMC190* kamere i programa *LAS Ver4.8.0*. Analiza fotografija i brojanje ćelija urađeno je pomoću *Image Tool Ink, Ver 3.00* programa.

4.6.2. Imunocitohemijska analiza ćelijskog razmaza

U cilju specifičnog imunološkog bojenja na HSD3B, marker Laydig-ovih ćelija, pripremani su razmazi ćelijske suspenzije. Za pripremu ćelijskog razmaza, 20000 Leydig-ovih ćelija u suspenziji zapremine 20 μ l je stavljeno na predmetno staklo. Nakon toga, razmaz je dehidratiran/fiksiran potapanjem u rastvor etra i etanola u odnosu 1:1 tokom 10 min. Tako dobijeni preparati su čuvani na -20°C do bojenja. Nakon odmrzavanja vršeno je fiksiranje u 4% rastvoru paraformaldehida tokom 10 min. Za deparafinizacija je korišćen ksilen, 3x5 minuta, nakon čega su preparati rehidratirani u seriji rastvora etanola opadajućih koncentracija (100%, 95%, 70%, 50%, 30%) po 5 minuta. Vraćanje antigena u prvobitno stanje, tzv. razotkrivanje antigena (*engl. antigen retrieval reaction*) rađeno je kuvanjem u 2 mM citratnim puferom (pH=6) 20 min u mikrotalasnoj rerni na temperature manjoj od 100°C . Specifično bojenje na HSD3B rađeno je uz pomoć UltraVision™ Quanto Detection System HRP komercijalnog kompleta (Thermo Fisher Scientific) prema uputstvu proizvođača (<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D11549~.pdf>). Sastavni deo kompleta je sekundarno antitelo obeleženo peroksidazom rena i diaminobenzidin (DAB) koji je supstrat za ovaj enzim. Za blokiranje endogenih peroksidaza korišćen je vodonik peroksid, takođe sastavni deo kompleta. Obrnuto bojenje je rađeno hematoksilinom (10 sec), a boja je diferencirana potapanjem preparata u običnu vodu (oko 30 min, uz zamenu vode 2-3 puta). Rastvor primarnog antitela HSD3B je pravljjen u 1xTBS puferu sa dodatkom 3% BSA i 0,1 % Tween-a, u odnosu 1:500. Po dva ili tri mikroskopska preparata su pripremljena za svaku životinju (n=5-8 po genotipu) i za svaki od njih napravljeno tri do pet fotografija pomoću imerzionog objektiva (100x) mikroskopa *Axio Imager A2* (Zeiss, 038-16035). Samo brojanje HSD3B-pozitivnih ćelija urađeno je na uvećanju objektiva od 63x i 100x istog mikroskopa, nezavisno od strane četiri osobe.

4.7. Priprema kulture seminifernih tubula

Seminiferne tubule su dobijene nakon filtracije enzimski razloženog tkiva testisa kroz mrežice (No.100 Mesh, Sigma Aldrich) tokom izolacije primarne culture Leydig-ovih ćelija. Tubule su sakupljane u plastičnu epruvetu ispiranjem mrežice 1xPBS-om. Zatim je takva suspenzija isprana 1xPBS-om i istaložena centrifugiranjem 5 min/500xg na sobnoj temperature, nakon čega je supernatant odliven, a talog tubula skladišten na -70°C do izolacije RNK.

4.8. Određivanje steroidogenog kapaciteta i steroidogene aktivnosti Leydig-ovih ćelija *ex vivo* produkcijom androgena i progesterona

U cilju merenja produkcije androgena i progesterone od strane Leydig-ovih ćelija u primarnoj kulturi, 25000 ćelija u suspenziji (dva do osam ponovaka po životinji u istom eksperimentu) je stavljeno u tubice od 1.5 ml (Spektar, Čačak). Ovoj suspenziji su dodati rastvori sledećih supstanci u DMEM/F12 mediumu: hCG (finalne koncentracije 50ng/ml), holesterola (10 µM), pregnenolona (10 µM), progesterona (10 µM), androstendiona (10 µM) ili čist DMEM/F12 mediuma za praćenje bazalne produkcije. hCG je korišćen u cilju praćenja steroidogenog kapaciteta ćelija (sposobnost Leydig-ovih ćelija da odgovore na stimulaciju LH/hCG-om), dok su ostale supstance dodavane radi praćenja steroidogene aktivnosti (sposobnost Leydig-ovih ćelija da konvertuju steroidogene supstrate/prekursore do krajnjih produkata). Suspenzija je inkubirana 1 h na 34°C i 500 rpm (*Thermomixer comfort*, Eppendorf) u prisutvu O₂ koji je dodat ćelijama pre inkubacije i finalnoj zapremini od 200 µl. Nakon isteka inkubacionog vremena, suspenzija je centrifugirana 7 min 500xg. Supernatant, tj. medijum je sakupljen u nove tubice i zamrznut na -20°C do merenja koncentracije androgena i progesterona, dok je talog, tj. ćelije zamrznut na -70°C (za reference pogledati Gak/Radović i sar. 2015).

4.9. Određivanje aktivnosti aromatize *ex vivo* produkcijom estradiola

Radi praćenja aktivnosti enzima aromataze, 25000 Leydig-ovih u 150 µl suspenzije je inkubirano u prisustvu testosterona, finalne koncentracije 5µM, ili u samom medijumu (bazalna, nestimulisana aktivnost) po istom principu kao i tokom praćenja steroidogenog

kapaciteta i aktivnosti. Inkubacioni medijum je takođe čuvan na -20°C do merenja koncentracije estradiola u njemu.

4.10. Određivanje potencijala membrane mitohondrija ($\Delta\psi$)

Potencijal membrane mitohondrija ($\Delta\psi$) je određen po standardnoj proceduri (za reference videte Gak/Radović i sar. 2015). 50000 Leydig-ovih ćelija je, nakon pripreme primarne kulture, zasađeno u crnu 96-well ploču za ćelijsku kulturu u 100 μl DMEM/F12 medijuma. Nakon sađenja, ćelije su ostavljene 2 h u CO_2 inkubatoru (5% CO_2 , 34°C) da se zalepe za dno ploče i uspostave normalnu metaboličku aktivnost. Posle 2 h, postojeći medijum je odliven i dodat je novi, bez hCG (bazalni uslovi) ili sa hCG (50 ng/ml) u kom su ćelije provele 1 h pri istim uslovima kao i tokom lepljenja. Za svaku životinju je urađeno 3 do 6 ponavljanja za bazalnu i hCG-om tretiranu grupu u okviru iste ploče. Po isteku inkubacionog perioda medijum je odliven i dodat je rastvor tetrametilrodamin estra (TMRE) finalne koncentracije 100 nM u zapremini od 200 μl . Ćelije su inkubirane sa bojom 20 min CO_2 inkubatoru (5% CO_2 , 34°C). TMRE je fluorescentna protonofora koja se koristi za indirektno određivanje potencijala mitohondrijalne membrane kroz koju nesmetano prolazi jer je lipofilno jedinjenje. Upotreba ove boje se zasniva na principu njenog kretanja ka negativnom naelektrisanju matriksa mitohondrija. Stepem kretanja i akumulacija boje zavise od nivoa negativnog naelektrisanja matriksa. Nakon odlivanja rastvora boje, ćelije su isprane 1xPBS-om posle čega je dodat 1xPBS obogaćen sa 0.1% BSA u kom je vršeno merenje fluorescencije na fluorimetru (Fluoroskan, Ascent, FL, Thermo LabSystems). TMRE apsorbuje svetlost talasne dužine 544 nm, a emituje 590 nm.

4.11. Određivanje relativnog broja mitohondrija (mitohondrijalne mase)

Za ispitivanje relativnog broja mitohondrija (mitohondrijalne mase) je korišćena MitoTracker Green FM® fluorescentna boja prema uputstvu proizvođača (www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/M7514) i ranije opisanoj proceduri (Nisoli i sar. 2003). To je selektivna, zeleno-fluorescentna fluorofora koja ima visok afinitet i specifičnost za lipide u membrane mitohondrija i njena lokalizacija u mitohondrijama ne zavisi od potencijala mitohondrijalne membrane. Boji isključivo žive, nefiksirane ćelije. Suspenzija 100000 Leydig-ovih ćelija u 200 nM rastvoru MitoTracker-Green-FM® boje u

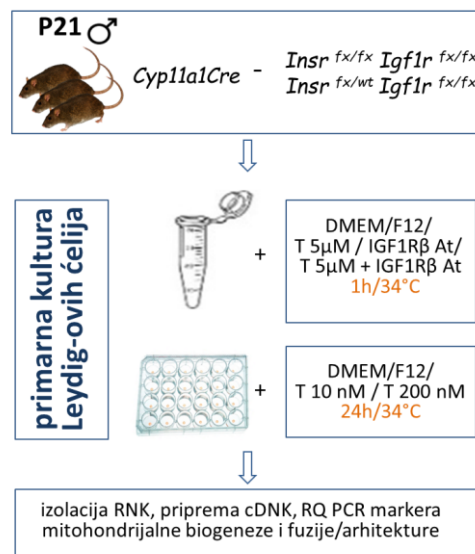
DMEM/F12 medijumu finalne zapremine 600 μ l, inkubirana je u suvom kupatilu (Thermomixer comfort, Eppendorf) tokom 35 min/34°C/500 rpm u prisutvu O₂ koji je dodat ćelijama pre inkubacije. Na kraju inkubacije, ćelije su prvo istaložene centrifugiranjem 7min/500xg. Supernatant je odliven, a talog rastvoren u 30 μ l 1xPBS-a i prenet na predmetno staklo (Gak/Radović i sar. 2015). Fluorescencija je detektovana Axio ImagerA2 (# 038-16035, Zeiss) fluorescentnim mikroskopom pomoću 490 nm-ekscitacionog i 516 nm-emisionog filtra i x100-objektiva.

4.12. Blokiranje IGF1R u primarnoj kulturi Leydig-ovih ćelija

50000 Leydig-ove ćelije (tri ponovka po životinji u okviru istog eksperimenta) kontrolnih životinja su tretirane *in vitro* IGF1R- β antitelom (1:10) koje prepoznaje ekstracelularni domen β subjedinice (#sc-9038, Santa Cruz Biotechnology), testosteronom (5 μ M) ili njihovom kombinacijom (Slika 4.12.1) tokom 1 h na 34°C i 500 rpm (*Thermomixer comfort*, Eppendorf). Nakon inkubacionog perioda, suspenzija je centrifugirana 7 min na 500xg. Supernatant je odliven, a ćelijski talog je iskorišćen za izolaciju RNK.

4.13. Tretman primarne kulture Leydig-ovih ćelija testosteronom tokom 24 h

250000 do 0.5x10⁶ Leydig-ovih ćelija izolovanih iz kontrolnih životinja je zasađeno u 24-well ploču za ćelijsku kulturu (Grainer BioOne) u 0.5 ml DMEM/F12 (sa 100 U/ml penicilina i 0,1 mg streptomocina/ml). Ćelije su se lepile i uspostavljale normalnu metaboličku aktivnost 2h u CO₂ inkubatoru (34°C, 5% CO₂). Nakon ovog perioda, postojeći medijum je odliven, a dodat je novi čist medijum sa 10 nM ili 200 nM testosterona, ili bez njega - bazalni uslovi (Slika 4.13.1). U prisustvu testosterona, kao i u bazalnim uslovima, ćelije su inkubirane 24 h nakon čega je medijum odliven, a ćelije su isprane hladnim 1xPBS i zamrznute na -70°C gde su čuvane za izolaciju RNK.



Slika 4.13.1. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna in vitro blokiranja IGF1R, samostalno ili u kombinaciji sa testosteronom, Leydig-ovih ćelija kontrolnih P21 miševa

4.14. Merenje hormona

Koncentracija **muških polnih hormona (androgena)** merena je RIA metodom. Za ovu metodu korišćen je *anti-testosteron serum №250* koji pokazuje 100% cross-reaktivnost sa dihidrotestosteronom tako da se izmerena koncentracija odnosi na testosteron i dihidrotestosteron, T+DHT (za reference pogledati Gak/Radovic i sar. 2015). Merenje je vršeno u duplikatu za svaki uzorak seruma ili ćelijskog medijuma u kojima je merena koncentracija ovih hormona. Senzitivnost metode je 6 pg po epruveti (uzorku) dok je koeficijent varijacije unutar eseja 5-8%. Opseg standardne krive je bio 6,25 pg/100 µl do 800 pg/100µl. Anti-testosteronski serum je razblažen u odnosu 1:110 ili 1:125 u puferu za testosteronu RIA sa dodatkom 0,1% BSA da bi se postiglo vezivanje antitela za radioaktivno obeleženi antigen od 30-50%. Koncentracija **progesterone** ćelijskom medijumu je takođe merena RIA metodom, upotrebom anti-progesteronskog seruma №337 (za reference pogledati Stojkov i sar. 2013). Senzitivnost metode, tj. najmanja detektovana koncentracija je 6 pg po epruveti. Koeficijent varijacije unutar pojedinačne analize je 6,8% dok je između različitih analiza 8,7 %. Opseg standardne krive je bio 6,25 pg/100 µl do 800 pg/100µl. U oba slučaja nivo scintilacije je meren pomoću scintilacionog brojača *Wallac 1410* (Laboratoire Kastler Brossel, Pharmacia).

Merenje koncentracije **estradiola**, u serumu i *ex vivo* produkovanog u ćelijski medijum od strane Leydig-ovih ćelija, vršeno je pomoću komercijalnog kompleta za merenje estradiola kompetitivnom ELISA metodom, *Estradiol Parameter Assay Kit* (RnD Systems, KGE014), u vidu 96-well ploče sa kozjim anti-mišjim IgG kao sekundarnim antitelom i ostalim potrebnim komponentama uključujući rastvor primarnog antitela, prema uputstvu proizvođača (www.rndsystems.com). Estradiol iz uzorka kompetituje sa estradiolom obeleženim peroksidazom rena za mesta vezivanja na monoklonalnom primarnom antitelu. Najniža koncentracija koja se može detektovati (senzitivnost kompleta) je 12,1 pg/ml, a je opseg standardne krive bio od 12,3 pg/ml do 3000 pg/ml. Koeficijent varijacije unutar eseja je bio 5,4-8,9%, dok je među različitim analizama 5,8-7,6%. Očitavanje apsorbance rađeno je pomoću fotometra *Multiscan EX Plate Reader* (Thermo-Labsystems).

4.15. Određivanje koncentracije cAMP u ćelijskom sadržaju Leydig-ovih ćelija

Leydig-ove ćelije su istaložene centrifugiranjem 7 min/500 xg , u tubicama od 1,5 ml (Spectar, Čačak), i zamrznute na $-70^{\circ}C$ gde su čuvane do izolacije cikličnog adenozinmonofosfata (cAMP). Za izdvajanje cikličnih nukleotida, ćelije su lizirane sa 250 μ l apsolutnog etanola. Nakon liziranja, tečni deo homogenata je uparen tako da je ostao samo talog na dnu tubica. Talog je rastvoren u 1 mM rastvoru 3-izobutil-1-metilksantina (*engl.* 3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX) u 1xPBS puferu sa dodatkom 0,1 % BSA. IBMX se koristi kao inhibitor diesteraza koje bi mogle da umanje koncentraciju cikličnih nukleotida. Ovako pripremljeni uzorci se mogu koristiti za dalje merenje koncentracije cikličnih nukleotida (Stojkov i sar. 2013).

Određivanje cikličnih nikleotida u ćelijskom sadržaju je vršeno pomocu kompleta za enzimsko-imunološku analizu (*engl.* enzyme immunoassay, EIA) za merenje koncentracije cAMP (Stojkov i sar. 2013). Princip analize je baziran na kompetitivnom vezivanju cAMP iz uzorka i konjugata cAMP-acetilholin esteraza za ograničen broj mesta na monoklonalnom antitelu. Priprema uzoraka, acetilacija i kompletna analiza je izvođena prema uputsvima proizvođača (<https://www.caymanchem.com>). Opseg inhibicione krive bio je od 0,08 do 10 pmol/ml. Senzitivnost je 0.1 pmol/ml (80% B/B₀), dok je *cross*-reaktivnost za acetilovani i neacetilovani cAMP 100%. Za merenje apsorbanci korišćen je fotometar *Multiscan EX Plate Reader* (Thermo-Labsystems).

4.16. Relativna kvantifikacija ekspresije transkripata

U cilju praćenja relativne ekspresije transkripata od interesa u primarnoj kulturi Leydig-ovih ćelija, kao tkivu testisa, seminifernih tubula, ovarijuma i nadbubreznih žlezda, ćelije i tkiva su nakon izolacije su zamrzavani na -70°C i čuvani do izolacije. Izolovana je ukupna RNK od koje je sintetisana komplementarna DNK (cDNK).

4.16.1. Izolacija ukupne RNK i tretman DNazom I

Izolacija ukupne RNK iz Leydig-ovih ćelija P21 miševa, rađena je pomoću *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) komercijalnog kompleta za izolaciju, prema uputstvima proizvođača (<https://www.qiagen.com>). Za izolaciju RNK iz ćelija P80 miševa, korišćen je *RNAqueous-4PCR* (Ambion, ThermoFisher Scientific) komplet (<https://www.thermofisher.com>). Za izolaciju RNK iz Leydig-ovih ćelija iz *in vitro* oglada korišćen je *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit* (Sigma) komplet. U osnovi svih navedenih metoda je sličan princip izdvajanje ukupne RNK iz ćelija/tkiva upotrebom silica-membrana koje poseduju svojstvo selektivnog vezivanja.

RNK iz tkiva je izolovana pomoću *TRIzol-a* (Invitrogen), komercijalno proizveden rastvor fenola i guanidin-izotio-cianata, čija je funkcija da obezbedi liziranje tkiva/ćelija, denaturiše protein i odvoji RNK od ribozomalnih protein. Za taloženje protein u ovoj metodi izolacije korišćen je hloroform, min. 99,92% (Lach-Ner.s.r.o, Neratovice, Czech Republic), a za taloženje RNK izopropil alcohol, min. 99,7% (Lach-Ner.s.r.o, Neratovice, Czech Republic).

Koncentracija i kvalitet RNK nakon izolacije u svim slučajevima je određivana pomoću *BioSpec-nano*, Shimadzu, aparata (<http://www.ssi.shimadzu.com>). Ovaj vid merenja je u osnovi spektrofotometrijska analiza i zasniva se na sposobnosti nukleinskih kiselina da apsorbuju svetlost talasne dužine 260 nm. Pored koncentracije RNK, određeni su čistoća i kvalitet RNK na osnovu odnosa sledećih apsorbanci: OD 260/280 nm (prisustvo proteina) i OD 260/230 (kontaminacija komponentama za izolaciju) (za reference pogledati Gak/Radović i sar. 2015).

U cilju digestije i uklanjanja genomske DNK iz uzorka, nakon izolacije RNK, korišćena je *DNase I Amplification Grade* (za reference pogledati Gak/Radović i sar, 2015) komplet koji sadrži Dnaza I enzim, DNaze I reakcioni pufer i EDTA kao inhibitor ovog enzima. Procedura je izvođena prema uputstvima proizvođača (<https://www.thermofisher.com/order/catalog>).

Izuzetak od ovog načina uklanjanja genomske DNK, bili su uzorci dobijeni upotrebom *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit complete*. U ovom slučaju je korišćena *On-Column DNase I Digestion Set* (#DNASE70-1SET, Sigma) u čijem sastavu je enzim koji se dodaje tokom same izolacije direktno na silika-membranu prema uputstvu proizvođača (<http://www.sigmaaldrich.com>).

4.16.2. Reakcija reverzne transkripcije - sinteza komplementarne DNK (cDNK)

cDNK je sintetisana upotrebom High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kompleta za reverznu transkripciju prema datom uputstvu (www.thermofisher.com/rs/en/home/brands/invitrogen). Najmanje 200 ng, a najviše 1 µg ukupne RNK je korišćeno za sintetsanje cDNK. U svakom setu reakcija je postojala negativna kontrola koja je sadržala komponente za transkripciju bez RNK (Gak/Radović i sar. 2015). Sve reakcije reverzne transkripcije izvođene su u Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) aparatu (za reference pogledati Gak/Radović i sar. 2015).

4.16.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (real time PCR)

Za relativnu kvantifikaciju ekspresije transkripata korišćen je Power SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems) prema datom uputstvu (<https://www.thermofisher.com>). U svakoj RQ-PCR reakciji bilo je 15-20 ng cDNK u zapremini od 2,5 µl (preračunato na početnu koncentraciju RNK koja je uneta u reakciju reverzne transkripcije). Specifični prajmeri (direktni i reverzni) su korišćeni u konačnoj koncentraciji od 500 nM. PCR reakcije su izvođene u aparatu Eppendorf Master Cycler RealPlex 4 (Eppendorf), dok je za obradu podataka korišćen Mastercycler® eprealplex Software (Eppendorf). Sekvence svih prajmera, pristupni kod za GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), reference, kao i Ct vrednosti u Leydig-ovim ćelijama, tkivima testis, ovarijuma i nadbubrežnih žlezda, dati su u Tabelama 4.16.1 - 4.16.6. Ekspresija *Gapdh* gena (*engl.* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), kao endogene kontrole, je praćena u svim uzorcima i služila je za korekciju varijacija u koncentraciji cDNA među uzorcima (Stojkov i sar. 2015). *Wbscr1/Eif-4H* (*engl.* eukaryotic translation initiation factor 4H) je praćen u uzorcima Leydig-ovih ćelija kao dodatna endogena kontrola. Relativno kvantifikovanje ekspresije svakog gena urađeno je u duplikatu, tri puta za svaki uzorak. Uzorci su sakupljeni od najmanje tri životinje po genotipu.

Tabela 4.16.1. Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi gena za elemente steroidogene mašinerije i glavni marker funkcionalnosti Leydig-ovih ćelija.

| Gen | Pristupni kod | Sekvenca prajmera | Dužina prajmera | Dužina produkta | Ct LCs P21 | Ct LCs P80 | Ct ovarijum P21 | Ct NB P21 ♂ | Ct NB P21 ♀ |
|-----------------------|---|--|-----------------|-----------------|------------|------------|-----------------|-------------|-------------|
| <i>Lhcgr</i> | NM_013582 | F: 5'- GAGAAGCGAATAACGAGACG -3' R: 5'- TTAGCCAAATCAACACCCTAA -3' | 20bp 21bp | 180bp | 22.95 | 23.67 | 27.88 | | |
| <i>Scarb1</i> | NM_001205083 NM_001205082 NM_016741 | F: 5'- GCCAGCGTGCTTTTATGA -3' R: 5'- CCGTTCCATTTGTCCACC -3' | 18bp 18bp | 217bp | 23.93 | 25.46 | 22.64 | 18.41 | 18.60 |
| <i>Star</i> | NM_011485 | F: 5'- AAAAGACACGGTCATCACTCA -3' R: 5'- CCACCCCTTCAGGTCAATAC -3' | 21 bp 20 bp | 268 bp | 28.31 | 22.66 | 26.54 | 16.37 | 15.84 |
| <i>Srd5a1</i> | NM_175283 | F: 5'- GAGTTGGATGAGTTGCGCCTA -3' R: 5'- GGACCACTGCGAGGAGTAG -3' | 21 bp 19 bp | 123 bp | 25.72 | 28.03 | | | |
| <i>Cyp11a1</i> | NM_019779 | F: 5'- GCACTTTGGAGTCAGTTTACATC -3' R: 5'- AGGACGATTCGGTCTTTCTT -3' | 23 bp 20 bp | 181 bp | 23.47 | 21.52 | 23.93 | 16.80 | 16.69 |
| <i>Cyp17a1</i> | NM_007809 | F: 5'- CCAGGACCCAAGTGTGTCT -3' R: 5'- CCTGATACGAAGCACTTCTCG -3' | 20 bp 21 bp | 250 bp | 23.64 | 19.93 | 25.5 | 30.31 | 31.70 |
| <i>Cyp19a1</i> | NM_007810 | F: 5'- GTGTCCAGCATGATGTGTCTCA -3' R: 5'- AGTCCATCAAGCAGCATTGG -3' | 22 bp 21 bp | 97 bp | 33.19 | 29.84 | 27.17 | 27.58 | 25.79 |
| <i>Hsd3b1</i> | NM_008293 | F: 5'- AGCATCCAGACACTCTCATC -3' R: 5'- GGAGCTGGTATGATATAGGTA -3' | 20 bp 22 bp | 76 bp | 23.95 | 23.21 | 19.73 | 15.68 | 16.00 |
| <i>Hsd3b6</i> | NM_013821 | F: 5'- CATCCTTCCACAGTTCTAGC -3' R: 5'- TGGTGTGAGATTAATGTACA -3' | 20 bp 20 bp | 96 bp | 22.61 | 18.98 | 32.37 | 22.50 | 24.74 |
| <i>Hsd17b1</i> | NM_008291 | F: 5'- ATGGAGTCAAGGAGGAAAGGC -3' R: 5'- GGCTGTAAAGAGGCCAGGG -3' | 21 bp 19 bp | 76 bp | 28.37 | 22.85 | 29.65 | | |
| <i>Insl3</i> | NM_013564 | F: 5'- TACTGATGCTCCTGGCTCTG -3' R: 5'- TGCAGGAGATGTCTCTGCTCT -3' | 20 bp 21 bp | 199 bp | 21.23 | 28.53 | | | |
| <i>Gapdh</i> | NM_008084 | F: 5'- AGGTCGGTGTGAACGGATTTG -3' R: 5'- TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA -3' | 21 bp 23 bp | 123 bp | 23.16 | 22.71 | 18.38 | 18.43 | 18.15 |
| <i>Eif4h (Wbscr1)</i> | NM_033561 | F: 5'- CTGCAATGTCCACACGAAGTG -3' R: 5'- TCCCTGAAGGAGGCTCTGACT -3' | 21 bp 21 bp | 70 bp | 27.20 | 23.80 | | | |

Prajmeri su dizajnirani pomoću softvera Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) ili preuzeti iz Primer Bank – označeni *. Sekvenca prajmera za *Hsd17b3* je preuzeta iz Korach i sar. 2006, a za za *Eif4h (Wbscr1)* iz OShaughnessy i sar. 2002. F - direktni prajmer (*engl.* forward); R - reverzni prajmer (*engl.* reverse); LCs – Leydig-ove ćelije; NB - nadbubrežna žlezda.

Tabela 4.16.2. Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi gena za transkripcione faktore u Leydig-ovim ćelijama i seminiferim tubulama.

| Gen | Pristupni kod | Sekvenca prajmera | Dužina prajmera | Dužina produkta | Ct LCs P80 | Ct LCs P21 | Ct testis P80 | Ct testis P21 | Ct STs P80 | Ct STs P21 |
|-----------------------------------|--------------------------|--|-----------------|-----------------|------------|------------|---------------|---------------|------------|------------|
| <i>Dax1</i> | NM_007430 | F: 5'- ATTGACACCAAAGAGTATGCC -3' R: 5'- GTTCTCCACTGAAGACCCCTC -3' | 21 bp 20 bp | 104 bp | 27.59 | 30.21 | 23.40 | 23.82 | 23.42 | 23.52 |
| <i>Arr19*</i> (<i>Cntma</i>) | NM_027022 | F: 5'- GAGCAATAAAGAGTTCTGGCTGT -3' R: 5'- TGTGGGAGCATTGTTCAAAGTA -3' | 23 bp 23 bp | 102 bp | 23.88 | 27.64 | 18.11 | 19.34 | 16.53 | 19.82 |
| <i>Ar</i> | NM_013476 | F: 5'- CCACTGAGGACCCATCCCAGAA -3' R: 5'- CGGCACACACCACTCCTGGCTC -3' | 22 bp 22 bp | 111 bp | 26.78 | 28.80 | | | | |
| <i>Nur77</i> | NM_010444 | F: 5'- ATGCCTCCCCTACCAATCTTC -3' R: 5'- CACCAGTTCCTGGAACCTGGA -3' | 21 bp 21 bp | 101 bp | 24.44 | 25.19 | | | | |
| <i>Gata4</i> | NM_008092 | F: 5'- CCCTACCCAGCCTACATGG -3' R: 5'- ACATATCGAGATTGGGGTGTCT -3' | 19 bp 22 bp | 139 bp | 26.49 | 27.10 | | | | |
| <i>Sfl</i> | NM_139051 | F: 5'- TTCGTCTGTCTCAAGTTCCTCATC -3' R: 5'- CCTTTACGAGGCTGTGGTTGTT -3' | 24 bp 22 bp | 73 bp | 23.91 | 26.60 | | | | |
| <i>Creb1</i> | NM_133828 NM_009952 | F: 5'- GGAGCTTGTACCACCGGTAA -3' R: 5'- GGGCTAATGTGGCAATCTGT -3' | 20 bp 20 bp | 136 bp | 28.04 | 28.48 | | | | |
| <i>Nr3a1</i> (<i>Esr1</i>) | NM_007956 | F: 5'- ATGAAAGGCGGCATACGGAAAG-3' R: 5'- CACCCATTTCAATTCGGCCTTC-3' | 22 bp 22 bp | 94 bp | 25.87 | 25.78 | | | | |
| <i>Nr3a1</i> (<i>Esr2</i>) | NM_207707* NM_010157* | F: 5'- CCAGACTGCAAGCCCAAATGT -3' R: 5'- AGAAGCGATGATTGGCAGTGG-3' | 21 bp 21 bp | 81 bp | 30.3 | 30.0 | | | | |
| <i>Gapdh</i> | NM_008084 | F: 5'- AGGTCGGTGTGAACGGATTG -3' R: 5'- TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' | 21 bp 23 bp | 123 bp | 22.71 | 23.16 | 19.97 | 20.67 | 19.93 | 20.64 |
| <i>Eif4h</i> (<i>Wbscr1</i>) | NM_033561 | F: 5'- CTGCAATGTCCACACGAAGTG -3' R: 5'- TCCCTGAAGGAGGCTCTGACT -3' | 21 bp 21 bp | 70 bp | 23.80 | 27.20 | | | | |

Prajmeri su dizajnirani pomoću softvera Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) ili preuzeti iz Primer Bank – označeni *. Prajmer za *Sfl* je dizajniran u Laboratoriji za molekularnu i biologiju razvoja pola prof. Serđa Nefa (Departman za genetičku medicinu i razvoj, Univerzitet u Ženevi, Švajcarska); za reference videti Pitetti i sar., 2013a. Sekvenca prajmera za *Eif4h* (*Wbscr1*) je preuzeta iz OShaugnessy i sar. 2002. F - direktni prajmer (*engl.* forward); R - reverzni prajmer (*engl.* reverse); LCs – Leydig-ove ćelije; STs - seminiferne tubule.

Tabela 4.16.3. Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi gena za faktore rasta i markere razvoja pola.

| Gen | Pristupni kod | Sekvenca prajmera | Dužina prajmera | Dužina produkta | Ct LCs P80 | Ct LCs P21 | Ct testis P80 | Ct testis P21 | Ct STs P80 | Ct STs P21 |
|-----------------------|---------------|---|-----------------|-----------------|------------|------------|---------------|---------------|------------|------------|
| <i>Fshr</i> | NM_013523 | F: 5'- CTGGCATTCTTGGGCTCG -3' R: 5'- GGGCGGAATCTCGGTCA -3' | 18 bp 17 bp | 102 bp | 27.69 | 29.93 | 25.82 | 23.84 | 26.64 | 25.13 |
| <i>Sry</i> | NM_011564 | F: 5'-TACAGGCTGCAGTTGCCTCA-3' R: 5'-TGTCCCCTGCAGAAGGTTGT-3' | 20 bp 21 bp | 51 bp | 27.12 | 33.14 | 28.38 | 33.14 | 28.50 | 33.91 |
| <i>Sox9</i> | NM_011448 | F: 5'-GTACCCGCATCTGCACAAC-3' R: 5'-CTCCACGAAGGGTCTCTTCTC-3' | 19 bp 21 bp | 91 bp | 26.09 | 30.48 | 24.35 | 23.01 | 24.63 | 24.36 |
| <i>Fgf9</i> | NM_013518 | F: 5'-TGCCAGAGAAACAGCCG-3' R: 5'-TCTTCAATCCATCCGATGCA-3' | 17 bp 20 bp | 51 bp | 31.42 | 32.65 | 30.67 | 29.40 | 29.41 | 30.78 |
| <i>Amh</i> | NM_007445 | F: 5'- GGGGAGACTGGAGAACAGC -3' R: 5'- AGAGCTCGGGCTCCCATA -3' | 19 bp 18 bp | 67 bp | 29.65 | 29.90 | 27.39 | 24.15 | 27.46 | 25.73 |
| <i>Rspo1</i> | NM_138683 | F: 5'-CCGCTAACAGCACCATGGA-3' R: 5'-CGCTCATTTACATTGTGCAG-3' | 19 bp 21 bp | 51 bp | 28.38 | 32.22 | 29.97 | 28.79 | 29.26 | 30.41 |
| <i>Wnt4</i> | NM_009523 | F: 5'-CGCGAGCAATTGGCTGTAC-3' R: 5'-GAGATGCTGCCACCGAT-3' | 19 bp 18 bp | 51 bp | 32.89 | 31.48 | 32.31 | 29.70 | 33.02 | 31.42 |
| <i>Gys1</i> | NM_030678 | F: 5'-TTGTCCGACTTGCTAGATTGGAA-3' R: 5'-CGCGCAGACATGTAGTACCG-3' | 23 bp 20 bp | 53 bp | 28.47 | 31.64 | 29.10 | 27.78 | 28.28 | 29.26 |
| <i>Gapdh</i> | NM_008084 | F: 5'- AGGTCGGTGTGAACGGATTTG -3' R: 5'- TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' | 21 bp 23 bp | 123 bp | 19.65 | 23.19 | 19.22 | 18.52 | 19.77 | 20.19 |
| <i>Eif4h (Wbscr1)</i> | NM_033561 | F: 5'- CTGCAATGTCCACACGAAGTG -3' R: 5'- TCCCTGAAGGAGGCTCTGACT -3' | 21 bp 21 bp | 70 bp | 23.80 | 27.20 | | | | |

Prajmeri za *Fgf9*, *Gys1*, *Sox9*, *Rspo1*, *Wnt4* i *Sry* su dizajnirani u Laboratoriji za molekularnu i biologiju razvoja pola (Departman za genetičku medicinu i razvoj, Univerzitet u Ženevi; za reference videti Pitetti i sar., 2013a, 2013b; Nef et al., 2003). Sekvenca prajmera za *Eif4h (Wbscr1)* je preuzeta iz OShaugnessy i sar. 2002. Ostali prajmeri su dizajnirani pomoću softvera Primer Express 3.0. F - direktni prajmer (*engl.* forward); R - reverzni prajmer (*engl.* reverse); LCs - Leydig-ove ćelije; STs- seminiferne tubule.

Tabela 4.16.4. Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi gena za markere matičnih ćelija.

| Gen | Pristupni kod | Sekvenca prajmera | Dužina prajmera | Dužina produkta | Ct LCs P21 | Ct LCs P80 |
|-----------------------|---------------------------|---|-----------------|-----------------|------------|------------|
| <i>Tsp2</i> | NM_011581 | F: 5'- GCAGGATGTACGTGGCCAAA-3' R: 5'- GAGATCTGTGGTGATGTGAG-3' | 20 bp 20 bp | 200 bp | 28.09 | 31.38 |
| <i>Pdgrfa*</i> | NM_011058 NM_001083316 | F: 5'- TCCATGCTAGACTCAGAAGTCA -3' R: 5'- TCCCGGTGGACACAATTTTC -3' | 22 bp 21 bp | 140 bp | 23.89 | 23.94 |
| <i>Pcna*</i> | NM_011045 | F: 5'- TTTGAGGCACGCCTGATCC -3' R: 5'- GGAGACGTGAGACGAGTCCAT -3' | 19 bp 21 bp | 135 bp | 23.38 | 23.39 |
| <i>Lef1</i> | NM_010703 | F: 5'-CTACCACGACAAGGCCAGAGA-3' R: 5'-CCGTCTGGATGCTTTCCTTC-3' | 21 bp 20 bp | 51 bp | 26.02 | 27.45 |
| <i>Gapdh</i> | NM_008084 | F: 5'- AGGTCGGTGTGAACGGATTTG -3' R: 5'- TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' | 21 bp 23 bp | 123 bp | 23.16 | 22.71 |
| <i>Eif4h (Wbscr1)</i> | NM_033561 | F: 5'- CTGCAATGTCCACACGAAGTG -3' R: 5'- TCCCTGAAGGAGGCTCTGACT -3' | 21 bp 21 bp | 70 bp | 27.20 | 23.80 |

Prajmeri su dizajnirani pomoću softvera Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) ili preuzeti iz Primer Bank – označeni *. Sekvenca prajmera za *Eif4h (Wbscr1)* je preuzeta iz OShaugnessy i sar. 2002, a prajmeri za *Lef1* su dizajnirani u Laboratoriji za molekularnu i biologiju razvoja pola (Departman za genetičku medicinu i razvoj, Univerzitet u Ženevi; za reference videti Pitetti i sar., 2013a, 2013b; Nef et al., 2003). F - direktni prajmer (*engl.* forward); R - reverzni prajmer (*engl.* reverse); LCs – Leydig-ove ćelije.

Tabela 4.16.5. Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi gena za markere mitohondrijalne biogeneze.

| Gen | Pristupni kod | Sekvenca prajmera | Dužina prajmera | Dužina produkta | Ct P21 LCs | Ct ovarijum | Ct NB ♂ | Ct NB ♀ |
|-----------------------|--|---|-----------------|-----------------|------------|-------------|---------|---------|
| <i>Ppargc1a</i> | NM_008904.2 | F: 5'- GACATAGAGTGTGCTGCTCTGGT -3' R: 5'- GTTCGCAGGCTCATTGTTGT -3' | 23 bp 20 bp | 180 bp | 30.38 | 27.93 | 27.31 | 29.52 |
| <i>Ppargc1b</i> | NM_133249.2 | F: 5'- CGCTCCAGGAGACTGAATCCAG -3' R: 5'- CTTGACTACTGTCTGTGAGGC-3' | 22 bp 21 bp | 142 bp | 30.46 | 27.66 | 26.05 | 27.72 |
| <i>Pparg</i> | NM_001127330.2 NM_011146.3 NM_001308352.1 NM_001308354.1 | F: 5'- CAAGAATACCAAAGTGCATCAA -3' R: 5'-GAGCTGGGTCTTTTCAGAATAATAAG -3' | 23 bp 26 bp | 69 bp | 27.78 | 26.48 | 25.77 | 26.84 |
| <i>Tfam</i> | NM_009360.4 | F: 5'- AGTTCATACCTTCGATTTTC -3' R: 5'- TGA CT TGGAGTTAGCTGC -3' | 20 bp 18 bp | 212 bp | 25.47 | 24.27 | 26.38 | 27.60 |
| <i>Nrf1</i> | NM_001164226.1 NM_001164227.1 NM_001164228.1 NM_001164229.1 | F: 5'- T TACTCTGCTGTGGCTGATGG -3' R: 5'- CCTCTGATGCTTGCGTCGTCT-3' | 21 bp 21 bp | 92 bp | 25.87 | 25.25 | 25.15 | 25.65 |
| <i>Mtnd1</i> | NC_005089.1 * | F: 5'- GAGCTGTAGCCCAAACAATTCA -3' R: 5'- ATGGCTATGGGTCAGGCTGGTA -3' | 23 bp 22 bp | 148 | 19.37 | 18.60 | 20.33 | 19.37 |
| <i>Gapdh</i> | NM_008084 | F: 5'- AGGTCGGTGTGAACGGATTG -3' R: 5'- TG TAG ACC ATGTAGTTGAGGTCA-3' | 21 bp 23 bp | 123 bp | 20.00 | 18.68 | 18.36 | 18.96 |
| <i>Eif4h (Wbscr1)</i> | NM_033561 | F: 5'- CTGCAATGTCCACACGAAGTG -3' R: 5'- TCCCTGAAGGAGGCTCTGACT -3' | 21 bp 21 bp | 70 bp | 27.20 | | | |

Prajmeri za *Pparg* and *Gapdh* su dizajnirani pomoću Primer Express 3.0 programa (Applied Biosystems), dok su ostali preuzeti iz Wang i sar., 2015, osim za *Eif4h (Wbscr1)* koji je preuzet iz OShaugnessy i sar., 2002. F - direktni prajmer (*engl.* forward); R - reverzni prajmer (*engl.* reverse). LCs - Leydig-ove ćelije; NB – nadbubrežna žlezda. * *Mus musculus* mitochondrion, complete genome.

Tabela 4.16.6. Sekvence prajmera korišćenih u RQ-PCR analizi gena za markere mitohondrijalne fuzije/arhitekture.

| Gen | Pristupni kod | Sekvenca prajmera | Dužina prajmera | Dužina produkta | Ct LCs | Ct ovarijumi | Ct NB | Ct NB |
|-----------------------------------|---|---|-----------------|-----------------|--------|--------------|-------|-------|
| <i>Opa1</i> | NM_001199177.1 NM_133752.3 | F: 5'- ACCAGGAGAAGTAGACTGTGTCAA-3' R: 5'-TCTTCAAATAAACGCAGAGGTG-3' | 24 bp 22 bp | 66 bp | 27.55 | 25.34 | 24.81 | 24.66 |
| <i>Mfn1</i> | NM_024200.4 | F: 5'- GTGAGCTTCACCAGTGCAAA -3' R: 5'- CACAGTCGAGCAAAAGTAGTGG -3' | 22 bp 22 bp | 71 bp | 26.55 | 24.64 | 25.26 | 24.95 |
| <i>Mfn2</i> | NM_001285920.1 NM_133201.3 NM_001285921.1 NM_001285922.1 NM_001285923.1 | F: 5'- CGAGGCTCTGGATTCACTTC -3' R: 5'- CAACCAGCCAGCTTTATTCC -3' | 20 bp 20 bp | 61 bp | 24.51 | 24.62 | 23.50 | 22.95 |
| <i>Gapdh</i> | NM_008084 | F: 5'- AGGTCGGTGTGAACGGATTTG -3' R: 5'- TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' | 21 bp 23 bp | 123 bp | 20.71 | 18.21 | 18.16 | 18.12 |
| <i>Eif4h</i> (<i>Wbscr1</i>) | NM_033561 | F: 5'- CTGCAATGTCCACACGAAGTG -3' R: 5'- TCCCTGAAGGAGGCTCTGACT -3' | 21 bp 21 bp | 70 bp | 27.20 | | | |

Prajmeri za *Gapdh* su dizajnirani pomoću programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems), dok su prajmeri za *Opa1*, *Mfn1* i *Mfn2* preuzeti iz Wu i sar. 2015, a za *Eif4h* (*Wbscr1*) iz OShaugnessy i sar. 2002. F - direktni prajmer (*engl.* forward); R - reverzni prajmer (*engl.* reverse); LCs - Leydig-ove ćelije; NB – nadbubrežna žlezda.

4.17. Relativna kvantifikacija ekspresije protein

U cilju praćenja relativne ekspresije proteina, proteini su izolovani iz taloga Leydig-ovih ćelija i razvojeni denaturišućom SDS-PAGE elektroforezom (*engl.* sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis). Nakon toga, ekspresija ciljnih proteina je praćena western blot metodom sa specifičnim antitelima.

4.17.1. Izolacija i merenje koncentracije proteina

U cilju praćenja promena u ekspresiji proteina, Leydig-ove ćelije su nakon izolovanja istaložene 7 minuta na 500xg u tubicama od 1,5 ml, medijum je odliven, a one zamrznute na -70°C do izolacije ukupnih proteina iz njih. Proteini su izolovani na prethodno opisani način (za reference videti Gak/Radović i sar. 2015) pomoću pufera za liziranje koji sadrži sledeće komponente: 20mM HEPES (za održavanje pH vrednosti pufera, pH=7,5), 10 mM EDTA (helator metalnih jona i inhibitor metal-zavisnih proteinaza), 2,5 mM MgCl₂, 40 mM β-glicerofosfat (lažni supstrat za fosfataze), 1 mM ditiotritol, DTT (stabilizator proteina sa sulfhidrilnom grupom), 1 % Niaproof 4 (deterdžent za liziranje ćelijskih membrana), 0,5 mM AEBSF (inhibitor serin proteinaza), 1 μM aprotinin (inhibitor tripsina), 2 μM leupeptin (inhibitor serin i cistein proteinaza) i koktel inhibitora fosfataza. Od 0,5 x10⁶ do 3x10⁶ Leydig-ovih ćelija je lizirano sa 150 μl do 200 μl ovog pufera. Nakon liziranja, proteini su oslobođeni ostalih ćelijskih frakcija centrifugiranjem dobijenog ćelijskog lizata 5 min /1000xg.

Koncentracija proteina merena je Bradfordovom metodom (Bradford 1976). Za pravljenje kalibracione krive korišćen je proteinski standard goveđeg albumina koncentracije 10 g/dl (Sigma Diagnostics, ST. Louis, USA). Opseg krive bio je od 0 do 60 μg/ml. Apsorbanca je merena na 595 nm.

4.17.2. SDS-PAGE elektroforeza

Razdvajanje proteina prema molekulskim masama vršeno je jednodimenzionalnom denaturišućom SDS-PAGE elektroforezom (*engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) upotrebom 12 % gela za razdvajanje (30 % akrilamid/N' N' -bis-metilen-akrilamid, 10 % SDS, 1,5 M Tris-HCl (pH=8,8), 10 % amonijumpersulfat i TEMED) prema ranije opisanom postupku (za reference videte Gak/Radovic i sar. 2015). 5-7 μg proteina,

pomešanih sa 5x koncentrovanom bojom za lodiranje (engl. SDS loading sample buffer) sa redukujućim agensima (62,5 mM Tris-base, 12 % SDS, 40 % glycerol, 50 mM DTT, 30 % β -merkaptoetanol, 25,4 mM EDTA, 0,1 % bromofenol plavo, pH=6,8), je lodirano po well-u. Nakon mešanja proteina sa odgovarajućom zapreminom boje, uzorci su kuvani 5 min da bi se dodatno pospešila denaturacija i obezbedila linearna forma molekula, kao i njihovo okruživanje SDS-om radi postizanja negativnog naelektrisanja. Razdvajanje protein je trajalo 2 h pri naponu od 100 V u 1x koncentrovanom puferu za elektroforezu (25 mM Tris, 0,192 M glicin, 0,1 % SDS). Prenos proteina sa gela na poliviniliden difluorid (PVDF) membranu sa porama veličine 0,45 μ m (Immobilion-P, Millipore, Bedford, MA) rađen je postupkom mokrog elektrotransfera tokom noći pri naponu od 40 V na +4°C u puferu za transfer (25 mM Tris, 0,19 M glicin). Elektroforeza i transfer su rađeni u aparaturama proizvođača Bio-Rad (Herkuliz, Kalifornija, SAD). Za praćenje specifične pozicije proteina na gelu i membrane korišćen je proteinski marker PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific). Kvalitet transfera, tj. zadržavanje proteina na gelu proveravano je bojenjem gela u 0,1 % rastvoru Coomassie Brilliant Blue R250 boje u metanolu, dH₂O i glacijalnoj sirćetnoj kiselini, a nakon toga obezbojavani rastvorom za obezbojavanje (metanola, glacijalna sirćetna kiselina, dH₂O u odnosu 1:1:8 (v:v:v)) pri čemu se zadržava samo boja vezana za proteine zaostale na gelu (vezuje se za bazne pozitivno naelektrisane amino kiseline). Prisustvo proteina na samoj membrane proveravano je potapanjem membrane u 0,1 % rastvor Panceau S boje, u 1% sirćetnoj kiselini, i ispiranjem dH₂O pri čemu se crvena boja zadržava na mestima gde su prisutni proteini (vezuje se za pozitivno naelektrisane amino grupe).

4.17.3. Western blot analiza

Western blot analiza je urađena prema prethodno opisanom postupku (za reference videti Gak/Radović i sar. 2015). Nakon transfera, membrane su blokirane 2 h na sobnoj temperaturi u 3 % rastvoru BSA u 1xTBS puferu (1 mM Tris, 10 mM NaCl, 0,01 % Tween) sa dodatkom 0,1 % Tween. Inkubacija sa primarnim antitelom je trajala tokom noći na +4°C, a sa sekundarnim 1 h na sobnoj temperaturi. Razblaženja primarnih i sekundarnih antitela, čije su karakteristike date u Tabeli 4.17.1, pripremana su u rastvoru za blokiranje. Korišćena su sekundarna antitela obeležena peroksidazom rena (engl. horseradish peroxidase, HRP): anti-mišje i anti-žečje (Kirkegaard&Pery Labs, Gaithersburg, MD). Za vizualizaciju kompleksa protein od interesa, primarnog i sekundarnog antitela korišćen je SuperSignal™ West Dura

Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) supstrat, a hemiluminiscencija je detektovana pomoću MyECL™ Imager aparata.

4.18. Statistička analiza

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM od najmanje tri nezavisna eksperimenta, tj. tri individue za svaki genotip. Rezultati eksperimenata gde su poređeni svi genotipovi analizirani su One-Way ANOVA analizom varijanse praćenom Tukey *posthoc* testom za poređenje individualnih srednjih vrednosti. Za analizu rezultata *in vitro* tretmana testosteronom i nivoa hormona u serumu korišćen je *two tailed* Man Whitney neparametarski test za poređenje dve eksperimentalne grupe. Za *ex vivo* eksperimente u kojima je praćena produkcija estradiola korišćena je Two-Way ANOVA analiza varijanse sa Bonferroni *post hoc* testom. U svim slučajevima, za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0,05$.

Sve statističke analize su urađene pomoću *GraphPad Prism 5* programa (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Tabela 4.17.1. Karakteristike antitela korišćenih za western blot analizu.

| | Sekvenca antigena | Naziv antitela | Proizvođač i kataloški broj | Tip Ig | Razblaženje |
|---------------------------------|--|--|--|--------------------------|-------------|
| PRKAc | Humana PKA[Ca] subjedinica aa. 18-347 | Anti- protein kinasa A katalitička subjedinica antitelo, PKAc | BD Transduction Laboratories P73420 MW (PRKAc) = 40 kDa | Mišji monoklonalni IgG2b | 1:250 |
| PRKArα | Humana PKA [R1 α] subjedinica aa. 1-381 | Anti-protein kinasa A regulatorna subjedinica antitelo, PKA (R1 α) | BD Transduction Laboratories P53620 MW (PRKAr) = 48 kDa | Mišji monoklonalni IgG2b | 1:250 |
| StAR | Sintetički polipeptid koji odgovara amino-kiselinskoj sekvenci 88-98 mišjeg StAR proteina | Poliklonalni antiserum protiv StAR proteina | <i>J. Biol. Chem.</i> 269:28314-28322, 1994. | Zečji poliklonalni IgG | 1:500 |
| HSD3B | Recombinantni humani tip II HSD3B (R1484) | Anti- HSD3b antitelo | Sasano et al.1990a, Sasano et al. 1990.b | Zečji poliklonalni IgG | 1:500 |
| NUR77 | Amino-kiselinska sekvenca 59-269 Nur77 proteina mišjeg porekla | Nur77 (M-210) | Santa Cruz Biotechnology Inc sc-5569 MW (Nur77) = 64 kDa | Zečji poliklonalni IgG | 1:50 |
| pNUR77 | Kratka amino-kiselinska sekvenca sa fosforilisanim Ser 341 Nur77 proteina humanog porekla | pNur77 (Ser 341) | Santa Cruz Biotechnology Inc sc-16991R MW (pNur77) = 64 kDa | Zečji poliklonalni IgG | 1:50 |
| ERK1/2 | Sintetički polipeptid (povezan sa KLH) koji odgovara sekvenci C-kraja p44 MAP kinaze pacova | p44/42MAPK (Erk1/2) Antitelo | Cell Signaling Technology #9102 MW (ERK1/2) = 42/44 kDa | Zečji poliklonalni IgG | 1:1000 |
| pERK1/2 | Sintetički fosfopeptid koji odgovara reziduama koja okružuje Thr202/Tyr204 humane p44 MAP kinaze | Fosfo p44/42 MAPK (Erk1/2) Antitelo | Cell Signaling Technology #9101 MW (pERK1/2) = 42/44 kDa | Zečji poliklonalni IgG | 1:1000 |
| P38MAPK | Sintetički polipeptid koji odgovara amino-kiselinskoj sekvenci humane p38 MAPK | P38 MAPK Antitelo | Cell Signaling Technology #9212 MW (P38MAPK) = 43 kDa | Zečji poliklonalni IgG | 1:1000 |
| pP38MAPK | Sintetički fosfopeptid koji odgovara reziduama koja okružuje Thr180/Tyr182 humane p38 kinaze | Fosfo-P38MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antitelo | Cell Signaling Technology #9211 MW (pP38MAPK) = 43 kDa | Zečji poliklonalni IgG | 1:1000 |
| MEK1/2 | Sintetički polipeptid (povezan sa KLH) dobijen od sekvence humane MEK1/2 | MEK1/2 Antitelo | Cell Signaling Technology #9122 MW (MEK1/2) = 45kDa | Zečji poliklonalni IgG | 1:1000 |
| pMEK1/2 | Sintetički polipeptid koji odgovara reziduama koja okružuje Ser 217/221 humane MEK1/2 | Fosfo-MEK1/2 (Ser 217/221) Antitelo | Cell Signaling Technology #9221 MW (pMEK1/2) = 45 kDa | Zečji poliklonalni IgG | 1:1000 |
| SAPK/JNK | Recombinantni humani JNK2 protein | SAPK/JNK Antitelo | Cell Signaling Technology #9252 MW (SAPK/JNK) = 46/54 kDa | Zečji poliklonalni IgG | 1:1000 |

| | | | | | |
|------------------|---|---------------------------------------|---|------------------------|--------|
| pSAPK/JNK | Sintetički fosfopeptid koji odgovara reziduama koja okružuje Thr183/Tyr185 humane SAPK/JNK | Fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)(81E11) | Cell Signaling Technology #4668 MW (pSAPK/JNK) = 46/54 kDa | Zečji poliklonalni IgG | 1:800 |
| AKT | Sintetički polipeptid koji odgovara sekvenci C-kraja mišje Akt kinaze | Akt Antitelo | Cell Signaling Technology #9272 MW (AKT) = 60 kDa | Rabbit polyclonal IgG | 1:1000 |
| pAKT | Sintetički polipeptid koji odgovara reziduama koja okružuje Ser473 mišje Akt kinaze | Fosfo-Akt (Ser473) Antitelo | Cell Signaling Technology #9271 MW (pAKT) = 60 kDa | Rabbit polyclonal IgG | 1:1000 |
| PGC1 | Antitelo protiv amino-kiselinske sekvence 1-300 blizu N-kraja humanog PGC-1 | PGC-1 (H-300) Antitelo | Santa Cruz Biotechnology #sc-13067 MW (PGC1) = 90 kDa | Rabbit polyclonal IgG | 1:100 |
| GAPDH | Antitelo protiv amino-kiselinske sekvence 1-335 GAPDH humanog porekla | GAPDH (FL-335) Antitelo | Santa Cruz Biotechnology #sc-25778 MW (GAPDH) = 37 kDa | Rabbit polyclonal IgG | 1:150 |
| ACTB | Sintetički polipeptid koji odgovara reziduama blizu N-kraja humanog β -actin proteina | β -Actin (D6A8) | Cell Signaling Technology #8457 MW (ACTIN) = 45 kDa | Rabbit monoclonal IgG | 1:500 |

5. Rezultati

U cilju definisanja uloge insulinskog receptora (INSR) i/ili receptor za insulinu sličan faktor rasta 1 (IGF1R) kao model funkcionalne genomike na kom su dobijeni svi rezultati, korišćeni su mužjaci ili ženke miševa sa kondicionalnom delecijom gena za INSR i/ili IGF1R u steroidogenim tkivima, dobijenom aktivnošću Cre rekombinaze pod kontrolom promotora za *Cyp11a1* (*Cyp11a1Cre*). Radi jednostavnijeg navođenja eksperimentalnih grupa u daljem tekstu, uvedene su skraćénice koje se odnose na specifične genotipove, tj. eksperimentalne grupe:

(1) Kontrolna grupa (miševi sledećih genotipova: *Cyp11a1Cre^{-/-} Insr^{wt/fx}Igf1r^{fx/fx}*, *Cyp11a1Cre^{-/-} Insr^{fx/fx}Igf1r^{wt/fx}* i *Cyp11a1Cre^{-/-} Insr^{fx/fx}Igf1r^{fx/fx}*, zbog odsustva delecije u okviru *Insr* i *Igf1r* gena).

(2) *Insr*-SKO (*engl.* *Insr* - single knockout; miševi sa delecijom *Insr* gena - *Cyp11a1Cre⁺ Insr^{fx/fx}Igf1r^{wt/fx}*).

(3) *Igf1r*-SKO (*engl.* *Igf1r* - single knockout; miševi sa delecijom *Igf1r* gena - *Cyp11a1Cre⁺ Insr^{wt/fx} Igf1r^{fx/fx}*).

(4) *Insr/Igf1r*-DKO ili samo **DKO** (*engl.* *Insr/Igf1r* - double knockout; miševi sa delecijom *Insr* i *Igf1r* gena - *Cyp11a1Cre⁺ Insr^{fx/fx}Igf1r^{fx/fx}*).

Svi eksperimenti su rađeni na dve uzrasne kategorije: **prepubertalni miševi stari 21 dan**, koji su obeleženi sa **P21** (21. postnatalni dan), i **adultni miševi stari 80 dana**, koji su obeleženi sa **P80** (80. postnatalni dan). Leydig-ove ćelije izolovane iz P21 mužjaka su dominantno progenitorne (za reference videti Teerds i Huhtaniemi 2015) i obeležene su skraćénicom **P21-LCs** (*engl.* P21-Leydig cells). Ćelije izolovane iz P80 mužjaka su dominantno zrele adultne Leydig-ove ćelije i obeležene su skraćénicom **P80-LCs** (*engl.* P80-Leydig cells). U skladu sa odgovarajućim genotipom i uzrasnom kategorijom životinja iz kojih su izolovane, Leydig-ove ćelije različitih eksperimentalnih grupa su obeležene na sledeći način: **(1) P21-*Insr*-SKO-LCs**, **(2) P21- ili P80-*Igf1r*-SKO-LCs** i **(3) P21- ili P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs**.

5.1. Fenotipske karakteristike muškog reproduktivnog sistema prepubertalnih (P21) i adultnih (P80) miševa sa kondicionalnom delecijom *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima

Neki aspekti fenotipa *Cyp11a1Cre⁺Insr^{fx/fx}Igf1r^{fx/fx}* miševa detaljno su okarakterisani od strane istraživača partnerske grupe (Neijnik i sar. 2018), a tokom istraživanja u okviru ove disertacije praćene su samo osnovne relevantne fenotipske karakteristike miševa uzgajanih u Laboratoriji za reproduktivnu endokrinologiju i signalizaciju (PMF, UNS), kao jedna od potvrda prisustva delecije *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim tkivima.

U cilju praćenja efekta nedostatka INSR/IGF1R na razvoj fenotipa muških reproduktivnih organa mužjaka obe uzrasne kategorije, P21 i P80, merena je masa životinja, masa testisa i vršeno je poređenje veličine semenih vezikula, testisa i epididimisa kod *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa sa kontrolnom grupom.

Kod P21 miševa, uočena je statistički značajna redukcija mase testisa za 50 % kod *Igf1r*-SKO i za 85 % kod *Insr/Igf1r*-DKO miševa u poređenju sa masom testisa u kontrolnoj grupi. Takođe, relativna masa testisa P21 *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa bila je statistički značajno manja (za 43 % i 82 %) od relativne mase testisa kontrolne grupe (Tabela 5.1.1). Kod P80 miševa, masa testisa je statistički značajno smanjena kod *Igf1r*-SKO (za 43 %) i *Insr/Igf1r*-DKO (za 77 %) miševa u poređenju sa masom testisa kontrolne grupe. Relativna masa testisa bila je, takođe, značajno smanjena kod P80 *Igf1r*-SKO (za 40 %) i *Insr/Igf1r*-DKO (za 75 %) miševa u odnosu na relativnu masu u kontrolnoj grupi (Tabela 5.1.2).

Tabela 5.1.1. Telesna masa i masa testisa kod kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO P21 miševa.

| Genotip | Telesna masa (g) | Telesna masa (% od kontrole) | Masa testisa (g) | Masa testisa (% od kontrole) | Relativna masa testisa (g) | Relativna masa testisa (% od kontrole) |
|------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|------------------------------|----------------------------|--|
| Kontrola | 10.00± 0.55 | 100 % ± 5.16 | 0.149 ± 0.002 | 100 % ± 1.76 | 1.40 ± 0.025 | 100 % ± 1.76 |
| <i>Igf1r</i>-SKO | 9.00 ± 1.46 | 84 % ± 11.69 | 0.075 ± 0.001* | 50 % ± 1.68* | 0.83 ± 0.014* | 57 % ± 1.57* |
| <i>Insr/Igf1r</i>-DKO | 8.75 ± 0.73 | 82 % ± 8.30 | 0.023 ± 0.002* | 15 % ± 0.27*# | 0.26 ± 0.001*# | 18 % ± 0.39*# |

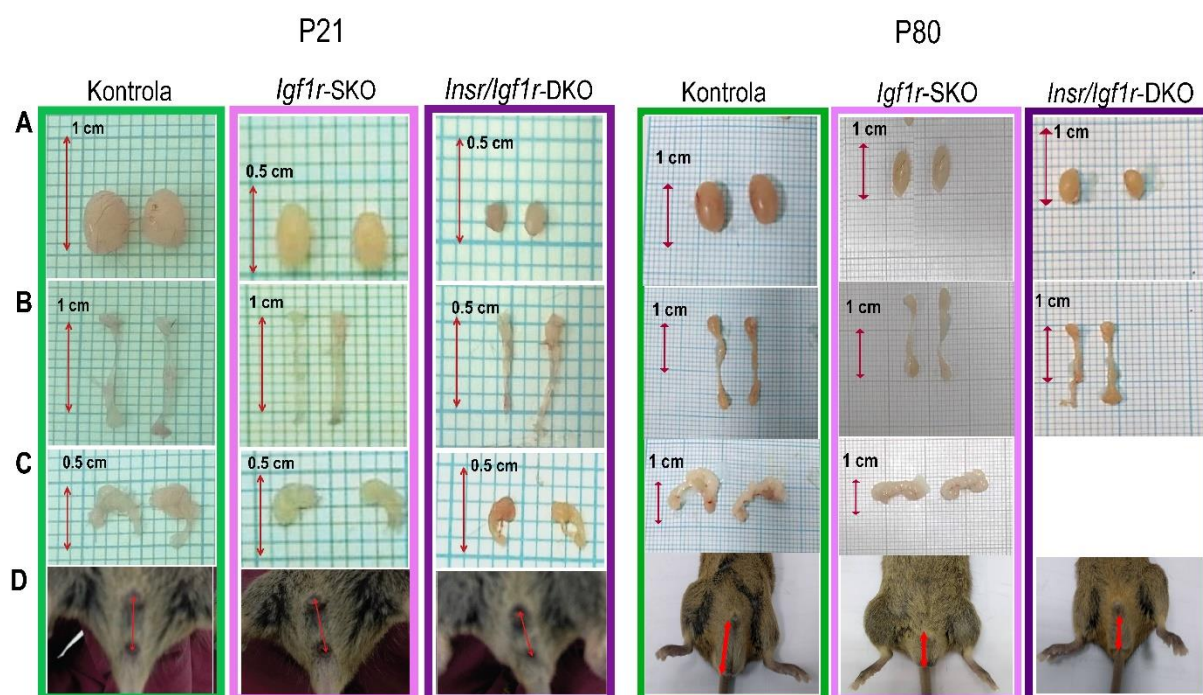
Nivo statističke značajnosti: p<0.05: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, # u odnosu na *Igf1r*-SKO (One-Way ANOVA).

Tabela 5.1.2. Telesna masa i masa testisa kod kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO P80 miševa.

| Genotip | Telesna masa (g) | Telesna masa (% od kontrole) | Masa testisa (g) | Masa testisa (% od kontrole) | Relativna masa testisa (g) | Relativna masa testisa (% od kontrole) |
|------------------------|------------------|------------------------------|------------------|------------------------------|----------------------------|--|
| Kontrola | 30.50 ± 0.68 | 100% ± 2.03 | 0.368 ± 0.001 | 100 ± 0.53 | 1.21 ± 0.003 | 100 ± 1.07 |
| <i>Igf1r</i> -SKO | 28.75 ± 1.66 | 94% ± 5.00 | 0.210 ± 0.0015 | 57 ± 1.07* | 0.73 ± 0.004* | 60 ± 2.18* |
| <i>Insr/Igf1r</i> -DKO | 27.00 ± 0.76 | 89% ± 2.62 | 0.083 ± 0.0003* | 23 ± 1.01*# | 0.31 ± 0.003*# | 25 ± 1.00*# |

Nivo statističke značajnosti: $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, # u odnosu na *Igf1r*-SKO (One-Way ANOVA).

Veličina testisa, epididimisa i semenih vezikula bila je smanjena kod *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa obe uzrasne kategorije (P21 i P80). Semene vezikule P80 *Insr/Igf1r*-DKO miševa nije bilo moguće adekvatno izolovati zbog veoma malih dimenzija i nekompaktnosti tkiva (Slika 5.1.1. A, B, C). Takođe, anogenitalna distanca P21 i P80 *Insr/Igf1r*-DKO miševa bila je smanjena u poređenju sa anogenitalnom distancom kontrolnih miševa. Smanjena anogenitalna distanca primećena je kod P80-*Igf1r*-SKO miševa, dok kod P21-*Igf1r*-SKO nije primećena značajnija promena (Slika 5.1.1.D).



Slika 5.1.1. Veličina reproduktivnih organa kod mužjaka P21 i P80 *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa.

Testisi (A), epididimisi (B) i semene vezikule (C) izolovani iz P21 i P80 kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa. Anogenitalna distanca kod istih životinja (D).

5.2. Efekat kondicionalne delecije *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima na diferencijaciju i funkcionalne karakteristike Leydig-ovih ćelija prepubertalnih (P21) i adultnih (P80) miševa

U cilju definisanja uloge INSR/IGF1R u regulaciji steroidogenog kapaciteta (sposobnost Leydig-ovih ćelija da odgovore na stimulaciju LH/hCG-om) i steroidogene aktivnosti (sposobnost Leydig-ovih ćelija da konvertuju steroidogene supstrate/prekursore do krajnjih produkata - androgena) Leydig-ovih ćelija, P21-LCs i P80-LCs su izolovane iz testisa P21 i P80 mužjaka. Pored toga, primarna kultura P21-LCs i P80-LCs korišćena je u cilju praćenja uloge INSR/IGF1R u regulaciji relativne ekspresije transkripata za steroidogene enzime, relevantne transkripcione aktivatore i represore steroidogeneze, markere diferencijacije Leydig-ovih ćelija i markere diferencijacije muškog i ženskog pola. Osim primarne kulture Leydig-ovih ćelija, steroidogeni represori, markeri diferencijacije pola, kao i ekspresija i aktivnost aromataze, praćeni su i u seminiferim tubulama, STs (*engl.* seminiferous tubules) i tkivu testisa (hemitestisima) u cilju definisanja potencijalnih kompartmentalnih razlika u odgovoru na nedostatak INSR/IGF1R.

5.2.1. Odsustvo INSR i IGF1R utiče na broj Leydig-ovih ćelija izolovanih iz P21 i P80 miševa

Broj izolovanih Leydig-ovih ćelija u primarnoj kulturi bio je statistički značajno smanjen kod *Igf1r*-SKO (za 43 %) i kod *Insr/Igf1r*-DKO (69 %) miševa u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 5.2.1). Takođe, zapažen je i statistički značajno smanjen broj P80-LCs kod *Igf1r*-SKO (za 59 %) i kod *Insr/Igf1r*-DKO (71 %) miševa u poređenju sa brojem Leydig-ovih ćelija u kontrolnoj grupi (Tabela 5.2.2).

Tabela 5.2.1. Broj P21-LCs izolovanih iz *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa.

| Genotip | Prosečan broj izolovanih ćelija u primarnoj kulturi | % u odnosu na kontrolu |
|------------------------------|---|------------------------|
| Kontrola | $0.56 \times 10^6 \pm 0.036 \times 10^6$ | $100\% \pm 6.47$ |
| <i>Igf1r</i>-SKO | $0.32 \times 10^6 \pm 0.028 \times 10^6$ * | $57\% \pm 6.37^*$ |
| <i>Insr/Igf1r</i>-DKO | $0.17 \times 10^6 \pm 0.009 \times 10^6$ *# | $31\% \pm 6.52^{*#}$ |

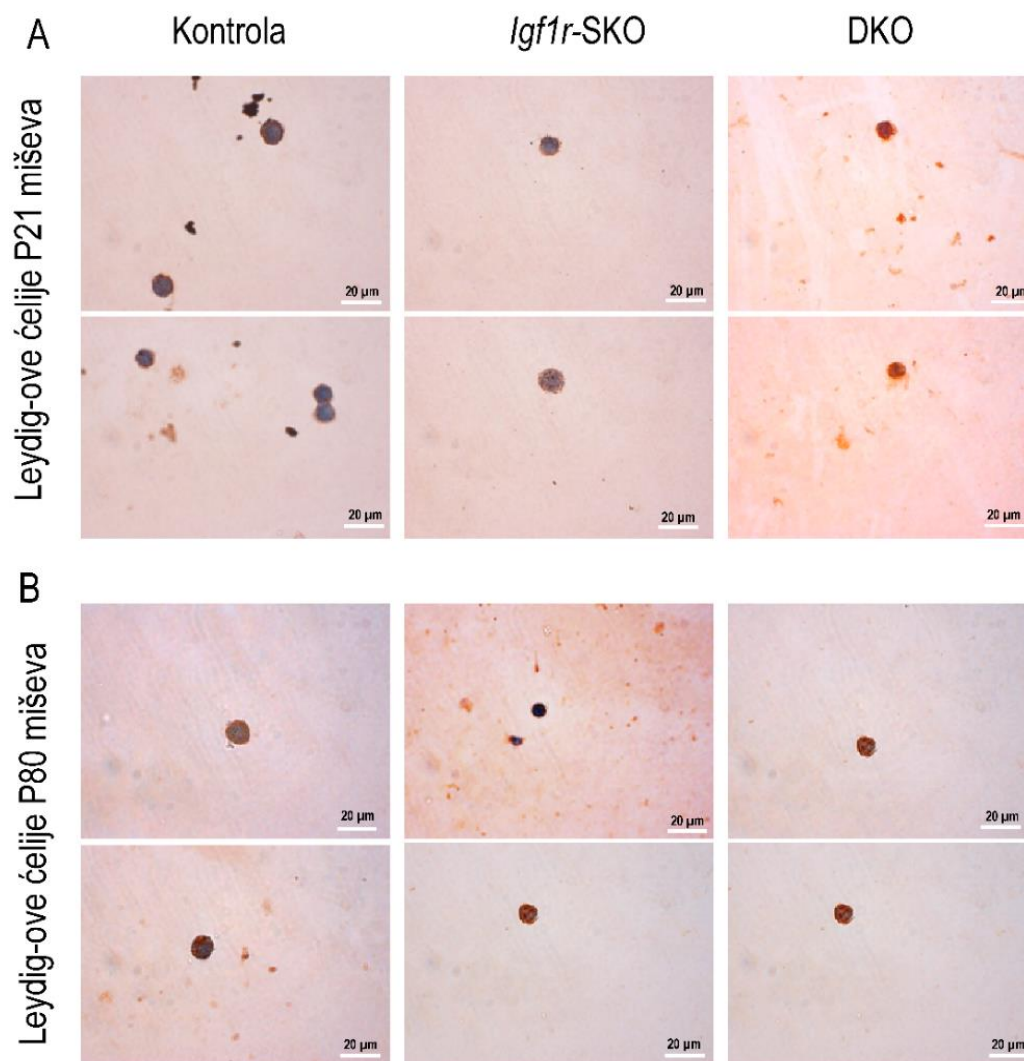
Nivo statističke značajnosti: $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, # u odnosu na *Igf1r*-SKO (One-Way ANOVA).

Tabela 5.2.2. Broj P80-LCs izolovanih iz *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa.

| Genotip | Prosečan broj izolovanih ćelija u primarnoj kulturi | % u odnosu na kontrolu |
|------------------------------|---|------------------------|
| Kontrola | $1.77 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ | $100\% \pm 6.3$ |
| <i>Igf1r</i>-SKO | $0.73 \times 10^6 \pm 0.08 \times 10^6 *$ | $41\% \pm 11.2 *$ |
| <i>Insr/Igf1r</i>-DKO | $0.51 \times 10^6 \pm 0.07 \times 10^6 *$ | $29\% \pm 14.06 *$ |

Nivo statističke značajnosti: $p < 0.05$: * statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu (One-Way ANOVA).

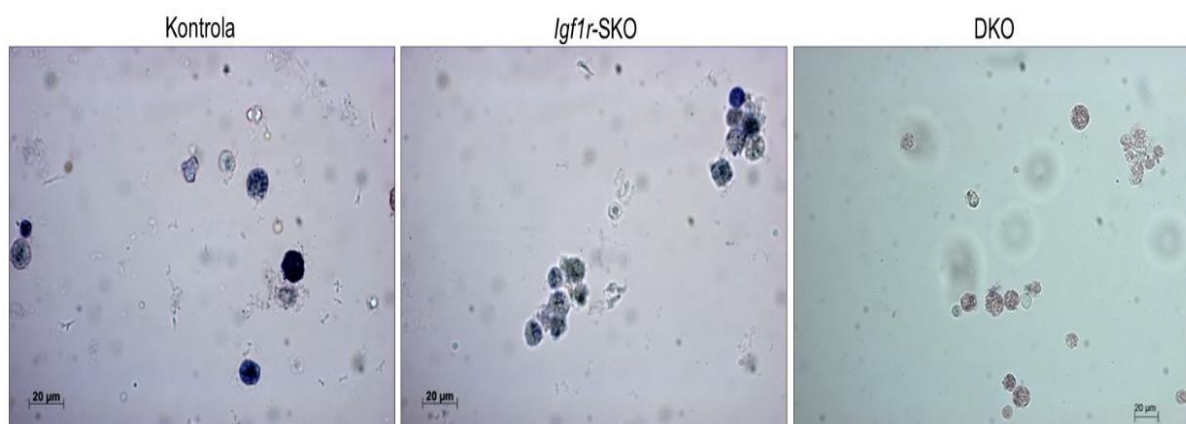
U cilju određivanja procenta Leydig-ovih ćelija u primarnoj ćelijskoj kulturi, rađeno je specifično imunološko bojenje izolovanih ćelija sa HSD3B antitelom. Enzim HSD3B se specifično ekspresuje u Leydig-ovim ćelijama pa je stoga prisustvo ovog proteina korišćeno kao marker za njihovu detekciju. Analiza pripremljenih preparata je urađena korišćenjem uvećanja 630x i 1000x. Na Slika 5.2.1. su prikazane reprezentativne fotografije P21-LCs i P80-LCs kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa, napravljene na uvećanju 1000x. Procenat Leydig-ovih ćelija u primarnoj kulturi izolovanoj iz P21, kao i iz P80 miševa, bio je između 80-95%.



Slika 5.2.1. Specifično imunološko bojenje Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa sa HSD3B antitelom.

Reprezentativne fotografije specifičnog imunološkog bojenja Leydig-ovih ćelija izolovanih iz kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa obe uzrasne kategorije (P21 i P80) sa HSD3B antitelom. Uvećanje: 1000x (20 μ m).

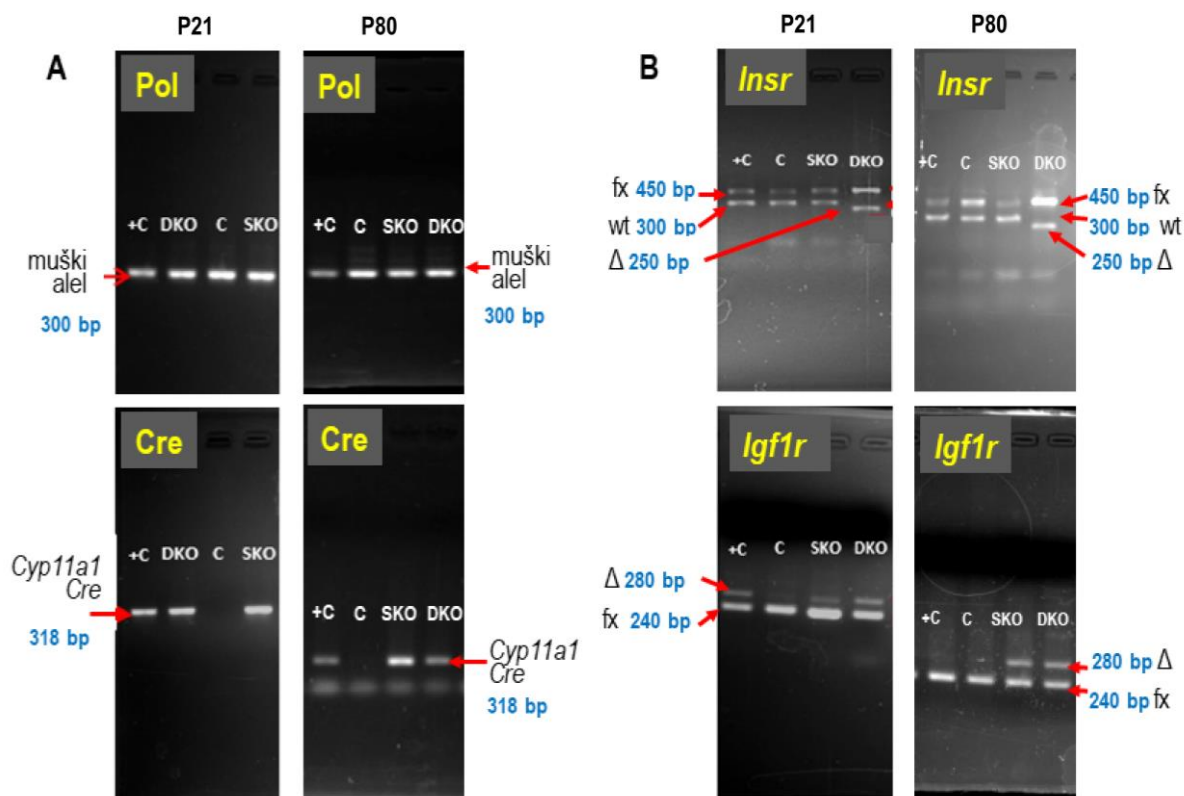
Kao još jedan način specifične potvrde Leydig-ovih ćelija u primarnoj kulturi, praćena je aktivnost enzima HSD3B u P80-LCs izolovanim iz kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa pomoću NBT testa u prisustvu pregnenolona kao specifičnog supstrata. Udeo NBT-pozitivnih ćelija u svim praćenim genotipovima bio je ~ 90 %. Međutim, uočen je manji intenzitet obojenosti (koji ukazuje na manju aktivnost HSD3B) kod P80-*Igf1r*-SKO i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa P80-LCs kontrolnih miševa. Ovo smanjenje bilo je izraženije kod P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (Slika 5.2.2).



Slika 5.2.2. Aktivnost HSD3B enzima u Leydig-ovim ćelijama P80 miševa praćena NBT testom.

Reprezentativne fotografije specifičnog bojenja P80-LCs izolovanih iz kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa u prisustvu pregnenolona i NBT-a. Uvećanje 630x (20 μ m).

Pored određivanja specifične kombinacije alela u celom organizmu miševa korišćenih u eksperimentima, aktivnost Cre rekombinaze i prisustvo specifičnih alela potvrđeni su i u primarnoj kulturi Leydig-ovih ćelija. Kao što je očekivano, klasičnom PCR metodom dobijeni su specifični produkti koji su potvrdili prisustvo sekvence karakteristične za muški pol, *Cyp11a1Cre* rekombinaze, kao i *wt* (*engl.* wild type), *fx* (*engl.* floxed, aleli sa *loxP* sekvencama) i Δ alela za *Insr* i *Igf1r*. Δ predstavlja alel gde je došlo do delecije 4. egzona u okviru *Insr*, odnosno 3. egzona u okviru *Igf1r* gena aktivnošću Cre rekombinaze. Korisno je naglasiti da je heterozigot za *Igf1r* (životinja koja poseduje i *wt* i *fx* alele), pa samim tim i miševi genotipa *Insr*-SKO, spontano izgubljen u populaciji. Genotipovi na nivou primarne kulture P21-LCs/P80-LCs koji odgovaraju genotipovima kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa u celom organizmu su sledeći: *Cyp11a1Cre⁻Insr^{wt/fx(fx/fx)}Igf1r^{fx/fx}* (kontrolna grupa), *Cyp11a1Cre⁺Insr^{wt/fx}Igf1r^{fx/\Delta}* (*Igf1r*-SKO), *Cyp11a1Cre⁺Insr^{fx/\Delta}Igf1r^{fx/\Delta}* (*Insr/Igf1r*-DKO) (Slika 5.2.3. A i B).



Slika 5.2.3. Genotipizacija Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa.

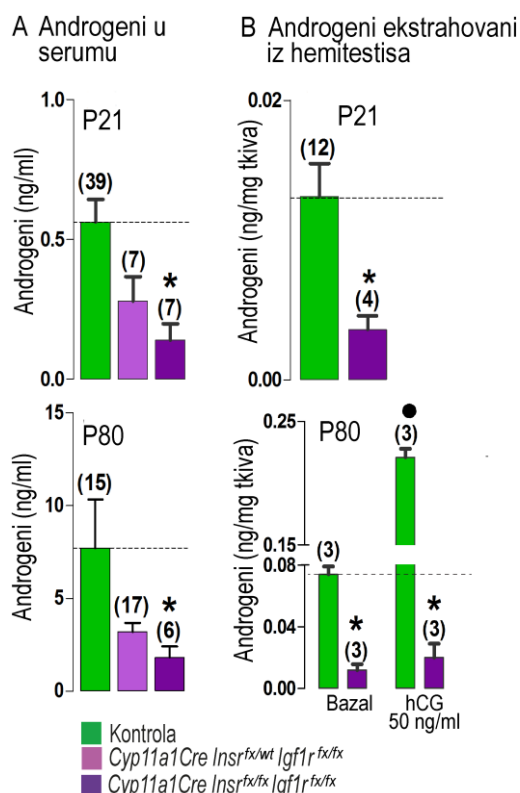
Fotografije PCR produkata genotipizacije Leydig-ovih ćelija sa specifičnim prajmerima za *pol*, *Cyp11a1Cre* rekombinazu (A), *Insr* i *Igf1r* (B) koje pokazuju specifične kombinacije alela tipične za genotip kontrolnih (C), *Igf1r*-SKO-LCs (SKO) i *Insr/Igf1r*-DKO-LCs (DKO). Genomska DNK *Igf1r*-SKO miševa, čiji je genotip ranije određen, korišćen je kao pozitivna kontrola (+C) jer poseduje *Cyp11a1Cre* alel, *wt* i *fx* alele za *Insr*, kao i *fx* i Δ alele za *Igf1r*. DNK fragmenti su razdvajani korišćenjem 2% ili 1% agaroznog gela.

5.2.2. Odsustvo INSR/IGF1R narušava steroidogenezu u testisima i smanjuje funkcionalnost Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa

U cilju praćenja uloge INSR/IGF1R u regulaciji testikularne steroidogeneze, meren je nivo androgena u serumu P21 i P80 miševa. Pored toga, određena je i koncentracija androgena ekstrahovanih iz tkiva testisa miševa obe uzrasne kategorije. Važno je napomenuti da su androstendion i androsteron najdominantniji produkti Leydig-ovih ćelija u prepubertalnom period, dok produkcija testosterona raste tokom puberteta (za reference pogledati Teerds i Huhtaniemi 2015).

Nivo serumskih androgena kod *Insr/Igf1r*-DKO miševa obe uzrasne kategorije, P21 i P80, bio je značajno smanjen u poređenju sa nivoom u serumu kontrolnih miševa. Nije bilo statistički značajne promene u koncentraciji serumskih androgena kod P21 i P80 *Igf1r*-SKO miševa u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 5.2.4. A). Koncentracija androgena

ekstrahovanih iz tkiva testisa bila je statistički značajno smanjena kod P21-*Insr/Igf1r*-DKO miševa u poređenju sa koncentracijom u kontrolnoj grupi (Slika 5.2.4. B). Koncentracija androgena ekstrahovanih iz tkiva testisa P80 miševa, u bazalnim i hCG-stimulisanim uslovima, bila je smanjena kod *Insr/Igf1r*-DKO miševa u poređenju sa koncentracijom u kontrolnoj grupi. Odgovor na stimulaciju hCG-om izostao je u testisima izolovanim iz *Insr/Igf1r*-DKO miševa, dok je produkcija androgena u prisustvu hCG-a bila značajno povećana u testisima miševa kontrolne grupe (Slika 5.2.4. B).



Slika 5.2.4. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima smanjuje koncentraciju androgena u serumu i testisima P21 i P80 miševa.

Nivo androgena u serumu je značajno redukovao kod obe uzrasne kategorije (P21 i P80) *Insr/Igf1r*-DKO mužjaka u poređenju sa kontrolnom grupom (A). Nivo androgena ekstrahovanih iz tkiva testisa bio je značajno smanjen kod P21 i P80 *Insr/Igf1r*-DKO mužjaka (B).

Koncentracija androgena u serumu i androgena ekstrahovanih iz tkiva testisa merena je RIA metodom. Rezultati su analizirani neparametarskim Man Whitney testom. Stubiči predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, ● u odnosu na bazal.

Pored koncentracije androgena u serumu i tkivu testisa, merena je produkcija ovih hormona od strane P21-LCs i P80-LCs u primarnoj kulturi, u (1) bazalnim uslovima, (2) nakon stimulacije hCG-om (za praćenje steroidogenog kapaciteta, tj. produkcija androgena u

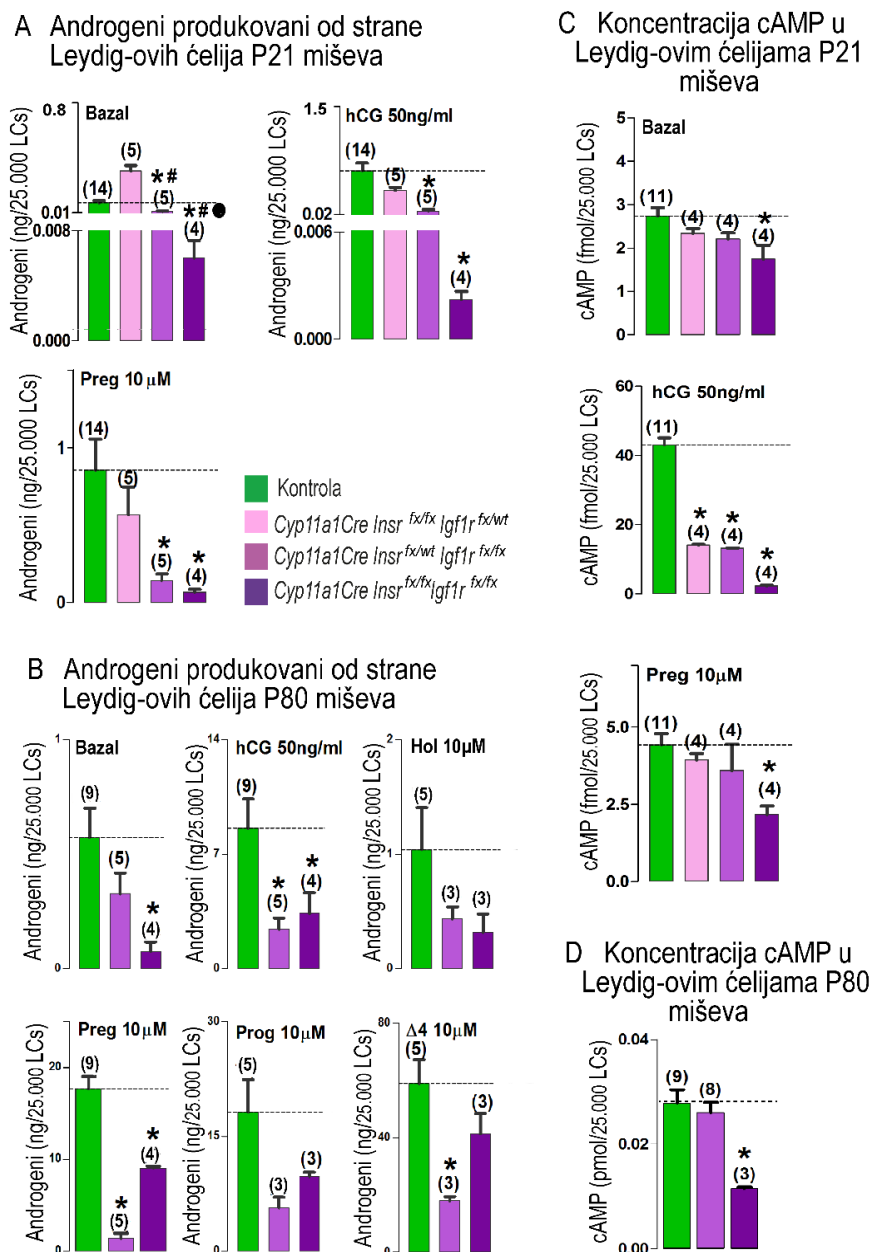
odgovoru na aktiviranje LHCGR), ili (3) nakon stimulacije različitim steroidogenim supstratima (za procenu steroidogene aktivnosti, tj. sposobnosti ovih ćelija da konvertuju steroidogene supstrate u androgene).

Produkcija androgena od strane P21-LCs, u bazalnim uslovima, bila je značajno smanjena kod *Igf1r*-SKO (4x) i *Insr/Igf1r*-DKO (13,3x) miševa u odnosu na koncentraciju androgena produkovanih od strane P21-LCs kontrolnih miševa (Slika 5.2.5. A). Steroidogeni kapacitet (u prisustvu 50 ng/ml hCG) i steroidogena aktivnost (u prisustvu 10 μ M pregnenolona) bili su statistički značajno smanjeni u P21-*Igf1r*-SKO-LCs (9,32x i 5,98x) i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (278x i 12,72x) u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe. Pojedninačna delecija *Insr* nije imala efekta na produkciju androgena ni u jednom od navedenih uslova (Slika 5.2.5. A).

Produkcija androgena od strane P80-LCs u bazalnim uslovima bila je statistički značajno smanjena samo u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (7,61x), dok pojedninačna delecija *Igf1r* nije imala značajnog efekta. Steroidogeni kapacitet i aktivnost (u prisustvu 10 μ M pregnenolona) u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs bili su značajno smanjeni (2,54x i 1,96x) u poređenju sa P80-LCs kontrolne grupe. Pojedninačna delecija *Igf1r* uzrokovala je smanjenu produkciju androgena od strane P80-*Igf1r*-SKO-LCs u prisustvu 10 μ M pregnenolona i 10 μ M Δ^4 (Slika 5.2.5. B). Efekat odsustva INSR/IGF1R na steroidogeni kapacitet i aktivnost (u prisustvu 10 μ M pregnenolona) bio je izraženiji u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Bazalna produkcija androgena bila je smanjena 13,3x u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, a 7,61x u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Steroidogeni kapacitet bio je smanjen 278x u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i 2,54x u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Steroidogena aktivnost u prisustvu 10 μ M pregnenolona bila je smanjena 12,72x u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i 1,96x u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs.

Osim steroidogenog kapaciteta i aktivnosti, određena je i koncentracija jednog od glavnih signalnih molekula u regulaciji steroidogeneze, cAMP, u sadržaju P21-LCs i P80-LCs. Koncentracija cAMP-a u P21-*Insr*-SKO-LCs, P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, u bazalnim uslovima, bila je statistički značajno smanjena u poređenju sa koncentracijom u P21-LCs kontrolne grupe. U prisustvu 50 ng/ml hCG-a, koncentracija cAMP bila je značajno smanjena u P21-*Insr*-SKO-LCs, P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe. U prisustvu 10 μ M pregnenolona, koncentracija cAMP bila je značajno smanjena samo u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Nije bilo statistički značajne promene u koncentraciji cAMP-a u P21-*Insr*-SKO-LCs i P21-*Igf1r*-SKO-

LCs u istim uslovima (Slika 5.2.5. C). Koncentracija cAMP-a u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs bila je značajno smanjena, a u P80-*Igf1r*-SKO-LCs nepromenjena u poređenju sa koncentracijom u P80-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.5. D).



Slika 5.2.5. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima smanjuje steroidogeni kapacitet, steroidogenu aktivnost i koncentraciju cAMP u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa.

Steroidogeni kapacitet i aktivnost P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs su značajno smanjeni u bazalnim uslovima i u prisustvu hCG/Preg (A). Slične promene su prisutne u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u bazalnim uslovima i u prisustvu hCG/Hol/Preg/Prog/Δ⁴ (B). Koncentracija cAMP je značajno smanjena u ćelijskom sadržaju P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (C) i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (D).

P21-LCs i P80-LCs su inkubirane u baznim uslovima ili u prisustvu 50ng/ml hCG, 10μM holesterola (Hol), 10μM pregnenolona (Preg), 10μM progesterona (Prog) ili 10μM androstendiona (Δ⁴). Nivo androgena je meren RIA metodom, a koncentracija cAMP EIA metodom. Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost ± SEM. Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, # u odnosu na *Insr*-SKO, • u odnosu na *Igf1r*-SKO.

5.2.3. INSR/IGF1R regulišu transkripcioni profil gena za elemente steroidogene mašinerije i relevantne transkripcione faktore u Leydigovim ćelijama P21 i P80 miševa

Da bi se uočile promene uzrokovane nedostatkom INSR/IGF1R koje mogu uticati na steroidogenu funkciju Leydig-ovih ćelija, praćena je transkripcija gena za elemente steroidogene mašinerije u P21-LCs i P80-LCs: (1) *Lhcgr*; (2) geni za proteine uključene u preuzimanje i transport holesterola (*Scarb1*, *Star*); (3) geni za enzime zadužene za biosintezu androgena (*Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*, *Hsd3b6*, *Hsd17b3*); (4) geni za relevantne transkripcione aktivatore (*Creb1*, *Sf1*, *Nur77*, *Gata4*) i steroidne receptore (*Ar*, *Er1*, *Er2*) uključene u regulaciju razvoja i steroidogeneze Leydig-ovih ćelija; (5) geni za glavni marker funkcionalnosti Leydig-ovih ćelija (*Insl3*) i njegov receptor (*Rxfpr2*).

Relativna ekspresija *Lhcgr* transkripta, kao i transkripata svih gena za steroidogene enzime, bila je značajno smanjena u P21-*Insr*-SKO-LCs, P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa ekspresijom u P21-LCs kontrolnih miševa. Ekspresija *Scarb1* i *Star* transkripata bila je smanjena samo u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe. Pojedinačna delecija *Insr* ili *Igf1r* nije imala uticaja na njihovu ekspresiju (Slika 5.2.6. A). Ekspresija transkripta za *Insl3*, kao glavnog markera funkcionalnosti Leydig-ovih ćelija, bila je značajno smanjena u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na ekspresiju u P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.6 A), dok je ekspresija *Rxfpr2* ostala nepromenjena (rezultati nisu prikazani).

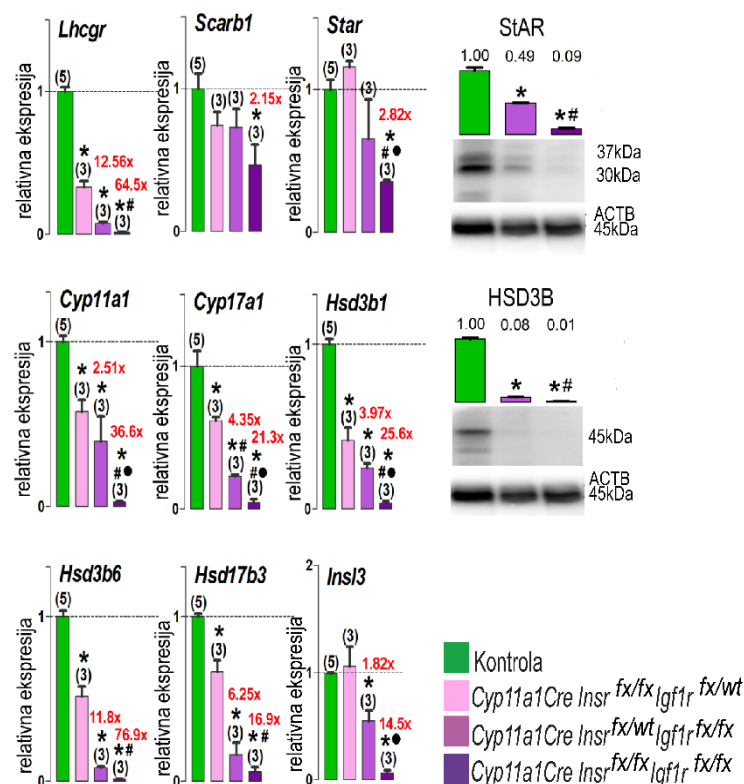
Ekspresija *Lhcgr*, *Star* i transkripata svih gena za steroidogene enzime u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs bila je statistički značajno smanjena, dok je ekspresija *Scarb1* ostala nepromenjena, u odnosu na ekspresiju u P21-LCs kontrolnih miševa. U P80-*Igf1r*-SKO-LCs, uočena je značajno smanjena ekspresija *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b6* i *Hsd17b3* u odnosu na P80-LCs kontrolne grupe. Pojedinačna delecija *Igf1r* nije imala efekta na transkripciju ostalih gena (Slika 5.2.6. B). Ekspresija *Insl3* je bila značajno smanjena u P80-*Igf1r*-SKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.6. B), ali je ekspresija *Rxfpr2* bila nepromenjena kod oba genotipa (rezultati nisu prikazani).

Važno je napomenuti da je razlika u smanjenju relativne ekspresije *Lhcgr*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*, *Hsd3b6* i *Hsd17b3* transkripata, između *Insr/Igf1r*-DKO-LCs i Leydig-ovih ćelija kontrolne grupe, izraženija kod P21 nego kod P80 miševa. Takođe, smanjenje

relativne ekspresije transkripata bilo je izraženije u P21/P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs nego u P21-*Insr*-SKO-LCs i P21/P80-*Igf1r*-SKO-LCs, što potvrđuje da pojedinačne delecije *Insr* ili *Igf1r* imaju manji uticaj na transkripciju ovih gena.

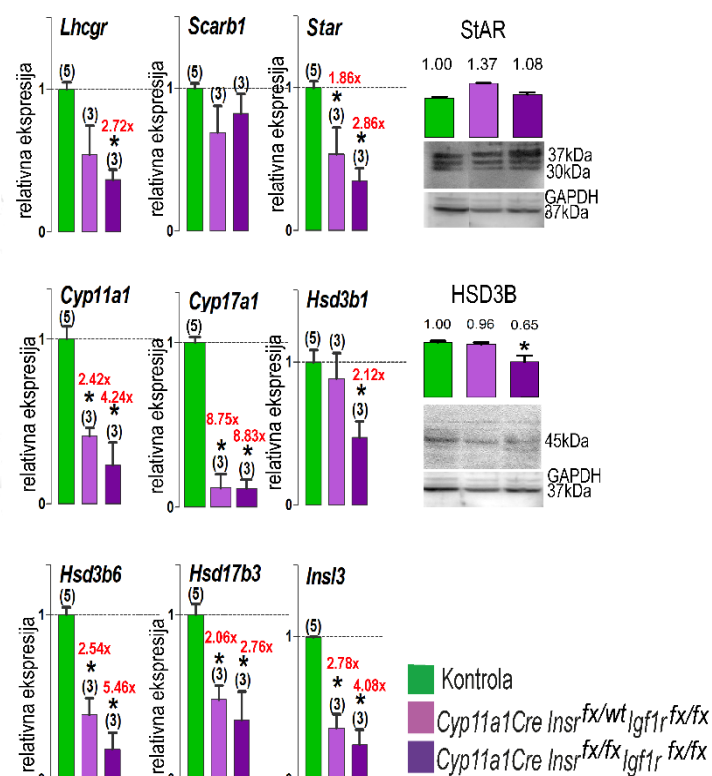
Relativna ekspresija StAR i HSD3B proteina bila je značajno smanjena u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa ekspresijom u P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.6. A). U P80-LCs oba genotipa (*Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO) nije uočena statistički značajna promena u ekspresiji StAR proteina, dok je ekspresija HSD3B bila značajno smanjena samo u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (Slika 5.2.6. B).

A Elementi steroidogene mašinerije i glavni marker funkcionalnosti Leydig-ovih ćelija P21 miševa



Slika 5.2.6. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima remeti transkripcijski profil glavnih markera steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa.

B Elementi steroidogene mašinerije i glavni marker funkcionalnosti Leydig-ovih ćelija P80 miševa



Relativna ekspresija transkripata za steroidogene enzime i glavni marker funkcionalnosti smanjena je u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (A), kao i u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (B) u poređenju sa kontrolnom grupom.

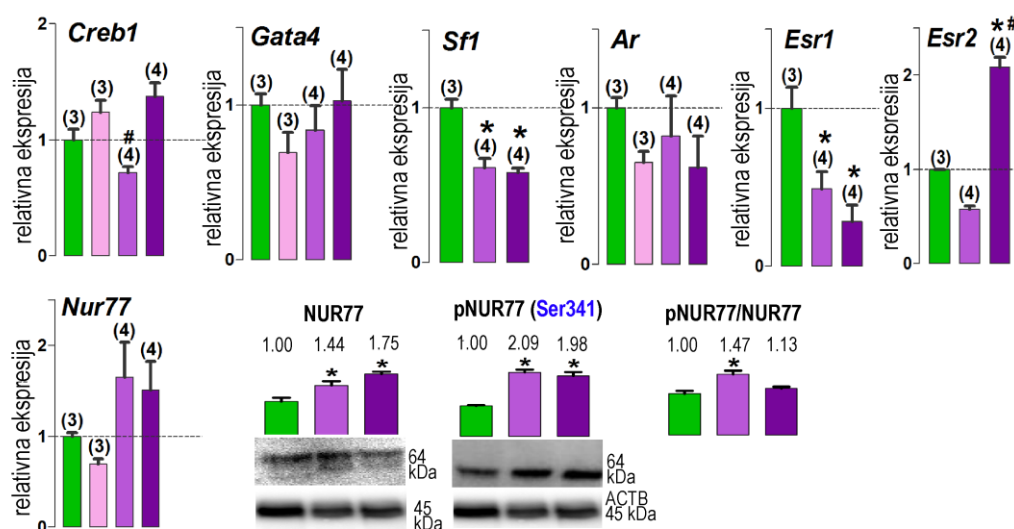
Relativna ekspresija transkripata je praćena RQ-PCR metodom. Relativna ekspresija proteina praćena je western blot metodom i prikazane su reprezentativne fotografije dobijenih specifičnih imuno-reaktivnih traka, dok su podaci dobijeni merenjem optičke gutine traka normalizovani na ACTB/GAPDH kao internu kontrolu i predstavljeni kao stubići iznad fotografija. Specifične imuno-reaktivne trake su, kao dvodimenzionalne slike, analizirani pomoću *ImageJ* programa (verzija 1.48). Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu; # u odnosu na *Insr*-SKO; • u odnosu na *Igf1r*-SKO.

Analizom relativne ekspresije transkripata za transkripcione faktore uključene u regulaciju razvoja i steroidogeneze Leydig-ovih ćelija, pokazano je da je ekspresija *Sfl* i *Esr1* transkripata bila statistički značajno smanjena u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Ekspresija *Esr2* bila je značajno povećana samo u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na ekspresiju u P21-LCs kontrolne grupe. *Creb1*, *Nur77*, *Gata4* i *Ar* su ostali nepromenjeni u P21-LCs oba genotipa u poređenju P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.7. A).

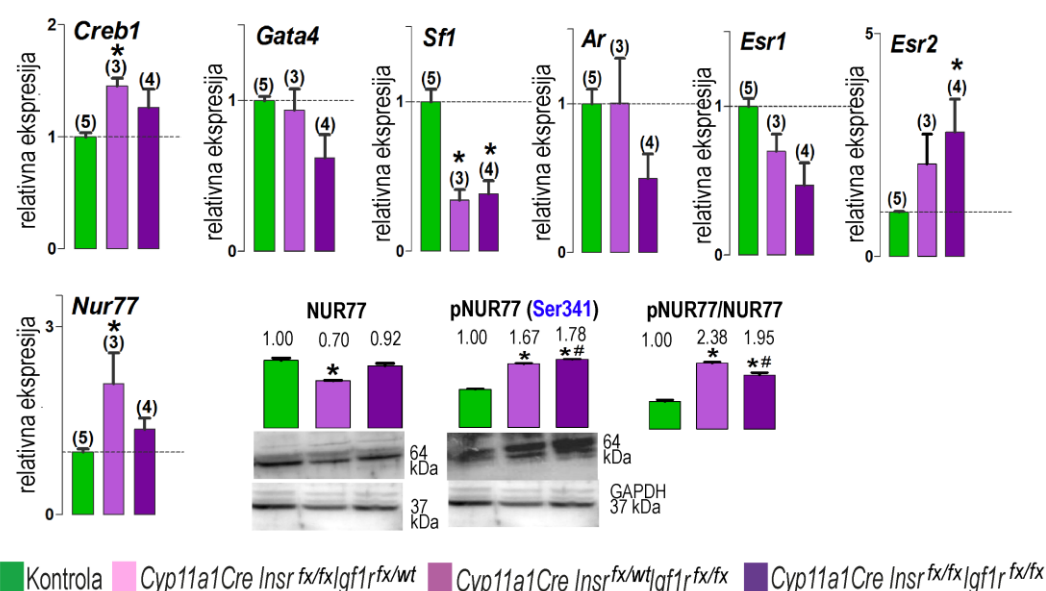
Ekspresija *Sfl* transkripta bila je značajno smanjena u P80-*Igf1r*-SKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, dok je ekspresija *Esr2* bila povećana u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Kao i kod P21-LCs, *Creb1*, *Gata4* i *Ar* su ostali nepromenjeni u P80-LCs oba genotipa. Transkripcija *Nur77* bila je povećana u P80-*Igf1r*-SKO-LCs, ali je ostala nepromenjena u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.7. B).

Ekspresija NUR77 proteina i njegove fosforilisane forme pNUR77 (Ser-341) praćena je u P21-LCs i P80-LCs. Iako bez značajne promene na nivou relativne ekspresije transkripta, značajno povećana ekspresija NUR77 i pNUR77 uočena je u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, dok je odnos pNUR77/NUR77 bio značajno povećan samo u P21-*Igf1r*-SKO-LCs u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.7. A). Ekspresija pNUR77 bila je značajno povećana u P80-*Igf1r*-SKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, ali je ekspresija nefosforilisane forme bila značajno smanjena u P80-*Igf1r*-SKO-LCs i nepromenjena u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. U skladu sa tim, u istim ćelijama je uočeno i značajno povećanje pNUR77/NUR77 odnosa u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.7. B).

A Transkripcijski faktori u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa



B Transkripcijski faktori u Leydig-ovim ćelijama P80 miševa



■ Kontrola ■ *Cyp11a1Cre Insr^{fx/fx}Igf1r^{fx/wt}* ■ *Cyp11a1Cre Insr^{fx/wt}Igf1r^{fx/fx}* ■ *Cyp11a1Cre Insr^{fx/fx}Igf1r^{fx/fx}*

Slika 5.2.7. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima menja profil transkripcije gena za transkripcijske aktivatore uključene u regulaciju steroidogene funkcije Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa.

Utjecaj delecije *Insr* i *Igf1r* gena na transkripciju gena za transkripcijske faktore i marker funkcionalnosti, *Insl3*, u Leydig-ovim ćelijama P21 (A) i P80 (B) miševa.

Relativna ekspresija transkriptata praćena je RQ-PCR metodom. Relativna ekspresija proteina praćena je western blot metodom i prikazane su reprezentativne fotografije dobijenih specifičnih imuno-reaktivnih traka, dok su podaci dobijeni merenjem optičke gutine traka normalizovani na ACTB/GAPDH kao internu kontrolu i predstavljeni su kao stubići iznad fotografija. Specifične imuno-reaktivne trake su, kao dvodimenzionalne slike, analizirani pomoću *ImageJ* programa (verzija 1.48). Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost ± SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu; # u odnosu na *Igf1r*-SKO.

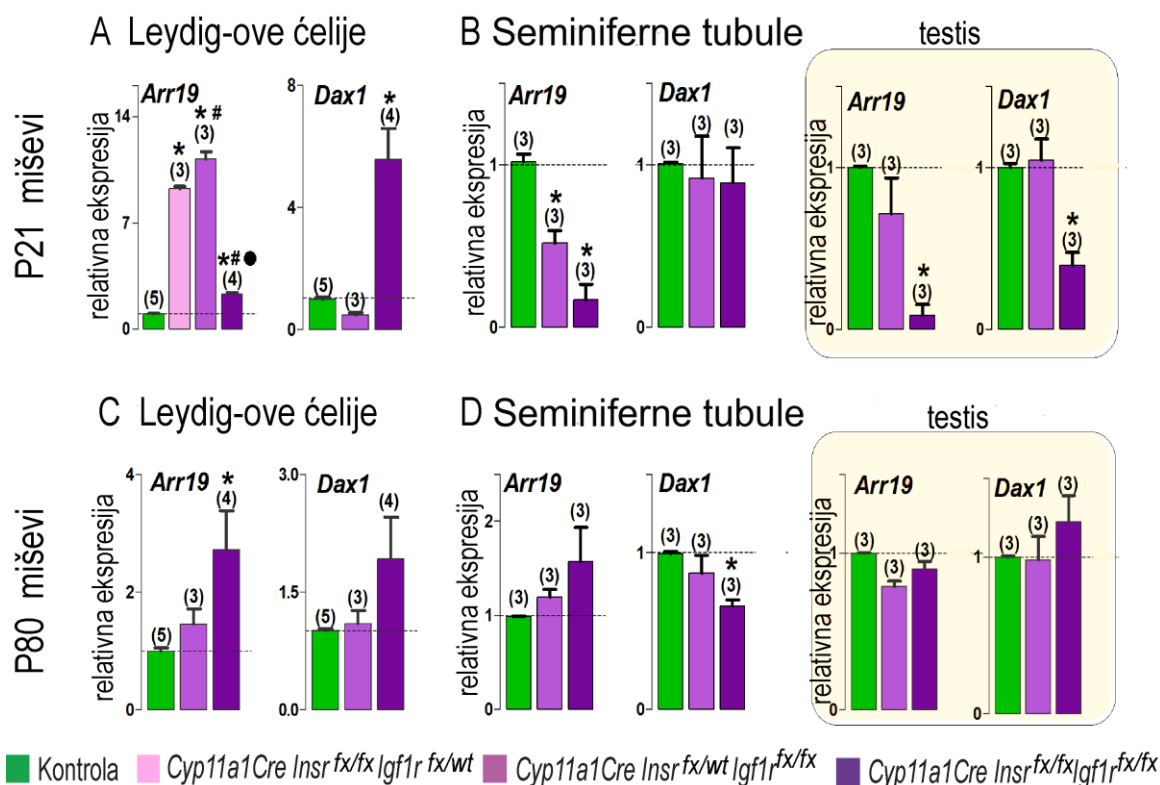
5.2.4. Odsustvo INSR/IGF1R u steroidogenim tkivima povećava transkripciju gena za glavne steroidogene represore (*Arr19* i *Dax1*) specifično u Leydig-ovim ćelijama, ali ne i u seminiferim tubulama, P21 i P80 miševa

ARR19 i DAX1 su poznati kao najmarkantniji negativni regulatori steroidogeneze Leydig-ovih ćelija. Prema tome, relativna ekspresija *Arr19* i *Dax1* praćena je u Leydig-ovim ćelijama, seminiferim tubulama (STs) i tkivu testisa P21 i P80 miševa da bi se uočile potencijalne razlike efekta delecije *Insr/Igf1r* na nivou različitih testikularnih kompartmenata.

Analizom relativne genske ekspresije, pokazano je da je ekspresija *Arr19* transkripta bila značajno povećana u P21-*Insr*-SKO-LCs, P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, dok je transkripcija *Dax1* bila značajno povećana samo u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na ekspresiju u P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.8. A). Suprotno tome, transkripcija *Arr19* bila je značajno smanjena u P21-*Igf1r*-SKO-STs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-STs u odnosu na P21-STs kontrolne grupe. Transkripcija *Dax1* ostala je nepromenjena, što ukazuje na moguću suprotnu ulogu INSR/IGF1R u regulaciji ovih gena u Leydig-ovim ćelijama i STs (Slika 5.2.8. B). Transkripcija *Arr19* i *Dax1* u tkivu testisa P21-*Insr/Igf1r*-DKO miševa bila je značajno smanjena u poređenju sa testisima kontrolne grupe. Nije uočena značajna promena ekspresije ovih transkripata u testisima P21-*Igf1r*-SKO miševa (Slika 5.2.8, gornji isečak).

Značajno povećana relativna ekspresija *Arr19* transkripta uočena je i u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na ekspresiju u P80-LCs kontrolnih životinja, dok je transkripcija *Dax1* ostala nepromenjena, sa tendencijom porasta. Promene u ekspresiji ova dva transkripta u P80-*Igf1r*-SKO-LCs nisu uočene (Slika 5.2.8. C). Transkripcija *Dax1* bila je značajno smanjena u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-STs u poređenju sa P80-STs kontrolne grupe, dok je *Arr19* imao trend povećane ekspresije. Slično Leydig-ovim ćelijama, ekspresija ovih gena u P80-*Igf1r*-SKO-STs nije bila statistički značajno promenjena (Slika 5.2.8. D). Nisu uočene značajne promene transkripcije ovih gena ni kod jednog genotipa u testisima P80 miševa (Slika 5.2.8, donji isečak).

Stepen povećanja relativne ekspresije *Arr19* transkripta u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe) i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (u odnosu na P80-LCs kontrolne grupe) bio je sličan (2,35x i 2,73x). Relativno povećanje ekspresije *Dax1* bilo je znatno izraženije u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (5,57x) nego u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (1,92x).



Slika 5.2.8. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima menja transkripcijski profil gena za glavne steroidogene represore (*Arr19* i *Dax1*) u Leydig-ovim ćelijama i seminifernim tubulama P21 i P80 miševa.

Ekspresija *Arr19* i *Dax1* značajno je povećana u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (A), smanjena (*Arr19*) ili jednaka (*Dax1*) u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-STs (B) i smanjena u testisima P21 *Insr/Igf1r*-DKO miševa (gornji isečak). Ekspresija istih gena u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs je povećana (C), smanjena (*Dax1*) ili nepromenjena (*Arr19*) u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-STs (D) i nepromenjena u testisima P80 *Insr/Igf1r*-DKO miševa (donji isečak).

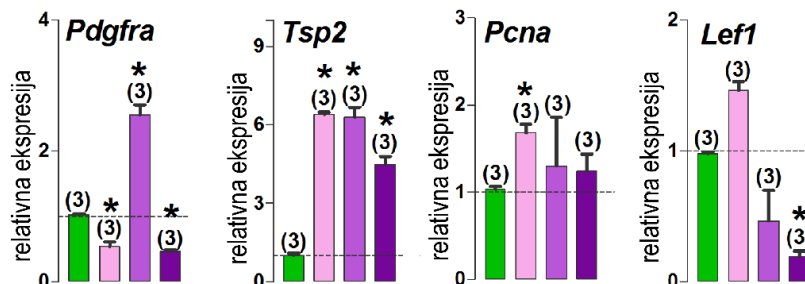
Relativna ekspresija transkriptata je praćena RQ-PCR metodom. Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua je naveden iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu; # u odnosu na *Insr*-SKO; • u odnosu na *Igf1r*-SKO.

5.2.5. INSR/IGF1R utiču na ekspresiju genskih markera matičnih ćelija u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa

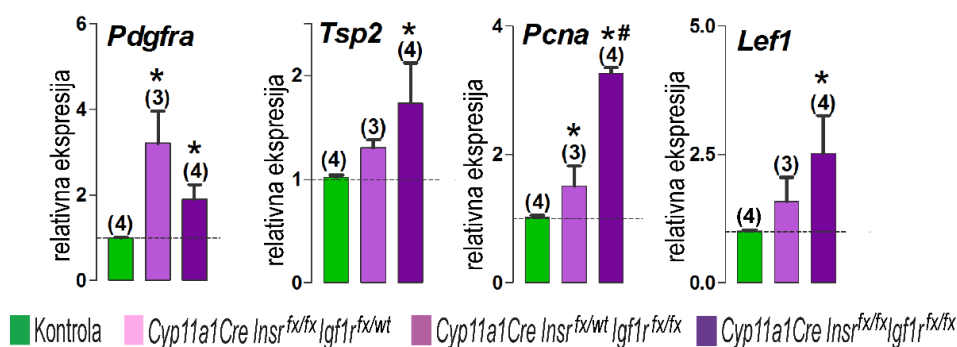
S obzirom na saznanja koja ukazuju na postojanje određenog procenta matičnih Leydig-ovih ćelija u intersticijumu testisa tokom celog života (za reference pogledati Shima i Morohashi 2018), kao i na uočen manji efekat nedostatka INSR/IGF1R u P80-LCs u odnosu na P21-LCs, u obe ćelijske populacije je praćena ekspresija markera matičnih ćelija važnih u proliferaciji i diferencijaciji Leydig-ovih ćelija (*Pdgfra*, *Tsp2*, *Pcna*, *Lef1*, *Couptf1*, *Couptf2*, *Kit*, *Kitl*).

Relativna ekspresija *Tsp2* transkripta u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs bila je statistički značajno povećana, a transkripcija *Pdgfra* i *Lef1* (*engl.* lymphoid enhancer-binding factor 1) značajno smanjena u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe. U P21-*Insr*-SKO-LCs, uočena je značajno povećana transkripcija *Tsp2* i *Pcna*, kao i značajno smanjena transkripcija *Pdgfra*. U P21-*Igf1r*-SKO-LCs, uočeno je povećanje transkripcije *Tsp2* i *Pdgfra*. Transkripcija *Lef1* ostala je nepromenjena u P21-*Insr*-SKO-LCs i P21-*Igf1r*-SKO-LCs u odnosu na transkripciju u P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.9. A). Ekspresija *Tsp2*, *Pdgfra*, *Lef1* i *Pcna* transkripata bila je povećana u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe. U P80-*Igf1r*-SKO-LCs, uočena je značajno povećana ekspresija *Pdgfra* i *Pcna* transkripata. Ekspresija *Lef1* bila je nepromenjena u P80-*Igf1r*-SKO-LCs u poređenju sa ekspresijom u P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.9. B). Stepem povećanja transkripcije *Pdgfra* bio je veći u P21-*Igf1r*-SKO-LCs u odnosu na P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, a sličan odnos je prisutan i kod P80-LCs ova dva genotipa. Ekspresija *Couptf1* i *Couptf2* (*Nr2f1*), *Kit* i *Kitl* transkripata ostala je nepromenjena u P80-LCs oba genotipa (rezultati nisu prikazani).

A Markeri proliferacije i diferencijacije u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa



B Markeri proliferacije i diferencijacije u Leydig-ovim ćelijama P80 miševa



Slika 5.2.9. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima menja transkripcioni profil genskih markera proliferacije i diferencijacije u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa.

Izmenjeni obrazac relativne ekspresije transkripata glavnih markera proliferacije i diferencijacije u populaciji P21-LCs (A) i P80-LCs (B) *Insr*-SKO, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa.

Relativna ekspresija transkripata je praćena sa RQ-PCR metodom. Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua je naveden iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, # u odnosu na *Igf1r*-SKO.

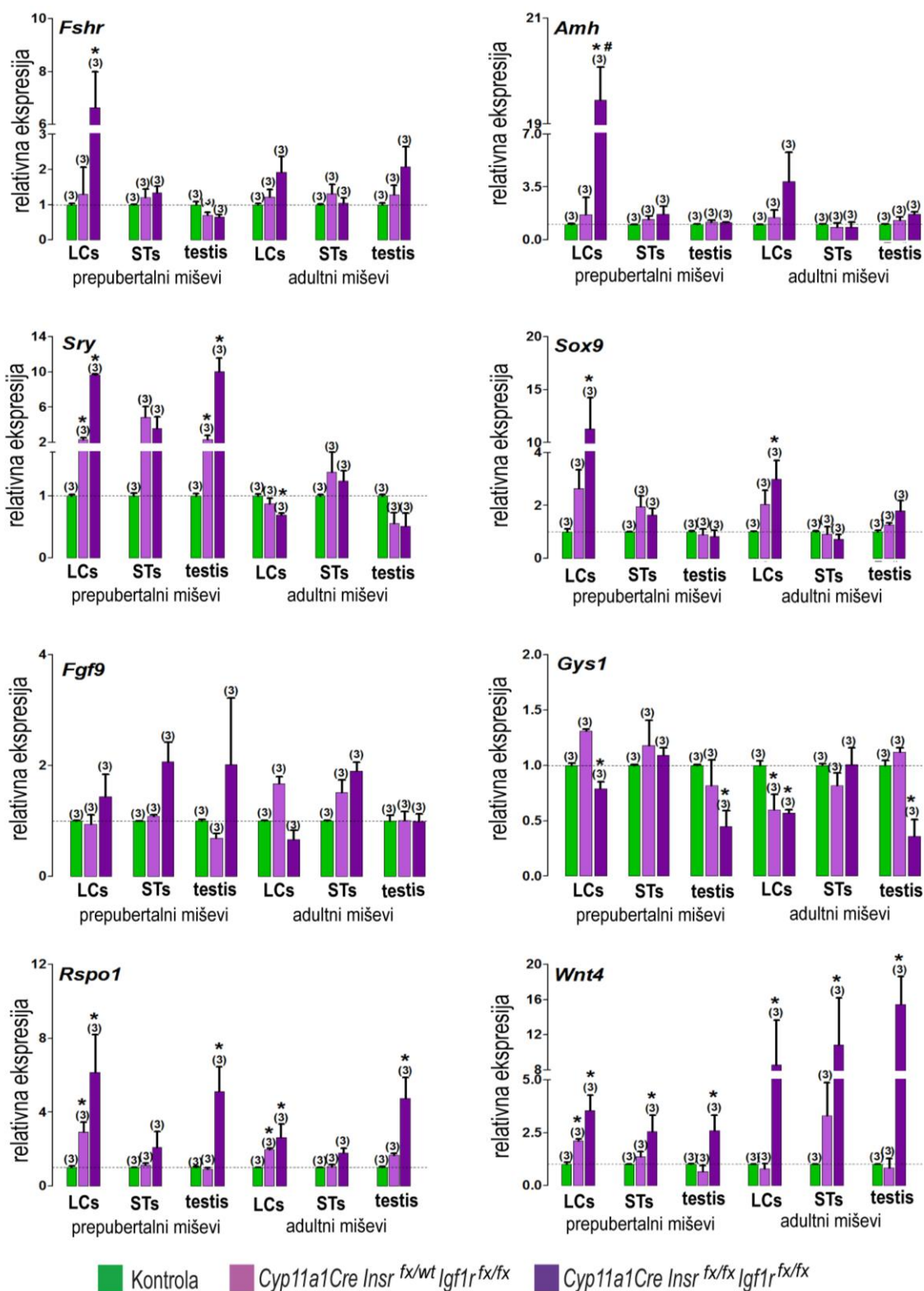
5.2.6. Odsustvo INSR/IGF1R menja transkripcioni profil gena za glavne markere razvoja pola u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa

S obzirom na ulogu germinativnih i Sertoli-jevih ćelija u kontroli sudbine i razvoja prekursora adultnih Leydig-ovih ćelija (Pitetti i sar. 2013a; Rebourcet i sar. 2014; 2017), kao i da delecija *Insr*, *Insr* i *Igf1r* tokom embrionalnog razvoja vodi konverziji XY u XX fenotip (Nef i sar. 2003), praćen je transkripcioni profil glavnih markera razvoja muškog i ženskog pola u Leydig-ovim ćelijama, seminiferim tubulama (STs) i tkivu testisa (hemitestisi), izolovanim iz P21 i P80 miševa. Iako u maloj meri, po prvi put je demonstrirano prisustvo transkripata za *Sry*, *Amh*, *Fshr*, *Rspo1* i *Wnt4* u P21-LCs i P80-LCs. Ekspresija *Sox9* transkripata u MA-10 kulturi Leydig-ovih ćelija je opisana ranije (Daigle i sar. 2015).

Relativna ekspresija *Sry* transkripta, koji je esencijalan za razvoj muškog pola, bila je značajno povećana u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe. Povećanje ekspresije uočeno je i u tkivu testisa P21-*Igf1r*-SKO i P21-*Insr/Igf1r*-DKO miševa u odnosu na testise kontrolne grupe miševa. Sa druge strane, ekspresija ovog gena u P21-*Igf1r*-SKO-STs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-STs ima je tendenciju povećanja, ali nije bila statistički značajna. Ekspresija *Sry* u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs bila je statistički značajno smanjena u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe, dok pojedinačna delecija *Igf1r* nije imala efekta. U tkivu testisa i STs P80-*Igf1r*-SKO i P80-*Insr/Igf1r*-DKO miševa, ekspresija *Sry* ostala je nepromenjena u poređenju sa ekspresijom u testisima i STs kontrolne grupe (Slika 5.2.10). Relativna ekspresija *Sox9* transkripta, SRY-ciljnog gena, bila je povećana samo u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, dok je promena izostala u STs i tkivu testisa miševa istih genotipova i starosti. Delecija *Insr* i *Igf1r* nije imala efekta na transkripciju *Fgf9* gena, dok je rezultovala povećanjem transkripcije *Amh* u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe. Relativna ekspresija *Fshr* transkripta bila je povećana samo u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.10).

Relativna ekspresija *Gysl* (*engl.* glycogen synthase 1) transkripta bila je smanjena u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Isti efekat je uočen i u tkivu testisa P21-DKO i P80-DKO u odnosu na testise kontrolne grupe. Delecija *Insr* i *Igf1r* nije imala efekta na ekspresiju ovog gena u STs (Slika 5.2.10).

Relativna ekspresija transkripata gena ključnih za razvoj ženskog pola, *Wnt4* i *Rspo1* (*engl.* R-spondin 1), bila je značajno povećana u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe. Ekspresija *Wnt4* transkripata u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-STs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-STs bila je značajno povećana u odnosu na P21-STs kontrolne grupe, dok statistički značajna promena u ekspresiji *Rspo1* nije uočena. Analizom tkiva testisa P21-*Insr/Igf1r*-DKO i P80-*Insr/Igf1r*-DKO miševa, pokazana je značajno povećana ekspresija oba transkripta u odnosu na testise P21 i P80 miševa kontrolne grupe. Pojedinačna delecija *Igf1r* uzrokovala je značajno povećanje transkripcije *Wnt4* i *Rspo1* samo u P21-*Igf1r*-SKO-LCs u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe, dok u ostalim slučajevima nije imala efekta (Slika 5.2.10).



Slika 5.2.10. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima menja profil transkripcije gena za glavne molekularne markere razvoja pola u Leydig-ovim ćelijama i seminifrnim tubulama P21 i P80 miševa.

RQ-PCR analiza glavnih markera razvoja muškog i ženskog pola u Leydig-ovim ćelijama, seminiferim tubulama (STs) i tkivu testisa izolovanim iz P21 i P80 kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa. Rezultati su analizirani t-testom za neuparene uzorke. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM. Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$; *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu.

5.2.7. Odsustvo INSR/IGF1R povećava ekspresiju i aktivnost aromataze i smanjuje ekspresiju 5 α -reduktaze u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa

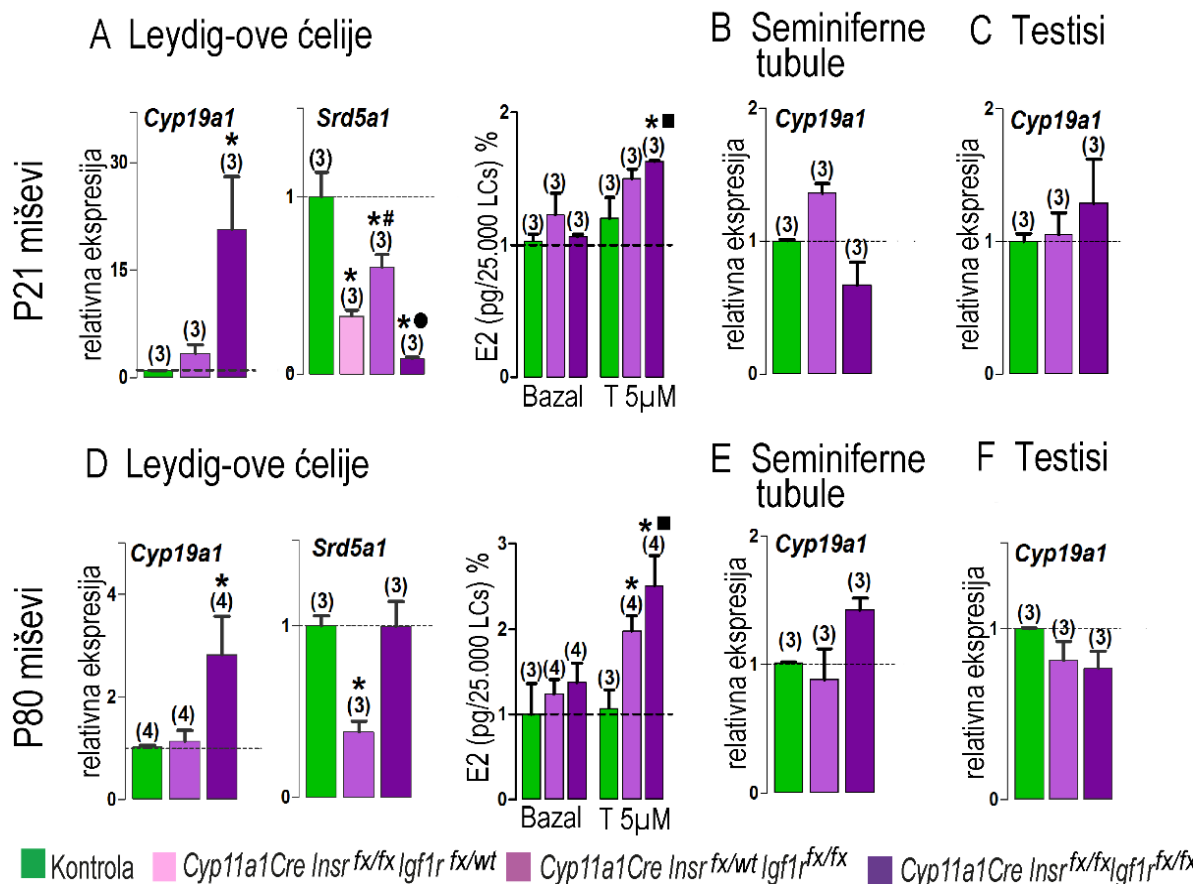
S obzirom na to da XY miševi sa delecijom *Insr*, *Insr* i *Igf1r* gena, razvijaju ženski fenotip (Nef i sar. 2003) i u skladu sa rezultatima analize relativne genske ekspresije markera pola, praćen je nivo transkripcije i aktivnost aromataze (*Cyp19a1*/CYP19), enzima zaduženog za konverziju T u E2. Nivo transkripcije *Cyp19a1* gena praćen je u Leydig-ovim ćelijama, STs i tkivu testisa P21 i P80 miševa. Aktivnost CYP19 praćena je u P21-LCs i P80-LCs.

Relativna ekspresija *Cyp19a1* transkripta bila je značajno povećana u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (20,63x) u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.11. A). U P21-*Insr/Igf1r*-DKO-STs, transkripcija *Cyp19a1* ostala je nepromenjena (Slika 5.2.11. B). U P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, ekspresija *Cyp19a1* transkripta bila je značajno povećana (2,83x) (Slika 5.2.11 D), dok je ekspresija u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-STs istih životinja ostala nepromenjena (Slika 5.2.11. E). Pojedinačna delecija *Igf1r* nije imala efekta na transkripciju *Cyp19a1* u P21-*Igf1r*-SKO-LCs/STs, kao ni u P80-*Igf1r*-SKO-LCs/STs. Stepen povećanja relativne ekspresije *Cyp19a1* transkripta bio je 8,45x manji u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Trend povećane transkripcije *Cyp19a1*, koji nije statistički značajan, uočen je u testisima P21-*Insr/Igf1r*-DKO miševa (Slika 5.2.11. C). U testisima P80-*Insr/Igf1r*-DKO miševa uočen je trend blagog smajenja, takođe bez statistički značajne promene u odnosu na P80-LCs kontrolne grupe miševa (Slika 5.2.11. F).

Kao parametar aktivnosti aromataze, merena je koncentracija E2 produkovanog od strane P21-LCs i P80-LCs u odsustvu (bazalni uslovi - Bazal) i prisustvu 5 μ M testosterona (5 μ M T). Rezultati su pokazali da je produkcija E2 izmerena nakon stimulacije 5 μ M T bila znacajno veća u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa produkcijom u P21-LCs kontrolne grupe. U bazalnim uslovima nije bilo razlike u koncentraciji produkovanog E2 između eksperimentalnih grupa (Slika 5.2.11. A). Takođe, i u P80-*Igf1r*-SKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, produkcija E2 je bila značajno povećana u odnosu na produkciju P80-LCs kontrolne grupe u prisustvu 5 μ M T (Slika 5.2.11. D).

Pored ekspresije *Cyp19a1* transkripta, praćena je i ekspresija transkripata za *Srd5a1* (gena koji kodira 5 α -reduktazu, enzim zadužen za konverziju T u dihidrotestosteron) u Leydig-ovim ćelijama. Uočeno je značajno smanjenje transkripcije *Srd5a1* u P21-*Insr*-SKO-LCs, P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe

miševa (Slika 5.2.11 A). Ekspresija *Srd5a1* transkripta bila je značajno smanjena u P80-*Igf1r*-SKO-LCs, dok je ekspresija u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs ostala nepromenjena u odnosu na P80-LCs kontrolne grupe (Slika 5.2.11 D).



Slika 5.2.11. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima povećava ekspresiju i aktivnost aromataze i samnjuje ekspresiju 5 α -reduktaze u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa.

Izmenjen obrazac ekspresije aromataze (*Cyp19a1*) i 5 α -reduktaze (*Srd5a1*), kao i produkcija estradiola (E2) u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (A) i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (D). Ekspresija *Cyp19a1* u seminiferim tubulama i testisima P21 (B, C) i P80 (E, F) miševa.

E2 je meren ELISA metodom pomoću komercijalnog kompleta. Relativna ekspresija gena je praćena sa RQ-PCR metodom. Rezultati relativne ekspresije gena su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom, dok je *ex vivo* produkcija E2 analizirana Two-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Bonferroni *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$. Relativna genska ekspresija: *statistička značajnost u odnosu na kontrolu, # u odnosu na *Insr*-SKO; • u odnosu na *Igf1r*-SKO. Produkcija E2: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu; ■ u odnosu na odgovarajući bazal.

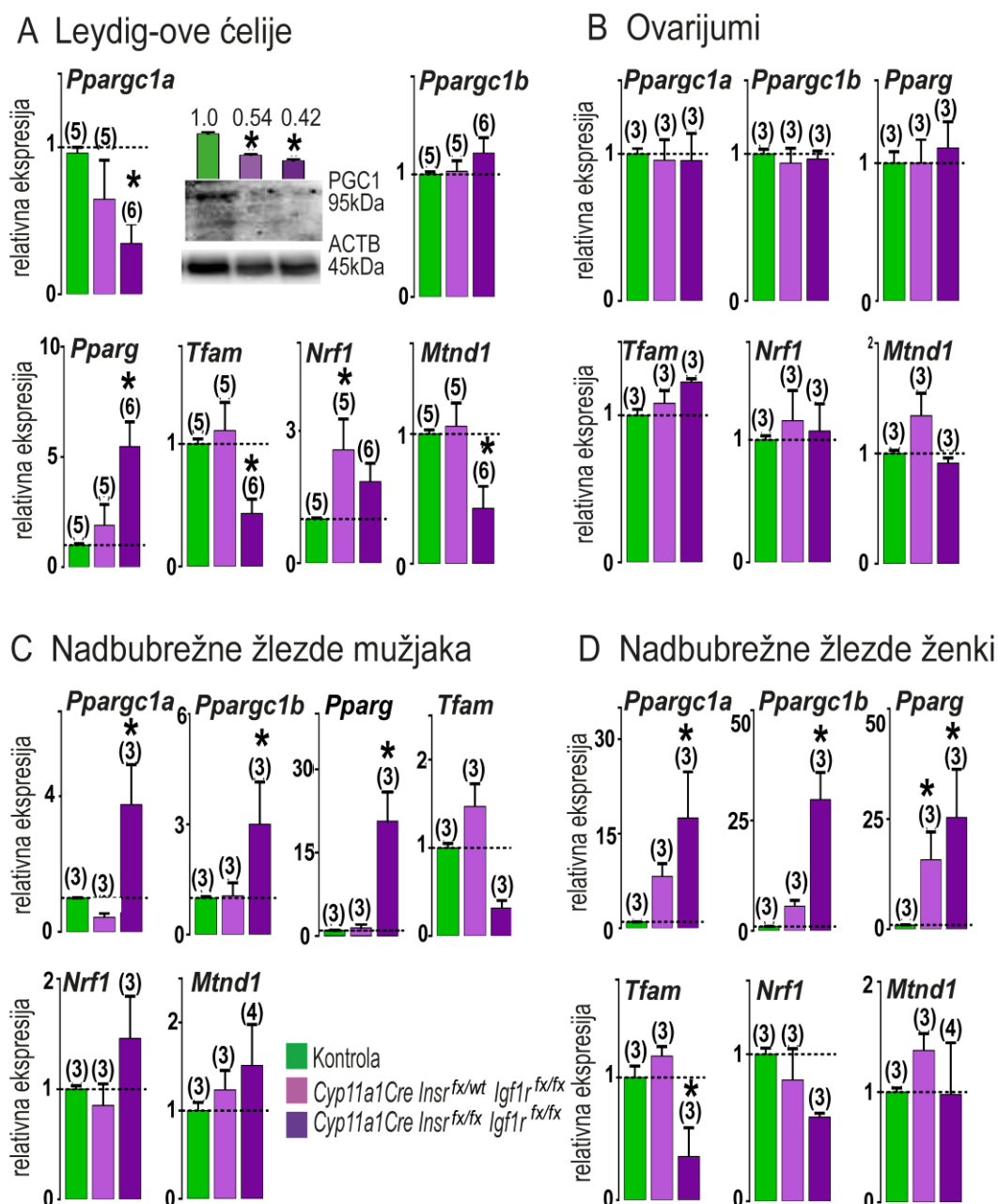
5.3. Efekat kondicionalne delecije *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima na glavne molekularne markere mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u Leydig-ovim ćelijama prepubertalnih (P21) miševa

S obzirom na ključni značaj mitohondrija za funkciju steroidogenih ćelija, relativna genska ekspresija glavnih markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture praćena je u Leydig-ovim ćelijama, ovarijumima i nadbubrežnim žlezdama mužjaka i ženki P21 miševa da bi se pratio uticaj delecije *Insr/Igf1r* u steroidogenim tkivima na nastanak novih, kao i na dinamiku postojećih mitohondrija. Kao što je ranije navedeno, u ovom periodu postnatalnog razvoja u intersticijumu testisa je dominantno prisutna prekursorska forma Leydig-ovih ćelija - P21-LCs. Takođe, u ovom periodu pubertet još uvek nije počeo i nije uspostavljena HPG osovina pa ni nema njenog uticaja na dešavanja u P21-LCs.

5.3.1. INSR/IGF1R regulišu transkripciju markera mitohondrijalne biogeneze u steroidogenim ćelijama gonada P21 mužjaka, ali ne i ženki

RQ-PCR i westrn blot analize su pokazale da je ekspresija glavnog regulatora mitohondrijalne biogeneze *Ppargc1a*/PGC1 (transkripta i proteina) bila značajno smanjena u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na ekspresiju u P21-LCs kontrolne grupe. U istim ćelijama, nivo transkripcije za *Tfam*, gen koji kodira glavni ciljni transkripcioni faktor za PGC1, bio je značajno smanjen, dok je *Pparg* bio povećan. Ovo je praćeno značajno redukovanom ekspresijom *Mtnd1* (*engl.* mitochondrially encoded NADH dehydrogenase subunit 1), gena koji se nalazi u mtDNA i kodira subjedinicu NADH dehidrogenaze (kompleks I respiratornog lanca na membrani mitohondrija zadužen za prenos elektrona sa NADH na respiratorni lanac) za koju se veruje da pripada delu kompleksa koji je minimalno potreban za katalizu. U P21-*Igf1r*-SKO-LCs, uočena je značajno povećana ekspresija *Nrf1* gena, dok su ostali markeri mitohondrijalne biogeneze ostali nepromenjeni (Slika 4.3.1. A). Nezavisno od genotipa, relativna ekspresija glavnih markera mitohondrijalne biogeneze i *Mtnd1* ostala je nepromenjena u ovarijumima (Slika 5.3.1. B).

U nadbubrežnim žlezdama oba pola, obrazac transkripcije markera mitohondrijalne biogeneze bio je isti, ali suprotan od onog zapaženog u P21-LCs, sa izuzetkom *Pparg* i *Tfam* koji imaju sličan obrazac ekspresije. Nivo relativne ekspresije *Ppargc1a*, *Ppargc1b* i *Pparg* bio je značajno povećan u nadbubrežnim žlezdama oba pola, *Tfam* je smanjen, dok je transkripcija *Mtnd1* ostala nepromenjena (Slika 5.3.1. C i D).



Slika 5.3.1. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima smanjuje nivo transkripcije ključnih markera mitohondrijalne biogeneze u Leydig-ovim ćelijama, ali ne i u ovarijumima, P21 miševa.

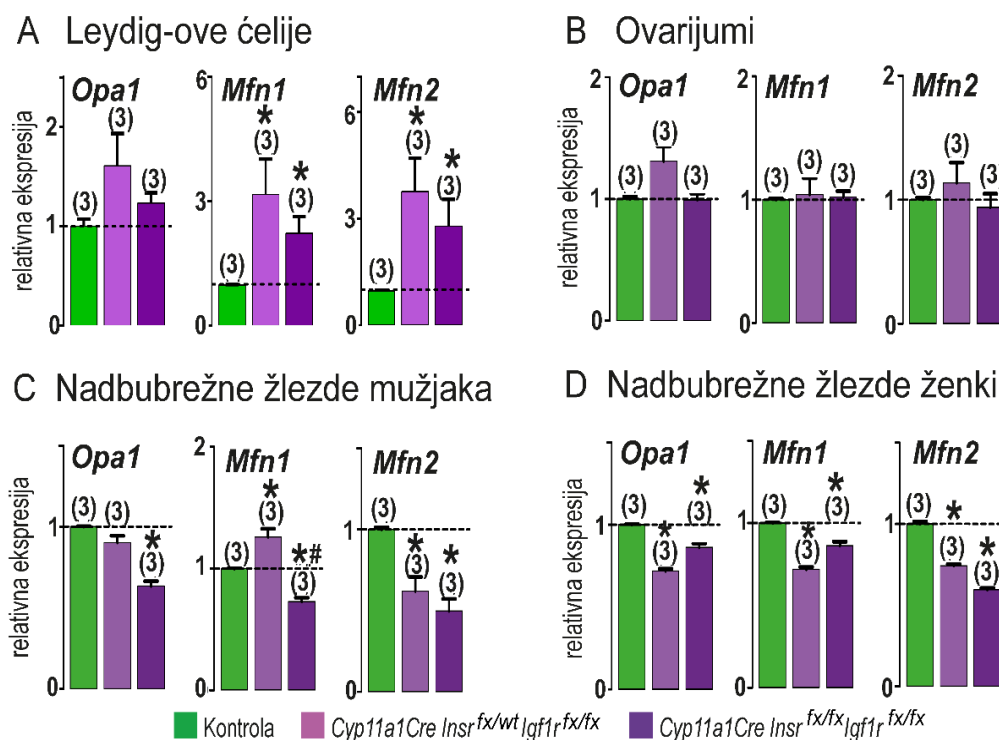
Delecija gena za INSR i IGF1R utiče na ekspresiju glavnog regulatora (PGC1) i glavnih transkripcionih faktora uključenih u regulaciju mitohondrijalne biogeneze u Leydig-ovim ćelijama (A), dok efekat izostaje u ovarijumima (B). Efekat u nadbubrežnim žlezdama mužjaka i ženki je suprotna onom u steroidogenim ćelijama gonada (C, D).

Relativna ekspresija gena je praćena RQ-PCR, a relativna ekspresija proteina western blot metodom i prikazane su reprezentativne fotografije specifičnih imuno-reaktivnih traka, dok su podaci dobijeni merenjem optičke gutine traka normalizovani na ACTB kao internu kontrolu (stubići iznad fotografija). Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$. Relativna genska ekspresija: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu.

5.3.2. Odsustvo INSR/IGF1R utiče na ekspresiju markera mitohondrijalne fuzije/arhitekture i mitohondrijalnu fazu steroidogeneza u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa

S obzirom na poznatu veza između aktivnosti ERK i MFN1 koja utiče na mitohondrijalnu dinamiku (Gomes i sar. 2011; Pyakurel i sar. 2015), praćen je efekat delecije *Insr/Igf1r* na relativnu ekspresiju gena za glavne markere mitohondrijalne fuzije/arhitekture (*Opal*, *Mfn1*, *Mfn2*). Rezultati su pokazali značajno povećanje ekspresije *Mfn1* i *Mfn2* u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/igf1r*-DKO-LCs u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe, dok je transkripcija *Opal* ostala nepromenjena (Slika 5.3.2. A). Ovakvi rezultati mogu ukazivati na to da je mitohondrijalna funkcija i mitohondrijalna faza steroidogeneze kod mužjaka izmenjena. Zaista, potencijal membrane mitohondrija P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs je smanjen za 41.58% u odnosu na kontrolu (rezultati nisu prikazani). Koncentracija progesterona i androgena, izmerena u inkubacionom medijumu P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u stimulisanim uslovima (u prisustvu pregnenolona), bila je značajno manja u odnosu na nivo hormona produkovanih u bazalnim uslovima (Slika 5.3.7. B). Takođe, produkcija pregnenolona u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, u bazalnim i stimulisanim uslovima, smanjena je (16x i 25.24x) više nego što je to produkcija androgena (8.33x i 15.7x). Ovi rezultati sugerišu da postoji poremećaj mitohondrijalne faze steroidogeneze u P21-LCs usled delecije *Insr* i *Igf1r* gena.

Nezavisno od genotipa, relativna ekspresija gore pomenutih markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture u ovarijumima je ostala nepromenjena (Slika 5.3.2. B). Nivo ekspresije *Opal* transkripta bio je značajno smanjen u nadbubrežnoj žlezdi P21 *Igf1r*-SKO ženki (Slika 5.3.2. D) i nepromenjen u nadbubrežnoj žlezdi P21 *Igf1r*-SKO mužjaka u odnosu na ekspresiju u nadbubrežnoj žlezdi kontrolnih miševa (Slika 5.3.2. C). Ekspresija *Opal* bila je značajno smanjena u nadbubrežnim žlezdama P21 *Insr/Igf1r*-DKO miševa oba pola. Ekspresija *Mfn1* bila je značajno povećana u nadbubrežnim žlezdama P21 *Igf1r*-SKO mužjaka (Slika 5.3.2. C) i značajno smanjena u nadbubrežnim žlezdama P21 *Igf1r*-SKO ženki (Slika 5.3.2. D). U nadbubrežnim žlezdama oba pola, ekspresija *Mfn1* bila je značajno smanjena. Obrazac ekspresije *Mfn2* bio je isti - značajno smanjen u nadbubrežnim žlezdama oba pola, istovremeno suprotan od onog u Leydig-ovim ćelijama (Slika 5.3.2. C i D).

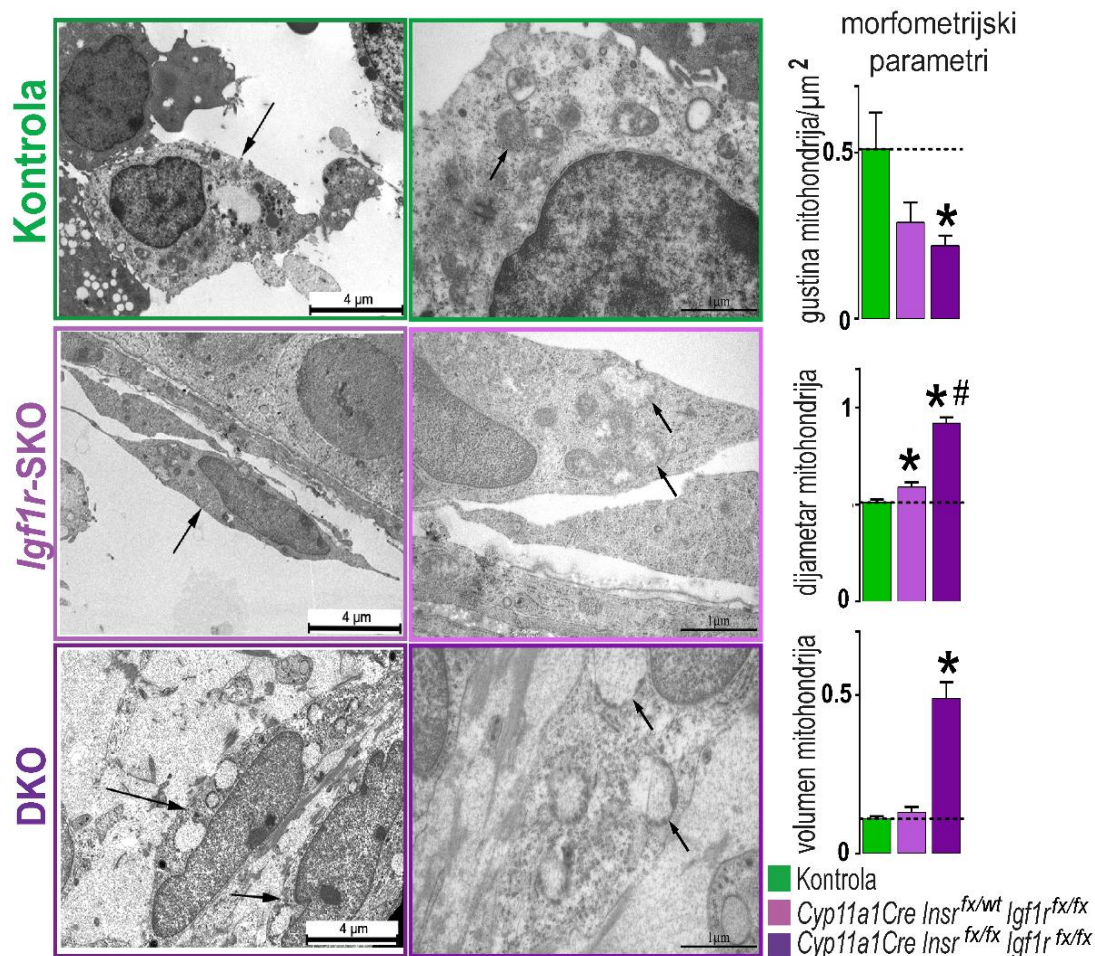


Slika 5.3.2. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima povećava nivo transkripcije gena za glavne markere mitohondrijalne fuzije i arhitekture u Leydig-ovim ćelijama, ali ne i u ovarijumina, P21 miševa.

Odsustvo INSR i IGF1R utiče na transkripciju gena važnih za mitohondrijalnu fuziju i arhitekturu u Leydig-ovim ćelijama (A), dok nema efekta na nivou ovarijuma (B). Za razliku od gonada, u nadbubrežnim žlezdama mužjaka (C) i ženki (D) uočen je sličan profil ekspresije ovih gena (suprotan od Leydig-ovih ćelija). Relativna ekspresija gena je praćena sa RQ-PCR metodom. Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$. Relativna genska ekspresija: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu upuz, # u odnosu na *Igf1r*-SKO.

5.3.3. Odsustvo INSR i IGF1R menja morfologiju Leydig-ovih ćelija P21 miševa, kao i morfologiju i broj mitohondrija u njima

Analiza transmissionom elektronskom mikroskopijom (TEM) pokazala je specifičnu ultrastrukturu P21-LCs izolovanih iz *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa (Slika 5.3.3). P21-LCs kontrolne grupe su poligonalnog oblika sa okruglim euhromatičnim jedrom i jednim jedarcem. Citoplazma je pretežno granulisana sa brojnim slobodnim ribozomima. Takođe, bogata je mitohondrijama gustog matriksa čija veličina varira od veoma malih do prosečne veličine. P21-*Igf1r*-SKO-LCs su vretenastog oblika, gusto granulisane citoplazme sa izduženim, ovalnim euhromatičnim jedrom.



Slika 5.3.3. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima menja morfologiju Leydig-ovih ćelija, kao i morfologiju i arhitekturu mitohondrija u njima.

Da bi se potvrdila uloga INSR/IGF1R u steroidogenim tkivima na morfologiju i arhitekturu mitohondrija u Leydig-ovim ćelijama, urađena je TEM analiza tkiva testisa izolovanih iz P21 kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa. P21-LCs kontrolne grupe su poligonalnog oblika sa okruglim euhromatičnim jedrom i jednim jedarcem. P21-*Igf1r*-SKO-LC su ćelije vretenastog oblika sa izduženim ovalnim euhromatičnim jedrom, kao i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs koje su izduženijeg vretenastog oblika (strelice na TEM mikrofografijama levo). Reprezentativne TEM fotomikrofografije pokazuju morfologiju i arhitekturu mitohondrija u P21-LCs kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa (strelice na TEM fotomikrofografijama desno; 22 000 × (1 μm)).

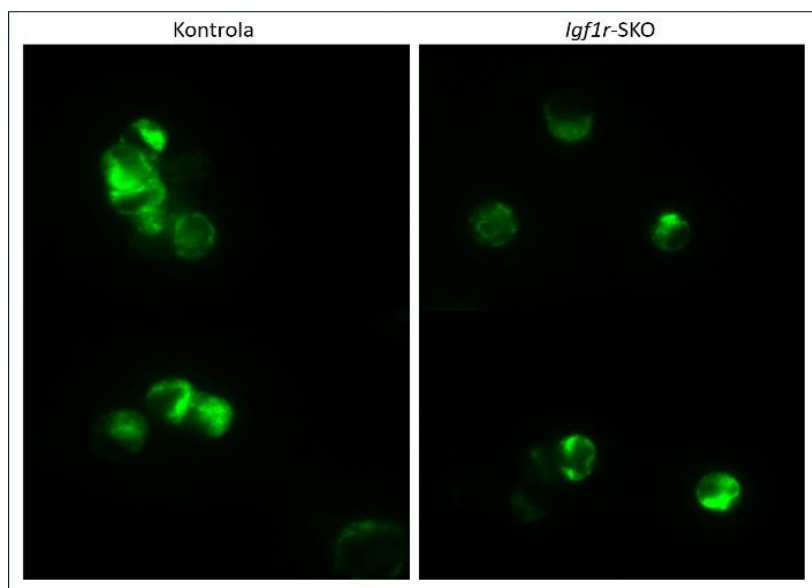
Koristeći morfometrijske metode, analizirani su numerička gustina mitohondrija po μm² citoplazme, korigovani dijametar i volumen mitohondrija. Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost ± SEM. Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, # u odnosu na *Igf1r*-SKO.

P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs takođe imaju vretenasti oblik sa izduženim ovalnim euhromatičnim jedrom (slično kao kod P21-*Igf1r*-SKO-LCs) i granulisanom citoplazmom sa dosta lipidnih kapi. TEM analize su pokazale da su mitohondrije P21-LCs u testisima kontrolnih miševa tipičnog izgleda za progenitore Leydig-ovih ćelija: uglavnom nezrele, tubulovezikularne, tamne sa visokim afinitetom za elektrone, tj. velike elektronske gustine (Haider 2004). Nasuprot tome, većina mitohondrija u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs su abnormalne veličine, bez

normalne arhitekture krista, niskog afiniteta za elektrone (male elektronske gustine), znatno veće i izduženije u poređenju sa mitohondrijama u P21-LCs kontrolnih miševa. Deo populacije mitohondrija u P21-*Igf1r*-SKO-LCs je nalik mitohondrijama u P21-LCs kontrolne grupe miševa, međutim neke mitohondrije su pokazale promene u ultrastrukтури i arhitekturi krista slične onim u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (Slika 5.3.3).

Gustina mitohondrija (broj mitohondrija po μm^2 citoplazme) je smanjena u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa brojem u P21-LCs kontrolne grupe miševa, dok je ostala nepromenjena u P21-*Igf1r*-SKO-LCs. Sa druge strane, korigovani dijametar mitohondrija je značajno povećana u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe, ali je efekat izraženiji u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Takođe, uočeno je i značajno povećanje volumena mitohondrija u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, dok u P21-*Igf1r*-SKO-LCs nije bilo promena (Slika 5.3.3, desni panel).

Mitohondrijalna masa je praćena u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-LCs kontrolne grupe miševa pomoću florescentne boje MitoTracker Green FM[®] prema postupku opisanom u Materijalu i metodama. Uočen je manji stepen fluorescencije u P21-*Igf1r*-SKO-LCs u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe što ukazuje na to da je u ovim ćelijama prisutan manji broj mitohondrija, tj. manja mitohondrijalna masa (Slika 5.3.4), u skladu sa trendom smanjenja broja mitohondrija po jedinici površine citoplazme dobijenim kod ovog genotipa analizom TEM mikrografija.



Slika 5.3.4. Mitohondrijalna masa u Leydig-ovim ćelijama P21 kontrolnih i *Igf1r*-SKO miševa.

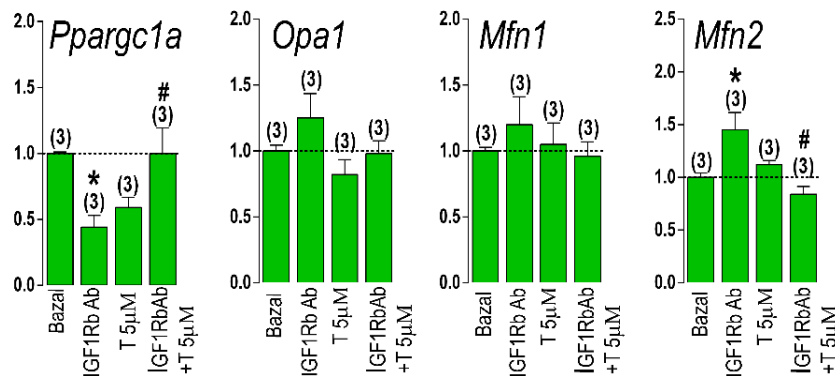
Mitohondrijalna masa u P21-LCs kontrolne grupe i P21-*Igf1r*-SKO-LCs praćena je pomoću fluorescentne boje MitoTracker Green FM[®]. Uočen je manji stepen fluorescencije u P21-*Igf1r*-SKO-LCs u poređenju sa fluorescencijom u P21-LCs kontrolne grupe. Uvećanje: 1000x.

5.3.4. Efekat *in vitro* blokade receptora za IGF1, samostalno ili u kombinaciji sa testosteronom, na transkripcioni profil glavnog markera mitohondrijalne biogeneze i markera mitohondrijalne fuzije/arhitekture

S obzirom na izraženije povećanje transkripcije markera fuzije/arhitekture mitohondrija u P21-*Igf1r*-SKO-LCs u odnosu P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, ćelije izolovane iz P21 miševa kontrolne grupe inkubirane su sa IGF1R β antitelom, samostalno ili u kombinaciji sa 5 μ M T, tokom 1 h. Cilj je bio da se definiše efekat signalizacije posredovane IGF1R i T na transkripciju navedenih markera. Pored toga, P21-LCs kontrolne grupe inkubirane su sa 10 nM i 200 nM T tokom 24 h, sa ciljem praćenja efekta manjih koncentracija T u dužem vremenskom periodu na markere mitohondrijalne fuzije/arhitekture.

Analiza relativne ekspresije transkripata je pokazala značajno smanjenje transkripta glavnog markera mitohondrijalne biogeneze, *Pparg1a*, kao posledicu *in vitro* blokade IGF1R, u poređenju sa ekspresijom u bazalnim uslovima. Značajno povećanje ekspresije ovog gena uočeno je i u uslovima blokade IGF1R u prisustvu T u poređenju sa samom blokadom. Ekspresija *Mfn2*, markera mitohondrijalne fuzije, bila je povećana kada je blokiran IGF1R što odgovara efektu delecije *Igf1r in vivo*, tj. isti obrazac ekspresije je uočen u P21-*Igf1r*-SKO-LCs. Blokada IGF1R u kombinaciji sa 5 μ M T rezultovala je značajno smanjenom

ekspresijom *Mfn2*. Nije bilo značajnih promena u ekspresiji *Opa1* i *Mfn1* gena u bazalnim niti u uslovima blokade IGF1R, pojedinačno ili u kombinaciji sa 5 μ M T (Slika 5.3.5).



Slika 5.3.5. In vitro efekat blokade IGF1R, samostalno ili u kombinaciji sa 5 μ M testosteronom, na *Pparg1a* i markere mitohondrijalne arhitekture/fuzije u Leydig-ovim ćelijama kontrolnih P21 miševa.

RQ-PCR analiza ekspresije *Pparg1a*, *Opa1*, *Mfn1* i *Mfn2* u P21-LCs nakon inkubacije tokom 1h u bazalnim uslovima, u prisustvu IGF1R β antitela (1:10), 5 μ M testosterona (T), ili njihove kombinacije (IGF1R β antitelo + T 5 μ M).

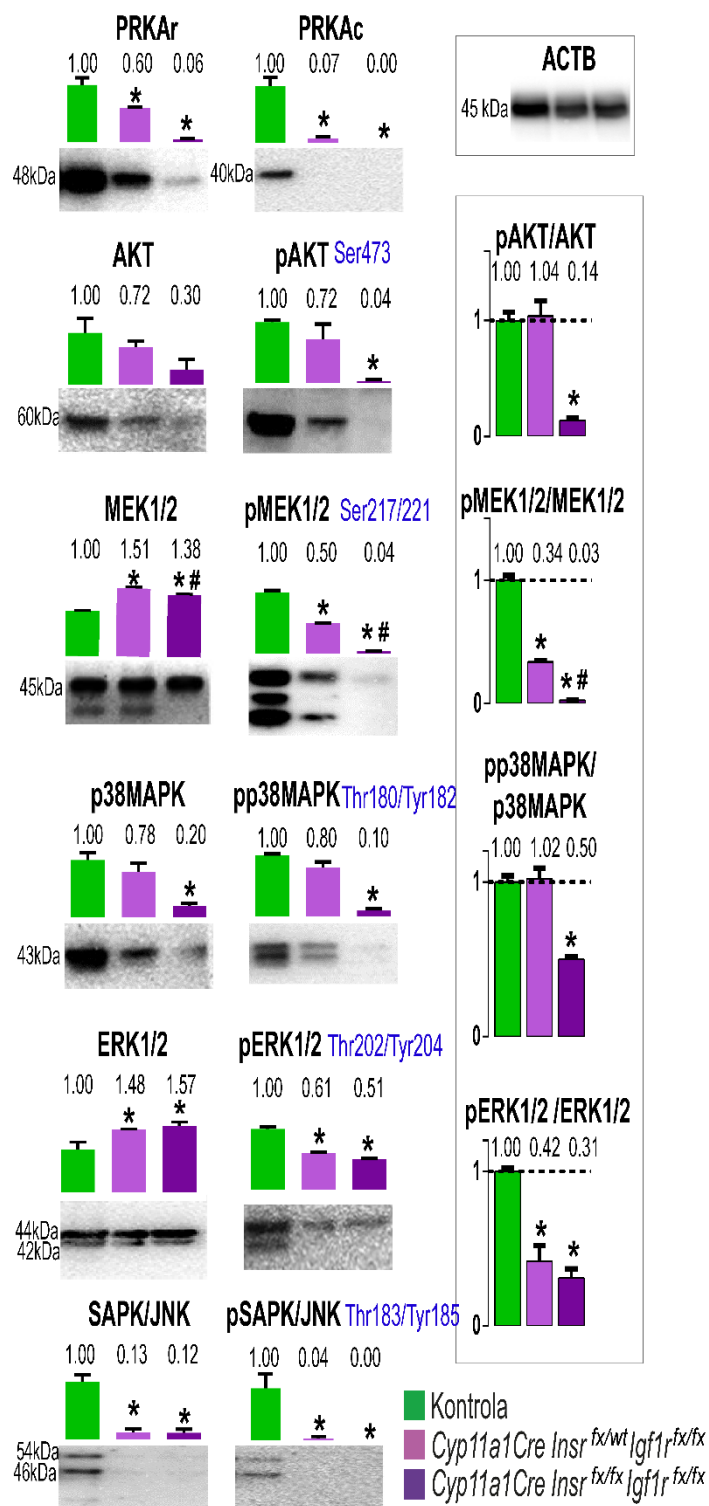
Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz Tukey *post hoc* test. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na bazal, # u odnosu na IGF1R β antitelo.

In vitro tretman Leydig-ovih ćelija izolovanih iz P21 kontrolnih miševa, sa 10 nM T tokom 24 h, značajno je smanjio nivo transkripta za *Nrf1* i povećao nivo transkripcije *Cyp19a1*. Ovaj tretman nije imao efekta na ekspresiju transkripata za ostale markere mitohondrijalne biogeneze (*Pparg1a*, *Pparg1b*, *Pparg*, *Tfam*, *Mtd1*) i mitohondrijalne fuzije/arhitekture (*Opa1*, *Mfn1*, *Mfn2*), kao ni na *Ar*. Primena 200 nM T tokom 24 h nije statistički značajno promenila nivo transkripcije nijednog od praćenih gena (Slika 5.3.6).

5.3.5. INSR/IGF1R regulišu ekspresiju ključnih kinaza uključenih u IGF1R-signalizaciju, kao i u aktivaciju PGC1, regulaciju mitohondrijalne biogeneze i steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa

PRKA i MAPK, kao i deo signalizacije od IGF1R, istovremeno su važne za aktivaciju PGC1 (Dominy i sar. 2015), regulaciju ekspresije mitohondrijalnih proteina (Gomes i sar. 2011; Pyakurel i sar. 2015) i steroidogenezu (Dufau i sar. 1984a, 1984b). Zbog svega navedenog, nivo ekspresije ovih kinaza u P21-LCs izolovanim iz kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/gf1r*-DKO miševa praćen je western blot metodom (Slika 5.3.7).

Rezultati pokazuju da odsustvo INSR/IGF1R menja ekspresioni profil glavnih kinaza uključenih u posredovanje signalizacije od INSR/IGF1R, a koje regulišu mitohondrijalnu biogenezu i steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama. Ekspresija proteina za regulatornu (PRKAr) i katalitičku (PRKAc) subjedinicu PRKA značajno je smanjena u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/gf1r*-DKO-LCs. U istim ćelijama, ekspresija AKT i pAKT, pMEK1/2, p38MAPK i pp38MAPK, pERK1/2, JNK (*engl.* c-Jun N-terminal kinases) i pJNK proteina bila je značajno smanjena u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe. Sve navedene kinaze su komponente signalozoma uključenog u regulaciju biosinteze steroidnih hormona (Paz i sar. 2009; Stocco i sar. 2005), ali su i važne za mobilizaciju transkripcione mašinerije koja promovise proliferaciju mitohondrija (Dominy i sar. 2015). Značajno smanjenje ekspresije AKT kinaze, njene fosforilisane forme (pAKT) kao i njihovog odnosa pAKT/AKT uočeno je u P21-*Insr/gf1r*-DKO-LCs. Nasuprot tome, nivo ekspresije MEK1/2 značajno je povećan u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/gf1r*-DKO-LCs, nivo fosforilisane forme pMEK1/2, pa i samog odnosa pMEK1/2/MEK1/2 značajno smanjen u istim ćelijama. Nivo ekspresije proteina za p38MAPK, pp38MAPK, kao i odnos pp38MAPK/p38MAPK značajno je smanjen u P21-*Insr/gf1r*-DKO-LCs. Ekspresija ERK1/2 značajno je povećana u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/gf1r*-DKO-LCs. Nasuprot tome, pERK1/2 i odnos pERK1/2/ERK1/2 su bili značajno smanjeni u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/gf1r*-DKO-LCs. U istim ćelijama, pokazano je značajno smanjenje ekspresije JNK i pJNK, koje deluju kao intracelularni senzori aktivirani povećanjem ROS-a i oksidativnim stresom, a utiču na aktivnost PGC1 α (Dominy i sar. 2015).



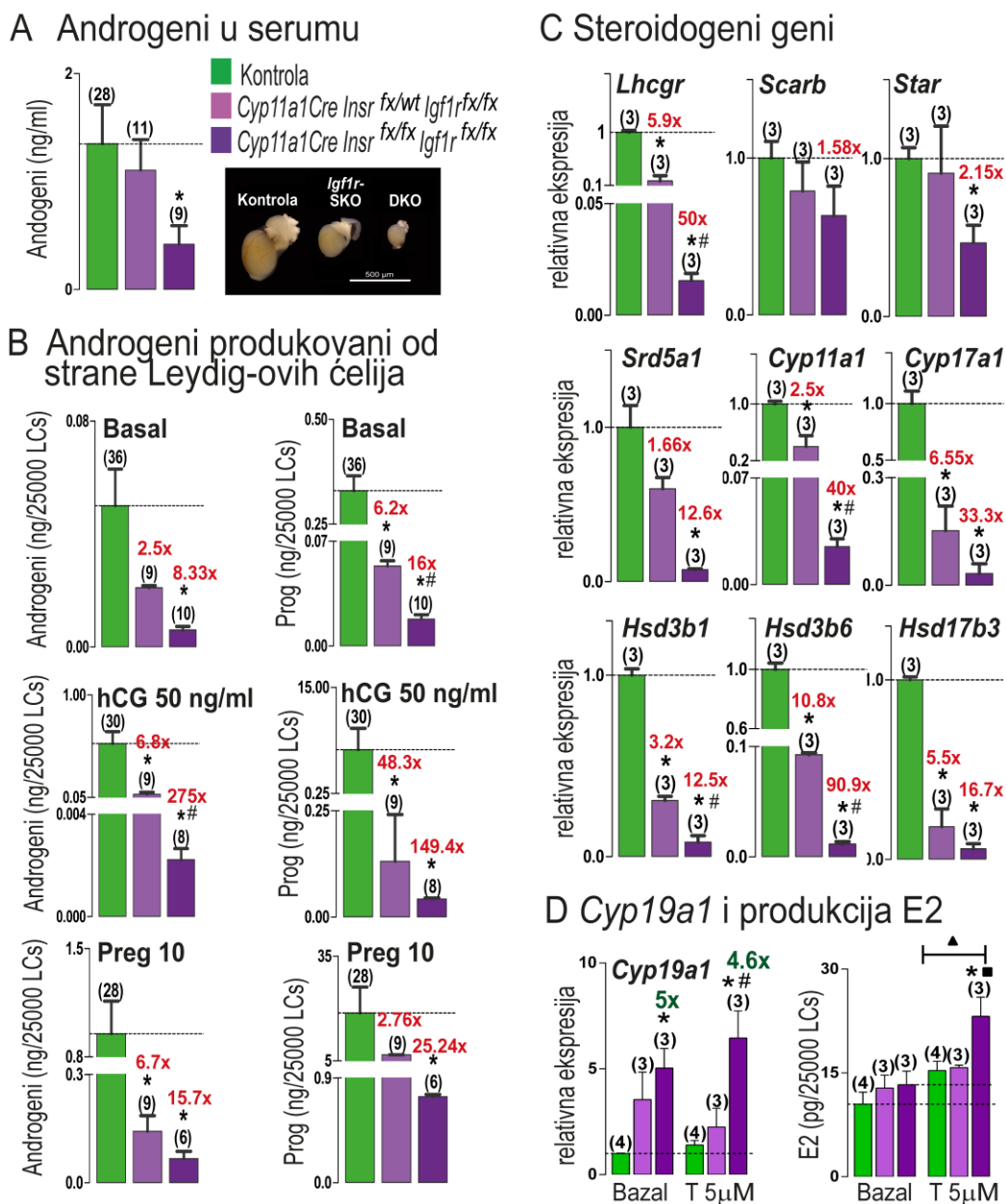
Slika 5.3.7. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima menja ekspresiju glavnih kinaza koje posreduju signalizaciju od INSR i IGF1R i regulišu mitohondrijalnu biogenezu i steroidogenezu u Leydig-ovim ćelijama.

Primarna kultura Leydig-ovih ćelija izolovanih iz P21 miševa (kontrolna grupa, *Igf1r*-SKO, *Insr/Igf1r*-DKO) korišćena je za izolaciju proteina. Za western blot analizu je korišćeno je 7,5 μ g proteina, ekstrahovanih iz Leydig-ovih ćelija. Specifične imunoreaktivne trake su, kao dvodimenzionalne slike, analizirane pomoću *Image J* programa (verzija 1.48). Prikazane su reprezentativne fotografije specifičnih traka, dok su podaci dobijeni merenjem optičke gutine traka normalizovani na ACTB kao internu kontrolu i predstavljeni kao stubići iznad fotografija. Rezultati se analizirani pomoću One-Way ANOVA testa uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, # u odnosu na *Igf1r*-SKO.

5.3.6. Odsustvo INSR i IGF1R utiče na mitohondrijalnu fazu steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama, kao i na transkripcioni profil gena za steroidogene enzime u Leydig-ovim ćelijama, ovarijumima i nadbubrežnim žlezdama P21 miševa

U cilju ispitivanja uticaja odsustva INSR/IGF1R na funkciju mitohondrija u steroidogenezi Leydig-ovih ćelija, praćen je steroidogeni kapacitet i mitohondrijalna faza steroidogeneze, kao i nivo androgena u serumu u populaciji P21 miševa korišćenih za analizu markera mitohondrijalne biogenze i fuzije/arhitekture. Još jednom je potvrđeno da odsustvo INSR/IGF1R značajno smanjuje nivo cirkulišućih androgena (Slika 5.3.8. A). Kao što je ranije navedeno (Tabela 5.1.1), relativna masa testisa je smanjena kod P21 *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa (Slika 5.3.8. A - makrografija). Dalje, rezultati su pokazali da profil bazalne produkcije androgena od strane Leydig-ovih ćelija prati obrazac promene koncentracije androgena u serumu. Značajno smanjenje produkcije androgena i progesterona zabeleženo je u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe miševa (Slika 5.3.8. B). Efekat je bio izraženiji na produkciju progesterona (16x) nego na produkciju androgena (8,33x). Ovakvi rezultati ukazuju na to da je mitohondrijalna faza steroidogeneze izmenjena.

Radi procene steroidogenog kapaciteta (sposobnosti ćelija da odgovore na hCG stimulaciju), Leydig-ove ćelije koje su izolovane iz P21 kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa su stimulisane *ex vivo* sa hCG-om (50 ng/ml), nakon čega je praćena proizvodnja progesterona i androgena. Rezultati su pokazali da profil produkcije androgena od strane Leydig-ovih ćelija u uslovima ovakve stimulacije (tj. aktivacije LHCGR) prati nivo serumskih androgena. Steroidogeni kapacitet tj. proizvodnja progesterona i androgena u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs značajno je smanjen u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe miševa (Slika 5.3.8. B). U cilju procene mitohondrijalne faze steroidogeneze, praćena je funkcionalnost HSD3B, glavnog markera Leydig-ovih ćelija čija je ćelijska lokalizacija prevashodno vezana za mitohondrije. P21-LCs dobijene iz kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa su stimulisane 10 μ M pregnenolonom. Rezultati su pokazali da je odsustvo INSR/IGF1R značajno smanjilo nivo produkovanog progesterona i androgena u prisustvu pregnenolona (Slika 5.3.8. B). Ovaj efekat u odnosu na produkciju u P21-LCs kontrolne grupe bio je više istaknut kada je u pitanju produkcija progesterona (25,24x) nego androgena (15,7x), što ukazuje na to da je mitohondrijalna faza steroidogeneze i funkcionalnost HSD3B najviše pogođena odsustvom ovih receptora.



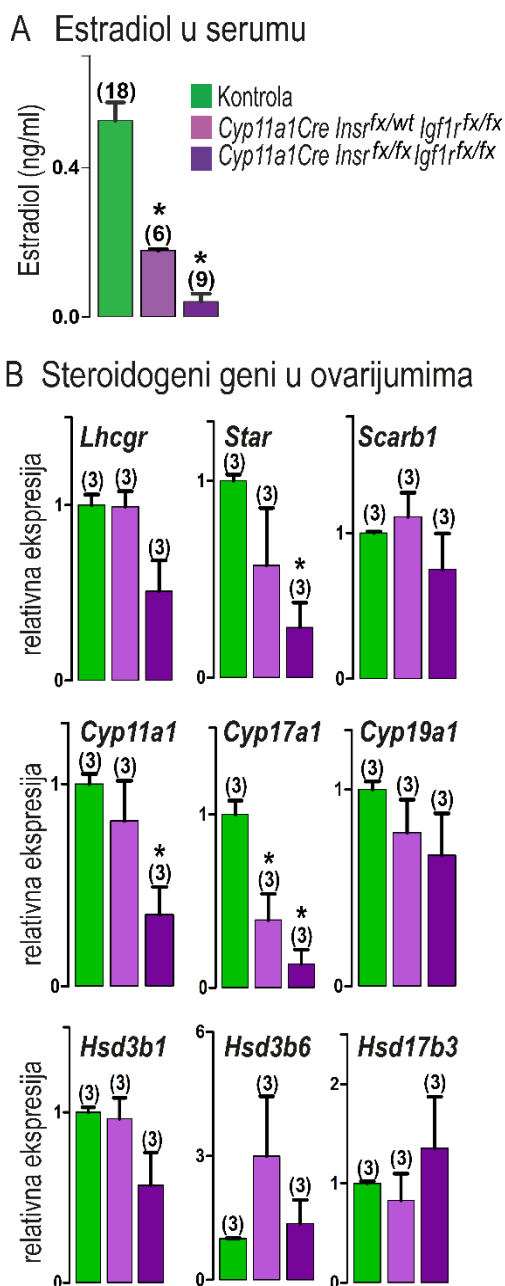
Slika 5.3.8. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima smanjuje koncentraciju androgena u serumu i remeti mitohondrijalnu fazu steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa.

Koncentracija androgena u serumu je smanjena kod *Insr/Igf1r*-DKO u poređenju sa kontrolnim miševima (A). Produkcija pregnenolona i androgena od strane P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs je dramatično smanjena u bazalnim ili hCG/PREG stimulisanim uslovima (B). Relativna ekspresija gena za glavne steroidogene enzime smanjena je u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (C), dok je ekspresija gena odgovornog za pretvaranje androgena u estrogene i proizvodnju estradiola (*Cyp19a1*) u prisustvu 5 μ M testosterona značajno povećana u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa kontrolnim P21-LCs (D). **Fotomakrografija** pokazuje smanjenu veličinu testisa kod *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa. Primarna kultura P21-LCs (kontrola, *Igf1r*-SKO, *Insr/Igf1r*-DKO) inkubirana je u odsustvu (bazal) ili prisustvu 50 ng/ml hCG (za procenu steroidogenog kapaciteta) ili 10 μ M pregnenolona (Preg) tokom 1 h za procenu steroidogene aktivnosti HSD3B. Za procenu aktivnosti aromataze, Leydig-ove ćelije su inkubirane sa 5 μ M testosteronom (T). Rezultati su analizirani One Way ANOVA testom uz poređenje pojedinačnih srednjih vrednosti Tukey *post-hoc* testom, dok je Two Way ANOVA korišćena za analiza *ex vivo* produkcije E2. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, # u odnosu na *Igf1r*-SKO, ■ u odnosu na odgovarajući bazal, ▲ ukupni efekat testosterona u odnosu na bazal.

Da bi se bolje razumeo efekat INSR/IGF1R na homeostazu Leydig-ovih ćelija, analizirana je i relativna ekspresija transkripata za steroidogene enzime u Leydig-ovim ćelijama. Rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje transkripcije gena za glavne steroidogene enzime: *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*, *Hsd3b6*, *Hsd17b3*, kao i za *Lhcgr*, u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa transkripcijom u P21-LCs kontrolne grupe. Najveće smanjenje je zabeleženo za *Hsd3b6*, koji kodira mitohondrijalni enzim HSD3B6 (90,9x), ponovo sugerišući uticaj INSR/IGF1R na mitohondrijalnu fazu steroidogeneze. Značajano smanjenje nivoa transkripcije u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs uočeno je i za *Lhcgr* (50x), *Cyp11a1* (40x) i *Cyp17a1* (33,3x) u poređenju sa P21-LCs kontrolne grupe. Smanjenje transkripcije je bilo manje izraženo kod *Hsd3b1* (12,5x) i *Hsd17b3* (16,7x). Transkripcija *Star* i *Srd5a1* gena je bila značajno smanjena samo u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (2,15x za *Star*, 12,6x za *Srd5a1*) u odnosu na transkripciju u P21-LCs kontrolne grupe, dok je *Scarb1* ostao nepromenjen (Slika 5.3.8. C).

Pored ekspresije transkripata za steroidogene gene, produkcije progesterona i androgena u bazalnim i stimulisanim uslovima, praćena je i ekspresija i aktivnost aromataze u bazalnim i u uslovima stimulacije 5 μ M T. Nedostatak INSR/IGF1R uzrokovao je značajno povećanje nivoa *Cyp19a1* transkripta u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, u bazalnim (5x) i 5 μ M T - stimulisanim uslovima (4,6x) u odnosu na transkripciju u P21-LCs kontrolne grupe (Slika 5.3.8. D). Kao što je već pokazano, usled *ex vivo* stimulacije 5 μ M T, zapažena je značajno povećana produkcija E2 u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa produkcijom od strane P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u bazalnim uslovim (1,74x, tj. 74,42%), kao i sa produkcijom P21-LCs kontrolne grupe tretiranih 5 μ M T (1,52x, tj. 51,11%) (Slika 5.3.8. D).

Iako su efekti na markere mitohondrijalne biogeneze izostali ili bili suprotni onima u Leydig-ovim ćelijama, odustvo INSR/IGF1R imalo je uticaja na ekspresiju transkripata za elemente steroidogene mašinerije u tkivu ovarijuma i nadbubrežnih žlezda oba pola. Ekspresija *Star*, *Cyp11a* i *Cyp17a1* bila je značajno smanjena u ovarijumima P21-*Insr/Igf1r*-DKO ženki u poređenju sa ovarijumima kontrolne grupe. Zapažen je i trend povećanja ekspresije *Hsd3b6* and *Hsd17b3* u ovarijumima P21-*Insr/Igf1r*-DKO ženki koji nije statistički značajan. U ovarijumima P21-*Igf1r*-SKO ženki, uočeno je statistički značajno smanjenje ekspresije *Cyp17a1*, dok je ekspresija ostalih transkripata ostala nepromenjena. Koncentracija estradiola u serumu P21-*Igf1r*-SKO i P21-*Insr/Igf1r*-DKO ženski bila je značajno smanjena u poređenju sa koncentracijom u kontrolnoj grupi (Slika 5.3.9).



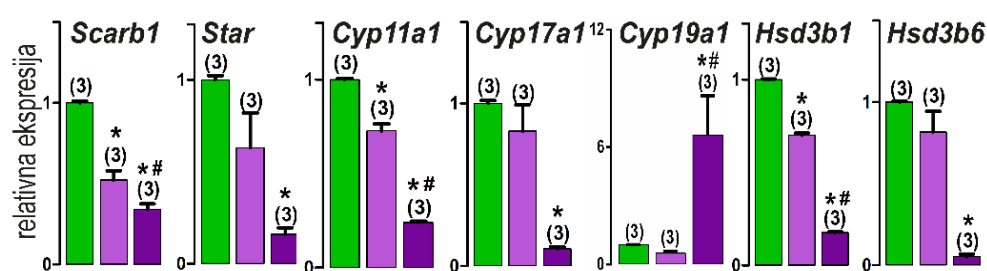
Slika 5.3.9. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima smanjuje koncentraciju estradiola u serumu i utiče na transkripciju steroidogenih gena u ovarijumima P21 ženki miševa.

Koncentracija serumskog estradiola kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO ženki (A). RQ-PCR analiza relativne ekspresije steroidogenih gena u tkivu ovarijuma (B).

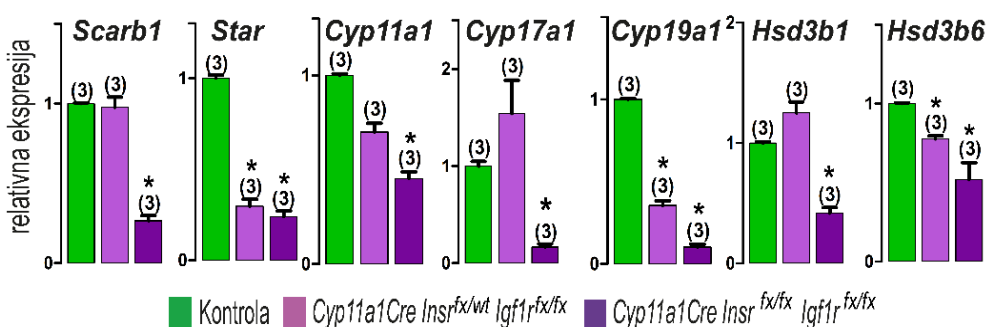
Koncentracija estradiola u serumu je merena ELISA metodom, dok je relativna ekspresija gena praćena RQ-PCR metodom, a „post-run“ analiza je rađena pomoću *Mastercycler® eprealplex* programa (Eppendorf). Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu.

Analiza relativne ekspresije gena u tkivu nadbubrežnih žlezda pokazala je značajno smanjenje transkripcije *Scarb1*, *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1* i *Hsd3b6* gena i povećanje transkripcije *Cyp19a1* u nadbubrežnim žlezdama P21-*Insr/Igf1r*-DKO mužjaka. Kod P21-*Igf1r*-SKO mužjaka, uočeno je značajno smanjenje transkripcije *Scarb1*, *Cyp11a1* i *Hsd3b1* u odnosu na nadbubrežne žlezde mužjaka kontrolne grupe (Slika 5.3.10. A). Transkripcija svih praćenih gena (*Scarb1*, *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*, *Hsd3b1* i *Hsd3b6*) bila je značajno smanjena u nadbubrežnim žlezdama P21-*Insr/Igf1r*-DKO ženki u poređenju sa kontrolnim ženkama. Kod P21-*Igf1r*-SKO ženki, zapaženo je značajno smanjenje ekspresije *Star*, *Cyp19a1* i *Hsd3b6* gena (Slika 5.3.10. B).

A Nadbubrežne žlezde mužjaka



B Nadbubrežne žlezde ženki



Slika 5.3.10. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima utiče na transkripciju glavnih steroidogenih gena u nadbubrežnim žlezdama P21 mužjaka i ženki miševa.

Ekspresija glavnih gena uključenih u steroidogenezu u nadbubrežnim žlezdama kontrolnih, *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO ženki (A) i mužjaka (B) P21 miševa. Relativna ekspresija gena praćena RQ-PCR metodom, a „post-run“ analiza je rađena pomoću *Mastercycler® eprealplex* programa (Eppendorf). Rezultati su analizirani One-Way ANOVA testom uz poređenje individualnih srednjih vrednosti Tukey *post hoc* testom. Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (broj individua za svaku eksperimentalnu grupu/genotip naveden je iznad stubića). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$: *statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, # u odnosu na *Igf1r*-SKO.

6. Diskusija

6.1. Receptori za insulin i IGF1 su značajno uključeni u regulaciju razvoja fenotipa muških reproduktivnih organa

Uloga familije insulinu sličnih faktora rasta potvrđena je na više stadijuma razvoja steroidogenih tkiva: nadbubrežne žlezde (Wang i Hardy 2004; Manna i sar. 2006; Pitetti i sar. 2013a) i gonada (Baker i sar. 1996; Nef i sar. 2003; Pitetti i sar. 2013 a, b; Neijnik i sar. 2018).

U ovoj doktorskoj disertaciji proučene su relevantne fenotipske karakteristike muških reproduktivnih organa prepubertalnih (P21) i adultnih (P80) miševa sa kondicionalnom delecijom *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima kao jedna od potvrda prisustva delecije. Dobijeni rezultati su pokazali da je: (1) relativna masa testisa P21-*Igf1r*-SKO i P21-*Insr/Igf1r*-DKO miševa bila je značajno manja (za 43 % i 82 %) od relativne mase testisa kontrolne grupe; (2) relativna masa testisa P80-*Igf1r*-SKO i P80-*Insr/Igf1r*-DKO miševa bila je značajno manja za 40 % i 75 % u poređenju sa kontrolnom grupom; (3) veličina testisa, semenih vezikula i epididimisa bila je smanjena kod *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO obe uzrasne kategorije (P21 i P80). Iako je i efekat pojedinačne delecije *Igf1r* primetan, efekat dvostruke delecije (*Insr* i *Igf1r*) bio je izraženiji, što ukazuje na značaj oba receptora u razvoju ovih organa.

Uočene fenotipske promene su u korelaciji sa ranije identifikovanim efektima familije insulinu sličnih faktora rasta na razvoj steroidogenih tkiva kroz eksperimentalne modele konstitutivne delecije *Igf1* (Baker i sar. 1996) ili *Insr/Igf1r* (Pitetti i sar. 2013a, b), ali i sa onima koje su nedavno opisane na istom eksperimentalnom modelu miševa sa kondicionalnom delecijom u steroidogenim ćelijama - *Cyp11a1Cre⁺ Insr^{fx/fx} Igf1r^{fx/fx}* (Neijnik i sar. 2018). Ranije je pokazano da su miševi sa konstitutivnom delecijom *Igf1* infertilne jedinke, manje telesne mase i sa 80% manjom produkcijom spermatozoida i testosterona u poređenju sa kontrolnim životinjama, a kao posledica značajnog kašnjenja u razvoju Leydig-ovih ćelija i poremećaja sekrecije testosterona stimulisane LH hormonom (Baker i sar. 1996). Novija istraživanja na miševima sa konstitutivnom delecijom *Insr* i *Igf1r* su pokazala značaj ovih faktora u regulaciji proliferacije somatskih progenitornih ćelija u gonadama oba pola (XX i XY) pre početka polne determinacije (Pitetti i sar. 2013a), ali i u regulaciji delovanja FSH, broja Sertoli-jevih ćelija i veličine testisa (Pitetti i sar. 2013b; Griffeth i sar. 2014). Konačno, na modelu istih, *Cyp11a1Cre⁺ Insr^{fx/fx} Igf1r^{fx/fx}* miševa starih 20 (P20) i 120 dana (P120), pokazano je da su *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim ćelijama potrebni za razvoj testisa,

nadbubrežne žlezde, razvoj Leydig-ovih ćelija i fertilitnost uopšte. Odnos mase testisa i ukupne mase, kod P20 i P120 miševa sa kondicionalnom delecijom *Igf1r* ili oba (*Insr* i *Igf1r*) gena, bio je redukovano za ~ 60 % i ~ 85 %, dok pojedinačna delecija *Insr* nije imala efekta na masu testisa (Nejnik i sar. 2018). Osim uloge INSR i IGF1R, pokazana je i značajna uloga IRS2 (*engl.* insulin receptor substrate 2) u razvoju testisa tokom embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja, verovatno posredstvom IGF1 signalizacije (Griffeth i sar. 2013).

Rezultati dobijeni tokom istraživanja opisanog u ovoj doktorskoj disertaciji, zajedno sa rezultatima drugih istraživanja na istom modelu (Nejnik i sar. 2018), ukazuju na to da su INSR/IGF1R i njihova signalizacija u steroidogenim ćelijama ključni za razvoj muških reproduktivnih organa, iako pitanje tačnog mehanizma ovog nivoa regulacije ostaje otvoreno.

6.2. Receptori za insulin i IGF1 su značajno uključeni u regulaciju diferencijacije i steroidogene funkcije Leydig-ovih ćelija

Brojna istraživanja ukazuju na ulogu IGF1 (Baker i sar. 1996; Manna i sar. 2006; Hu i sar. 2010) i INSR/IGF1R (Pitetti i sar. 2013a; Nejnik i sar. 2018) u razvoju i funkcionalnosti Leydig-ovih ćelija tokom postnatalnog perioda. Međutim, geni i mehanizmi koji posreduju ove efekte, kao i njihova aktivnost/prisustvo u različitim razvojnim fazama, i dalje su nedovoljno poznati. Kao što je već navedeno, dosadašnja istraživanja uloge IGF1, INSR i IGF1R na razvoj gonada, kao i razvoj i funkciju Leydig-ovih ćelija, su rađena *in vitro* na ćelijskim kulturama (Manna i sar. 2006), ili *in vivo*, na modelima sa konstitutivnom delecijom gena za IGF1, INSR i/ili IGF1R (Baker i sar. 1996; Hu i sar. 2010; Pitetti i sar. 2013a). Uz nedostake ovih modela i veliku smrtnost ovakvih delecija u perinatalnom periodu, uloga INSR i IGF1R u razvoju funkcionalnih karakteristika Leydig-ovih ćelija ostala je nerazjašnjena u potpunosti.

U istraživanju opisanom u ovoj doktorskoj disertaciji, primarna kultura Leydig-ovih ćelija, izolovanih iz miševa sa kondicionalnom delecijom *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim ćelijama, korišćena je za praćenje (1) njihovog steroidogenog kapaciteta i aktivnosti, (2) ekspresije glavnih elemenata steroidogene mašinerije, (3) ključnih transkripcionih aktivatora i represora steroidogeneze, i (4) gena koji diktiraju razvoj muškog ili ženskog pola, a u cilju definisanja uloge INSR/IGF1R u razvoju funkcionalnosti i androgenih karakteristika Leydig-ovih ćelija. Navedeni markeri su praćeni na dva stadijuma razvoja - P21-LCs (dominantno progenitorne

ćelije adultne populacije) i P80-LCs (dominantno zrele adultne ćelije). Glavni rezultati su pokazali da je delecija *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim ćelijama značajno uticala na obim populacije P21-LCs i P80-LCs i njihove funkcionalne karakteristike (sa izraženijim efektom na P21-LCs), upućujući na pojavu karakteristika ženskog pola - „feminizaciju“, kao i na suprotne efekte nedostatka INSR i IGF1R u Leydig-ovim ćelijama i STs. U prilog tome govori sledeće: (1) broj izolovanih P21-LCs i P80-LCs je značajno smanjen; (2) produkcija androgena (bazalna produkcija androgena, steroidogeni kapacitet, steroidogena aktivnost) je značajno smanjena; (3) ekspresija glavnih elemenata steroidogene mašinerije je značajno smanjena; (4) ekspresija transkripcionih represora steroidogeneze, *Arr19* i *Dax1*, je povećana specifično u Leydig-ovim ćelijama, ali ne i u ostatku testisa; (5) ekspresija markera muškog pola je izmenjena; (6) ekspresija markera ženskog pola je povećana; (7) ekspresija *Cyp19a1* i produkcija E2 su povećane specifično u Leydig-ovim ćelijama. Shodno navedenom, specifičnom delecijom *Insr* i/ili *Igf1r* u ćelijama koje proizvode steroidne hormone, u *in vivo* sistemu, potvrđena je važna uloga INSR/IGF1R u regulaciji diferencijacije i razvoja androgenih karakteristika progenitornih i adultnih Leydig-ovih ćelija.

6.2.1. Receptori za insulin i IGF1 su ključni u regulaciji steroidogene funkcije Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa

Poznato je da su insulin i IGF1 veoma važni faktori u regulaciji steroidogene funkcije Leydig-ovih ćelija (Baker i sar. 1996; Manna i sar. 2006; Neijnik i sar. 2018). Stoga je razumevanje uloge njihovih receptora, kao i mehanizama koji su uključeni u ovaj vid regulacije funkcionalnosti Leydig-ovih ćelija, od velikog značaja.

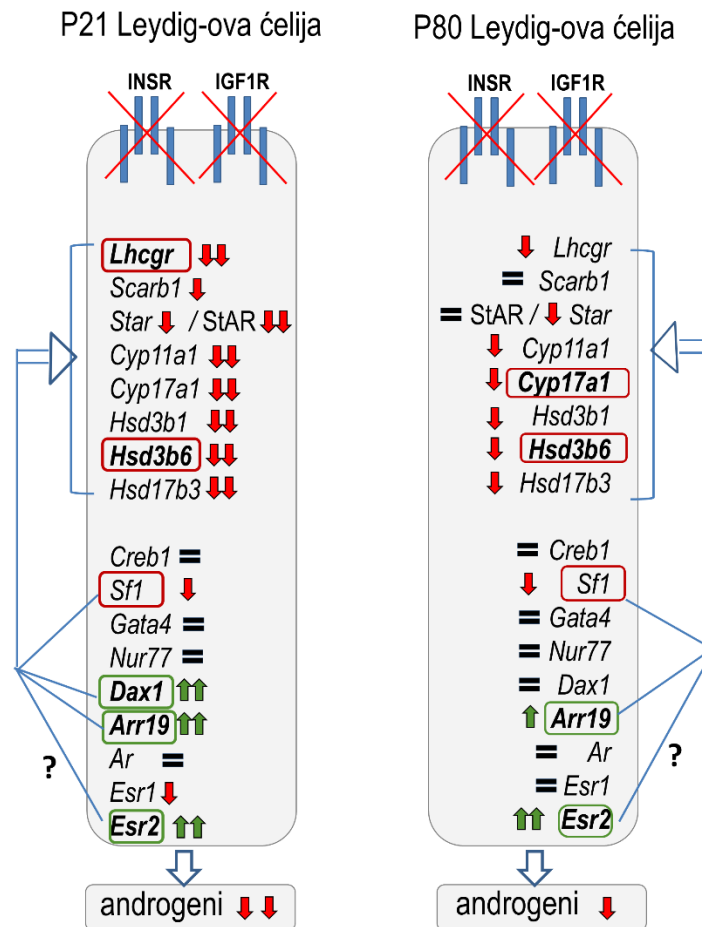
Rezultati dobijeni tokom istraživanja u okviru ove disertacije pokazuju da su markeri funkcije Leydig-ovih ćelija značajno izmenjeni usled delecije *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim ćelijama (Slika 6.2.1). Funkcionalni kapacitet i aktivnost P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, ali i P80-LCs istih genotipova, su značajno smanjeni u odnosu na P21/P80-LCs kontrolne grupe. Bazalna produkcija androgena je smanjena 13,3x u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i 7,61x u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Steroidogeni kapacitet je smanjen 278x u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i 2,54x u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Steroidogena aktivnost je bila 12,72x manja u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i 1,96x u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs.

Smanjena produkcija androgena može biti logična posledica izraženo smanjene ekspresije transkripata za glavne elemente steroidogene mašinerije (*Lhcgr*, *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*, *Hsd3b6*, *Hsd17b3*) u *Igf1r*-SKO-LCs i *Insr/Igf1r*-DKO-LCs obe uzrasne kategorije. Pored smanjene transkripcije gena, ekspresija StAR i HSD3B proteina u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, i HSD3B u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, bila je smanjena. Uz to, koncentracija LH u serumu *Insr/Igf1r*-DKO miševa bila je povećana 5x u poređenju sa kontrolnim miševima što pokazuje da je i HPG osovina narušena usled odsustva INSR/IGF1R (Neijnik i sar. 2018). Ovakvi rezultati ukazuju na značajnu ulogu INSR/IGF1R u regulaciji steroidogeneze i to na nivou regulacije ekspresije gena za glavne elemente steroidogene mešinerije. Slično uočenim fenotipskim promenama, efekti dvostruke delecije su bili izraženiji od pojedinačne delecije *Igf1r*. Sve navedeno je u skladu sa ranije potvrđenim kritičnim značajem MEK/ERK1/2 signalizacije za funkcionalnost adultne populacije Leydig-ovih ćelija (Yamashita i sar. 2011) i vezama između IGF1R-MAPK signalizacije i ekspresije steroidogenih markera. Poznato je da su ekspresija StAR proteina i sinteza steroida pozitivno regulisani IGF1 signalizacijom (Manna i sar. 2006). Takođe, IGF1 je jedan od faktora koji povećava transkripciju gena za StAR i CYP11A1 u Leydig-ovim ćelijama, dok je insulin okarakterisan kao pozitivni regulator CYP11A1 (King i LaVoie 2012).

Delecija *Insr* i *Igf1r* (ni pojedinačna, ni dvostruka) nije imala efekta na ekspresiju transkripata za transkripcione faktore *Creb1*, *Gata4* i *Nur77*, dok je, i pored toga, pNUR77 povećan u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Profil ekspresije navedenih transkripata nije u skladu sa ekspresijom gena za steroidogene enzime, budući da su u pitanju važni transkripcioni aktivatori steroidogenog procesa. Ovakvi rezultati su u suprotnosti sa onima koji ukazuju na ulogu CREB1 i GATA4 u pozitivnoj regulaciji gena za steroidogene enzime, sugerišući da je regulacija ekspresije ovih gena od strane INSR/IGF1R posredovana mehanizmima nezavisnim od ekspresije navedenih transkripcionih faktora. Poznato je da su GATA4 i CREB1 važni transaktivatori *Cyp11a1* transkripcije (Martin i Tremblay 2010), GATA4 i GATA6 transkripcije *Hsd3b* u MA-10 Leydig-ovim ćelijama (Simard i sar. 2005), a GATA2 i GATA3 su transaktivatori humanog *HSD17B1* gena (Tremblay 2015). Ovakva ekspresija transkripcionih faktora, kao i manje izraženo smanjenje steroidogene funkcije u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, mogu ukazivati na postojanje adaptivnih mehanizama u uslovima smanjene signalizacije od INSR/IGF1R.

Sa druge strane, ekspresija *Sf1* transkripta, jednog od važnih transkripcionih aktivatora razvoja gonada i steroidogeneze (Morohashi 1997), smanjena je u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, što je u korelaciji sa profilom ekspresije steroidogenih gena, sugerirajući da je to mogući transkripcioni faktor koji posreduje efekat nedostatka INSR/IGF1R. SF1 je esencijalni transkripcioni faktor koji promovira diferencijaciju Sertoli-jevih ćelija i muških gonada tako što (1) učestvuje u aktivaciji ekspresije *Sry* gena, (2) unapređuje i održava ekspresiju *Sox9* u prekursorima Sertoli-jevih ćelija, ali i (3) regulira funkcionalnost samih Leydig-ovih ćelija (Sekido i Lovell-Badge 2008; Pitetti i sar. 2013a, b) i (4) reprogramiranje fibroblasta u Leydig-ove ćelije (Inoue i sar. 2018). Potvrđena je i analogija između efekta konstitutivne delecije *Nr5a1* (*Sf1*) i delecije *Insr/Igf1r* koje su uzrokovale odsustvo razvoja nadbubrežnih žlezda i reverziju pola, zbog čega se pretpostavlja da postoji kooperativnost između SF1 i INSR/IGF1R signalizacije (Luo i sar. 1994).

U prilog smanjenoj ekspresiji steroidogenih markera u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs ide i povećana ekspresija transkripcionih represora *Dax1* i *Arr19* u istim ćelijama (Slika 6.2.1). DAX1 je poznati transrepresor gena za steroidogene enzime i kao takav može biti uzrok smanjene steroidogene aktivnosti Leydig-ovih ćelija i još jedan od potencijalnih medijatora efekta nedostatka INSR i IGF1R. Poznato je da DAX1 formira heterodimerne komplekse sa SF1, čime sprečava njegovu aktivnost transkripcionog aktivatora, pre svega *Cyp11a1*, *Cyp17* i *Cyp19* gena (Clipsham i McCabe 2003; Lalli i Sassone-Corsi 2003). Takođe, inhibira i ekspresiju StAR proteina direktnim vezivanjem za DNK u oblasti genskog promotora (Zazopoulos i sar. 1997) ili preko modulacije signalnih puteva PRKA i PRKC (Manna i sar. 2009). Pored toga, DAX1 inhibira aktivnost promotora *Nur77* gena *in vivo* i *in vitro* (Song i sar. 2004). *Arr19/ARR19*, poznat je, pre svega, kao represor transkripcione aktivnosti ARs (Jeong i sar. 2004). Uključen je u regulaciju produkcije testosterona preko regulacije ekspresije steroidogenih gena (inhibiranjem aktivnosti promotora *Nur77* gena), a veruje se da ima važnu ulogu i u razvoju Leydig-ovih ćelija (Qamar i sar. 2010). Kao takav, može biti još jedan od potencijalnih medijatora efekta nedostatka INSR i IGF1R na steroidogenu funkciju Leydig-ovih ćelija.



Slika 6.2.1. Delecija *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim tkivima menja transkripcijski profil gena za glavne elemente steroidogene mašinerije i relevantne transkripcijske faktore/nuklearne receptore u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 miševa.

Efekat delecije *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim tkivima na steroidogenu funkciju Leydig-ovih ćelija je izraženiji kod P21 miševa i slabi sa odrastanjem (do P80). Obrazac ekspresije *Sf1*, *Dax1* i *Arr19* (transkripcijskih aktivatora/inhibitora steroidogeneze i razvoja pola) čini ove transkripcijske faktore kandidatima koji posreduju efekat nedostatka *INSR*/*IGF1R* na ekspresiju gena za steroidogene enzime.

Zelene strelice označavaju povećanje ekspresije, crvene smanjenje ekspresije (odnosno produkcije androgena), a znak jednakosti nepromenjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Crveni pravougaonici označavaju transkripte čije je smanjenje ekspresije bilo najizraženije, dok zeleni označavaju one sa najvećim relativnim povećanjem ekspresije. Povratne strelice ukazuju na mogući uticaj smanjene transkripcije *Sf1* i povećane transkripcije *Arr19*, *Dax1* i *Esr2* na ekspresiju gena za steroidogene enzime (znak pitanja ukazuje na do sada nepotvrđenu ulogu *ESR2* kao negativnog transkripcijskog regulatora gena za steroidogene enzime, za razliku od *DAX1* i *ARR19*).

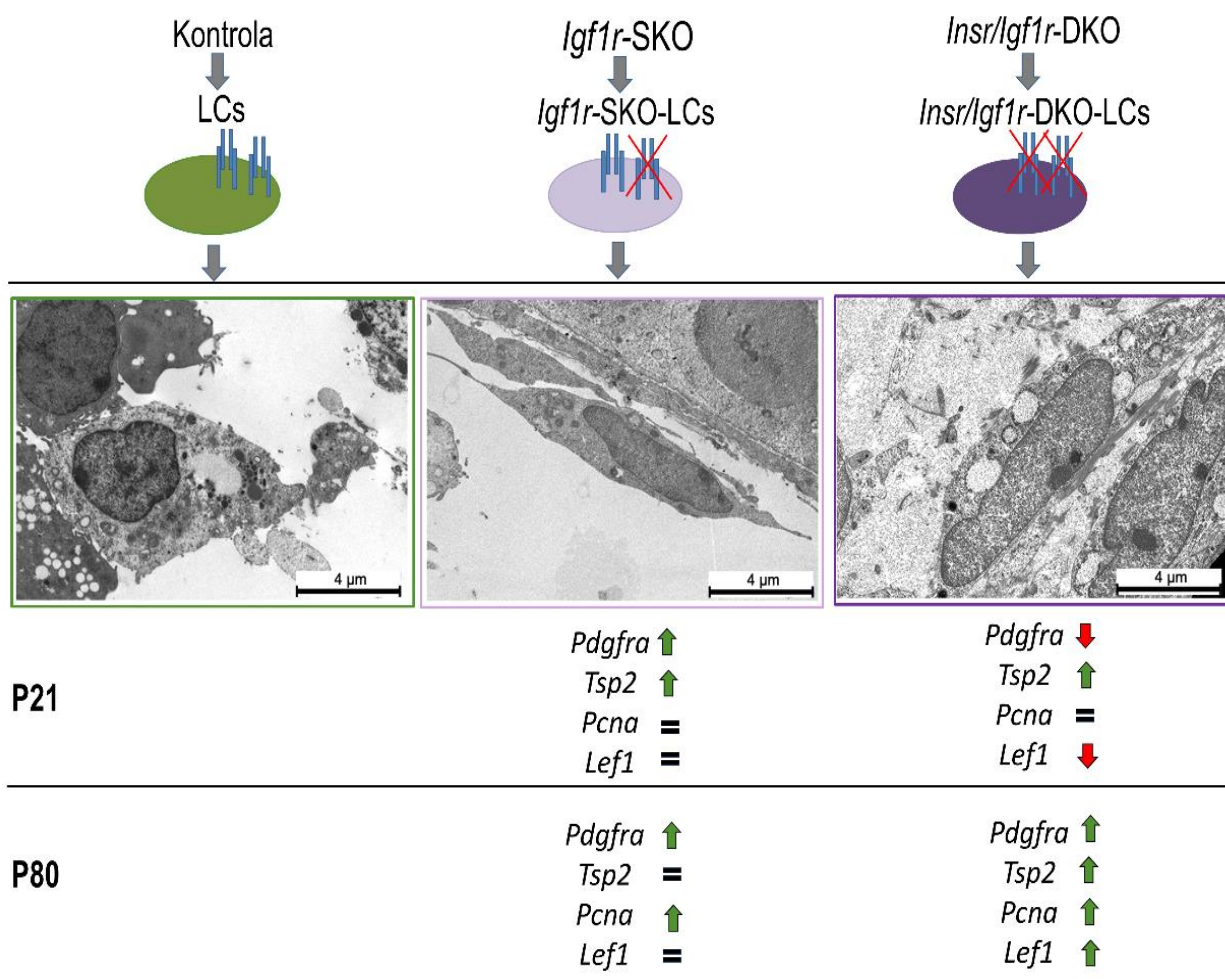
Efekat odsustva INSR i IGF1R u steroidogenim tkivima na funkcionalne karakteristike Leydig-ovih ćelija je bio izraženiji kod P21 u odnosu na P80 miševa, sugerirajući mogući oporavak tokom diferenciranja ALCs (Slika 6.2.1). Može postojati nekoliko razloga za to: (1) povećanje relativne ekspresije steroidogenih gena, (2) smanjenje relativne ekspresije *Arr19* i *Dax1*, glavnih steroidogenih represora i (3) povećanje relativne ekspresije markera proliferacije i diferencijacije ćelija u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Može se spekulirati da postoje mehanizmi adaptacije kojima se „prevazilazi“ nedostatak INSR/IGF1R signalizacije u testisima odraslih miševa. Jedan od mogućih mehanizama je porast ekspresije transkriptata za neke od poznatih markera proliferacije i diferencijacije (*Tsp2*, *Pdgfra*, *Pcna* i *Lef1*) u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Ovo je u korelaciji sa prethodnim istraživanjima koja ukazuju na to da se ekspresija *Pdgfra* povećava na početku procesa regeneracije populacije Leydig-ovih ćelija kada se i dešava proliferacija prekursora (O'Shaughnessy i sar. 2008). *Pdgfra* je poznat i kao marker čija ekspresija raste tokom *de novo* regeneracije adultnih Leydig-ovih ćelija (Makala i sar. 2015), a ekspresija *Pcna* je i tokom ranijih istraživanja praćena kao pokazatelj proliferacije Leydig-ovih ćelija (Li i sar. 2016). U prilog tome, potvrđena je i *de novo* „regrutacija“ COUP-TF2-pozitivnih ćelija (opredeljenih progenitornih ćelija koje daju populaciju adultnih Leydig-ovih ćelija) u testisima P20 *Insr/Igf1r*-DKO miševa (Neirijnck i sar. 2018). Ostaje nepoznato da li se isto dešava i u ALCs, iako rezultati ovog istraživanja sugeriraju da postoji mogućnost takve obnove populacije nakon P80.

Delecija *Insr* i *Igf1r* značajno utiče na diferencijaciju Leydig-ovih ćelija. Broj P21-LCs i P80-LCs, izolovanih iz *Igf1r*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO miševa, bio je značajno manji u odnosu na broj Leydig-ovih ćelija izolovanih iz P21 i P80 miševa kontrolne grupe. Šta više, TEM analiza testisa je pokazala da su morfologija i citologija progenitornih P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs značajno izmenjene, ukazujući na manji stepen diferencijacije u odnosu na P21-LCs kontrolne grupe. Kao što je već navedeno, ekspresija transkriptata za markere proliferacije i diferencijacije bila je izmenjena u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (Slika 6.2.2). Ovakvi nalazi su u korelaciji sa ranijim koji sugeriraju da je IGF1 jedan od ključnih autokrinih i parakrinih faktora, kao i posrednika efekta LH, u kontroli broja i funkcije adultnih Leydig-ovih ćelija (Wang i Hardy 2004). Na *in vivo* modelu miševa sa konstitutivnom delecijom *Igf1*, ranije je pokazano da je proliferacija opredeljenih progenitornih, kao i broj zrelih adultnih Leydig-ovih ćelija značajno smanjen (Hu i sar.

2010), kao i da IGF1 ima antiapoptotički efekat na Leydig-ove ćelije pacova tokom postnatalnog razvoja, posredovan Akt/PI₃K (Colon i sar. 2007).

Iako ekspresija markera ukazuje na povećanu proliferaciju, ipak ne rezultuje povećanjem broja P80-*Insr/Igflr*-DKO-LCs u odnosu na P80-LCs kontrolne grupe (odnos je sličan onom kod P21 miševa). Ostaje otvoreno pitanje da li do takvih promena dolazi na kasnijim stadijumima razvoja? Mogući uzrok smanjenom broju P21-LCs i P80-LCs usled delecije *Insr* i *Igflr* u steroidogenim ćelijama, može biti i smanjena produkcija androgena i povećana produkcija E2, budući da je ranije pokazano da androgeni/AR imaju kritičnu ulogu u razvoju adultnih Leydig-ovih ćelija (O'Shaughnessy i sar. 2002b), a 17 β -estradiol je poznat kao negativni regulator ćelijske proliferacije (preko ESR1 i ESR2) i steroidogeneze (preko ESR1) na stadijumu PLCs (Seok Oh i sar. 2017). Na modelu transgenih miševa sa tzv. „over“ ekspresijom humanog *CYP19A1* gena, visok nivo E2 je povećao hiperplaziju Leydig-ovih ćelija, aktivaciju makrofaga preko ESR1 - signalizacije i fagocitozu apoptotičnih ćelija (Yu i sar. 2014).

Sumirano, rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su pokazali da INSR i IGF1R imaju značajnu ulogu u regulaciji diferencijacije i steroidogene funkcije Leydig-ovih ćelija prepubertalnih i adultnih miševa. Odsustvo INSR i IGF1R ima izraženiji efekat na parametre funkcionalnosti Leydig-ovih ćelija prepubertalnih miševa što sugeriše na sticanje potencijalnih adaptivnih mehanizama u adultnom periodu.



Slika 6.2.2. Delecija *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim tkivima menja ultrastrukturu P21-LCs i obrazac transkripcije gena za neke od markera proliferacije i diferencijacije u P21-LCs i P80-LCs.

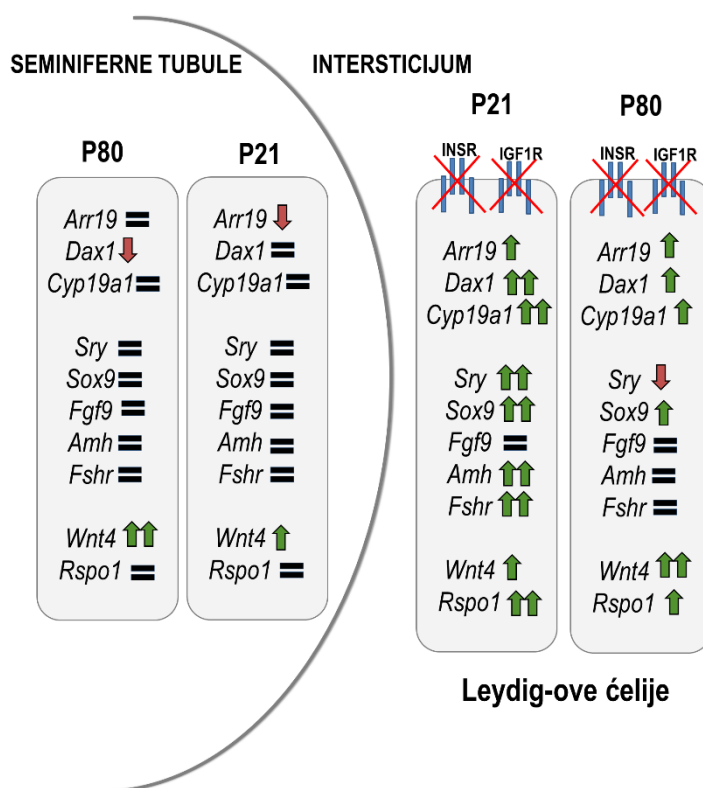
TEM mikrografije predstavljaju P21-LCs u testisima kontrolnih, *Insr*-SKO i *Insr/Igf1r*-DKO P21 miševa. Zelene strelice označavaju povećanje ekspresije, crvene smanjenje, a znak jednakosti nepromenjenu ekspresiju u odnosu na kontrolnu grupu.

6.2.2. Receptori za insulin i IGF1 regulišu transkripciju molekularnih markera diferencijacije pola i uzrokuju tzv. „feminizaciju“ Leydig-ovih ćelija

Insr i *Igf1r*, tokom embrionalnog perioda, predstavljaju važan deo kompleksnog dinamičnog transkripcionog programa koji se pokreće u somatskim progenitornim ćelijama primordijuma gonada pre diferencijacije pola (Pitetti i sar. 2013a) i imaju ključnu ulogu u razvoju XY fenotipa (Nef i sar. 2003). Ovi geni su važni za razvoj Sertoli-jevih ćelija (Pitetti i sar. 2013a, b), koje zatim direktno određuju veličinu populacije adultnih Leydig-ovih ćelija (Rebourcet i sar. 2017). Pretpostavlja se da antagonistički signalni putevi koji određuju polnu diferencijaciju, funkcionišu ne samo tokom prenatalnog razvoja već i tokom odrasle dobi. Njihov balans, preko ćelijskih autonomnih mehanizama, takođe igra važnu ulogu u održavanju normalne funkcije gonada u adultnom periodu (Tower 2017). Uloga INSR/IGF1R u regulaciji specifičnih molekularnih markera pola u embrionalnom razvoju je potvrđena ranijim istraživanjima. Međutim, njihova uloga u regulaciji ekspresije ovih markera u testisima, posebno u Leydig-ovim ćelijama, tokom postnatalnog/adultnog perioda je u velikoj meri nepoznata.

S obzirom na smanjen broj, narušenu diferencijaciju i steroidogenu funkciju P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, u nastavku istraživanja vezanih za ovu doktorsku disertaciju praćena je ekspresija markera muškog i ženskog pola koji mogu biti umešani u određivanje sudbine i sticanje androgenih karakteristika ovih ćelija. S obzirom na funkcionalnu povezanost Sertoli-jevih i germinativnih ćelija sa Leydig-ovim ćelijama (i njihovu podršku razvoju Leydig-ovih ćelija), markeri diferencijacije pola (*Dax1*, *Sry*, *Sox9*, *Fgf9*, *Amh*, *Fshr*, *Rspo1*, *Wnt4*, ali i *Cyp19a1*) su praćeni u Leydig-ovim ćelijama, STs i tkivu testisa izolovanim iz miševa sa delecijom *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim tkivima. Glavni rezultati pokazuju da INSR i IGF1R u steroidogenim tkivima imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije glavnih markera razvoja muškog i ženskog pola, sa značajnim razlikama u efektu u različitim kompartmentima testisa. U prilog tome govori sledeće: (1) povećana ekspresija *Sry* transkripta u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i smanjena u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs; (2) povećana ekspresija *Sox9* transkripta specifično u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs; (3) povećana ekspresija *Amh* i *Fshr* transkripata specifično u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs; (4) povećana ekspresija transkripata markera ženskog pola, *Rspo1* i *Wnt4*, u testisima P21- i P80-*Insr/Igf1r*-DKO miševa; (5) povećana ekspresija *Cyp19a1* transkripta specifično u Leydig-ovim ćelijama; (5) smanjena ekspresija *Sfl* i povećana ekspresija *Dax1* transkripta

specifično u Leydig-ovim ćelijama. Stepenn promena je izraženiji u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u odnosu na P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, izuzev promene u ekspresiji *Wnt4* (Slika 6.2.3).



Slika 6.2.3. Delecija *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim tkivima različito menja transkripcioni profil molekularnih markera razvoja muškog i ženskog pola u testisima P21 i P80 miševa u zavisnosti od nivoa strukturne i funkcionalne organizacije.

Zelene strelice označavaju povećanje ekspresije, crvene smanjenje, a znak jednakosti nepromenjenu ekspresiju u odnosu na kontrolnu grupu.

SRY, SOX9 i FGF9 se smatraju ključnim molekularnim antagonistima razvoja XX fenotipa. Njihova ekspresija, pre svega tokom prenatalnog razvoja, je prevashodno karakteristična za Sertoli-jeve ćelije, ali se zna da je ekspresija *Sox9*, uz *Sox5* i *Sox13*, potvrđena i u nukleusu MA-10 Leydig-ovih ćelija miševa (Daigle i sar. 2015). Rezultati istraživanja u ovoj disertaciji su, pored transkripata *Sox9* gena, pokazala i prisustvo transkripata *Sry* i *Fgf9* gena u Leydig-ovim ćelijama. Relativna transkripcija *Sry* gena u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs je povećana, sa tendencijom povećanja i u P21-STs istog genotipa (ali promena nije statistički značajna). Suprotno tome, ekspresija *Sry* transkripta je smanjena u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, tj. nepromenjena u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-STs. *Sry* je visoko konzerviran gen, Y-specifičan, široko rasprostranjen među sisarima, i njegova transkripcija je karakteristična za testise

(Sinclair i sar. 1990). Poremećena ili odložena ekspresija *Sry* ometa razvoj testisa, naglašavajući važnost njegove precizne prostorno-vremenske regulacije i implicira potencijalnu ulogu SRY u poremećajima razvoja pola kod ljudi (Larney i sar. 2014; Gonen i sar. 2018). Kroz direktnu regulaciju SOX9, SRY inicira kaskadu ekspresije gena važnih za diferencijaciju i ćelijsku specifikaciju Leydig-ovih ćelija (Sekido i Lovell-Badge 2008). Naši rezultati pokazuju da je ekspresija *Sox9* izraženo povećan u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, ali i u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs (uprkos samnjenjnoj ekspresiji *Sry*), dok delecija *Insr/Igf1r* nije imala efekta na njegovu ekspresiju u STs istog genotipa i starosne kategorije. Ekspresija SOX9 u Sertoli-jevima ćelijama je neophodna za prevenciju reverzije pola do odrasle dobi (Lardenois i sar. 2010). Poznato je i da prekomerna (tzv. „over“) ekspresija SOX9 uzrokuje razvoj muškog fenotipa XX miševa (Bishop i sar. 2000; Vidal i sar. 2001), ali i ženskog fenotipa (ili tzv. „međufenotipa“) kod XY pacijenata (Schafer i sar. 1996). Međutim, ekspresija *Fgf9*, koji je uz *Sox9* molekularni antagonist razvoja ovarijuma (Kim i sar. 2006; Jameson i sar. 2012), je ostala nepromenjena.

Tokom razvoja XY jedinki, SF1 i DAX1, čija ekspresija tokom embrionalnog razvoja započinje pre SRY, su takođe ključni faktori u diferencijaciji testisa. Naši rezultati pokazuju da je ekspresija *Sfl* transkripta bila smanjena u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, a transkripcija *Dax1* je povećana u istim ćelijama. SF1 je uključen u regulaciju ranog razvoja pola preko kontrole transkripcione aktivnosti gena za SOX9 i AMH. Kooperativnost SF1, SRY i SOX9 u promovisanju ekspresije gena za SOX9, sa manjim varijacijama u mehanizmu između vrsta, je evidentna, a molekularni mehanizma je opisan kod miševa i ljudi (Croft i sar. 2018). SF1 je esencijalan, kako za rani razvoj pola, tako i za transkripcionu aktivnost steroidogenih gena. Veoma važan faktor u regulaciji aktivnosti SF1 je DAX1, sa kojim formira heterodimerne komplekse, i koji sprečavaju njegovu aktivnost transkripcionog aktivatora (Swain i sar. 1998). Pored toga, poznata je uloga DAX1 u ranoj determinaciji pola sisara, kao i u reverziji pola u dozno-zavisnom maniru (Ludbrook i Harley 2004). Nivo DAX1 i precizna vremenska regulacija ekspresije su ključni u ovim procesima. Duplikacija *DAX1* kod ljudi vodi reverziji muškog u ženski pol (Bowles i sar. 2018). Stoga, povećana ekspresija *Dax1* transkripta (specifično u Leydig-ovim ćelijama) uočena tokom istraživanja u okviru ove disertacije može biti jedan od potencijalnih faktora koji vodi smanjenom razvoju androgenih karakteristika Leydig-ovih ćelija. Sa druge strane, *Dax1* je nepromenjen u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-STs, tj. smanjen u P80-*Insr/Igf1r*-DKO-STs,

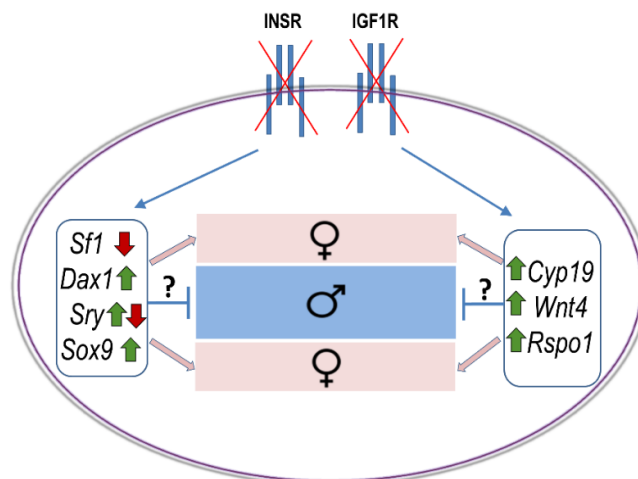
ukazujući na to da INSR/IGF1R u steroidogenim ćelijama regulišu ekspresiju *Dax1* na različit način u Leydig-ovim ćelijama i seminiferim tubulama.

Važno je naglasiti da mutacije, delecije i duplikacije gena za SRY, SOX9, SF1 i DAX1, kao i odstupanja od vremenskog i doznog tzv. „prozora“ ekspresije, mogu voditi reverziji pola kod miševa i ljudi (Hanley i sar. 2000; Ludbrook i Harley 2004). Slične promene su uočene i kada je u pitanju FGF9 (Colvin i sar. 2001). Dakle, promene ekspresije ovih gena (smanjenja, kao i velika povećanja) u odgovoru na deleciju *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim tkivima mogu biti uzrok smanjenom razvoju androgenih karakteristika i tzv. „feminizaciji“ Leydig-ovih ćelija, iako do sada nema dostupnih saznanja o ovakvim događajima u samim Leydig-ovim ćelijama (Slika 6.2.4).

U odsustvu transkripcije *Sry* gena, pokreće se alternativna genska kaskada, koja podrazumeva ekspresiju gena za RSPO1, WNT4/ β -katenin i FOXL2 (*engl.* forkhead box protein L 2), uključenih u formiranje ženskih gonada (za reference pogledati She i Yang 2017). Naši rezultati su po prvi put pokazali da su transkripti molekularnih markera ženskog pola, *Rspo1* i *Wnt4*, prisutni u Leydig-ovim ćelijama. Ekspresija *Rspo1* je bila povećana u P21- i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, kao i tokom analize tkiva testisa miševa istih genotipova i uzrasta. Sa druge strane, *Wnt4* je bio povećan, kako u Leydig-ovim ćelijama, tako i u STs i tkivu testisa, P21-*Insr/Igf1r*-DKO i P80-*Insr/Igf1r*-DKO miševa. Ovakvi rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima koja su pokazala pojavu markera specifičnih za ženski pol (uključujući *Wnt4*) u XY gonadama *Igf1r*^{-/-} *Insr*^{-/-} *Insr*^{-/-} miševa (Nef i sar. 2003) i ukazuju na pojavu karakteristika ženskog pola.

Pored promena navedenih markera pola, naši rezultati ukazuju na moguću tzv. „feminizaciju“ Leydig-ovih ćelija usled povećane transkripcije i aktivnosti *Cyp19a1*/CYP19A1, specifično u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, ali ne i u STs istih genotipova. Nivo transkripcije *Cyp19a1* gena koji kodira enzim aromatazu zadužen za konverziju T u E2, bio je značajno povećan u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Efekat specifične delecije *Insr* i *Igf1r* na ekspresiju *Cyp19a1* bio je izraženiji u P21-LCs (8,45x). Za razliku od produkcije androgena, koncentracija E2, produkovanog od strane P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, bila je povećana. Osim toga, transkripcija *Esr2* je značajno povećana u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs, dok je ekspresija *Ar* nepromenjena. Ovakvi rezultati sugerišu da efekat specifične delecije *Insr* i *Igf1r* na tzv. „feminizaciju“ Leydig-ovih ćelija može biti posredovan, ne samo povećanom ekspresijom

markera ženskog pola, već i povećanom aktivnošću aromataze i povećanom ekspresijom *Er2* u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs i P80-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Ranija istraživanjima su pokazala da *in utero* ili neonatalno izlaganje višku estrogena uzrokuje niz abnormalnosti muškog reproduktivnog trakta, ali i da je nizak nivo T u serumu infertilnih muškaraca praćen povećanim nivoom E2 (Skakkebaek i sar. 2001).



Slika 6.2.4. Favorizovanje karakteristika ženskog pola u Leydigovim ćelijama P21 i P80 miševa kao posledica delecije *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim ćelijama i obrazac ekspresije specifičnih markera kao potencijalni uzrok.

Delecije *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim ćelijama uzrokuje veliko povećanje ekspresije i aktivnosti aromataze (*Cyp19a1/CYP19A1*), kao i molekularnih markera razvoja ženskog pola (*Wnt4*, *Rspo1*). Sa druge strane, dolazi do smanjenja transkripcije *Sf1*, kao i izraženog povećanja/smanjenja transkripcije *Sry*, *Sox9* i *Dax1*, čime se potencijalno odstupa od „prozora ekspresije“ potrebnog za razvoj androgenih karakteristika.

Naši rezultati pokazuju da usled nedostatka INSR/IGF1R dolazi do povećanja ekspresije steroidogenih represora, umešanih i u regulaciju razvoja pola, specifično u Leydig-ovim ćelijama, ali ne i u ostatku testisa. Takođe, promena ekspresije molekularnih markera pola je izraženija u Leydig-ovim ćelijama *Insr/Igf1r*-DKO miševa (pre svega u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs) u poređenju sa STs istog genotipa. Ovo može ukazivati na različiti efekat delecije *Insr/Igf1r* u Leydig-ovim ćelijama i STs.

Poznato je da mikrosredina testisa i ćelije iz okruženja imaju značajnu ulogu u razvoju i funkciji adultne populacije Leydig-ovih ćelija, od prepubertalnog perioda do starosti (Curley i sar. 2019). Sertoli-jeve ćelije, kao i parakrini faktori produkovanih od strane seminifernih tubula u niši adultnih SLCs, kontrolišu razvoj i brojnost populacije adultnih Leydig-ovih ćelija *in vitro* (Rebourcet i sar. 2017). Neka istraživanja upućuju i na ulogu germinativnih ćelija u regeneraciji populacije Leydig-ovih ćelija (Li i sar. 2016). Shodno ovakvoj

funkcionalnoj povezanosti različitih tipova ćelija testisa, definisanje potencijalnih razlika u ulozi INSR/IGF1R na različitim nivoima organizacije testisa je od velikog značaja.

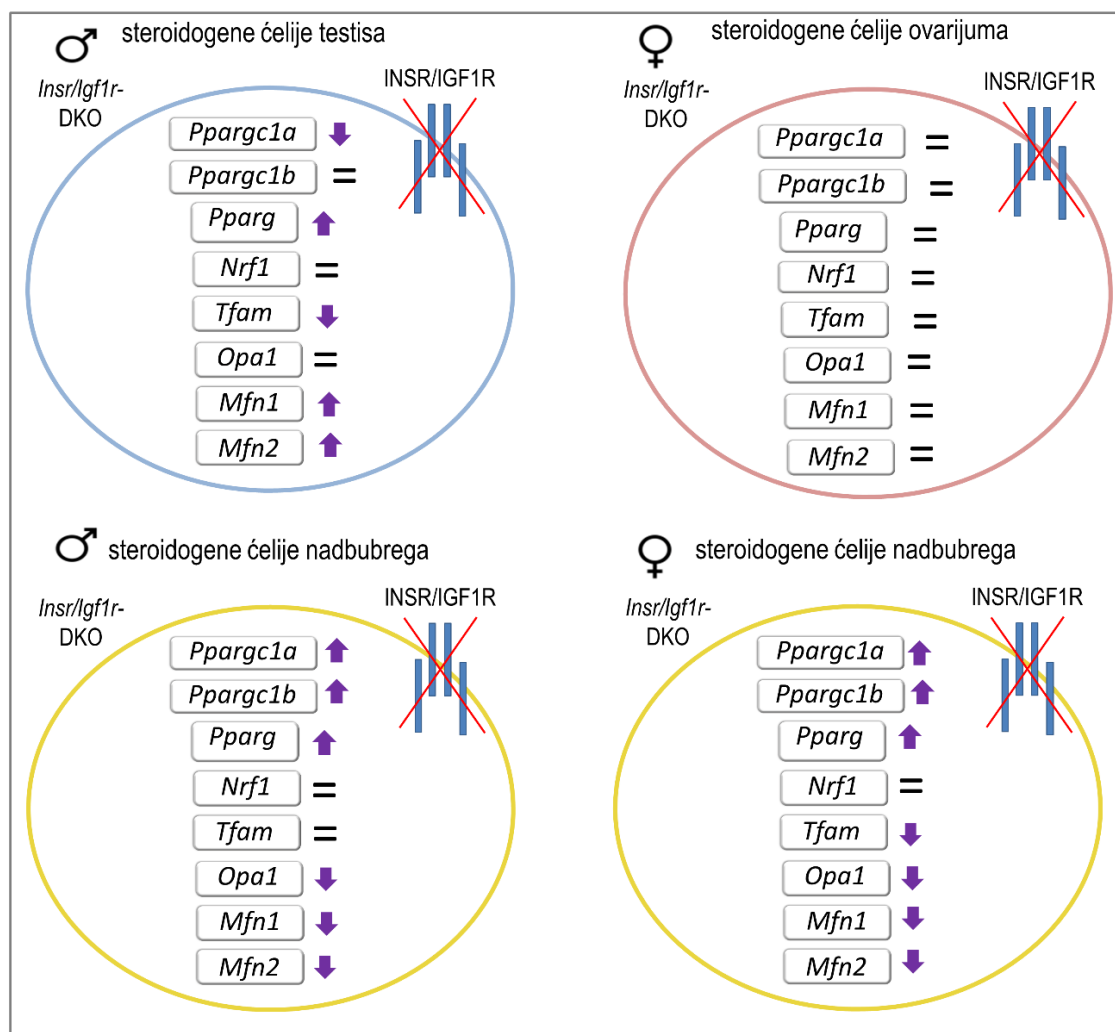
Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije nedvosmisleno ukazuju na favorizovanje karakteristika ženskog pola u Leydig-ovim ćelijama mužjaka miševa usled nedostatka INSR i IGF1R. Takođe, ukazuju i na različitu ulogu INSR i IGF1R u različitim delovima testisa, sa posebno izraženim efektom na Leydig-ove ćelije (i to P21-LCs). Kao takvi, mogu pružiti novi uvid u ulogu INSR/IGF1R signalizacije u regulaciji razvoja androgenih karakteristika Leydig-ovih ćelija i mogu biti osnov za dalja ispitivanja mehanizama specifičnih za različite nivoe organizacije testisa.

6.3. Delecija receptora za insulin i IGF1 menja transkripcioni profil markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u Leydig-ovim ćelijama, kao i morfologiju ćelija prepubertalnih (P21) miševa

S obzirom na ključnu ulogu mitohondrija u ćelijskoj fiziologiji, veoma je važno razumevanje mehanizama koji upravljaju promenama u mitohondrijalnoj morfologiji i nastanku novih mitohondrija. Ovo posebno važi za ćelije koje proizvode steroidne hormone, kao što su Leydig-ove ćelije, s obzirom na to da se ključni korak - početna faza steroidogeneze odvija u mitohondrijama, i ove organele su ključna kontrolna tačka za regulaciju biosinteze steroida (Haider 2004; Miller i Auchus 2011). U okviru istraživanja vezanih za ovu doktorsku disertaciju, korišćeni su mužjaci i ženke prepubertalnih miševa (P21) sa delecijom gena za INSR i IGF1R u steroidogenim tkivima za ispitivanje ekspresije ključnih regulatora mitohondrijalne biogeneze (*Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Pparg*, *Nrf1*, *Tfam*) i mitohondrijalne arhitekture (*Mfn1*, *Mfn2*, *Opal*) u Leydig-ovim ćelijama, ovarijumima i nadbubrežnim žlezdama.

Pored toga, Leydig-ove ćelije su korišćene za praćenje ekspresije ključnih proteina uključenih u regulaciju mitohondrijalne biogeneze, ali i biosintezu testosterona. Na ovaj način je, specifičnom delecijom *Insr* i/ili *Igf1r* u ćelijama koje proizvode steroidne hormone, u *in vivo* sistemu potvrđena važna uloga receptora za familiju insulinu sličnih faktora rasta u regulisanju markera mitohondrijalne biogeneze i arhitekture u progenitornim Leydig-ovim ćelijama kroz najvažnije dobijene rezultate: (1) Ekspresija *Ppargc1a*/PGC1, glavnog regulatora mitohondrijalne biogeneze, kao i gena za njegov ciljni transkripcioni faktor *Tfam*, značajno je smanjena u Leydig-ovim ćelijama. (2) Transkripcija *Mtnd1* (gena u sastavu

mtDNA koji kodira subjedinicu 1 NADH dehidoregaze neophodnu za katalizu) takođe je smanjena. (3) Nivo transkripcije za markere mitohondrijalne arhitekture (*Mfn1*, *Mfn2*) značajno je povećan u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs sugerišući da su narušene mitohondrijalna arhitektura i mitohondrijalna faza steroidogeneze. (4) U prilog tome, bazalna i progonolonom stimulirana produkcija progesterona u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs je smanjena više od produkcije androgena i koncentracije oba hormona su veoma niske. (5) Transkripcija markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture ostala je nepromenjena u ovarijumima ženki miševa, dok je profil transkripcije ovih markera u nadbubrežnim žlezdama P21-*Insr/Igf1r*-DKO miševa sličan kod oba pola, ali suprotan onom u Leydig-ovim ćelijama: *Ppargc1a* je povećan, *Mfn1* i *Mfn2* su smanjeni, dok je *Mtd1* povećan samo kod mužjaka (Slika 6.3.1).



Slika 6.3.1. Delecija *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim tkivima menja profil transkripcije markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u steroidogenim ćelijama testisa i nadbubrežnih žlezda, ali ne i ovarijuma, P21 miševa.

Ljubičaste strelice označavaju povećanje ili smanjenje ekspresije datog gena u odnosu na kontrolu, dok znak jednakosti predstavlja nepromenjenju ekspresiju.

6.3.1. Delecija insulinskog i IGF1 receptora menja transkripcioni profil markera mitohondrijalne biogeneze u steroidogenim ćelijama testisa i ovarijuma

Ranija istraživanja su pokazala da poremećaji mitohondrijalne biogeneze, arhitekture, oblika i funkcije oštećuju/remete otpornost na oksidativni stres, proizvodnju energije i regulisanje metabolizma čime mogu dovesti do razvoja različitih bolesti (Lowell i Shulman 2005; Cheng i sar. 2010; Sadaba i sar. 2016) koje su često povezane sa stresom i starenjem (Manoli i sar. 2007; Gesing i sar. 2013; Pluomi i sar. 2017). Ukazano je na važnu ulogu insulinske/IGF1 signalizacije u regulaciji nekoliko aspekata mitohondrijalne biogeneze, fuzije/arhitekture (Gesing i sar. 2011; Lyons i sar. 2017) i funkcije mitohondrija (Cheng i sar. 2010; Ribeiro i sar. 2014). Takođe, smatra se da niske doze IGF1 mogu biti moćna terapija za disfunkciju mitohondrija i obnavljanje normale funkcionalnosti (Sadaba i sar. 2016). Međutim, molekularni mehanizmi kontrole mitohondrijalne biogeneze su u velikoj meri nepoznati. U istraživanju vezanom za ovu doktorsku disertaciju proučene su promene povezane sa poremećenom INSR/IGF1R signalizacijom na modelu funkcionalne genomike, tj. miševa sa kondicionalnom delecijom *Insr* i/ili *Igf1r* u steroidogenim ćelijama. Dobijeni rezultati u okviru ovog istraživanja jasno ukazuju na značajno smanjenje PGC1 transkripta i proteina, kao i njegovog ciljnog proteina *Tfam*, u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. Paralelno sa tim, transkripcija *Mtnd1* je značajno smanjena u istim ćelijama, verovatno kao posledica niže ekspresije *Tfam*, glavnog mitohondrijalnog transkripcionog faktora (Larsson i sar. 1998). Povećana transkripcija *Pparg* u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs je u skladu sa prethodnom studijom koja ukazuje na povećanu ekspresiju PPAR u skeletnim mišićima Zucker pacova (koji razvijaju dijabetes i višak masnog tkiva) kao posledica niskog nivoa insulina (Jove i sar. 2004). Pored smanjene transkripcije glavnih markera mitohondrijalne biogeneze, i transkripti markera mitohondrijalne fuzije/arhitekture/oblika (*Opa1*, *Mfn1*, *Mfn2*) su značajno promenjeni u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa kontrolom. Ovo je praćeno smanjenjem broja kopija mtDNA (rezultati nisu prikazani) i mitohondrijalne gustine, ali i povećanjem dijametra i volumena mitohondrija.

Naši rezultati jasno ukazuju na to da odsustvo INSR/IGF1R menja obrazac ekspresije glavnih kinaza koje posreduju prenos signala od INSR/IGF1R, a istovremeno su uključene i u regulisanje mitohondrijalne biogeneze i steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama (Martinelle i sar. 2004; Shiraishi i Ascoli 2007; Yamashita i sar. 2011). Nivo ekspresije PRKA, ključnog regulatora steroidogeneze (Dufau i sar. 1984a, b; Payne i Hales 2004; Stocco i sar. 2005), kao

i aktivatora PGC1 (Dominy i Puigserver 2013), značajno je smanjen u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-*LCs*. U istim ćelijama, sličan obrazac ekspresije uočen je i za AKT i pAKT, pMEK1/2, p38MAPK i pp38MAPK, pERK1/2, JNK i pJNK, dok je ekspresija MEK1/2 i ERK1/2 značajno povećana. Ove kinaze su dobro poznate komponente signosoma uključene u regulaciju biosinteze steroidnih hormona (Martinelle i sar. 2004; Shiraishi i Ascoli 2007; Yamashita i sar. 2011), kao i kritični akteri u mobilizaciju transkripcione mašinerije koja promovise mitohondrijalnu proliferaciju i oksidaciju masnih kiselina (Dominy i Puigserver 2013). Naši rezultati su u skladu sa studijama koje pokazuju da aktivacija p38MAPK utiče na povećanje mitohondrijalne mase kroz fosforilaciju i stabilizaciju PGC1a (Puigserver i sar. 2001).

Uprkos značajnim promenama transkripcionog profila markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u Leydig-ovim ćelijama testisa, nije bilo promene ekspresije istih markera u ovarijumima. Suprotno tome, značajno povećanje transkripcije *Ppargc1a*, *Ppargc1b* i *Pparg* je uočeno u tkivu nadbubrežnih žlezda oba pola. Ove promene su bile izraženije u nadbubrežnim žlezdama prepubertalnih ženki (povećanje od 30-40x). Razlozi za ove razlike su verovatno različite osobine steroidogenih ćelija u testisima, ovarijumima i nadbubrežnim žlezdama. Iako su produkti ekspresije svih ovih gena uključeni u sintezu steroidnih hormona i većina faza u steroidogenezi jesu iste, finalne faze su svakako veoma različite i specifične za svako steroidogeno tkivo. Naši rezultati iz ove studije su u skladu sa nedavno objavljenim podacima koji sugerišu potencijalnu ulogu polnog dimorfizma u regulaciji mitohondrijalne biogeneze na ćelijskom nivou (Amengual-Cladera i sar. 2012; Straface i sar. 2012; Capllonch-Amer i sar. 2014a). Takođe, uloga polnog dimorfizma u regulaciji mitohondrijalne biogeneze je potvrđena u više tkiva, kao što je belo (Capllonch-Amer i sar. 2014b) i mrko (Nadal-Casellas i sar. 2013) masno tkivo, skeletni mišići (Gomez-Perez i sar. 2012; Capllonch-Amer i sar. 2014a), mozak i bubrezi (Zawada i sar. 2015). Osim toga, suprotan efekat 17β -estradiola i testosterona na mitohondrijalnu biogenezu je uočen u belim adipocitima, što ide u prilog pretpostavci da su polni hormoni uključeni u regulaciju mitohondrijalne biogeneze (Capllonch-Amer i sar. 2014b). Delecija gena za AR u granulosa ćelijama miševa (*AR^{-/-}*) je uzrokovala smanjenje nivoa iRNK za PGC1 β , NRF1 i TFAM, što ukazuje na to da gubitak AR vodi značajnom smanjenju ekspresije PGC1 β i njegovih tzv. „nizvodnih“ ciljnih proteina, NRF1 i TFAM, što dovodi do smanjenja mitohondrijalne biogeneze i konačno disfunkcije mitohondrija (Wang i sar. 2015). Slično tome, preliminarni neobjavljeni rezultati Laboratorije za reproduktivnu endokrinologiju i signalling

(<http://www.dbe.uns.ac.rs/en/nauka-eng/lares>) ukazuju na postojanje: (1) *in silico* interakcije između AR i IGF1R, kao i (2) kompleksa između PGC1 i AR u Leydig-ovim ćelijama odraslih pacova dobijenog imunoprecipitacijom, što ukazuje na moguću regulatornu interakciju između IGF1R i AR, kao i PGC1 i AR. Ovi rezultati su u skladu sa potvrđenom „komunikacijom“ između AR i IGF signalizacije na nivou aktivacije, nuklearne translokacije i regulacije transkripcione aktivnosti *Ar/AR* u normalnim (Orio i sar. 2002) i tumorskim ćelijama humane prostate (Orio i sar. 2002; Zhu i Kyprianou 2008). Rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja pokazuju da je nivo i cirkulišućih i androgena produkova *ex vivo* od strane Leydig-ovih ćelija dramatično smanjeni kod P21-*Insr/Igf1r*-DKO miševa. Naime, može se pretpostaviti da odsustvo IGF1R i androgena kao liganda za AR suzbijaju normalnu aktivnost AR (uključujući njenu potencijalnu ulogu u regulaciji PGC1, direktno ili preko IGF1R) i može dovesti do smanjenja ekspresije markera mitohondrijalne biogeneze u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs. To bi moglo biti i mogući razlog za poremećaj mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture budući da su rezultati *in vitro* blokade IGF1R u Leydig-ovim ćelijama su u skladu sa promenama uočenim kod P21-*Igf1r*-SKO miševa.

Sumirano, rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su pokazali da INSR i IGF1R imaju značajnu ulogu u regulaciji ekspresije glavnih molekularnih markera mitohondrijalne biogeneze u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa. Pored toga, nedostatak INSR i IGF1R u istim ćelijama značajno utiče na smanjenje broja mitohondrija i povećanje njihovog dijametra i volumena. Dobijeni rezultati predstavljaju otvaranje novog polja istraživanja mitohondrijalne dinamike u steroidogenim ćelijama u uslovima smanjene insulinske/IGF1 signalizacije, o kome još uvek ima veoma malo podataka. Kao takvi, mogu biti osnov za dalje ispitivanje molekularnih mehanizama u ovoj oblasti.

6.3.2. Delecija insulinskog i IGF1 receptora menja transkripcioni profil markera mitohondrijalne arhitekture/fuzije i mitohondrijalne faze steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama

S obzirom na to da je mitohondrijalni signalosom neophodan za steroidogenezu (Tremblay 2015; Midzak i Papadopoulos 2016) i da ERK aktivirajući MFN1 moduliše oblik mitohondrija i apoptozu (Gomes i sar. 2011; Pyakurel i sar. 2105), praćeni su i merkeri mitohondrijalne arhitekture/fuzije (*Opa1*, *Mfn1*, *Mfn2*) u steroidogenim ćelijama testisa, ovarijuma i nadbubrežne žlezde P21-*Igf1r*-SKO i P21-*Insr/Igf1r*-DKO miševa.

Rezultati pokazuju povećanu ekspresiju markera fuzije spoljašnjih membrana mitohondrija, *Mfn1* i *Mfn2*, u P21-*Igf1r*-SKO-LCs i P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs što može ukazivati na poremećaj mitohondrijalne arhitekture, dok je *Opa1*, zadužen za fuziju unutrašnje mitohondrijalne membrane, ostao nepromenjen u istim ćelijama. Isti markeri su bili nepromijenjeni u ovarijumima P21-*Igf1r*-SKO i P21-*Insr/Igf1r*-DKO ženki. U skladu sa tim, TEM analiza je pokazala dramatične promene oblika i strukture mitohondrija u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs u poređenju sa kontrolom, što je praćeno smanjenjem broja mitohondrija, ali i povećanjem njihovog dijametra i volumena u istim ćelijama. Ovi rezultati u saglasnosti sa istraživanjima koja ukazuju na ulogu MAPK signalne kaskade u regulaciji oblika mitohondrija preko regulacije *Mfn1* (Pyakurel i sar. 2015), kao i na ulogu Ras proteina u regulaciji mitohondrijalne morfologije preko *Mfn2* (de Brito i Scorrano 2009). Pored toga, naši rezultati su pokazali suprotne profile ekspresije *Mfn1/Mfn2* i PGC1 u progenitornim Leydig-ovim ćelijama, kao posledicu delecije *Insr* i/ili *Igf1r* u steroidogenim ćelijama. Ovo je u skladu sa studijom koje pokazuje povećanu ekspresiju MFN2 proteina u srčanom mišiću PGC1 α *knockout* miševa (Adhietty i sar. 2009).

Naši rezultati ukazuju na promene broja, oblika, i strukture mitohondrija u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs što može uticati na fazu steroidogeneze koja se odvija u mitohondrijama. U prilog tome, pregnenolonom stimulirana produkcija progesterona (PROG) i androgena u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs je smanjena više (25,24x za PROG; 15,7x za androgene) od bazalne (16x za PROG, 8,33x za androgene). Takođe, bazalna i pregnenolonom stimulirana produkcija progesterona u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs je smanjena (16x i 25,24x) više nego produkcija androgena (8,33x i 15,7x). Ovi rezultati ukazuju na poremećaj mitohondrijalne faze steroidogeneze i u saglasnosti su sa studijama koje pokazuju da je MAPK-ERK signalizacija uključena u akutnu aktivaciju steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama pacova (Martinelle i sar. 2004) i da je LH-stimulacija primarnih progenitornih Leydig-ovih ćelija pacova uključuje i aktivaciju kaskade ERK1/2 (Shiraishi i Ascoli 2007). Dalje, rezultati pokazuju da je koncentracija androgena u P21-*Insr/Igf1r*-DKO-LCs veoma niska (i jedva detektovana), a njihov steroidogeni kapacitet je dramatično smanjen verovatno kao posledica značajno smanjene transkripcije *Lhcgr* u istim ćelijama. Značajno smanjenje transkripcije zapaženo je i kod svih praćenih steroidogenih enzima. Najizraženije smanjenje ekspresije (90,9 puta) zapaženo je kod gena za mitohondrijalni enzim *Hsd3b6*. I u ovom slučaju je uočen mnogo izraženiji efekat dvostruke delecije oba gena – *Insr* i *Igf1r* u odnosu na pojedinačnu deleciju *Igf1r*.

Sumirano, rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su pokazali da INSR i IGF1R imaju značajnu ulogu u regulaciji ekspresije glavnih molekularnih markera mitohondrijalne arhitekture i fuzije u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa. Pored toga, nedostatak INSR i IGF1R u istim ćelijama značajno utiče na mitohondrijalnu fazu steroidogeneze što rezultuje smanjenom produkcijom progesterona u istim ćelijama.

7. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata, opšti zaključak je da INSR i IGF1R značajno regulišu diferencijaciju, funkcionalnost i razvoj androgenih karakteristika Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa, kao i na mitohondrijalnu biogenezu i fuziju/arhitekturu u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa (detaljnije u specifičnim zaključcima).

(1) Odsustvo INSR i IGF1R smanjuje steroidogenu funkciju Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa. Zaključak je izveden na osnovu:

- Značajno smanjene koncentracije androgena u serumu.
- Značajno smanjene bazalne produkcije androgena, steroidogenog kapaciteta i steroidogene aktivnosti Leydig-ovih ćelija.
- Značajno smanjene koncentracije cAMP, jednog od glavnih signalnih molekula u regulaciji steroidogeneze Leydig-ovih ćelija.
- Značajno smanjene relativne ekspresije transkripata za steroidogene enzime i *Insl3* (jedan od glavnih markera funkcionalnosti) u Leydig-ovim ćelijama.
- Značajno smanjene relativne ekspresije transkripata za jedan od glavnih transkripcionih aktivatora steroidogeneze i razvoja pola, *Sfl*, u Leydig-ovim ćelijama.
- Značajno povećane relativne ekspresije transkripata za glavne transkripcione represore steroidogeneze i razvoja pola, *Dax1* i *Arr19*, u Leydig-ovim ćelijama.

(2) Odsustvo INSR i IGF1R narušava diferencijaciju Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa. Zaključak je izveden na osnovu:

- Značajno smanjenog broja Leydig-ovih ćelija.
- Značajne promene relativne ekspresije transkripata za neke od markera proliferacije i diferencijacije ćelija (*Pdgfr1*, *Tsp2*, *Pcna*, *Lef1*) u Leydig-ovim ćelijama.
- Izmenjene morfologije i ultrastrukture Leydig-ovih ćelija P21 miševa.

(3) Odsustvo INSR i IGF1R narušava ekspresiju molekularnih markera razvoja muškog pola i dovodi do pojave karakteristika ženskog pola, tzv. „feminizacije“ Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa. Zaključak je izveden na osnovu:

- Značajno povećane relativne ekspresije transkripata za glavne molekularne markere razvoja ženskog pola (*Wnt4*, *Rspo1*) u testisima.

- Značajno povećane relativne ekspresije transkripata za aromatazu, *Cyp19a1*, (specifično u Leydig-ovim ćelijama, ali ne i u ostatku testisa) i značajno povećane produkcije E2 u Leydig-ovim ćelijama.
- Značajno povećane relativne ekspresije *Sry* transkripata u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa.
- Značajno smanjene relativne ekspresije *Sry* transkripata u Leydig-ovim ćelijama P80 miševa.
- Značajno povećane relativne ekspresije *Amh* i *Sox9* transkripata u Leydig-ovim ćelijama.

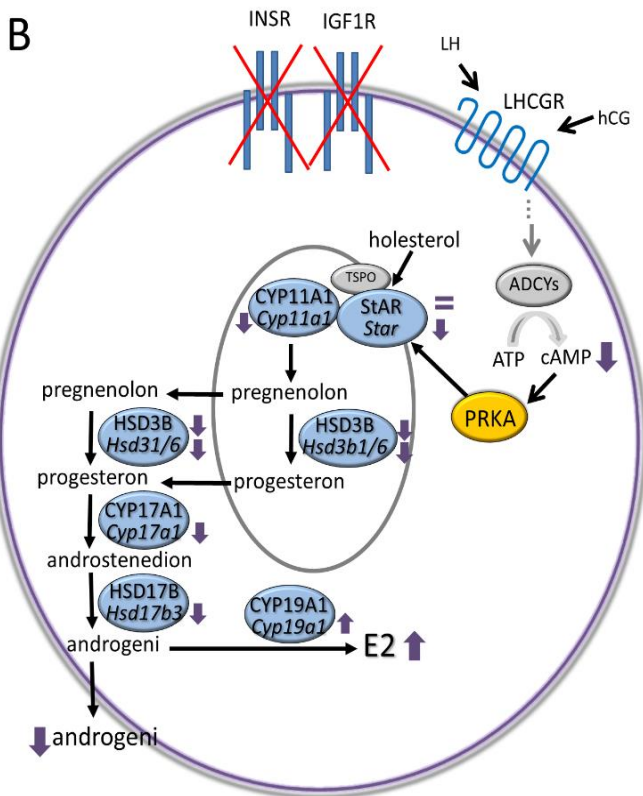
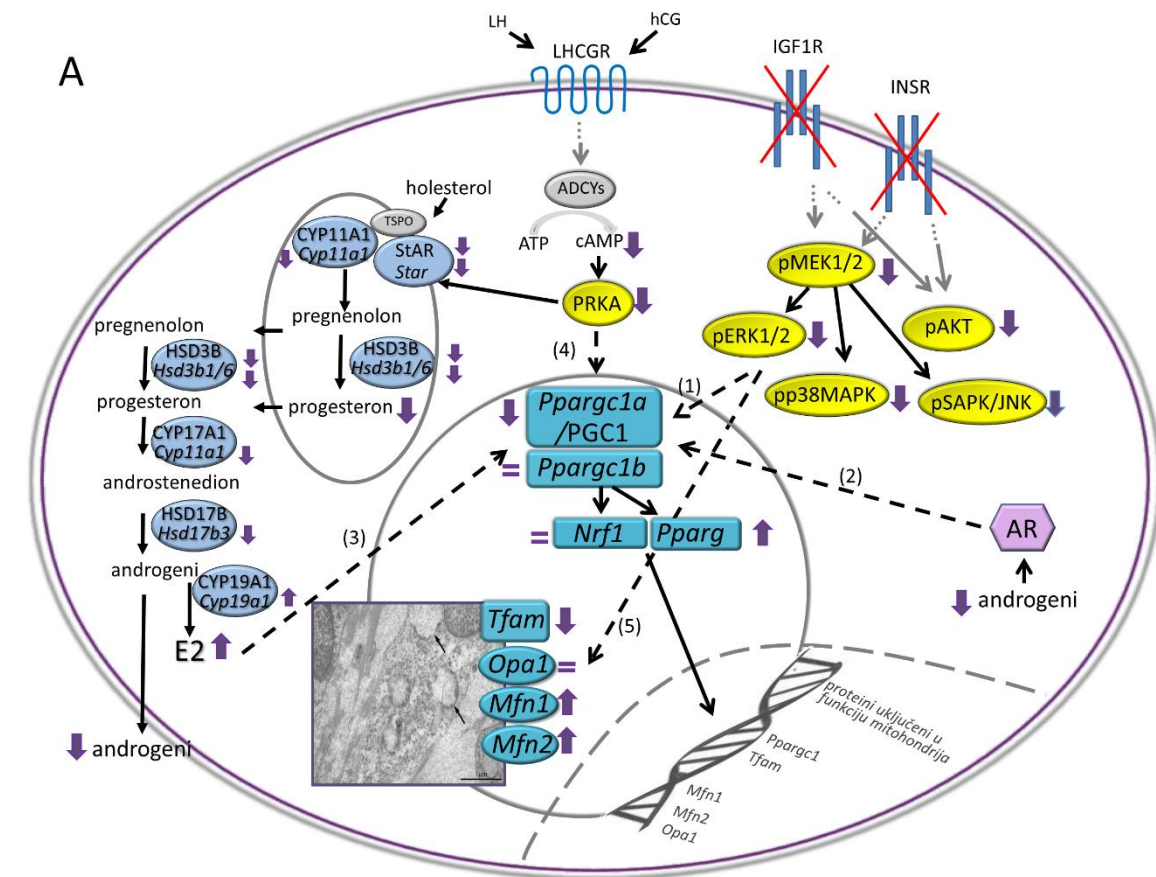
(4) Odsustvo INSR i IGF1R narušava ekspresiju markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture, kao i mitohondrijalnu fazu steroidogeneze u Leydig-ovim ćelijama, ali nema efekta na iste markere u ovarijumima P21 miševa. Zaključak je izveden na osnovu:

- Značajno smanjene relativne ekspresije glavnih markera mitohondrijalne biogeneze (*Ppargc1a*, *Tfam*, *Mtnd1*) u Leydig-ovim ćelijama, i nepromenjene relativne ekspresije u ovarijumima.
- Značajno povećane relativne ekspresije glavnih markera mitohondrijalne fuzije (*Mfn1*, *Mfn2*) u Leydig-ovim ćelijama, i nepromenjene relativne ekspresije u ovarijumima.
- Značajno smanjenog broja i značajno povećanog dijametra i volumena mitohondrija u Leydig-ovim ćelijama.
- Narušene mitohondrijalne faze steroidogeneze (produkcija progesterona i ekspresija *Cyp11a1* i *Hsd3b6*) u Leydig-ovim ćelijama.

(5) Odsustvo INSR i IGF1R narušava ekspresiju glavnih komponenti signalnog puta od INSR/IGF1R istovremeno uključenih u regulaciju steroidogeneze i mitohondrijalne biogeneze/fuzije u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa. Zaključak je izveden na osnovu:

- Značajno promenjene ekspresije Akt, MEK1/2, ERK1/2, p38MAPK i SAPK/JNK kinaza u Leydig-ovim ćelijama.

Sumirano, može se zaključiti da odsustvo INSR i IGF1R u steroidogenim ćelijama prepubertalnih (P21) i adultnih (P80) miševa: (1) narušava diferencijaciju Leydig-ovih ćelija; (2) narušava steroidogenu funkciju i razvoj androgenih karakteristika Leydig-ovih ćelija i (3) uzrokuje tzv. „feminizaciju“ Leydig-ovih ćelija tj. sticanje karakteristika steroidogenih ćelija ženskog pola. Pored toga, odsustvo INSR i IGF1R u steroidogenim ćelijama prepubertalnih (P21) miševa: (1) smanjuje broj mitohondrija i povećava njihov dijametar u Leydig-ovim ćelijama; (2) smanjuje ekspresiju markera mitohondrijalne biogeneze u Leydig-ovim ćelijama testisa, ali ne i steroidogenim ćelijama ovarijuma; (3) povećava ekspresiju markera mitohondrijalne fuzije/arhitekture u Leydig-ovim ćelijama testisa, ali ne i steroidogenim ćelijama ovarijuma; (4) smanjuje ekspresiju kinaza koje su uključene u transdukciju signala od INSR/IGF1R, a takođe su i poznati regulatori mitohondrijalne biogeneze i steroidogeneze; (5) dramatično smanjuje mitohondrijalnu fazu steroidogeneze i ekspresiju steroidogenih enzima u Leydig-ovim ćelijama, pre svega onih koji su lokalizovani u mitohondrijama (Slika 7.1).



Slika 7.1. Šematski prikaz efekata odsustva **INSR/IGF1R** na ekspresiju elemenata steroidogene mašinerije, elemenata **INSR/IGF1R** signalnog puta i markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa (A), kao i na ekspresiju elemenata steroidogene mašinerije u Leydig-ovim ćelijama P80 miševa (B).

Ljubičaste strelice i znaci jednakosti predstavljaju promenu ekspresije gena i proteina, odnosno nivo hormona u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 *Insr/Igf1r*-DKO miševa u odnosu na kontrolnu grupu. Proteini koji su deo insulinske/IGF1, kao i cAMP signalizacije su predstavljeni žutim krugovima, a enzimi uključeni u proces steroidogeneze svetlo plavim krugovima. Sve crne strelice predstavljaju puteve steroidogeneze, kao i signalne puteve, poznate od ranije. Isprekidane strelice predstavljaju moguće mehanizme koji uzrokuju smanjenu ekspresiju markera mitohondrijalne biogeneze i povećanu ekspresiju markera mitohondrijalne fuzije i arhitekture. Mikrografija predstavlja izgled mitohondrija u Leydig-ovim ćelijama P21 *Insr/Igf1r*-DKO miševa.

8. Značaj prikazanih rezultata

Značaj rezultata ove doktorske disertacije je u tome da doprinose boljem razumevanju uloge INSR i IGF1R u regulaciji razvoja i funkcije Leydig-ovih ćelija miševa različitih uzrasnih kategorija. Takođe, deo rezultata predstavlja otvaranje novog polja istraživanja mitohondrijalne dinamike u steroidogenim ćelijama u uslovima smanjene insulinske/IGF1 signalizacije (analognim insulinskoj rezistenciji i sličnim metaboličkim stanjima u humanoj populaciji) o kome jos uvek ima veoma malo podataka. Kao takvi, dobijeni rezultati predstavljaju osnov za dalje ispitivanje molekularnih mehanizama u ovoj oblasti. Ukoliko se ima u vidu sve evidentniji porast problema u oblasti reproduktivnog zdravlja, ali i povezanost kardiovaskularnih bolesti, gojaznosti, metaboličkog sindroma, insulinske rezistencije itd, sa smanjenom produkcijom i sekrecijom muških polnih hormona, ovakvi rezultati su značajni kao polazna tačka za dalje kliničke i farmaceutske studije vezane za lečenje navedenih oboljenja i stanja.

9. Pravci budućih istraživanja

Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su nedvosmisleno pokazali da INSR i IGF1R značajno utiču na diferencijaciju, funkcionalnost i razvoj androgenih karakteristika Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa, kao i na mitohondrijalnu biogenezu i fuziju/arhitekturu u Leydig-ovim ćelijama P21 miševa. Ipak, mnoga pitanja ostaju otvorena i predstavljaju osnov za buduća istraživanja:

- (1) Definisati potencijalne promene na nivou ultrastrukture Leydig-ovih ćelija P80 miševa kojima nedostaju INSR i IGF1R, odnosno, odgovoriti na pitanje da li i u kojoj meri dolazi do obnove populacije u adultnom periodu i kakve se morfološke i citološke promene dešavaju.
- (2) Definisati potencijalne promene u mitohondrijalnoj morfologiji/arhitekturi, kao i ekspresiji markera mitohondrijalne biogeneze/fuzije, u Leydig-ovim ćelijama P80 miševa kojima nedostaju INSR i IGF1R.
- (3) Definisati efekte tzv. „pojačane“ signalizacije od INSR i/ili IGF1R (eventualni sinergistički efekat, kao i efekat aktivacije svakog receptora pojedinačno) editovanjem *Insr* i/ili *Igf1r* gena u primarnoj kulturi Leydig-ovih ćelija pomoću CRISPR/Cas sistema.
- (4) U cilju definisanja opšteg mehanizma regulacije mitohondrijalne biogeneze/fuzije, pratiti efekat *in vitro* inaktivacije INSR i IGF1R, kao i efekat steroidnih hormona (T i E2), korišćenjem drugih steroidogenih (ćelije koje sekretuju steroidne hormone) i tzv. nesteroidogenih tipova ćelija.
- (5) Korišćenjem podataka dobijenih iz *in vivo* i *in vitro* eksperimentalnih modela formirati matematičke modele korišćenjem teorije grafa i/ili drugih matematičkih modela.

10. Literatura

- Adhietty PJ, Ugucioni G, Leick L, Hidalgo J, Pilegaard H, Hood DA (2009). The role of PGC1 α on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 297(1):C217-C225.
- Allen JA, Diemer T, Janus P, Hales KH, Hales DB (2004). Bacterial endotoxin lipopolysaccharide and reactive oxygen species inhibit Leydig cell steroidogenesis via perturbation of mitochondria. *Endocrine* 25(3):265-275.
- Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, Hales KH, Hales DB (2006). Energized, polarized, and actively respiring mitochondria are required for acute Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 147(8):3924-3935.
- Alvarez JD, Hansen A, Ord T, Bebas P, Chappell PE, Giebultowicz JM, Williams C, Moss S, Sehgal A (2008). The circadian clock protein BMAL1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice. *J Biol Rhythms* 23(1):26-36.
- Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M, Proenza AM (2012). Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity. *Metabolism* 61(8):1108-1117.
- Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS (2007). Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(5):E1399-E1408.
- Arakane F, Kallen CB, Watari H, Foster JA, Sepuri NB, Pain D, Stayrook SE, Lewis M, Gerton GL, Strauss JF (1998). The Mechanism of Action of Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR). *J Biol Chem* 273(26):16339-16345.
- Artemenko IP, Zhao D, Hales DB, Hales KH, Jefcoate CR (2001). Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J Biol Chem* 276(49):46583-46596.
- Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 23(2):141-174.
- Baburski AZ, Sokanovic SJ, Janjic MM, Stojkov-Mimic NJ, Bjelic MM, Andric SA, Kostic TS (2015). Melatonin replacement restores the circadian behavior in adult rat Leydig cells after pinealectomy. *Mol Cell Endocrinol* 413:26-35.
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75(1):73-82.
- Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, Efstratiadis A (1996). Effects of an *Igfl* gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10(7):903-918.

- Baker PJ, Sha JA, McBride MW, Peng L, Payne AH, O'Shaughnessy PJ (1999). Expression of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur J Biochem* 260(3):911-917.
- Ban T, Ishihara T, Kohno H, Saita S, Ichimura A, Maenaka K, Oka T, Mihara K, Ishihara N (2017). Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat Cell Biol* 19(7):856-863.
- Bernard K, Logsdon NJ, Miguel V, Benavides GA, Zhang J, Carter AB, Darley-Usmar VM, Thannickal VJ (2017). NADPH Oxidase 4 (Nox4) suppresses mitochondrial biogenesis and bioenergetics in lung fibroblasts via a nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)-dependent pathway. *J Biol Chem* 292(7):3029-3038.
- Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, Harrison WR, Behringer RR, Overbeek PA (2000). A transgenic insertion upstream of SOX9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* 26(4):490-494.
- Bjelic MM, Stojkov NJ, Baburski AZ, Sokanovic SJ, Mihajlovic AI, Janjic MM, Kostic TS, Andric SA (2014). Molecular adaptations of testosterone-producing Leydig cells during systemic *in vivo* blockade of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 396(1-2):10-25.
- Bowles J, Feng CW, Ineson J, Miles K, Spiller CM, Harley VR, Sinclair AH, Koopman P (2018). Retinoic acid antagonizes testis development in mice. *Cell Rep* 24(5):1330-1341.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Britt KL, Stanton PG, Misso M, Simpson ER, Findlay JK (2004). The effects of estrogen on the expression of genes underlying the differentiation of somatic cells in the murine gonad. *Endocrinology* 145(8):3950-3960.
- Capllonch-Amer G, Sbert-Roig M, Galmés-Pascual BM, Proenza AM, Llado I, Gianotti M, García-Palmer FJ (2014a). Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle. *J Endocrinol* 221:391-403.
- Capllonch-Amer G, Llado I, Proenza AM, García-Palmer FJ, Gianotti M (2014b). Opposite effects of 17- β estradiol and testosterone on mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in white adipocytes. *J Mol Endocrinol* 52:203-214.
- Caravia XM, Fanjul V, Oliver E, Roiz-Valle D, Morán-Álvarez A, Desdín-Micó G, Mittelbrunn M, Cabo R, Vega JA, Rodríguez F, Fueyo A, Gómez M, Lobo-González M, Bueno H3, Velasco G, Freije JMP, Andrés V, Ibáñez B, Ugalde AP, López-Otín C

- (2018). The microRNA-29/PGC1 α regulatory axis is critical for metabolic control of cardiac function. *PLoS Biol* 16(10): e2006247.
- Chen CW, Oberley TD, Roy D (1996). Inhibition of stilbene estrogen-induced cell proliferation of renal epithelial cells through the modulation of insulin-like growth factor-I receptor expression. *Cancer Lett* 105(1):51-59.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160(2):189-200.
- Chen M, Wang X, Wang Y, Zhang L, Xu B, Lv L, Cui X, Li W, Gao F (2014). WT1 is involved in leydig cell steroid hormone biosynthesis by regulating paracrine factor expression in mice. *Biol Reprod* 90(4):1-9.
- Chen H, Wang Y, Ge R, Zirkin BR (2017). Leydig cell stem cells: Identification, proliferation and differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 445:65-73.
- Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM (1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269(45):28314-28322.
- Clipsham R, McCabe ER (2003). DAX1 and its network partners: exploring complexity in development. *Mol Genet Metab* 80(1-2):81-120.
- Colón E, Zaman F, Axelson M, Larsson O, Carlsson-Skwirut C, Svechnikov KV, Söder O (2007). Insulin-like growth factor-I is an important antiapoptotic factor for rat Leydig cells during postnatal development. *Endocrinology* 148(1):128-139.
- Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104(6):875-889.
- Couvillion MT, Soto IC, Shipkovenska G, Churchman LS (2016). Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs. *Nature* 533(7604):499-503.
- Croft B, Ohnesorg T, Hewitt J, Bowles J, Quinn A, Tan J, Corbin V, Pelosi E, van den Bergen J, Sreenivasan R, Knarston I, Robevska G, Vu DC, Hutson J, Harley V, Ayers K, Koopman P, Sinclair A (2018). Human sex reversal is caused by duplication or deletion of core enhancers upstream of SOX9. *Nat Commun* 9(1):5319.
- Curley M, Milne L, Smith S, Jørgensen A, Frederiksen H, Hadoke P, Potter P, Smith LB (2019). A young testicular microenvironment protects Leydig cells against age-related dysfunction in a mouse model of premature aging. *FASEB J* 33(1):978-995.

- Daigle M, Roumaud P, Martin LJ (2015). Expressions of Sox9, Sox5, and Sox13 transcription factors in mice testis during postnatal development. *Mol Cell Biochem* 407(1-2):209-221.
- de Brito OM, Scorrano L (2009). Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: The role of Ras. *Mitochondrion* 9(3):222-226.
- Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP (1996). Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 137(12):5337-43.
- Dominy JE, Puigserver P (2013). Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(7): a015008.
- Duarte A, Poderoso C, Cooke M, Soria G, Cornejo Maciel F, Gottifredi V, Podestá EJ (2012). Mitochondrial fusion is essential for steroid biosynthesis. *PLoS One* 7(9): e45829.
- Dufau ML, Winters CA, Hattori M, Aquilano D, Barañao JL, Nozu K, Baukal A, Catt KJ (1984a). Hormonal regulation of androgen production by the Leydig cell. *J Steroid Biochem* 20(1):161-173.
- Dufau ML, Warren DW, Knox GF, Loumaye E, Castellon ML, Luna S, Catt KJ (1984b). Receptors and inhibitory actions of gonadotropin-releasing hormone in the fetal Leydig cell. *J Biol Chem* 259(5):2896-2899.
- Dufau ML, Khanum A, Winters CA, Tsai-Morris CH (1987). Multistep regulation of Leydig cell function. *J Steroid Biochem* 27(1-3):343-350.
- Dufau ML, Tsai-Morris CH (2007). Gonadotropin-regulated testicular helicase (GRTH/DDX25): an essential regulator of spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 18(8):314-320.
- Dyson MT, Jones JK, Kowalewski MP, Manna PR, Alonso M, Gottesman ME, Stocco DM (2008). Mitochondrial A-kinase anchoring protein 121 binds type II protein kinase A and enhances steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis in MA-10 mouse leydig tumor cells. *Biol Reprod* 78(2):267-277.
- Echave P, Machado-da-Silva G, Arkell RS, Duchon MR, Jacobson J, Mitter R, Lloyd AC (2009). Extracellular growth factors and mitogens cooperate to drive mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci* 122(24):4516-4525.
- Ehse S, Raschke I, Mancuso G, et al (2009). Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol* 187(7):1023-1036.

- Eisner V, Cupo RR, Gao E, et al (2017). Mitochondrial fusion dynamics is robust in the heart and depends on calcium oscillations and contractile activity. *Proc Natl Acad Sci* 114(5):E859-E868.
- Evaul K, Hammes SR (2008). Cross-talk between G protein-coupled and epidermal growth factor receptors regulates gonadotropin-mediated steroidogenesis in Leydig cells. *J Biol Chem* 283(41):27525-27533.
- Firth SM, Baxter RC (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23(6):824-854.
- Franco A, Kitsis RN, Fleischer JA, Gavathiotis E, Kornfeld OS, Gong G, Biris N, Benz A, Qvit N, Donnelly SK, Chen Y, Mennerick S, Hodgson L, Mochly-Rosen D, Dorn GW (2016). Correcting mitochondrial fusion by manipulating mitofusin conformations. *Nature* 540(7631):74-79.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Parborell F, Albrecht M, Mayerhofer A, Calandra RS (2006). Cyclooxygenase-2 and prostaglandin F₂ α in syrian hamster Leydig cells: inhibitory role on luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-stimulated testosterone production. *Endocrinology* 147(9):4476-4485.
- Fukushima M, Villar J, Tsai-Morris CH, Dufau ML (2011). Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25), a negative regulator of luteinizing/chorionic gonadotropin hormone-induced steroidogenesis in Leydig cells: Central role of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 286(34):29932-29940.
- Gak IA, Radovic SM, Dukic AR, Janjic MM, Stojkov-Mimic NJ, Kostic TS, Andric SA (2015). Stress triggers mitochondrial biogenesis to preserve steroidogenesis in Leydig cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1853(10):2217-2227.
- Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Papadopoulos V, Zirkin BR, Hardy MP (2006). In search of rat stem Leydig cells: Identification, isolation, and lineage-specific development. *Proc Natl Acad Sci* 103(8):2719-2724.
- Geng XJ, Zhao DM, Mao GH, Tan L (2017). MicroRNA-150 regulates steroidogenesis of mouse testicular leydig cells by targeting star. *Reproduction* 154(3):229-236.
- Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3):202-212.
- Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13(5):589-598.
- Gómez NV, Gorostizaga AB, Mori Sequeiros García MM, Brion L, Acquier A, González-Calvar SI, Méndez CF, Podestá EJ, Paz C (2011). MAPK phosphatase-2 (MKP-2) is

- induced by hCG and plays a role in the regulation of CYP11A1 expression in MA-10 leydig cells. *Endocrinology* 154(4):1488-1500.
- Gómez-Pérez Y, Capllonch-Amer G, Gianotti M, Lladó I, Proenza AM (2012). Long-term high-fat-diet feeding induces skeletal muscle mitochondrial biogenesis in rats in a sex-dependent and muscle-type specific manner. *Nutr Metab (Lond)* 9:15.
- Gonen N, Futtner CR, Wood S, Garcia-Moreno SA, Salamone IM, Samson SC, Sekido R, Poulat F, Maatouk DM, Lovell-Badge R (2018). Sex reversal following deletion of a single distal enhancer of Sox9. *Science* 360(6396):1469-1473.
- Griffeth RJ, Bianda V, Nef S (2014). The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic Clin Androl* 24(1):1-10.
- Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1995). Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene. *Development* 121(6):1603-1614.
- Haider SG (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 233:181-241.
- Hales DB (2002). Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol* 57(1-2):3-18.
- Hazra R, Jimenez M, Desai R, Handelsman DJ, Allan CM (2013). Sertoli cell androgen receptor expression regulates temporal fetal and adult leydig cell differentiation, function, and population size. *Endocrinology* 154(9):3410-3422.
- Hu GX, Lin H, Chen GR, Chen BB, Lian QQ, Hardy DO, Zirkin BR, Ge RS (2010). Deletion of the *Igf1* gene: Suppressive effects on adult Leydig cell development. *J Androl* 31(4):379-387.
- Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab* 7:47.
- Ivell R, Wade JD, Anand-Ivell R (2013). INSL3 as a biomarker of Leydig cell functionality. *Biol Reprod* 88(6):147
- Ivell R, Heng K, Anand-Ivell R (2014). Insulin-like factor 3 and the HPG axis in the male. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:1-7.
- Janjic MM, Stojkov NJ, Andric SA, Kostic TS (2012). Anabolic-androgenic steroids induce apoptosis and NOS2 (nitric-oxide synthase 2) in adult rat Leydig cells following *in vivo* exposure. *Reprod Toxicol* 34(4):686-693.
- Jeong BC, Hong CY, Chattopadhyay S, Park JH, Gong EY, Kim HJ, Chun SY, Lee K (2004). Androgen receptor corepressor-19 kDa (ARR19), a leucine-rich protein that represses the transcriptional activity of androgen receptor through recruitment of histone deacetylase. *Mol Endocrinol* 18(1):13-25.

- Jové M, Salla J, Planavila A, Cabrero A, Michalik L, Wahli W, Laguna JC, Vázquez-Carrera M (2004). Impaired expression of NADH dehydrogenase subunit 1 and PPAR γ coactivator-1 in skeletal muscle of ZDF rats: restoration by troglitazone. *Lipid Res* 45(1):113-123.
- Kaprara A, Huhtaniemi IT (2018). The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism* 86:3-17.
- Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B (2006). *Fgf9* and *Wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* 4(6):e187.
- King SR, LaVoie HA (2012). Gonadal transactivation of STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17:824-46.
- Kostic TS, Stojkov NJ, Bjelic MM, Mihajlovic AI, Janjic MM, Andric SA (2011). Pharmacological doses of testosterone upregulated androgen receptor and 3-Beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta-5-delta-4 isomerase and impaired leydig cells steroidogenesis in adult rats. *Toxicol Sci* 121(2):397-407.
- Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe JF, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510(7503):162-166.
- Kumar S, Kang H, Park E, Park HS, Lee K (2018). The expression of CKLF2B is regulated by GATA1 and CREB in the Leydig cells, which modulates testicular steroidogenesis. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1861(12):1063-1075.
- Lalli E, Sassone-Corsi P (2003). DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. *Mol Endocrinol* 17(8):1445-1453.
- Lardenois A, Chalmel F, Barrionuevo F, Demougin P, Scherer G, Primig M (2010). Profiling spermatogenic failure in adult testes bearing *Sox9*-deficient Sertoli cells identifies genes involved in feminization, inflammation and stress. *Reprod Biol Endocrinol* 8(1):154.
- Larney C, Bailey TL, Koopman P (2014). Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene *Sry*. *Development* 141(11):2195-2205.
- Lee S, Miselis R, Rivier C (2002). Anatomical and functional evidence for a neural hypothalamic-testicular pathway that is independent of the pituitary. *Endocrinology* 143(11):4447-4454.

- Lemecha M, Morino K, Imamura T, Iwasaki H, Ohashi N, Ida S, Sato D, Sekine O, Ugi S, Maegawa H (2018). MiR-494-3p regulates mitochondrial biogenesis and thermogenesis through PGC1- α signalling in beige adipocytes. *Sci Rep* 8(1):1-14.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16(2):143-163.
- Lia X, Wang Z, Jiang Z, Guo J, Zhang Y, Li C, Chung J, Folmer J, Liu J, Lian Q, Ge R, Zirkin BR, Chen H (2016). Regulation of seminiferous tubule-associated stem Leydig cells in adult rat testes. *PNAS* 113(10): 2666–2671.
- Li XY, Zhang Y, Wang XX, Jin C, Wang YQ, Sun TC, Li J, Tang JX, Batool A, Deng SL, Chen SR, Cheng CY, Liu YX (2018). Regulation of blood-testis barrier assembly *in vivo* by germ cells. *FASEB J* 32(3):1653-1664.
- Lin JD (2009). Minireview: the PGC-1 coactivator networks: chromatin-remodeling and mitochondrial energy metabolism. *Mol Endocrinol* 23(1):2-10.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (*Igf-1*) and type 1 IGF receptor (*Igf1r*). *Cell* 75(1):59-72.
- Liu R, Chan DC (2017). OPA1 and cardiolipin team up for mitochondrial fusion. *Nat Cell Biol* 19(7): 760–762.
- Lowell BB, Shulman GI (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307(5708):384-387.
- Ludbrook LM, Harley VR (2004). Sex determination: a 'window' of DAX1 activity. *Trends Endocrinol Metab* 15(3):116-121.
- Lyons A, Coleman M, Riis S, Favre C, O'Flanagan CH, Zhdanov AV, Papkovsky DB, Hursting SD, O'Connor R (2017). Insulin-like growth factor 1 signaling is essential for mitochondrial biogenesis and mitophagy in cancer cells. *J Biol Chem* 292(41):16983-16998.
- MacVicar T, Langer T (2016). OPA1 processing in cell death and disease – the long and short of it. *J Cell Sci* 129(12):2297-2306.
- Madreiter-Sokolowski CT, Sokolowski AA, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF (2018). Targeting mitochondria to counteract age-related cellular dysfunction. *Genes (Basel)* 9(3):E165.
- Majdic G, Saunders PT, Teerds KJ (1998). Immunoeexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17-alpha hydroxylase, C17,20 lyase and the

- receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol Reprod* 58(2):520-525.
- Manna PR, Chandrala SP, King SR, Jo Y, Counis R, Huhtaniemi IT, Stocco DM (2006). Molecular mechanisms of insulin-like growth factor-I mediated regulation of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse leydig cells. *Mol Endocrinol* 20(2):362-378.
- Manna PR, Jo Y, Stocco DM (2007). Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: Role of protein kinase A and protein kinase C signaling. *J Endocrinol* 193(1):53-63.
- Manna PR1, Dyson MT, Jo Y, Stocco DM (2009). Role of dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome, gene 1 in protein kinase A- and protein kinase C-mediated regulation of the steroidogenic acute regulatory protein expression in mouse Leydig tumor cells: mechanism of action. *Endocrinology* 150(1):187-199.
- Manna PR, Cohen-Tannoudji J, Counis R, Garner CW, Huhtaniemi I, Kraemer FB, Stocco DM (2013). Mechanisms of action of hormone-sensitive lipase in mouse leydig cells: Its role in the regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *J Biol Chem* 288(12):8505-8518.
- Manoli I, Alesci S, Blackman MR, Su YA, Rennert OM, Chrousos GP (2007). Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 18(5):190-198.
- Martin LJ, Boucher N, Brousseau C, Tremblay JJ (2008). The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I. *Mol Endocrinol* 22(9):2021-2037.
- Martinelle N, Holst M, Söder O, Svechnikov K (2004). Extracellular signal-regulated kinases are involved in the acute activation of steroidogenesis in immature rat leydig cells by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 145(10):4629-4634.
- Matzkin ME, Lauf S, Spinnler K, Rossi SP, Köhn FM, Kunz L, Calandra RS, Frungieri MB, Mayerhofer A (2013). The Ca²⁺-activated, large conductance K⁺-channel (BKCa) is a player in the LH/hCG signaling cascade in testicular Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 367(1-2):41-49.
- Midzak AS, Chen H, Aon MA, Papadopoulos V, Zirkin BR (2011). ATP synthesis, mitochondrial function, and steroid biosynthesis in rodent primary and tumor Leydig Cells. *Biol Reprod* 84(5):976-985.

- Miller WL, Auchus RJ (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 32(1):81-151.
- Morohashi KI (1997). The ontogenesis of the steroidogenic tissues. *Genes to Cells* 2(2):95-106.
- Mruk DD, Cheng CY (2015). The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. *Endocr Rev* 36(5):564-591.
- Nadal-Casellas A, Bauzá-Thorbrügge M, Proenza AM, Gianotti M, Llado I (2013). Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet. *Mol Cell Biochem* 373:125–135.
- Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, Parada LF (2003). Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 426(6964):291-295.
- Neirijnck Y, Calvel P, Kilcoyne KR, Kühne F, Stévant I, Griffeth RJ, Pitetti JL, Andric SA, Hu MC, Pralong F, Smith LB, Nef S (2018). Insulin and IGF1 receptors are essential for the development and steroidogenic function of adult Leydig cells. *FASEB J* 32(6):3321-3335.
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299(5608):896-899.
- Oh SY, Koh IK, Choi B, Chan Gye M (2017). ESR1 inhibits hCG-induced steroidogenesis and proliferation of progenitor Leydig cells in mice. *Sci Reports* 7:43459.
- O'Shaughnessy PJ, Willerton L, Baker PJ (2002a). Changes in Leydig cell gene expression during development in the mouse. *Biol Reprod* 66(4):966-975.
- O'Shaughnessy PJ, Johnston H, Willerton L, Baker PJ (2002b). Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J Cell Sci* 115(17):3491-3496.
- O'Shaughnessy PJ, Morris ID, Baker PJ (2008). Leydig cell re-generation and expression of cell signaling molecules in the germ cell-free testis. *Reproduction* 135(6):851-858.
- O'Shaughnessy PJ, Morris ID, Huhtaniemi I, Baker PJ, Abel MH (2009). Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. *Mol Cell Endocrinol* 306(1-2):2-8.
- Orio F Jr, Térouanne B, Georget V, Lumbroso S, Avances C, Siatka C, Sultan C (2002). Potential action of IGF-1 and EGF on androgen receptor nuclear transfer and

- transactivation in normal and cancer human prostate cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 198(1-2):105-114.
- Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191(6):1141-1158.
- Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P, Karsenty G (2011). Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 144: 796–809.
- Palikaras K, Tavernarakis N (2014). Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol* 56:182-188.
- Papadopoulos V, Miller WL (2012). Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26(6):771-90.
- Peralta S, Wang X, Moraes CT (2012). Mitochondrial transcription: lessons from mouse models. *Biochim Biophys Acta* 1819(9-10):961-969.
- Pernas L, Scorrano L (2016). Mito-Morphosis: Mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annu Rev Physiol* 78:505-531.
- Payne AH, Hales DB (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25(6):947-970.
- Paz C, Poderoso C, Maloberti P, Cornejo Maciel F, Mendez C, Poderoso JJ, Podestá EJ (2009). Detection of a mitochondrial kinase complex that mediates PKA-MEK-ERK-dependent phosphorylation of mitochondrial proteins involved in the regulation of steroid biosynthesis. *Methods Enzymol* 457:169-192.
- Pitetti JL1, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou MD, Aubry F, Cederroth CR, Urner F, Fumel B, Crausaz M, Docquier M, Herrera PL, Pralong F, Germond M, Guillou F, Jégou B, Nef S (2013a). An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating Sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol Endocrinol* 27(5):814-827.
- Pitetti JL1, Calvel P, Romero Y, Conne B, Truong V, Papaioannou MD, Schaad O, Docquier M, Herrera PL, Wilhelm D, Nef S (2013b). Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice. *PLoS Genet* 9(1):e1003160.
- Ploumi C, Daskalaki I, Tavernarakis N (2017). Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *FEBS J* 284(2):183-195.

- Poderoso C, Maloberti P, Duarte A, Neuman I, Paz C, Cornejo Maciel F, Podesta EJ (2009). Hormonal activation of a kinase cascade localized at the mitochondria is required for StAR protein activity. *Mol Cell Endocrinol* 300(1-2):37-42.
- Podlecki DA, Smith RM, Kao M, Tsai P, Huecksteadt T, Brandenburg D, Lasher RS, Jarett L, Olefsky JM (1987). Nuclear translocation of the insulin receptor. A possible mediator of insulin's long-term effects. *J Biol Chem* 262(7):3362-3368.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92(6):829-839.
- Pyakurel A, Savoia C, Hess D, Scorrano L (2015). Extracellular regulated kinase phosphorylates mitofusin 1 to control mitochondrial morphology and apoptosis. *Mol Cell* 58(2):244-254.
- Qamar I, Gong EY, Kim Y, Song CH, Lee HJ, Chun SY, Lee K (2010). Anti-steroidogenic factor ARR19 inhibits testicular steroidogenesis through the suppression of *Nur77* transactivation. *J Biol Chem* 285(29):22360-22369.
- Qin J, Tsai MJ, Tsai SY (2008). Essential roles of COUP-TFII in Leydig cell differentiation and male fertility. *PLoS One* 3(9): e3285.
- Rambold AS, Pearce EL (2018). Mitochondrial dynamics at the interface of immune cell metabolism and function. *Trends Immunol* 39(1):6-18.
- Rebourcet D, O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Milne L, Cruickshanks L, Jeffrey N, Guillou F, Freeman TC, Mitchell RT, Smith LB (2014). Sertoli cells maintain Leydig cell number and peritubular myoid cell activity in the adult mouse testis. *PLoS One* 9(8):e105687.
- Rebourcet D, Darbey A, Monteiro A, Soffientini U, Tsai YT, Handel I, Pitetti JL, Nef S, Smith LB, O'Shaughnessy PJ (2017). Sertoli cell number defines and predicts germ and Leydig cell population sizes in the adult mouse testis. *Endocrinology* 158(9):2955-2969.
- Ribeiro M, Rosenstock TR, Oliveira AM, Oliveira CR, Rego AC (2014). Insulin and IGF-1 improve mitochondrial function in a PI-3K/Akt-dependent manner and reduce mitochondrial generation of reactive oxygen species in Huntington's disease knock-in striatal cells. *Free Radic Biol Med* 74:129-144.
- Rone MB, Fan J, Papadopoulos V (2009). Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta* 1791(7):646-658
- Rone MB, Midzak AS, Issop L, Rammouz G, Jagannathan S, Fan J, Ye X, Blonder J, Veenstra T, Papadopoulos V (2012). Identification of a dynamic mitochondrial protein

- complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol Endocrinol* 26(11):1868-1882.
- Sádaba MC, Martín-Estal I, Puche JE, Castilla-Cortázar I (2016). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) therapy: Mitochondrial dysfunction and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1862(7):1267-1278.
- Saez JM (1994). Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15(5):574-626.
- Sarfstein R, Werner H (2013). Minireview: Nuclear insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: A novel paradigm in signal transduction. *Endocrinology* 154(5):1672-1679.
- Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 23(9):459-466.
- Schrepfer E, Scorrano L (2016). Mitofusins, from mitochondria to metabolism. *Mol Cell* 61(5):683-694.
- Schafer AJ, Foster, JW, Kwok C, Weller PA, Guioli, S, Goodfellow PN (1996). Campomelic dysplasia with XY sex reversal: diverse phenotypes resulting from mutations in a single gene. *Ann NY Acad Sci* 785: 137-149.
- Sekido R, Lovell-Badge R (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific *Sox9* enhancer. *Nature* 453(7197):930-934.
- Selvage DJ, Parsons L, Rivier C (2006). Role played by brainstem neurons in regulating testosterone secretion via a direct neural pathway between the hypothalamus and the testes. *Endocrinology* 147(6):3070-3075.
- Sharpe RM, Cooper I (1983). Testicular interstitial fluid as a monitor for changes in the intratesticular environment in the rat. *J Reprod Fertil* 69(1):125-135.
- Shabalina IG, Landreh L, Edgar D, Hou M, Gibanova N, Atanassova N, Petrovic N, Hultenby K, Söder O, Nedergaard J, Svechnikov K (2015). Leydig cell steroidogenesis unexpectedly escapes mitochondrial dysfunction in prematurely aging mice. *FASEB J* 29(8):3274-3286.
- Shima Y, Morohashi K (2017). Leydig progenitor cells in fetal testis. *Mol Cell Endocrinol* 445:55-64.
- Shiraishi K, Ascoli M (2007). Lutropin/choriogonadotropin stimulate the proliferation of primary cultures of rat Leydig cells through a pathway that involves activation of the extracellularly regulated kinase 1/2 cascade. *Endocrinology* 148(7):3214-3225.
- Simões T, Schuster R, den Brave F, Escobar-Henriques M (2018). Cdc48 regulates a deubiquitylase cascade critical for mitochondrial fusion. *Elife* 7:1-29.

- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346(6281):240-244.
- Song KH, Park YY, Park KC, Hong CY, Park JH, Shong M, Lee K, Choi HS (2004). The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation. *Mol Endocrinol* 18(8):1929-1940.
- Spinelli JB, Haigis MC (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 20(7):745-754.
- Stévant I, Neirijnck Y, Borel C, Escoffier J, Smith LB, Antonarakis SE, Dermitzakis ET, Nef S (2018). Deciphering cell lineage specification during male sex determination with single-cell RNA sequencing. *Cell Rep* 22(6):1589-1599.
- Stocco DM, Sodeman TC (1991). The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem* 266(29):19731-19738.
- Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR (2005). Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: More complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 19(11): 2647-2659.
- Straface E, Gambardella L, Brandani M, Malorni W (2012). Sex differences at cellular level: "cells have a sex". *Handb Exp Pharmacol* (214):49-65.
- Strauss JF, Kishida T, Christenson LK, Fujimoto T, Hiroi H (2003). START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Mol Cell Endocrinol* 202(1-2):59-65.
- Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R (1998). *Dax1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature* 391(6669):761-767.
- Tang PZ, Tsai-Morris CH, Dufau ML (1999). A novel gonadotropin-regulated testicular RNA helicase. A new member of the dead-box family. *J Biol Chem* 274(53):37932-37940.
- Tapanainen JM, Paloneva T, Veijola M, Rajaniemi H (1990). Rat testicular interstitial fluid contains mediators of vasopermeability. *J Reprod Fertil* 89(2):723-728.
- Teerds KJ, Huhtaniemi IT (2015). Morphological and functional maturation of Leydig cells: From rodent models to primates. *Hum Reprod Update* 21(3):310-328.

- Thornton C, Jones A, Nair S, Aabdien A, Mallard C, Hagberg H (2017). Mitochondrial dynamics, mitophagy and biogenesis in neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *FEBS Lett* 592(5):812-830.
- Tower J (2017). Sex-specific gene expression and life span regulation. *Trends Endocrinol Metab* 28(10):735-747.
- Tremblay JJ (2015). Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids* 103:3-10.
- Tsai-Morris CH, Koh E, Sheng Y, Maeda Y, Gutti R, Namiki M, Dufau ML (2007). Polymorphism of the GRTH/DDX25 gene in normal and infertile Japanese men: a missense mutation associated with loss of GRTH phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 13(12):887-892.
- Tsai-Morris CH, Sheng Y, Gutti RK, Tang PZ, Dufau ML (2010). Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25): A multifunctional protein essential for spermatogenesis. *J Androl* 31(1):45-52.
- Valenti S, Cuttica CM, Fazzuoli L, Giordano G, Giusti M (1999). Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified rat Leydig cells cultured in vitro. *Int J Androl* 22(5):336-341.
- van der Laan M, Horvath SE, Pfanner N (2016). Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Curr Opin Cell Biol* 41:33-42.
- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F (2011). Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1813(7):1360-1372.
- Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A (2001). *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 28(3):216-217.
- Wang G, Hardy MP (2004). Development of Leydig Cells in the insulin-like growth factor-I (IGF-I) knockout mouse: Effects of IGF-I replacement and gonadotropic stimulation. *Biol Reprod* 70(3):632-639.
- Wang RS, Chang HY, Kao SH, Kao CH, Wu YC, Yeh S, Tzeng CR, Chang C (2015). Abnormal mitochondrial function and impaired granulosa cell differentiation in androgen receptor knockout mice. *Int J Mol Sci* 16(5):9831-9849.
- Wiedemann N, Pfanner N (2017). Mitochondrial machineries for protein import and assembly. *Annu Rev Biochem* 86(1):685-714.
- Winters CA, Dufau ML (1984). Characterization of Leydig cell protein kinase. Further studies in hormone action. *FEBS Lett* 178(1):73-78.

- Wu X, Guo X, Wang H, Zhou S, Li L, Chen X, Wang G, Liu J, Ge HS, Ge RS (2017). A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis. *Sci Rep* 7(1):6337.
- Yamashita S, Tai P, Charron J, Ko C, Ascoli M (2011). The Leydig cell MEK/ERK pathway is critical for maintaining a functional population of adult Leydig cells and for fertility. *Mol Endocrinol* 25(7):1211-1222.
- 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(6): 2709–2721.
- Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P (1997). DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 390(6657):311-315.
- Zawada I, Masternak MM, List EO, Stout MB, Berryman DE, Lewinski A, Kopchick JJ, Bartke A, Karbownik-Lewinska M, Gesing A (2015). Gene expression of key regulators of mitochondrial biogenesis is sex dependent in mice with growth hormone receptor deletion in liver. *Aging (Albany NY)* 7(3):195-204.
- Zhu ML, Kyprianou N (2008). Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 15(4):841-849.

BIOGRAFIJA



Sava Radović je rođena u Ivanjici 27. maja 1987. godine, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju opšteg smera. Osnovne akademske studije Molekularne biologije upisala je 2006. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. Zvanje Diplomirani biolog-master, molekularni biolog stekla je 2012. godine, takođe na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, sa postignutom prosečnom ocenom tokom studija 9,14/10. Doktorske akademske studije Biologije, upisala je 2013. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. U novembru iste godine angažovana je kao istraživač - pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru Laboratorije za reproduktivnu endokrinologiju i signalizaciju. Zvanje istraživač - saradnik stekla je u novembru 2016. godine. Bila je uključena u realizaciju jednog projekta Ministarstva Prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, dva projekta Autonomne pokrajine Vojvodine, jednog međuvladinog projekta bilateralne saradnje između Republike Srbije i Republike Slovenije, kao i jednog SCOPES projekta Švajcarske nacionalne fondacije za nauku. Sve ispite predviđene programom doktorskih studija položila je sa prosečnom ocenom 9,83. Kao prvi autor objavila je dva rada u časopisima međunarodnog značaja kategorije M21, četiri kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja kategorije M34 i pet kongresnih saopštenja na skupovima nacionalnog značaja kategorije M64. U koautorstvu je objavila tri rada kategorije M21, dva rada kategorije M51, kao i kongresna saopštenja u formi dva predavanja po pozivu na skupovima međunarodnog značaja kategorije M32 i jedno predavanje po pozivu na skupu nacionalnog značaja kategorije M62, šest saopštenja na skupovima međunarodnog značaja kategorije M34 i dva kongresna saopštenja na skupovima domaćeg značaja kategorije M64. Član je Srpskog društva za molekularnu biologiju, Srpskog biohemijškog društva i Srpskog biološkog društva. Pored naučne aktivnosti, bila je uključena i u realizaciju praktične nastave iz predmeta Molekularna i ćelijska fiziologija, Osnove molekularne i ćelijske imunologije, Reproductivna fiziologija i Reproductivna endokrinologija, kao i u izradi eksperimentalnog dela diplomskih i master radova studenata.



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO – MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA



| | |
|---------------------------------|--|
| Redni broj: RBR | |
| Identifikacioni broj: IBR | |
| Tip dokumentacije: TD | Monografska dokumentacija |
| Tip zapisa: TZ | Tekstualni štampani materijal |
| Vrsta rada: VR | Doktorska disertacija |
| Ime i prezime autora: AU | Sava Radović |
| Mentor: MN | Dr Silvana Andrić, redovni profesor |
| Naslov rada: NR | Uloga insulinskih i IGF1 receptora u regulaciji steroidogeneze i mitohondrijalne biogeneze u Leydigovim ćelijama |
| Jezik publikacije: JP | Srpski |
| Jezik izvoda: JI | srp. / eng. |
| Zemlja publikovanja: ZP | Republika Srbija |
| Uže geografsko područje: UGP | AP Vojvodina |
| Godina: GO | 2019. |
| Izdavač: IZ | Autorski reprint |

| | |
|--|---|
| Mesto i adresa: MA | Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad |
| Fizički opis rada: FO | (broj poglavlja: 10 / stranica: 171 / slika: 36 / grafika: / tabela: 12 / referenci: 185 / priloga: 0) |
| | |
| Naučna oblast: NO | Biologija |
| Naučna disciplina: ND | Fiziologija životinja (subdisciplina: Ćelijska signalizacija u reproduktivnoj biologiji) |
| Predmetna odrednica, ključne reči: PO | Leydig-ove ćelije, insulinski receptor, IGF1 receptor, androgeni, steroidogeneza, diferencijacija ćelija, mitohondrije, mitohondrijalna biogeneza, mitohondrijalna fuzija |
| UDK | |
| Čuva se: ČU | U biblioteci Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, Srbija |
| Važna napomena: VN | Nema |
| Izvod: IZ | Leydig-ove ćelije testisa su primarno mesto sinteze muških polnih hormona. Ovi hormoni su neophodani za reproduktivno, ali i za opšte zdravlje budući da su ozbiljni zdravstveni problemi često povezani sa njihovom smanjenom produkcijom. Insulin i insulinu sličan faktor rasta 1, IGF1 (<i>engl.</i> insulin like growth factor 1), i signalizacija koju pokreću preko svojih receptora (INSR i IGF1R), su jedan od ključnih faktora koji regulišu specifični razvoj tkiva, pa i samih gonada. Ipak, uloga i mehanizmi delovanja ovih receptora u steroidogenim tkivima nisu u potpunosti poznati. Stoga je istraživanje u |

okviru ove doktorske disertacije koncipirano sa ciljem da se, na modelu prepubertalnih (P21) i adultnih (P80) mužjaka miševa sa kondicionalnom delecijom *Insr* i *Igf1r* gena u steroidogenim ćelijama (*Insr/Igf1r*-DKO), definiše uloga INSR i IGF1R u regulisanju diferencijacije i steroidogene funkcije Leydig-ovih ćelija. Pored toga, mužjaci i ženke P21 miševa sa istom delecijom su korišćeni za praćenje ekspresije glavnih markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u Leydig-ovim ćelijama, ovarijumima i nadbubrežnim žlezdama. Rezultati su potvrdili da delecija *Insr* i *Igf1r* u steroidogenim tkivima utiče na diferencijaciju i funkcionalne karakteristike Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa, upućujući na pojavu tzv. „feminizacije“. Broj Leydig-ovih ćelija izolovanih iz P21 i P80 *Insr/Igf1r*-DKO miševa bio je smanjen, a morfologija i ultrastruktura ovih ćelija izmenjene kod P21 *Insr/Igf1r*-DKO miševa. Steroidogeni kapacitet i aktivnost, kao i ekspresija glavnih elemenata steroidogene mašinerije (*Lhcgr*, *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1* i *6*, *Hsd17b3*, *Sf1*) bili su smanjeni u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 *Insr/Igf1r*-DKO miševa, dok je ekspresija transkripcionih represora steroidogeneze (*Arr19* i *Dax1*) bila povećana specifično u istim ćelijama, ali ne i u ostatku testisa. Transkripcioni profil markera muškog pola (*Sry*, *Sox9*, *Amh*) bio je izmenjen u Leydig-ovim ćelijama P21 i P80 *Insr/Igf1r*-DKO miševa. Transkripcija markera ženskog pola (*Rspo1*, *Wnt4*) u testisima, kao i ekspresija *Cyp19a1* i produkcija estradiola (E2) u Leydig-ovim ćelijama, P21 i P80 *Insr/Igf1r*-DKO miševa bile su povećane. Transkripcija markera mitohondrijalne biogeneze (*Ppargc1a*, *Tfam*, *Mtnd1*) bila je smanjena u Leydig-ovim ćelijama P21 *Insr/Igf1r*-DKO miševa, dok su

| | |
|---|---|
| | <p>promene ekspresije izostale u ovarijumima ženki istog genotipa. Isti markeri su bili povećani u nabdubrežnim žlezdama oba pola. Markeri mitohondrijalne fuzije/arhitekture (<i>Mfn1</i> i <i>Mfn2</i>) bili su povećani u Leydig-ovim ćelijama P21 <i>Insr/Igf1r</i>-DKO miševa, što je praćeno i narušenom mitohondrijalnom fazom steroidogeneze (produkcija progesterona), kao i brojem i morfologijom ovih organela. Ekspresija istih markera u ovarijumima bila je nepromenjena. Sumirano, rezultati ovog istraživanja su pokazali da su INSR i IGF1R važni za diferencijaciju i steroidogenu funkciju Leydig-ovih ćelija P21 i P80 miševa. Takođe, ovi receptori su važni regulatori markera mitohondrijalne biogeneze i fuzije/arhitekture u steroidogenim ćelijama muških gonada P21 miševa, ali ne i u steroidogenim ćelijama ovarijuma.</p> |
| <p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p> | <p>12.05.2016. godine na X sednici Senata UNS.</p> |
| <p>Datum odbrane: DO</p> | |
| <p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p> | <p>Predsednik: dr Tatjana Kostić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.</p> <p>Mentor: dr Silvana Andrić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.</p> <p>Član: dr Gordana Matić, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.</p> <p>Član: dr Zvezdana Kojić, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu</p> <p>Član: dr Sonja Kaišarević, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.</p> |



UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION



| | |
|--------------------------------|--|
| Accession number: ANO | |
| Identification number: INO | |
| Document type: DT | Monograph documentation |
| Type of record: TR | Textual printed material |
| Contents code: CC | PhD Thesis |
| Author: AU | Sava Radović |
| Mentor: MN | Dr Silvana Andrić, full professor |
| Title: TI | The role of insulin and IGF1 receptors in regulation of steroidogenesis and mitochondrial biogenesis in Leydig cells |
| Language of text: LT | Serbian |
| Language of abstract: LA | eng. / srp. |
| Country of publication: CP | Republic of Serbia |
| Locality of publication: LP | AP Vojvodina |
| Publication year: PY | 2019 |
| Publisher: PU | Personal reprint |

| | |
|-----------------------------|---|
| Publication place: PP | Novi Sad |
| Physical description: PD | (chapters: 10 / pages: 171 / pictures: / figures: 36 / tables: 12 / references: 185 / supplement material: 0) |
| Scientific field SF | Biology |
| Scientific discipline SD | Animal physiology (subdiscipline: Cell signaling in reproductive biology) |
| Subject, Key words SKW | Leydig cell, insulin receptor, IGF1 receptor, androgens, steroidogenesis, cell differentiation, mitochondria, mitochondrial biogenesis, mitochondrial fusion |
| UC | |
| Holding data: HD | Library of Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Serbia |
| Note: N | None. |
| Abstract: AB | Leydig cells of testes are the primary site of the male sex hormones synthesis. These hormones are indispensable for both reproductive and general health since serious health problems are often associated with their reduced production. Insulin and insulin-like growth factor 1, IGF1 (insulin like growth factor 1), and signaling triggered through their receptors (INSR and IGF1R), are one of the key factors that regulate specific development of tissue including gonads. However, the role and mechanisms of these receptors action in steroidogenic tissues are not known enough. This study was designed to observe the role of INSR and IGF1R in regulating the differentiation and steroidogenic function of Leydig cells by using the model of prepubertal (P21) and adult (P80) male mice with the conditional deletion of the <i>Insr</i> and <i>Igflr</i> genes in steroidogenic cells (<i>Insr/Igflr</i> -DKO). In addition, male and female P21 mice with the same |

deletion were used to monitor the expression of the main markers of mitochondrial biogenesis and fusion/architecture in Leydig cells, ovaries and adrenal glands. The results confirmed that deletion of *Insr* and *Igf1r* in steroidogenic tissues influences differentiation and functional characteristics of Leydig cells isolated from P21 and P80 mice, suggesting an appearance of "feminization". The number of Leydig cells isolated from both P21 and P80 *Insr/Igf1r*-DKO mice was reduced. Morphology and ultrastructure of Leydig cells were disturbed in P21 *Insr/Igf1r*-DKO mice. Steroidogenic capacity and activity, as well as expression of the main elements of steroidogenic machinery (*Lhcgr*, *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1* and *6*, *Hsd17b3*, *Sf1*) were decreased in Leydig cells from P21 and P80 *Insr/Igf1r*-DKO mice, while the expression of transcriptional repressors of steroidogenesis (*Arr19* and *Dax1*) was increased in the same cells, but not in the rest of the testes. Transcription profile of the male sex markers (*Sry*, *Sox9*, *Amh*) was altered in Leydig cells from P21 and P80 *Insr/Igf1r*-DKO mice. Transcription of the female sex markers (*Rspo1*, *Wnt4*) in the testes, as well as *Cyp19a1* expression and estradiol (E2) production in Leydig cells, from P21 and P80 *Insr/Igf1r*-DKO mice were increased. Transcription of mitochondrial biogenesis markers (*Ppargc1a*, *Tfam*, *Mtd1*) was declined in Leydig cells from P21 *Insr/Igf1r*-DKO mice, while changes were absent in the ovaries of the same genotype. Transcription of the same markers was increased in the adrenal glands of both sexes. The mitochondrial fusion/architecture markers (*Mfn1* and *Mfn2*) were increased in Leydig cells from *Insr/Igf1r*-DKO mice and followed by disturbed

| | |
|--------------------------------------|--|
| | <p>mitochondrial phase of steroidogenesis (progesterone production), as well as decreased number and disturbed morphology of mitochondria. Expression of the same markers in the ovaries was unchanged. In summary, results of this study showed that INSR and IGF1R are important in differentiation and steroidogenic function of Leydig cells from P21 and P80 mice. Also, these receptors are important regulators of mitochondrial biogenesis and fusion/architecture markers in steroidogenic cells of P21 male mice, but not in steroidogenic cells of ovaries.</p> |
| <p>Accepted on Senate on: AS</p> | <p>May 12, 2016. on the X meeting</p> |
| <p>Defended: DE</p> | |
| <p>Thesis Defend Board: DB</p> | <p>President: Tatjana Kostić, PhD, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.</p> <p>Mentor: Silvana Andrić, PhD, professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.</p> <p>Member: Gordana Matić, PhD, professor, Faculty of Biology, University of Belgrade.</p> <p>Member: Zvezdana Kojić, PhD, professor, Faculty of Medicine, University of Belgrade.</p> <p>Member: Sonja Kaišarević, PhD, associated professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.</p> |