



Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Lekarski

Z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

mgr Weronika Lebedzińska

**Charakterystyka ekspresji glikoproteiny *Zona pellucida 3*
w tkankach zdrowych oraz jej ontogeneza wraz z rozwojem
jądra i spermatogenezy**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Nafis Rahman

Pracę wykonano w Klinice Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
we współpracy z Uniwersytetem w Turku.

Kierownik jednostki: prof. dr hab. Sławomir Wołczyński

Białystok, 2023 rok

Składam serdeczne podziękowania

Mojemu Promotorowi prof. dr hab. Nafisowi Rahmanowi za ogromną pomoc i nieocenione wsparcie podczas powstawania niniejszej pracy, a także cierpliwość i poświęcony czas.

Panu prof. dr hab. Sławomirowi Wolczyńskiemu za naukową opiekę, wsparcie merytoryczne oraz stworzenie warunków do rozwoju naukowego.

Koleżankom i kolegom z Zakładu Biologii i Patologii Rozrodu Człowieka Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie oraz Kliniki Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za wsparcie, życzliwość i wszelką pomoc.

Dziękuję Rodzinie, Mateuszowi, Bliskim i Przyjaciółom za obecność i wsparcie.

Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki (2022/45/N/NZ4/03410)
oraz subwencje przyznane Uniwersytetowi Medycznemu w Białymstoku
(SUB/1/DN/19/002/1104, SUB/1/DN/20/001/1104, SUB/1/DN/21/005/1104)

SPIS TREŚCI

ABSTRACT.....	6
STRESZCZENIE.....	8
LISTA SKRÓTÓW.....	10
1. WSTĘP.....	12
1.1. Wprowadzenie.....	12
1.2. Glikoproteina zp3.....	12
1.3. Rozwój płodowy jądra.....	14
1.4. Steroidogeneza.....	18
1.5. Budowa histologiczna jądra.....	19
1.6. Spermatogeneza.....	20
2. CEL.....	24
3. MATERIAŁY I METODY.....	25
3.1. Tkanki ludzkie.....	25
3.2. Tkanki mysie.....	25
3.3. Hodowle komórkowe.....	26
3.4. Warunki stymulacji komórek.....	26
3.5. Izolacja RNA.....	27
3.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	27
3.7. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (Real-Time PCR).....	27
3.8. RNAScope <i>in situ</i> hybridization.....	28
3.9. Barwienie immunohistochemiczne (IHC).....	29
3.10. Barwienie immunocytochemiczne (ICC).....	30
3.11. Technika barwienia całego kanalika nasiennego.....	30
3.12. Analizy statystyczne.....	31
4. WYNIKI.....	32
4.1. Ekspresja glikoproteiny ZP3 w jądrze mysim i ludzkim oraz w linii komórkowej mysich spermatocytów GC-2spd(ts).....	32
4.2. Tkanki negatywne dla ZP3.....	43
4.3. Ekspresja ZP3 w ontogenezie jądra u myszy.....	45
4.4. Ekspresja ZP3 u myszy LuRKO $-/-$ i LuRKO $+/-$	48
4.5. Profil ekspresji genów enzymów steroidogenezy w ontogenezie jądra u myszy.....	49
4.6. Wpływ hormonów na ekspresję ZP3 w linii komórkowej GC-2spd(ts).....	55

5. DYSKUSJA.....	57
6. WNIOSKI	63
7. SPIS RYCIN.....	64
8. SPIS TABEL.....	67
9. PIŚMIENNICTWO.....	68

ABSTRACT

In the mammalian ovary, the oocyte is surrounded by a zona pellucida layer (ZP), consisting of four glycoproteins in humans (ZP1-ZP4) and three in mice (ZP1-ZP3). The main functions of the zona pellucida are to participate in the fertilization process and prevent polyspermy, as well as its involvement in embryo development. Zona pellucida has already been successfully used as a target antigen for active immunization of certain wild-life populations as a contraceptive method, as ZP3-specific antibodies initiate a loss of ovarian function due to autoimmune oophoritis mediated by autoreactive T cells. Classically, ZP3 is expressed in the ovary exclusively but was found also in several cancer tissues (ovarian, prostate, colorectal, and lung cancers). This finding expanded the opportunity to use ZP3 in active or passive cancer immunization. Very recently, surprising ZP3 expression in mouse and human testis was shown.

The aim of the present study was to characterize the ZP3 expression in healthy human and mouse tissues, with a special emphasis on the testis, and to analyze its functional implication during the testicular ontogeny and spermatogenesis process in mice.

In this research study, mouse (n=6) and human tissues (n=14) preserved in RNAlater and/or 4% paraformaldehyde (PFA) and a commercially available mouse spermatocyte cell line GC-2spd(ts) were used. For the ontogenesis study, mouse testis from 7 groups: embryonic day (ED) 18, postnatal day (PND) 1, PND 7, PND 15, PND 21, PND 35, 2-months-old (n=6/each group). ZP3 expression was examined using the RT-PCR analysis. Using RNAscope *in situ* hybridization and immunohistochemistry methods, mRNA transcripts and protein localization of ZP3 were checked, respectively. The whole-mount immunostaining of seminiferous tubule staining was performed to assess the ZP3 expression in stem and progenitor cells (SSPCs) and visualized by confocal microscopy. ZP3 expression at the protein level was analyzed in luteinizing hormone (LH) receptor (R) knockout mice testis (LuRKO), which are completely devoid of spermatogenesis. To analyze the hormonal effects that may regulate the ZP3 action, mouse spermatocyte GC-2spd(ts) cells were treated with estradiol, testosterone, progesterone, FSH, LH, and hCG. Subsequently, ZP3 expression at the mRNA level and its protein localization using immunofluorescence assay were performed.

Immunohistochemical analysis showed ZP3 protein and RNAScope ZP3 mRNA transcripts localization in human and mouse testis, namely in the germ cells, spermatogonia, spermatocytes, and spermatids, as well as in mouse spermatocyte GC-2spd(ts) cells. ZP3 was absent in normal humans and mice (n=14/species) testicular Leydig and Sertoli somatic cells, SSPCs, and differentiating progenitor spermatogonia. During the mouse testis ontogenesis, ZP3 expression appeared on PND21 (during puberty). Younger PND1, PND7, PND15, and fetal ED18 mice did not express ZP3 in the testis. Additionally, no ZP3 could be detected in LuRKO mice. Moreover, estradiol, testosterone, progesterone, FSH, LH, or hCG treatments had no effects on the ZP3 expression level in GC-2spd(ts) cells.

In conclusion, the presented data showed novel ZP3 expression at molecular levels in human and mouse testis, which enhances the potential for ZP3 as a target antigen for reversible male contraception. Ontogenesis study and no ZP3 expression in LuRKO mice emphasized the functional impact of ZP3 in the testis during spermatogenesis. Finally, negative ZP3 expression in any other healthy tissues (besides the ovary and testis) excludes potential off-target effects of ZP3 cancer immunotherapy.

STRESZCZENIE

W jajniku ssaków oocyt jest otoczony osłonką przejrzystą (ZP), składającą się z czterech glikoprotein u ludzi (ZP1-ZP4) i trzech u myszy (ZP1-ZP3). Główne funkcje osłonki przejrzystej to udział w procesie zapłodnienia i zapobieganie polispermii, a także udział w rozwoju zarodka. Osłonka przejrzysta była z powodzeniem stosowana jako docelowy antygen w metodzie antykoncepcyjnej do czynnej immunizacji populacji niektórych dzikich zwierząt, ponieważ przeciwciała specyficzne dla ZP3 inicjują utratę funkcji jajników z powodu autoimmunologicznego zapalenia jajników, w którym pośredniczą komórki T. Konwencjonalnie ZP3 ulega ekspresji wyłącznie w jajniku, ale została odkryta również w kilku tkankach nowotworowych (rak jajnika, prostaty, jelita grubego i płuc). To odkrycie rozszerzyło możliwości wykorzystania ZP3 w czynnej lub biernej immunizacji raka. Niespodziewanie, niedawno wykazano ekspresję ZP3 w mysich i ludzkich jądrach.

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie ekspresji ZP3 w zdrowych ludzkich i mysich tkankach, ze szczególnym uwzględnieniem jądra, oraz analiza jej funkcjonalnych implikacji w procesie ontogenezy jąder i spermatogenezy u myszy.

W badaniu wykorzystano tkanki mysie (n=6) i ludzkie (n=14) utrwalone w RNAlater i/lub 4% paraformaldehydzie (PFA) oraz komercyjna linia komórkowa spermatocytów mysich GC-2spd(ts). Do badania ontogenezy wybrano jądra myszy z 7 grup: 18. dzień płodowy (ED), 1. dzień po urodzeniu (PND), 7 PND, 15 PND, 21 PND, 35 PND, 2-miesięczne (n=6/każda grupa). Ekspresję ZP3 zbadano stosując analizę RT-PCR. Wykorzystując hybrydyzację RNAscope *in situ* i metody immunohistochemiczne, sprawdzono odpowiednio transkrypty mRNA i lokalizację białka ZP3. Przeprowadzono barwienie immunologiczne całych kanalików nasiennych w celu oceny ekspresji ZP3 w komórkach macierzystych i progenitorowych (SSPC) i zwizualizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Ekspresję ZP3 na poziomie białka analizowano w jądrach u myszy ze znokautowanym receptorem (R) hormonu luteinizującego (LH) (LuRKO), które są całkowicie pozbawione spermatogenezy. Aby przeanalizować czynniki, które mogą regulować działanie ZP3, mysie spermatocyty GC-2spd(ts) poddano działaniu hormonów:

estradiolu, testosteronu, progesteronu, FSH, LH i hCG. Ekspresję ZP3 zbadano na poziomie mRNA i lokalizację białka za pomocą testu immunofluorescencyjnego.

Analiza immunohistochemiczna wykazała lokalizację białka ZP3, a RNAScope transkryptów mRNA ZP3 w ludzkich i mysich jądrach, a mianowicie w komórkach rozrodczych: spermatogoniach, spermatocytach i spermatydach, a także w komórkach spermatocytów mysich GC-2spd(ts). ZP3 był nieobecny w zdrowych ludzkich i mysich (n=14/gatunek) komórkach somatycznych Leydiga i Sertolego, SSPC oraz progenitorowych i macierzystych. Podczas ontogenezy jąder myszy ekspresja ZP3 pojawiła się w PND21 (w okresie dojrzewania). Młodsze myszy PND1, PND7, PND15 i płodowe myszy ED18 nie wykazywały ekspresji ZP3 w jądrach. U myszy LuRKO również nie wykryto ZP3. Stymulacja estradiolem, testosteronem, progesteronem, FSH, LH lub hCG nie miała wpływu na poziom ekspresji ZP3 w komórkach GC-2spd(ts).

Podsumowując, przedstawione dane wykazały ekspresję ZP3 w jądrach ludzkich i mysich na poziomie molekularnym, ZP3 prawdopodobnie można wykorzystać jako docelowy antygen w odwracalnej męskiej antykoncepcji. Wyniki badań ontogenezy i brak ekspresji ZP3 u myszy LuRKO, podkreśla funkcjonalne znaczenie ZP3 w jądrach podczas spermatogenezy. Brak ekspresji ZP3 w innych zdrowych tkankach (poza jajnikiem i jądrem), sugeruje, że potencjalne efekty uboczne off-target w immunoterapii nowotworowej z udziałem ZP3 będą nieznaczne.

LISTA SKRÓTÓW:

17 β -HSD / HSD17B3 – dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa

3 β -HSD – dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa

Ad – spermatogonia ciemne

ALCs – dojrzałe komórki Leydiga

AMH – hormon antymüllerowski

Ap – spermatogonia jasne

AR – receptor androgenowy

B – spermatocyty I rzędu

BTB – bariera krew-jądro

CYP11A1 - gen cytochromu P450_{scc}

CYP19A1 – gen aromatazy

ddH₂O – woda dejonizowana

DHH – czynnik „desert hedgehog”

Di – spermatocyty diplotenowe

ED – ang. embryonic day, dzień życia płodowego

EMBL –European Molecular Biology Laboratory

FBS – płodowa bydlęca surowica

FIG α – czynnik transkrypcyjny

FLC – płodowe komórki Leydiga

FSH – hormon folikulotropowy

GCT – ziarniszcak (nowotwór)

GVBD – rozpad błony jądrowej pęcherzyków zarodkowych podczas mejozy

HSD3B2 – gen kodujący dehydrogenazę 3 β -hydroksysteroidową

L – spermatocyty leptotenowe

LC – komórki Leydiga

LH – hormon luteinizujący

P – spermatocyty pachytenowe
P/S – roztwór penicylina/streptomycyna
P450scc – enzym przekształcający cholesterol do pregnolonu
PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna
PDGFA – płytkowy czynnik wzrostu
PFA – paraformaldehyd
PGC – pierwotne komórki rozrodcze
Pl – spermatocyty preleptotenowe
PND – ang. postnatal day, dzień po narodzinach
RA – kwas retinowy
SC – komórki Sertolego
SRY – ang. sex-determining region Y
StAR – białko szybkiej regulacji steroidogenezy
Z – spermatocyty zygotenowe
ZP – osłonka przejrzysta
ZP1 – glikoproteina pierwsza osłonki przejrzystej
ZP2 – glikoproteina druga osłonki przejrzystej
ZP3 – glikoproteina trzecia osłonki przejrzystej
ZP4 – glikoproteina czwarta osłonki przejrzystej

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Glikoproteina ZP3 wchodzi w skład osłonki przejrzystej komórki jajowej. Dotychczas uważano, że do jej ekspresji dochodzi specyficycznie tylko w tych komórkach. Ekspresję ZP3 wykazano jednak także w niektórych nowotworach (jajnika, prostaty, jelita grubego i płuc), co stworzyło perspektywę jej wykorzystania jako celu w immunoterapii nowotworów. Niedawno nasz zespół przeprowadził dodatkowe badania w celu ustalenia, czy poza jajnikiem jakiegokolwiek inne prawidłowe tkanki ludzkie i mysie wykazują ekspresję ZP3, aby wykluczyć potencjalne niepożądane efekty immunoterapii z ZP3. Nieoczekiwanie nasz zespół badawczy stwierdził ekspresję ZP3 w prawidłowych ludzkich i mysich jądrach.

Jądra męskie pełnią dwie powiązane ze sobą funkcje, germinatywną (produkcja plemników) i endokrynną (produkcja hormonów). Mimo wielu lat badań mechanizmy kontrolujące oba procesy nadal nie zostały w pełni poznane, a wiele z nich jak choćby proces spermatogenezy pozostaje zagadkowymi. Jaka rolę pełni ZP3 w regulacji funkcji jądra i czy ZP3 może stać się celem terapeutycznym w leczeniu niepłodności albo męskiej antykoncepcji są interesującymi pytaniami. To zainspirowało mnie do podjęcia badań charakteryzujących profil ekspresji ZP3 w jądrze w różnych etapach jego rozwoju.

1.2. Glikoproteina ZP3

Oocyty ssaków są otoczone cienką, glikoproteinową warstwą, tzw. osłonką przejrzystą (łac. *zona pellucida*, ZP) (Bleil and Wassarman 1980). Osłonka przejrzysta u człowieka zbudowana jest z czterech glikoprotein: ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 (Gupta, Bhandari i in. 2012). U myszy występują trzy glikoproteiny, a ZP4 występuje w postaci pseudogenu (Goudet, Mugnier i in. 2008). Ekspresja białek osłonki rozpoczyna się w fazie wzrostu oocytu, podczas której komórka zwiększa objętość, przechodzi replikację i redystrybucję organelli cytoplazmatycznych. Glikoproteiny ZP tworzą charakterystyczną włóknisto-ziarnistą strukturę wokół oocytu za pomocą wiązań niekowalencyjnych (Wassarman and Mortillo 1991). Badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej wykazały, że włókna tworzące

ZP mają długość 2-3 μm , a każde z nich zawiera powtarzające się heterodimery ZP2-ZP3 o długości 14-15 nm, natomiast dwa łańcuchy ZP1 sieciują całość struktury (Greve i Wassarman 1985). Glikoproteiny osłonki przejrzystej są glikozylowane i posiadają N- i O-glikany w swojej strukturze (Dell, Morris i in. 1999, Töpfer-Petersen 1999). Poszczególne glikoproteiny osłonki wykazują znaczne różnice zarówno strukturalne (skład aminokwasów, skład oligosacharydów, wielkość cząsteczki) jak i funkcjonalne (aktywność immunologiczna, aktywność biologiczna) (Bleil i Wassarman 1980, Wassarman 1987).

Gen Zp3 u człowieka położony na chromosomie 7, zawiera 8 eksonów o wielkości 18,3 kb, których transkrypt koduje polipeptyd o długości 424 aminokwasów. Produkcja ZP3 podczas dojrzewania oocyty rozpoczyna się na etapie pęcherzyka pierwotnego (Ryc. 6). Badania wskazują, że oocyty na wczesnym etapie dojrzewania mają wyższy poziom ekspresji ZP3 w porównaniu do dojrzałych (Canosa, Adriaenssens i in. 2017). Udowodniono, że usunięcie grup „O” oligosacharydowych z ZP3 powoduje całkowitą utratę jego funkcji receptorowych (Florman and Wassarman 1985).

Osłonka przejrzysta bierze udział w oogenezie i procesie zapłodnienia oraz chroni zarodek na przedimplantacyjnym etapie rozwoju (Millar, Lader i in. 1993, Rankin, Familiar i in. 1996, Rankin, Talbot i in. 1999). Glikoproteina ZP3 bierze udział w wiązaniu plemnika oraz jest odpowiedzialna za indukowanie reakcji akrosomalnej (Wassarman 1982, Bleil i Wassarman 1983, Bleil, Greve i in. 1988, Cross, Morales i in. 1988). Wykazano, że występujące w strukturze ZP3 N-glikany pełnią szczególną rolę w wiązaniu plemnika z osłonką (Chiu, Wong i in. 2008). Połączenie plemnika z komórką jajową indukuje reakcję korową, która powoduje uwalnianie proteazy, glikozydazy, peroksydazy, kwasnej fosfatazy, lektyny i cynku z ziaren korowych do przestrzeni okołożółtkowej (Coy and Avilés 2010, Fahrenkamp, Algarra i in. 2020). Pod wpływem enzymów struktura łańcuchów oligosacharydowych ZP3 ulega zmianie, a ZP2 ulega rozszczepieniu. W wyniku tego następuje inaktywacja ZP2 i ZP3 oraz zmiana struktury osłonki, zapobiegając w ten sposób dalszej penetracji przez plemniki (Wassarman i Litscher 2004).

W badaniach wykazano, że glikoproteina ZP3 może brać udział w zaniku błony jądrowej w pęcherzykach zarodkowych (GVBD, ang. Germinal Vesicle Breakdown), na wczesnym etapie mejozy podczas dojrzewania oocytów (Gao, Zhou i in. 2017, Jin, Yang i in. 2022). Jednak poza udziałem w procesach rozrodczych jej rola nie jest zbadana.

1.3. Rozwój płodowy jądra

Rozwój jądra jest złożonym procesem obejmującym liczne zdarzenia molekularne i komórkowe, które powodują sekwencyjne różnicowanie wielu typów komórek, z których wszystkie mają określone funkcje (Svingen i Koopman 2013).

We wczesnym okresie rozwoju embrionalnego gonady u obu płci są bipotencjalne. Początek rozwoju gonad następuje wraz z utworzeniem listw płciowych pochodzących z mezodermy, które znajdują się obok krezki grzbietowej. Do listwy płciowej migrują komórki nabłonka jamy ciała, tworząc sznury rdzeniowe, które w dalszym rozwoju różnicują się w kierunku komórek Sertolego, a u człowieka ze ściany pęcherzyka żółtkowego migrują zawiązkowe komórki płciowe. U myszy pierwotne komórki rozrodcze (PGC) są indukowane z tylnych proksymalnych komórek epiblastu cylindra jądrowego 6. dnia po zapłodnieniu. U człowieka różnicowanie w kierunku jądra rozpoczyna się około 42. dnia ciąży, a u myszy w 11,5 ED. Rozwój płci męskiej schematycznie przedstawia Rycina 1. O różnicowaniu gonady w kierunku jądra decyduje ekspresja genu *SRY*, położonego na chromosomie Y (Koopman, Münsterberg i in. 1990, Hacker, Capel i in. 1995, Hanley, Hagan i in. 2000). Białko kodowane przez gen *SRY* jest czynnikiem transkrypcyjnym uruchamiającym całą kaskadę ekspresji genów kodujących: czynnik transkrypcyjny *SRY-Box9* (*SOX9*), hormon anty-Müllerowski (*AMH*), czynnik „desert hedgehog” (*DHH*), syntaza prostaglandyny D2 (*PGDS*), decydujących o różnicowaniu gonady w kierunku męskim. W zarodku ludzkim 46XY, *SRY* indukuje ekspresję *SOX9* i osiąga ona najwyższą aktywność w ludzkich jądrach 9-tygodniowego płodu (Ostrer, Huang i in. 2007). *SOX9* jest niezbędny i wystarczający do organogenezy jąder i może funkcjonalnie zastąpić brak *SRY* i indukować rozwój jąder w zarodku XX, zarówno u ludzi jak i myszy. Działanie *SOX9* podczas różnicowania gonad u ludzi jest ściśle zależne od dawki, a krytyczny próg ekspresji *SOX9* musi zostać osiągnięty, aby utrzymać różnicowanie w kierunku jąder.

Dotychczasowe badania wskazują na decydującą rolę komórek Sertolego podczas embrionalnego rozwoju jądra. Komórka Sertolego jest jedynym typem komórek, który wymaga do różnicowania białka *SRY*. Ekspresja *SOX9* w komórkach Sertolego hamuje czynniki promujące różnicowanie w kierunku jajników, takie jak *WNT4*, *RSPO1* i *FOXL2*. Komórki pre-Sertolego gromadzą się i namnażają, tworząc sznury płciowe otaczające

komórki płciowe, budując nieregularne struktury i dzieląc gonadę na dwa odrębne przedziały: sznury rdzeniowe (przyszłe kanaliki nasienne) i tkankę śródmiąższową. Sznury rdzeniowe rosną w kanaliki w kształcie pętli, połączone na każdym końcu z podstawą śródnercza jądra, które staje się później siecią jądra. Komórki Sertolego zapewniają warunki do rozwoju komórek rozrodczych w kierunku męskim. Zapewnia to ekspresja enzymu CYP26B1, który degraduje kwas retinowy (RA) i utrzymuje komórki w stadium nieodróżnicowanym, zapobiegając wejściu w podział mejotyczny. Komórki Sertolego są zaangażowane w rekrutację płodowych komórek Leydiga i okołokanalikowych komórek mioepitelialnych, wydzielając DHH (Godin, Wylie i in. 1990, Nef, Verma-Kurvari i in. 2003, Miyamoto, Taniguchi i in. 2008, Zhang, Ai i in. 2017). DHH odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu płodowych komórek Leydiga. Komórki okołokanalikowe różnicują się do komórek mioidalnych i tworzą osłonkę wokół sznurów jąder. Procesy te powodują zwiększenie rozmiarów gonady i rozpoczyna się ogólne kształtowanie struktury jądra.

Embrionalne komórki Sertolego wytwarzają hormon anty-Müllerowski (AMH), który dyfunduje do sąsiednich przewodów Müllera i powoduje ich regresję. W późnym okresie embrionalnym komórki Sertolego nabywają receptor (FSHR) dla hormonu folikulotropowego (FSH), wytwarzanego przez przysadkę mózgową.

Rozwój przewodów Wolffa i zewnętrznych narządów płciowych zależy od wydzielania androgenów przez płodowe komórki Leydiga (FLC) już na wczesnym etapie ciąży. Różnicowanie FLC odbywa się przez cały okres płodowy i są one kluczowe w maskulinizacji zarodka. Ekspresję genów kodujących kluczowe czynniki steroidogenezy (LHCGR, STAR, HSD3B2, CYP11A1, CYP17A1) u ludzi obserwowano około 8. tygodnia życia płodowego (Tapanainen, Kellokumpu-Lehtinen i in. 1981), a znaczny wzrost ekspresji w 11-12. tygodniu (Savchuk, Morvan i in. 2019). Komórki FLC myszy mają ekspresję większości kluczowych genów steroidogenezy, jednak nie przeprowadzają ostatniej reakcji syntezy testosteronu. Funkcję tę pełnią czasowo płodowe komórki Sertolego, u których wyjątkowo wykazano ekspresję enzymu HSD17B3 (O'Shaughnessy, Baker i in. 2000, Shima, Miyabayashi i in. 2013). W okresie płodowym komórki Sertolego nie mają receptora androgenowego (AR). Na proces różnicowania płodowych komórek Leydiga mają wpływ produkty wydzielane przez komórki Sertolego: DHH i płytkowy czynnik wzrostu (PDGFA).

Płodowe komórki Leydiga nie namnażają się, ale ich liczba zwiększa się, ponieważ nowe powstają z komórek progenitorowych (Chiquoine 1954).

Funkcję płodowych komórek Leydiga reguluje ludzka gonadotropina kosmówkowa (hCG), aktywując błonowy receptor hormonu luteinizującego/ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej LH/hCGR. Gonadotropina kosmówkowa hCG za pośrednictwem receptora LH/hCGR aktywuje szlaki kontrolujące regulację ekspresji genów enzymów steroidogennych (Zhang, Poutanen i in. 2001, O'Shaughnessy, Johnston i in. 2002, Yeh, Tsai i in. 2002, Ma, Dong i in. 2004, Valdes-Socin, Salvi i in. 2004). Efektem pobudzenia receptora jest synteza i wydzielanie testosteronu.

Testosteron jest konieczny w procesach muskulinizacji zarodka na wczesnym etapie rozwoju. Wydzielanie testosteronu u ludzi zaczyna się około 8. tygodnia po zapłodnieniu, około 14-16. tygodnia jego stężenie osiąga wartość maksymalną w surowicy, po czym zaczyna się zmniejszać (Tapanainen, Kellokumpu-Lehtinen i in. 1981, O'shaughnessy, Baker i in. 2007, Scott, Hutchison i in. 2007). U myszy produkcja androgenów przez płodowe komórki Leydiga rozpoczyna się około 12-13. dnia ciąży (Gondos 1980), szczytowe stężenie osiągają około 17-18. dnia życia płodowego a następnie zaraz po urodzeniu ich stężenie maleje (Gondos 1980, O'Shaughnessy, Baker i in. 1998). Wczesne różnicowanie i aktywność hormonalna komórek Leydiga prawdopodobnie odbywają się niezależnie od LH (Habert, Lejeune i in. 2001). Wydzielanie LH w przysadce płodu męskiego jest wykrywalne około 10. tygodnia życia i szybko wzrasta do osiągnięcia maksymalnego stężenia około 20-25. tygodnia. W surowicy płodu męskiego LH można wykryć około 11-12. tygodnia ciąży a maksymalne stężenie osiąga między 14. a 16. tygodniem ciąży. U płodów ludzkich FLC pełne zróżnicowanie osiągają w 14 tygodniu ciąży i są czynne do 18 tygodnia po czym aż do momentu porodu donoszonego, następuje involucja FLC, ale prawdopodobnie niekompletna (Sato, Kimura i in. 2002). U gryzoni hormon anty-Müllerowski (AMH), hormon uwalniający gonadotropiny (GnRH) i transformujący czynnik wzrostu (TGF) odpowiadają za ich różnicowanie i mogą być odpowiedzialne za ich involucję. Jednak ich rola w regresji człowieka FLC są nieznane (Weber, Eckert i in. 2010).

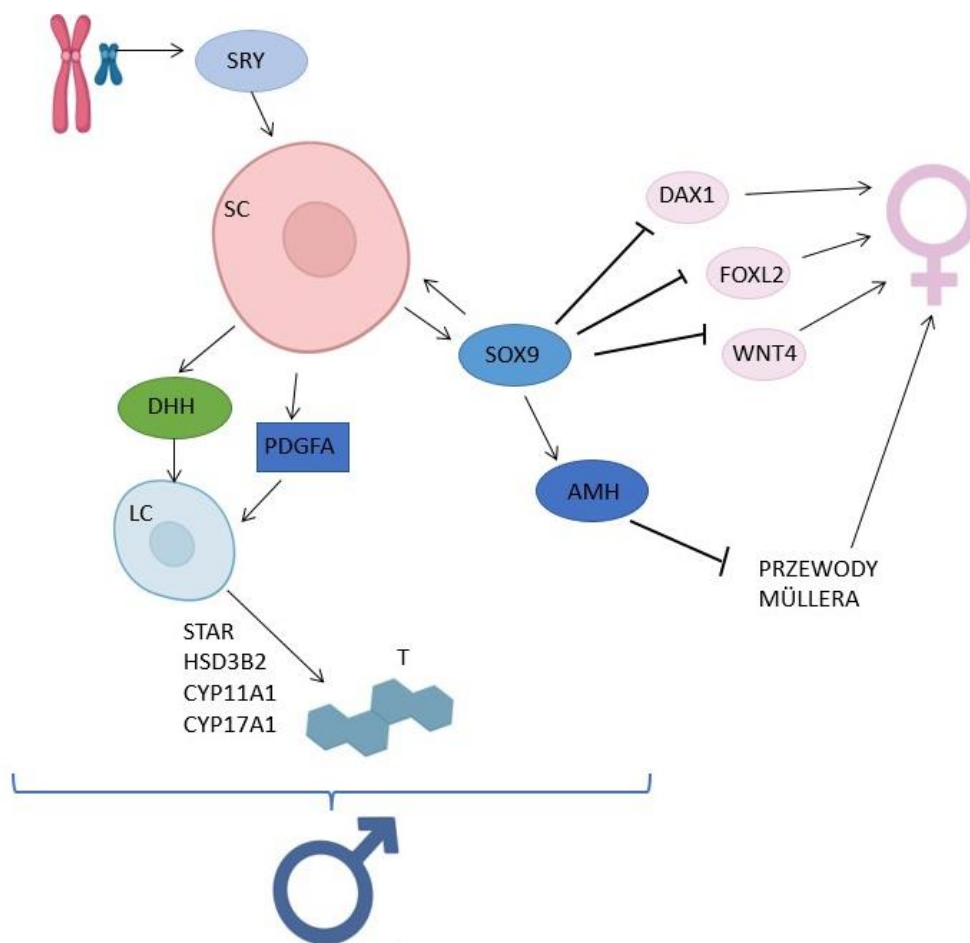
Zaobserwowano, że stężenia we krwi LH oraz testosteronu wzrasta zaraz po urodzeniu (Forest i Cathiard 1975, Corbier, Dehennin i in. 1990), co zaobserwowano również u szczura (Roffi 1977), myszy (Motelica-Heino, Castani er i in. 1988) i fretki (Erskine, Tobet

i in. 1988). Biologiczna rola tego wzrostu nie jest dokładnie wyjaśniona, ale przypuszcza się, że może być związana z ustalaniem się w mózgowiu męskim acyklicznego typu kontroli wydzielania gonadotropin lub też może mieć wpływ na dojrzewanie komórek macierzystych gamet. Związek między FLC i ALC pozostaje niejasny. Pierwsze prace wskazywały, że FLC ulegają całkowitej regresji i zostają zastąpione przez ALC. Jednakże, teza ta została obalona. Obecność FLC można stwierdzić na podstawie piku wydzielania hormonów zaraz po urodzeniu, w tzw. fazie „minidojrzewania” (Pereda, Zorn i in. 2006). Później przychodzi okres wyciszenia na wiele lat. W tym okresie większość FLC zanika lub staje się morfologicznie nierozpoznawalna. Część z nich jednak przeżyje i pozostają obecne w dojrzałym jądrze (Fujimoto, Miyayama i in. 1977) Ostatnie badania na myszach udowodniły, że FLC można znaleźć w dojrzałych gonadach i stanowią one około 10% populacji LC (Sasaki, Yokobayashi i in. 2015).

Płodowe komórki rozrodcze można podzielić na pierwotne komórki rozrodcze (PGCs) i gonocyty. U człowieka wyróżnia się dodatkowo prespermatogonia. U myszy w momencie indukcji genu Sry, gonadalne PGC są włączane do rdzeni jąder około 12. dnia od zapłodnienia, wówczas są określane jako gonocyty. Gonocyty aktywnie proliferują w powstających sznurach jąder do 13,5. dnia życia płodowego (Tam i Snow 1981) i są chronione przed przedwczesnym wejściem w mejozę, przez ekspresję genu NANOS2 oraz aktywność CYP26 w SC, skutkujące degradacją kwasu retinowego. Gonocyty wchodzą w stan spoczynku mitotycznego między ED13.5 a ED15.5 i stają się gonocytami T1 (Western, Miles i in. 2008). Na tym etapie tworzenie rdzenia jądra jest zakończone. W okresie okołoporodowym następuje reaktywacja mitozy gonocytów (gonocyty T2), które stają się następnie spermatogoniami.

U człowieka różnicowanie komórek płciowych na poziomie molekularnym zachodzi podobnie jak u myszy, jednak dynamika procesu jest inna. Pierwsze gonocyty migrują do błony podstawnej około 13. tygodnia ciąży, określa się je wówczas jako prespermatogonia. Prespermatogonia tworzą tzw. syncytia dwóch lub więcej komórek połączonych mostkami cytoplazmatycznymi. Proces różnicowania komórek rozrodczych człowieka zachodzi stopniowo i trwa do około 1-6. miesiąca życia, kiedy to zaraz po urodzeniu zachodzi gwałtowny wzrost aktywności hormonalnej tzw. „minidojrzewanie”, uważane za końcowy

etap różnicowania gonocytów (Forest, Cathiard i in. 1973, Hadžiselimovič, Thommen i in. 1986).



Rycina 1. Schemat regulacji rozwoju płci męskiej.

1.4. Steroidogeneza

Około 10. roku życia u chłopców obserwuje się rozpoczęcie procesu dojrzewania płciowego. Wzrasta stężenie FSH, LH oraz testosteronu we krwi, co wiąże się z rozpoczynającymi się zmianami fizycznymi. W okresie dojrzewania wzrasta ekspresja

genów steroidogenezy (O'Shaughnessy, Willerton i in. 2002) oraz stężenie wewnątrzjądrowego testosteronu.

Synteza testosteronu z cholesterolu zachodzi w komórkach Leydiga w odpowiedzi na LH. Związanie LH z receptorem LHR aktywuje białko Gs i cyklazę adenylową (AC), zwiększając poziom cAMP/cGMP oraz jonów wapnia (Ca^{2+}). Wzrost stężenia cAMP, cGMP i Ca^{2+} aktywuje kinazy, które są zaangażowane w aktywację czynników transkrypcyjnych, które zwiększają ekspresję genów steroidogenezy (Dufau 1988). Cholesterol jest związkami hydrofobowym, przez co w transporcie międzybłonowym mitochondrium wymaga udziału specjalnego białka ostrej regulacji steroidogenezy (ang. steroidogenic acute regulatory protein, StAR). Enzym wewnętrznej błony mitochondrium P450scc przekształca cholesterol do pregnolonu. Następnie pregnolon dyfunduje do siateczki śródplazmatycznej gładkiej, gdzie zachodzą kolejne etapy steroidogenezy. Pregnonon jest przekształcany przez enzym CYP17A1 w dwóch etapach do 17-hydroxypregnononu i dehydroepiandrosteronu (DHEA), a DHEA jest przekształcany do testosteronu przez enzymy dehydrogenazę 3β -hydroksysteroidową (3β -HSD) i dehydrogenazę 17β -hydroksysteroidową (17β -HSD). Pewne ilości testosteronu przy udziale aromatazy (CYP19A1) ulegają konwersji do estradiolu.

1.5. Budowa histologiczna jądra

W budowie histologicznej dojrzałego jądra wyróżniamy kanaliki nasienne oraz tkankę śródmiąższową. Nabłonek plemnikotwórczy kanalika odpowiada za spermatogenezę, a tkanka śródmiąższowa pełni funkcję dokrewną gonady. Komórki Leydiga (LC) znajdują się w tkance śródmiąższowej i produkują hormony płciowe podczas steroidogenezy. W kanaliku nasiennym, wyróżniamy komórki podporowe (komórki Sertolego, SC) oraz komórki płciowe na różnych etapach dojrzewania. Komórki Sertolego to wysokie komórki kolumnowe z jądrem zlokalizowanym w części przypośredniej i rozciągają się od blaszki podstawnej do światła kanalików nasiennych. Komórki te produkują czynniki regulujące spermatogenezę i budują barierę krew-jądro. U wszystkich ssaków tkanka graniczna (błona własna) kanalika odgranicza nabłonek plemnikotwórczy od tkanki śródmiąższowej. Komórki mioidalne błony (PMC, ang. peritubular myoid cells) składają się z licznych

włókien kurczliwych, m. in. filamentów aktynowych. Ruchy kurczliwe tych komórek regulują transport plemników do nasieniowodów.

Bariera krew-jądro (BTB, ang. blood-testis barrier) obejmuje kompleks wyspecjalizowanych połączeń międzykomórkowych między komórkami Sertolego, które przylegają do nabłonka plemnikotwórczego kanalika nasiennego (Cheng i Mruk 2012). BTB dzieli nabłonek plemnikotwórczy na część przypodstawną i adluminalną. W skład przedziału przypodstawnego wchodzi spermatogonia oraz leptotenowe spermatocyty I rzędu. Przedział adluminalny znajduje się bliżej światła kanalika i składa się z zygotenowych spermatocytów I rzędu, spermatocytów II rzędowych, spermatyd i dojrzałych plemników. BTB zapewnia transport składników odżywczych i czynników regulacyjnych z komórek Sertolego do części adluminalnej oraz stanowi barierę immunologiczną zapobiegającą wnikaniu leukocytów i przeciwciał (Mruk i Cheng 2004), zapewniając komórkom rozrodczym ściśle regulowane mikrośrodowisko.

1.6. Spermatogeneza

Spermatogeneza jest unikalnym i niezwykle złożonym procesem, obejmuje szereg podziałów i transformacji komórki macierzystej, w wyniku których powstaje plemnik. Spermatogeneza zależna jest od testosteronu. Mężczyźni z mutacją receptora FSH są płodni. FSH pełni tylko rolę pomocniczą i poprawia wydajność spermatogenezy.

Spermatogenezę można podzielić na 4 główne etapy: proliferację spermatogonii, podział mejotyczny spermatocytów, transformację spermatyd w plemniki i uwolnienie plemników do światła kanalika (Russell, Ettlina i in. 1993). Do tej pory wyróżniono 13 rodzajów ludzkich komórek rozrodczych (GC): spermatogonia ciemne (Ad), spermatogonia jasne (Ap), spermatogonia typu B, spermatogonia preleptotenowe (PL), leptotenowe (L), zygotenowe (Z) i pachytenowe (P), spermatocyty II rzędu oraz spermatydy (Ryc. 2).

Począwszy od okresu dojrzewania i równoległe z procesem proliferacji, spermatogonia rozpoczynają proces różnicowania w kierunku plemników. Spermatogonia są diploidalnymi prekursorami wszystkich innych typów GC i odpowiadają za mejozę (w celu wytworzenia męskiej gamety) oraz mitozę (w celu samoodnawiania, utrzymując ciągłą produkcję plemników przez całe życie). Zlokalizowane są w podstawowym przedziale

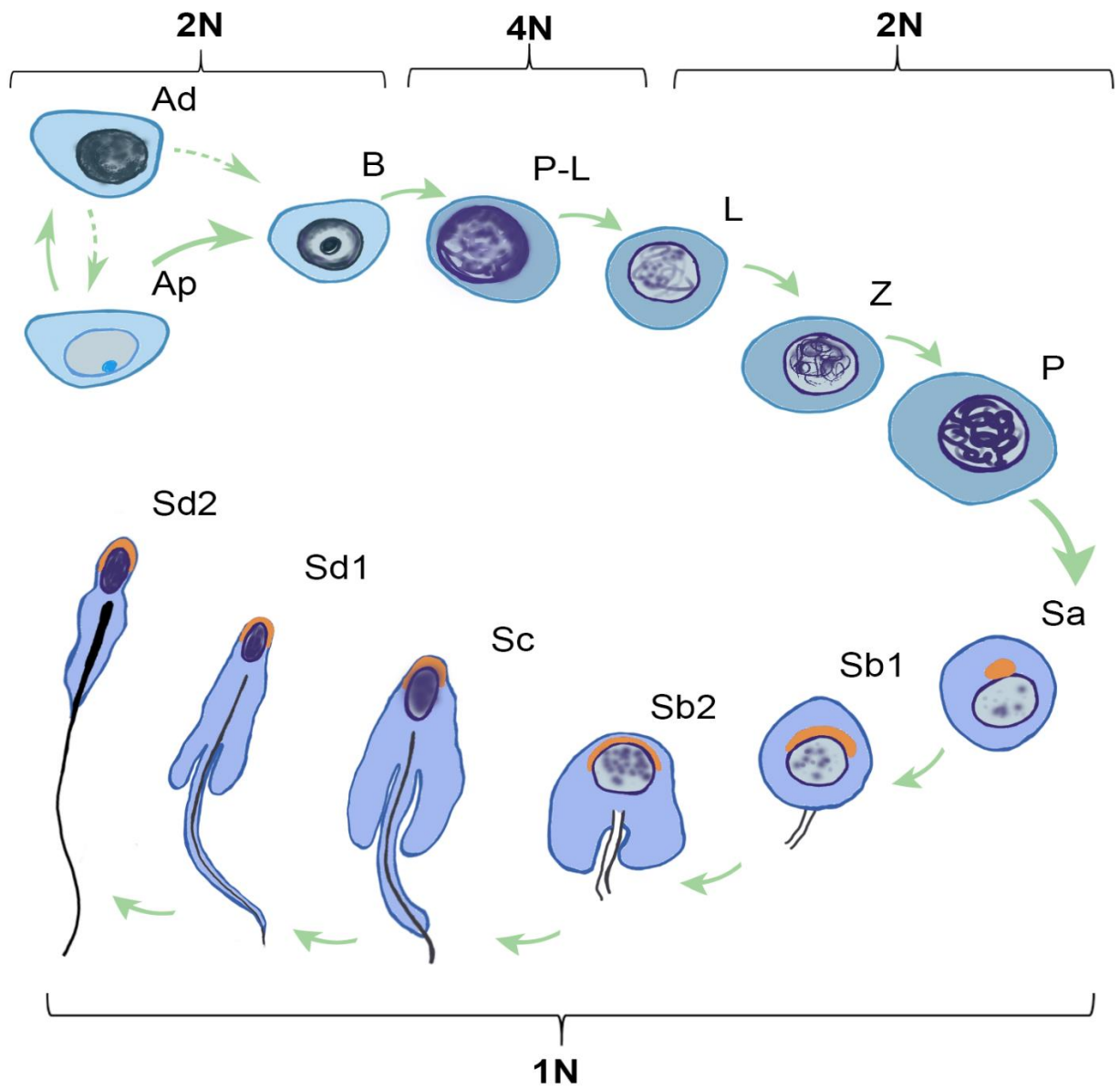
kanalika nasiennego i w bliskim kontakcie z komórkami Sertolego. Mają owalne jądro i gęstą cytoplazmę, zawierającą mały aparat Golgiego, kilka mitochondriów i wiele wolnych rybosomów. Spermatozonia ciemne to komórki spoczynkowe lub rezerwowe, podczas gdy spermatozonia jasne są aktywne mitotycznie. Spermatozonia jasne namnażają się w celu samoodnawiania lub wytwarzania spermatozonii typu B, które przechodzą przez jeden podział mitotyczny przed rozpoczęciem mejozy (Clermont 1966, DE ROOIJ i RUSSELL 2000). Według obecnie przyjętego modelu podziału spermatozonii jasnych, z jednej pary Ap powstaje 8 spermatozytów preleptotenowych (PL). Na decyzję, czy spermatozonia będą się samoodnawiać, różnicować czy ulegać apoptozie, wpływają głównie czynniki pochodzące z komórek Sertolego. Wykazano, że GDNF promuje samoodnawianie się plemników. Natomiast różnicowanie indukują SCF, białko morfogenetyczne kości 4, kwas retinowy i system sygnalizacyjny Notch1/Jagged2. Kilka mikro-RNA jest również zaangażowanych w modulację losu spermatozonii (Hayashi, Yamada i in. 2004, Hai, Hou i in. 2014, van den Driesche, Sharpe i in. 2014). Apoptoza jest mechanizmem używanym przez SC do kontrolowania liczby komórek rozrodczych, utrzymując stałą proporcję SC/GC. W rzeczywistości około 50-70% rozwijających się GC jest usuwanych podczas spermatogenezy.

Spermatozyty I-rzędu (B), które powstają po podziale mitotycznym spermatozonii typu B, są pierwszymi komórkami rozrodczymi które przekraczają barierę krew-jądro, gdzie wchodzi w etap mejozy. Zgodnie z etapami profazy występują kolejno w następujących stadiach: spoczynkowym (inaczej preleptotenowym (R, PL)), leptotenowym (L), zygotenowym (Z), pachytenowym (P) i diplotenowym (Di). Proces rekombinacji DNA zachodzi na etapie pachytenu i ma kluczowe znaczenie dla ewolucji człowieka. Po pierwszym podziale mejotycznym powstają dwa spermatozyty II-rzędu, każdy z haploidalną liczbą chromosomów, ale podwójną ilością DNA. Podczas drugiego etapu mejozy spermatozyt II-rzędu przekształca się w dwie haploidalne okrągłe spermatydy. Od tego momentu podziały komórkowe są zahamowane i rozpoczyna się różnicowanie komórek - spermioogeneza. Morfologicznie wyróżniamy sześć rodzajów spermatyd, oznaczanych kolejno: Sa, Sb₁, Sb₂, Sc, Sd₁, Sd₂. Ich różnicowanie odbywa się pod kontrolą komórek Sertolego. Dowodzi tego powiązanie lokalizacyjne a także obecność mikrotubul i

mikrofilamentów. Po pełnej metamorfozie spermatyda jest oddzielana od SC i uwalniana do światła kanalika podczas spermiacji.

Na podstawie zmieniającej się zawartości typów komórek w obrębie nabłonka plemnikotwórczego wyróżniono 6 stadiów spermatogenezy u człowieka. W skład każdego stadium wchodzi grupy komórek na różnym stopniu zaawansowania. U myszy wyodrębniono 12 (Nakata, Wakayama i in. 2015), a u szczura 14 stadiów spermatogenezy (Russell, Ettlina i in. 1993). W przekroju poprzecznym kanalika, profil danego segmentu zmienia się wraz z upływem czasu, ale po zakończeniu ostatniego etapu, rozpoczyna się pierwszy, zgodnie z tzw. cyklem nabłonka plemnikotwórczego. W celu ułatwienia rozpoznania komórek germinalnych w ciągu trwania spermatogenezy na różnych jej etapach, dokonano uporządkowania stadiów cyklu w obrębie nabłonka plemnikotwórczego. Udowodniono, że u człowieka stadia te ułożone są w kanaliku mozaikowo, przez to w przekroju poprzecznym kanalika możemy zaobserwować 2-4 różne grupy komórek. Z kolei u innych ssaków układ jest segmentowy, dzięki czemu w przekroju poprzecznym widoczna jest jedna grupa komórek odpowiadająca jednemu ze stadiów. Obliczono, że u człowieka jeden cykl nabłonka plemnikotwórczego trwa 16 dni, a u myszy 8,6 dnia (Oakberg 1956, Heller i Clermont 1963). Na tej podstawie oszacowano, że cały proces spermatogenezy człowieka trwa 74 dni, a myszy 35 dni (Heller i Clermont 1964, Clermont 1972).

W literaturze brak jest danych na temat ekspresji glikoproteiny ZP3 w jądrze.



Rycina 2. Schemat etapów spermatogenezy.

2. CEL

Celem pracy jest scharakteryzowanie ekspresji ZP3 w wybranych tkankach ludzkich i mysich oraz zbadanie ontogenezy ZP3 wraz z rozwojem jądra i spermatogenezy u myszy.

Cele szczegółowe obejmują:

1. Określenie, porównanie i lokalizacja ekspresji genu i białka ZP3 w jajnikach, jądrach i innych zdrowych tkankach u myszy i człowieka.
2. Określenie ekspresji oraz lokalizacji szczegółowej ZP3 w jądrze, spermatogenezie oraz w komórkach macierzystych/progenitorowych spermatogenezy.
3. Charakterystyka ontogenezy ekspresji i lokalizacji ZP3 w jądrze mysim począwszy od życia płodowego, przed i po okresie dojrzewania płciowego do okresu osiągnięcia dorosłości (w zależności od zmian hormonalnych płciowych, rozwoju jąder/spermatogenezy).
4. Ocena wpływu wybranych hormonów płciowych i gonadotropin na ekspresję ZP3 w linii komórkowej GC-2spd(ts).

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Tkanki ludzkie

Tkanki ludzkie (jelito cienkie, jelito grube, wątroba, trzustka, żołądek, węzeł chłonny, mózg, płuca, najądrza, prostata, nerka, piersć, myometrium, mięśnie szkieletowe, jajnik, jądro; n=16) zostały odpowiednio utrwalone, w zależności od dalszych zaplanowanych eksperymentów. Do zabezpieczenia tkanek przeznaczonych na do analiz ekspresji genów, wykorzystano RNAlater (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a następnie przechowywano w temperaturze -80 °C. Do analiz metodami immunohistochemicznymi, fluorescencyjnymi oraz RNAscope *in situ* hybridization tkanki utrwalano w 4% zbuforowanej formalinie (PFA). Bloczki parafinowe zostały pozyskane z archiwum Zakładu Patomorfologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o numerze: R-I-002/323/2019.

3.2. Tkanki mysie

Tkanki mysie przeznaczone do analiz ekspresji genów były utrwalone w RNAlater (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a następnie przechowywane w temperaturze -80 °C. Do barwień metodami immunohistochemicznymi, fluorescencyjnymi oraz RNAscope *in situ* hybridization tkanki utrwalono w 4% PFA. Do badań nad ontogenezą metodami immunohistochemicznymi wykorzystano tkanki jąder myszy z poszczególnych grup badanych: ED18, PND1, PND7, PND15, PND21, PND35, 2-mo, 6-mo, (n=6) Tabela 1., pochodzące z materiału archiwalnego, który był utrwalony w 4% PFA. Tkanki jąder mysich do analizy ekspresji ZP3 u myszy LuRKO (n=6) zostały pozyskane, jak to opisano w niniejszej publikacji (Zhang, Poutanen i in. 2001) i utrwalone w 4% PFA. Bloczki parafinowe tkanek kontrolnych zostały pozyskane z innych projektów badawczych realizowanych w Klinice Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Tabela 1. Grupy eksperymentalne myszy do badania nad ontogenezą jądra.

Nazwa grupy	Wiek myszy
ED18	18. dzień życia płodowego
PND1	1. dzień życia
PND7	7. dzień życia
PND15	15. dzień życia
PND21	21. dzień życia
PND35	35. dzień życia
2-mo	2. miesiąc życia

3.3. Hodowle komórkowe

Spermatocyty mysie GC-2(spd)ts (CRL-2196; ATCC, Manassas, VA), były hodowane w butelkach o powierzchni 75 cm² w medium DMEM/f-12 (GIBCO, Paisley, UK), suplementowane 10% surowicą bydlęcą (FBS; Biochrom, Berlin, Germany) oraz roztworem P/S (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) w warunkach 37 °C w obecności 5% CO₂. Podłoże było zmieniane co 3 dni.

3.4. Warunki stymulacji komórek

Hodowane komórki spermatocytów mysich przed rozpoczęciem stymulacji poddano przegłodzeniu w medium DMEM/f-12 z dodatkiem 0,5% dFBS oraz roztworu P/S. Następnie przeprowadzono stymulacje z: progesteronem (o stężeniu 0,01; 0,1; 1; 10 μM), estradiolem (o stężeniu 3; 30; 300 nM), testosteronem (o stężeniu 0,001; 0,01; 0,1; 1 μM), hCG (o stężeniu 0,1; 1; 10 ng/ml), LH (o stężeniu 0,1; 1; 10; 100 mIU), i FSH (o stężeniu 10 IU) przez 24h. Przeprowadzono identyczne eksperymenty trzykrotnie, za każdym razem w trzech powtórzeniach dla każdego warunku.

3.5. Izolacja RNA

Do izolacji RNA zarówno z tkanek jak i z komórek wykorzystano metodę TRIzol/chloroform (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Etap puryfikacji z 75% etanolem powtórzono trzykrotnie w celu uzyskania wysokiej jakości RNA. Po ostatnim cyklu wirowania, próby rozcieńczono w wodzie wolnej od nukleaz (Ambion, Austin, TX, USA). Ilość i jakość wyizolowanego RNA została sprawdzona przez pomiar absorbancji przy użyciu NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA). Integralność wyizolowanego RNA potwierdzono wykonując elektroforezę w żelu agarozowym.

3.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Wyizolowane RNA poddano inkubacji z deoksyrybonukleazą (DNase I, Thermo Fisher Scientific) w temperaturze pokojowej w celu eliminacji pozostałości fragmentów DNA, a następnie z 25 mM roztworem EDTA przez 10 minut 65 °C w celu zahamowania reakcji. Reakcja odwrotnej transkrypcji została przeprowadzona za pomocą SensiFAST cDNA SynthesisKit (Bioline Reagents Ltd, London, UK) zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta.

3.7. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (Real-Time PCR)

Reakcję qPCR przeprowadzono z wykorzystaniem SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) na termocyklerze Step One plus, w następujących warunkach dla jednego cyklu: 2 minuty w temp. 50 °C, 10 min. w temp. 95 °C, 40 cykli amplifikacji: 15 sekund w 95°C, 1 minuta w 60°C. W reakcji wykorzystano sekwencje starterów podane w Tabeli 2. Po zakończeniu reakcji przeprowadzono analizę z wyliczeniem $\Delta\Delta Ct$.

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych w reakcji q-RT-PCR.

Gen	Sekwencja startera	Wielkość produktu (pz)	EMBL
Startery ludzkie:			
PPIA*	F: GTTCTTCGACATTGCCGTCG	65	NM_021130.5

	R: TGTCTGCAAACAGCTCAAAGG		
ZP3	F: TGGCAACAGCATGCAGGTA	57	NM_001110354.2
	R: TGGAGCAGGAAGGTGCTGTA		
FSHR	F: GCCAAGAGAGCAAGGTGACA	84	NM_000145.4
	R: CTCGAAGCTTGGTGAGGACA		
LHR	F: CCGGTCTCACTCGACTATCACT	60	NM_000233.4
	R: AAGCTTGAGATGGGATCACTTTG		
Startery mysie:			
<i>PPIA</i> *	F: CATAACAGGTCCTGGCATCTTGTC	112	NM_008907.2
	R: AGACCACATGCTTGCCATCCAG		
<i>ZP3</i>	F: CCAACGACCAGACTGTGGAA	106	NM_011776.1
	R: AGGACTATAGCTGCCAGGGT		

* Gen referencyjny (gen metabolizmu podstawowego, ang. housekeeping gene)

3.8. RNAScope *in situ* hybridization

Zgodnie z protokołem producenta zestawu RNAScope 2.0 HD Assay (catalog number 310033, Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA), zabezpieczone w formalinie tkanki mysie i ludzkie poddano deparafinizacji w ksylenu (2 x 5 min.), 100% EtOH (2 x 1 min.) a następnie osuszono przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Preparaty inkubowano w nadtlenku wodoru przez 10 min. w temperaturze pokojowej i przepłukano dwukrotnie w wodzie destylowanej. Preparaty inkubowano w buforze do odkrywania antygeny w temperaturze 121 °C przez 15 minut i od razu zanurzono w wodzie destylowanej. Następnie szkiełka przepłukano w alkoholu absolutnym i wysuszono. Po dokładnym obrysowaniu preparatów markerem hydrofobowym, zaaplikowano proteazę przez 30 minut w HybEZ™ Oven (ACD) w 40 °C. Po przepłukaniu dwukrotnie w wodzie destylowanej zastosowano sondy do transkryptów docelowych ZP3 (mysi ZP3: ACD-447551, ludzki ZP3: ACD-442631) a także sondy dla kontroli pozytywnych (gen metabolizmu podstawowego, cyklofilina B-PPIB, ludzki: ACD 313901; mysie: ACD-313911) oraz negatywnych (DapB - negative control probe targeting bacteria gene, ACD-310043). Następnie szkiełka inkubowano w 40 °C przez 2 godziny i przepłukano 2 x 2 min. w buforze płuczającym. Po tym

zastosowano amplifikatory hybrydazyjne (AMPs) przez 30 minut (AMP 1, 3, 5) lub 15 minut (AMP 2, 4, 6) w temperaturze 40 °C (AMP 1-4) lub w temperaturze pokojowej (AMP 5 i 6). Między każdym etapem płukano dwukrotnie. Po ostatnim płukaniu równe objętości odczynników BROWN-A i BROWN-B zostały wymieszane i zaaplikowane na każdy preparat i inkubowane przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po dwukrotnym płukaniu w wodzie destylowanej szkiełka wybarwiono kontrastowo w 50% hematoksylinie Gilla (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i przepłukane w 0,02% wodzie amoniakalnej przez 10 s i dwukrotnie w wodzie destylowanej. Odwodnione szkiełka (2 × 2 min w 70% EtOH, 2 × 2 min w 100% EtOH i 5 min w ksylenie) utrwalono za pomocą Pertex (Histolab Products, Goteborg, Szwecja) i nałożono szkiełko nakrywkowe.

3.9. Barwienie immunohistochemiczne (IHC)

Tkanki zabezpieczone w 4% roztworze formaliny i utrwalone w parafinie poddano etapom deparafinizacji i uwodnieniu w ksylenie (trzykrotnie po 2 minuty) oraz szeregu malejących stężeń alkoholi (dwukrotnie po 2 minuty na każde stężenie: alkohol absolutny, alkohol 96% oraz alkohol 70%). Po przepłukaniu w wodzie destylowanej przez 10 min, preparaty inkubowano w temperaturze 121 °C przez 15 minut w 10 mM buforze do odkrywania antygeny (bufor cytrynianowy z 0.05% Tween20, pH = 6). Następnie po ostudzeniu preparaty inkubowano w temperaturze pokojowej w wilgotnej komorze przez 1 h zanurzone w roztworze 3% BSA w celu zredukowania barwienia niespecyficznego. Po tym czasie inkubowano w temperaturze 4 °C z monoklonalnymi przeciwciałami pierwszorzędowymi anti-ZP3 (0.125 µg/mL) do 24 h. Aktywność endogennej peroksydazy została zablokowana przez inkubację szkiełek w temperaturze pokojowej w 0,5% roztworze H₂O₂ w PBS przez 20 min., po czym użyto gotowego zestawu przeciwciał drugorzędowych firmy DAKO (DAKO EnVision + System – HRP labeled polymer; Agilent, Santa Clara, CA) i inkubowano próby w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Barwny efekt reakcji uzyskano z wykorzystaniem DAB+ Chromogen (DAKO). Szkiełka wypłukano w wodzie destylowanej i zabarwiono kontrastowo hematoxyliną Mayera (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), następnie odwodniono w szeregu alkoholowym ze wzrastającym stężeniem i utrwalono klejem Pertex na bazie ksylenu (Histolab Products, Goteborg, Szwecja).

3.10. Barwienie immunocytochemiczne (ICC)

Komórki mysich spermatocytów wysiano na szkiełkach 8-dołkowych, pokrytych kolagenem i hodowano przez 24 h w podłożu hodowlanym DMEM/F-12 (Gibco) z dodatkiem 10% FBS (Biochrom) oraz P/S (Sigma-Aldrich) w temperaturze 37 °C w wilgotnej atmosferze w obecności 5% CO₂. Następnie przepłukano dwukrotnie PBS i utrwalono 3,7% paraformaldehydem (PFA). W celu zablokowania niespecyficznego przyłączenia przeciwciał komórki inkubowano w roztworze blokującym zawierającym 2% BSA (Sigma-Aldrich) w PBS oraz 0,05% Tween (Sigma-Aldrich) przez 1 godzinę w wilgotnej komorze. Po tym czasie komórki inkubowano przez noc w temperaturze 4 °C z pierwotnymi monoklonalnymi przeciwciałami anti-ZP3 rozpuszczonymi w 2% roztworze blokującym. Po przepłukaniu trzykrotnie w PBS komórki były inkubowane z przeciwciałem goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (A11029; Thermo Fisher, Waltham, MA) w rozcieńczeniu 1:500 przez 45 minut. Jądra komórkowe zabarwiono DAPI (Sigma-Aldrich) i utrwalono. W celu odróżnienia barwienia niespecyficznego od specyficznego przeprowadzono kontrolę przeciwciał.

3.11. Technika barwienia całego kanalika nasiennego (ang. Whole-mount immunostaining of seminiferous tubules)

Barwienie całego mysiego kanalika nasiennego zostało przeprowadzone według metody opisanej w niniejszej publikacji (Makela, Cisneros-Montalvo i in. 2020). Po wykonaniu gonadektomii zwierząt, odpowiednio pocięte segmenty kanalików były utrwalane w 4% roztworze formaliny (PFA) przez 2 h w temperaturze 4 °C a następnie płukane w PBS. Po etapie blokowania w roztworze 2% BSA z 10% FBS i 0,3% Tritonie X-100 w PBS, kanaliki inkubowano przez noc w temperaturze 4 °C z pierwszorzędowymi monoklonalnymi przeciwciałami anti-ZP3 (1 µg/ml), anti-GFRa1 (AF560, R&D Systems, Minneapolis, MN; rozcieńczenie 1:250) oraz anti-SALL4 (1:2000, ab29112, Cambridge, UK). Po przepłukaniu roztworem PBS inkubowano odpowiednio z drugorzędowymi przeciwciałami (A11055, A10036 i A31573, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA; rozcieńczenie 1:500) przez 1 h w temperaturze pokojowej. Następnie kanaliki ułożono liniowo, utrwalono i zobrazowano (Zeiss LSM880, Carl Zeiss, Jena, Germany).

3.12. Analizy statystyczne

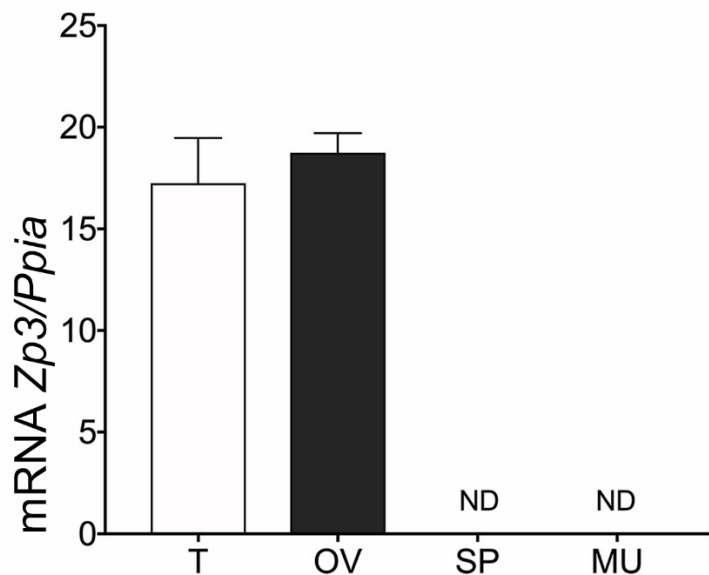
Do analiz statystycznych użyto programu GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Istotność statystyczną sprawdzono za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Wyniki zostały przedstawione jako średnia \pm SEM, a wartość $p \leq 0,05$ była uznawana za statystycznie istotną.

4. WYNIKI

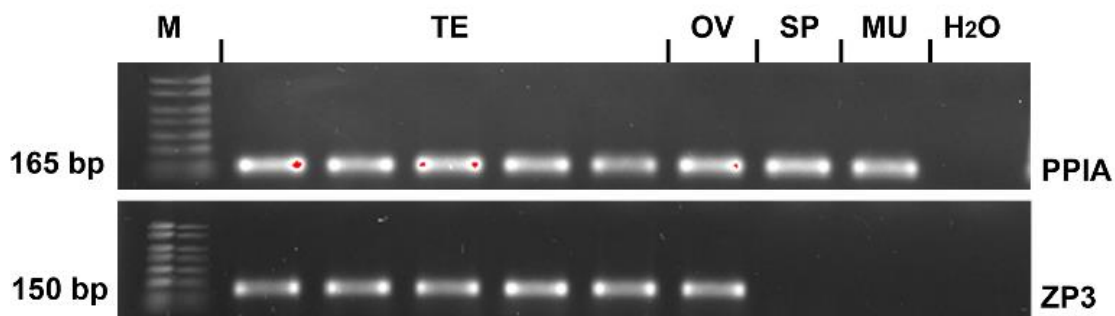
Wyniki badania ekspresji ZP3 w jądrze mysim i ludzkim, oocytach, linii komórkowej spermatocytów mysich GC-2spd(ts) i tkankach zdrowych takich jak: jelito cienkie, jelito grube, wątroba, trzustka, żołądek, węzeł chłonny, mózg, płuca, najądrza, prostata, nerka, pierś, myometrium, mięśnie szkieletowe (Ryc: 3-14), zostały opublikowane w: Pulawska K., i in. "Novel expression of zona pellucida 3 protein in normal testis; potential functional implications." *Molecular and Cellular Endocrinology* 539 (2022): 111502. Mój udział polegał na przeprowadzeniu eksperymentów oraz analizie i opracowaniu wyników.

4.1. Ekspresja glikoproteiny ZP3 w jądrze mysim i ludzkim oraz w linii komórkowej mysich spermatocytów GC-2spd(ts).

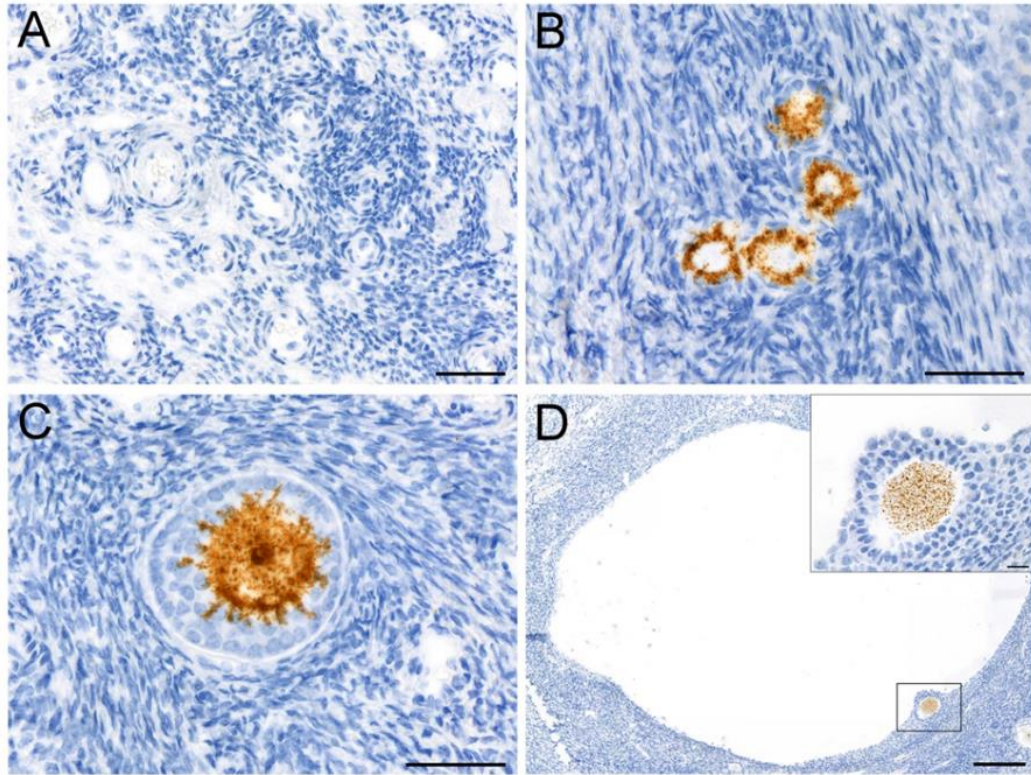
Analiza metodą qPCR wykazała znaczącą ekspresję ZP3 w jajniku i jądrze mysim w porównaniu do kontroli negatywnych (Ryc. 3-4). Jako kontrole negatywne wykorzystane były tkanka śledziony i tkanka mięśni szkieletowych. Metodami IHC oraz RNAscope *in situ* hybridization zlokalizowałam glikoproteinę ZP3 (Ryc. 6A) oraz jej transkrypty mRNA w obrębie tkanki jajnika myszy, potwierdzając jego obecność w pęcherzykach pierwotnych, wtórnych oraz antralnych oocytu (Ryc. 5B-D i 6C). Jednocześnie potwierdziłam ekspresję glikoproteiny ZP3 oraz transkryptów mRNA w spermatogoniach, spermatocytach oraz spermatydach (okrągłych oraz wydłużonych) mysiego jądra (Ryc. 6B i 6D). Nie wykazałam ekspresji ZP3 w pęcherzyku pierwotnym oocytu (Ryc. 5A), w komórkach Sertolego, komórkach Leydiga ani w dojrzałych plemnikach (Ryc. 6B i 6D).



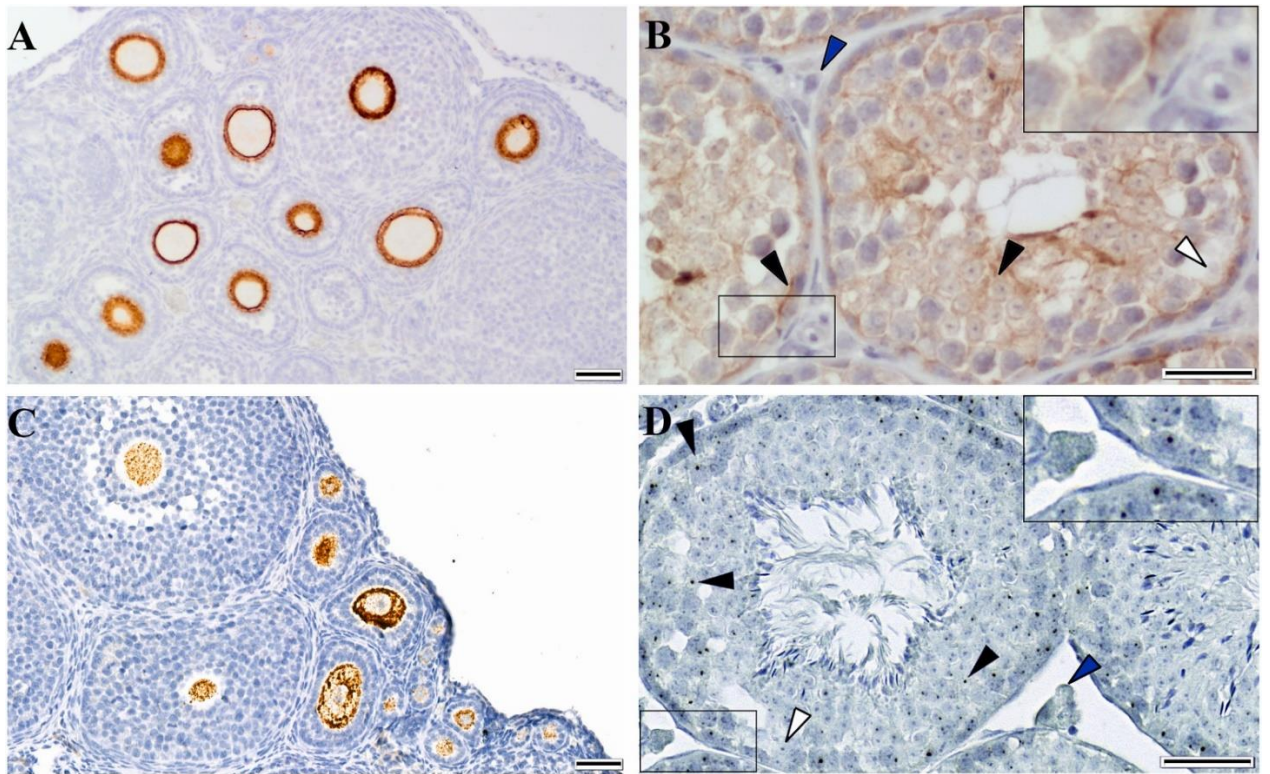
Rycina 3. Profil ekspresji ZP3 w zdrowych tkankach myszy typu dzikiego (WT) jądra, jajnika, śledziony, mięśnia szkieletowego. Kolumny reprezentują stosunek ekspresji genu *Zp3* i *Ppia* \pm SEM. Poziom istotności statystycznej: * $p \leq 0,05$; (A).



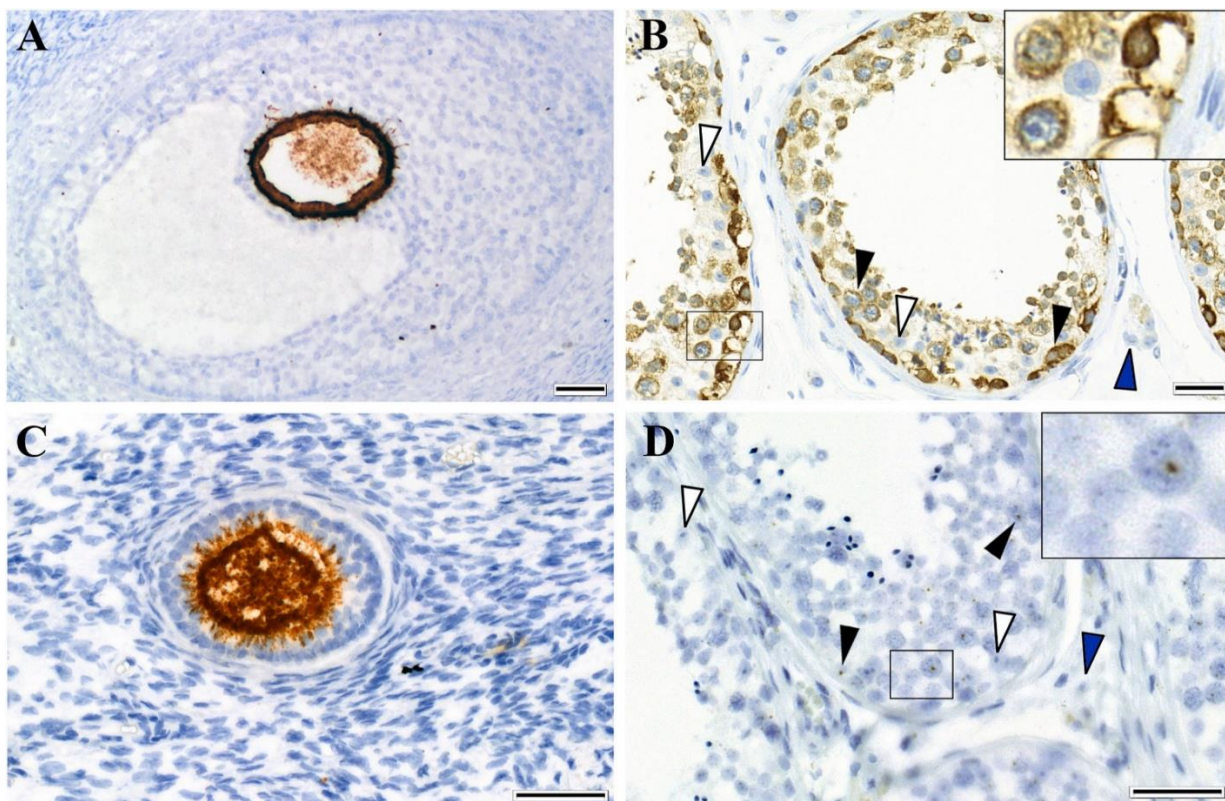
Rycina 4. Analiza ekspresji metodą RT-PCR zobrazowana elektroforezą w żelu agarozowym dla ZP3 oraz genu metabolizmu podstawowego *Ppia* w zdrowych tkankach jądra, jajnika, śledziony, mięśnia szkieletowego (B). M – marker wielkości, T, TE – jądro, OV – jajnik, SP – śledziona, MU- mięsień, H₂O – woda wolna od nukleaz.



Rycina 5. Lokalizacja ZP3 metodą RNAscope *in situ* hybridization w oocytach w poszczególnych etapach dojrzewania: (A) zawiązkowy, (B) pierwotny, (C) wtórny, (D) antralny.

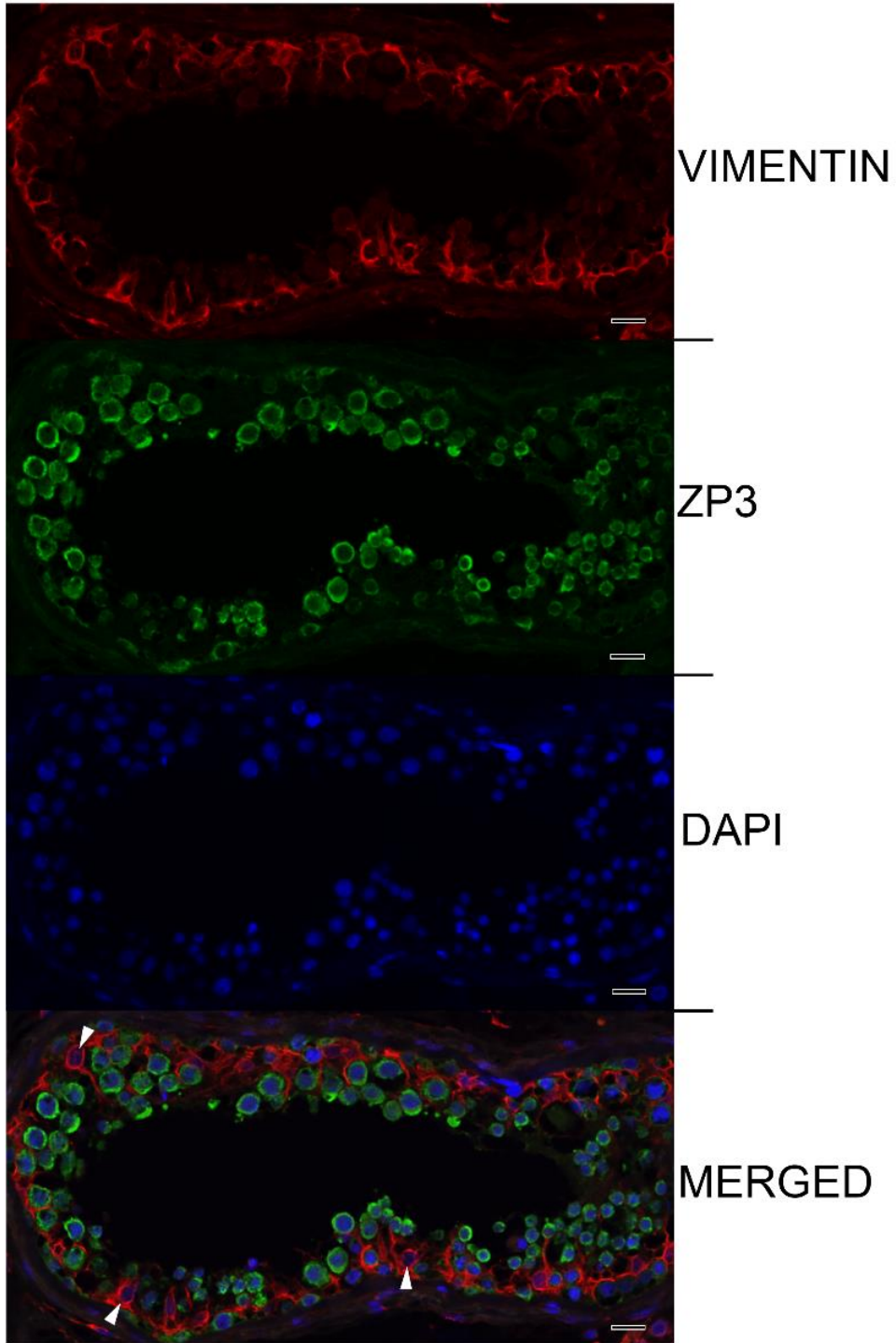


Rycina 6. Lokalizacja ZP3 metodami IHC oraz RNAscope *in situ* hybridization w jajniku (A) i jądrze (B) oraz transkryptów mRNA ZP3 w jajniku (C) i jądrze (D). Czarne strzałki wskazują pozytywne barwienie glikoproteiny/transkryptów ZP3, białe strzałki wskazują negatywne dla ZP3 komórki Sertolego, niebieskie strzałki wskazują negatywne dla ZP3 komórki Leydiga.



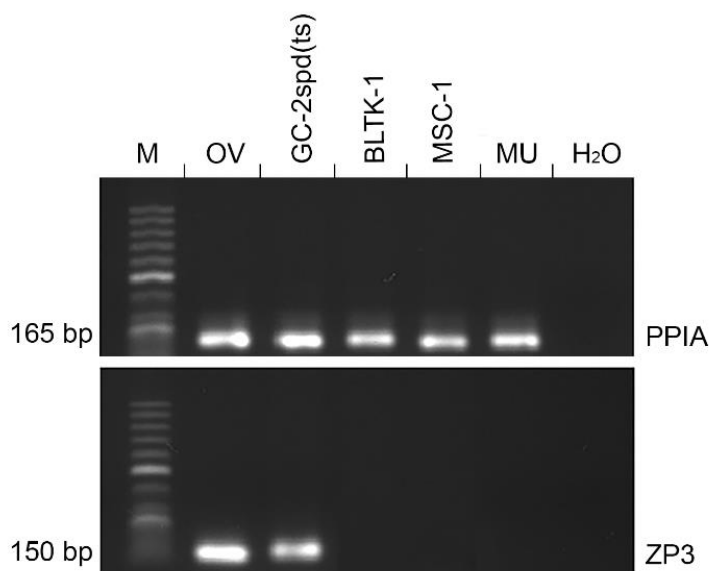
Rycina 7. Lokalizacja ZP3 metodami IHC oraz RNAscope in situ hybridization w ludzkim jajniku (A) i jądrze (B) oraz transkryptów mRNA ZP3 w jajniku (C) i jądrze (D). Czarne strzałki wskazują pozytywne barwienie glikoproteiny/transkryptów ZP3, białe strzałki wskazują negatywne dla ZP3 komórki Sertolego, niebieskie strzałki wskazują negatywne dla ZP3 komórki Leydiga.

Barwienia na tkance ludzkiej jajnika – zarówno na poziomie białka jak i mRNA, wykazały ekspresję ZP3 w oocycie (Ryc. 7 A i 7C), a także w tkance jąder ludzkich, a dokładnie w komórkach germinalnych: spermatogoniach, spermatocytach i spermatydach (okrągłych oraz wydłużonych) (Ryc. 7B i 7D). Ekspresja ZP3 nie została wykazana w ludzkich komórkach Sertolego ani komórkach Leydiga zarówno na poziomie mRNA jak i samego białka. Dodatkowo wykonałam podwójne barwienie immunofluorescencyjne jądra ludzkiego z przeciwciałami anti-ZP3 oraz przeciwko Vimentynie, aby wykazać brak ekspresji ZP3 w komórkach Sertolego (Ryc. 8).

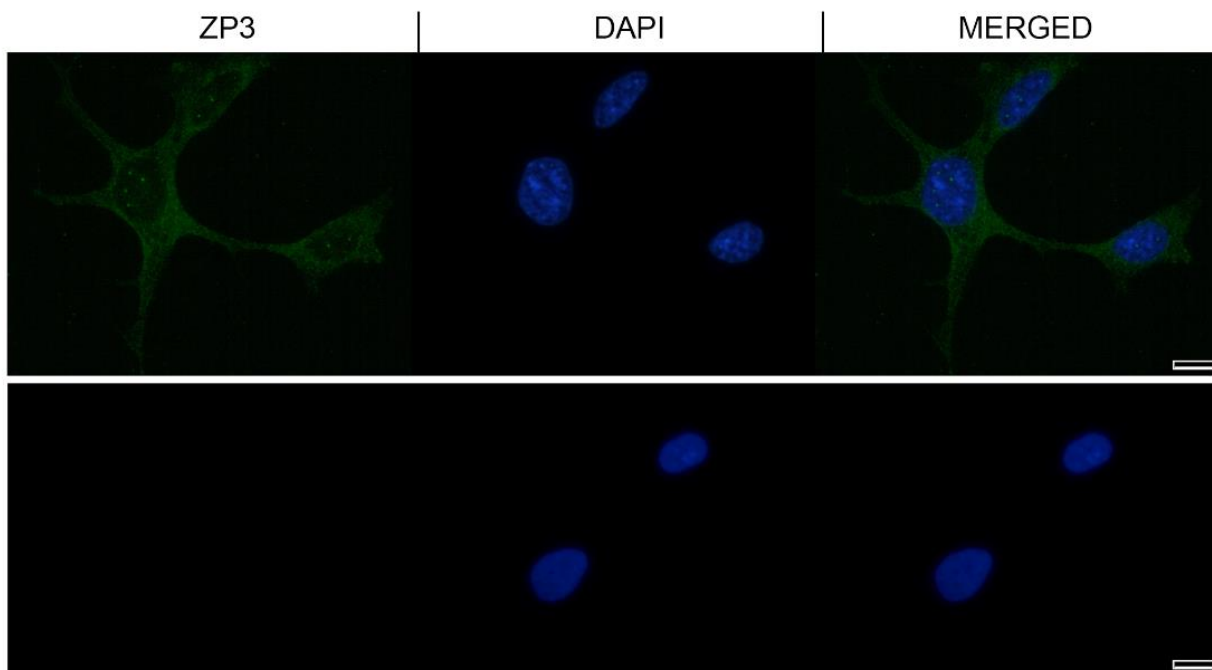


Rycina 8. Immunofluorescencyjna lokalizacja vimentyny oraz ZP3 w jądrze ludzkim. Obraz wykonany za pomocą mikroskopii konfokalnej. Białe strzałki wskazują negatywne dla ZP3 komórki Sertolego.

Ekspresja *Zp3* została potwierdzona również w immortalizowanej linii komórkowej spermatocytów mysich GC-2spd(ts) metodą RT-PCR (Ryc. 9). Nie stwierdziłam ekspresji *Zp3* w linii komórkowej BLTK1 ani w komórkach Sertolego MSC-1. Kontrolę pozytywną stanowił jajnik myszy, zaś negatywną fragment tkanki mięśnia szkieletowego myszy. Barwienie ICC z przeciwciałami monoklonalnymi anti-ZP3 wykazało znaczącą ekspresję glikoproteiny Zp3 w cytoplazmie immortalizowanej linii komórkowej spermatocytów mysich GC-2spd(ts) (Ryc. 10).

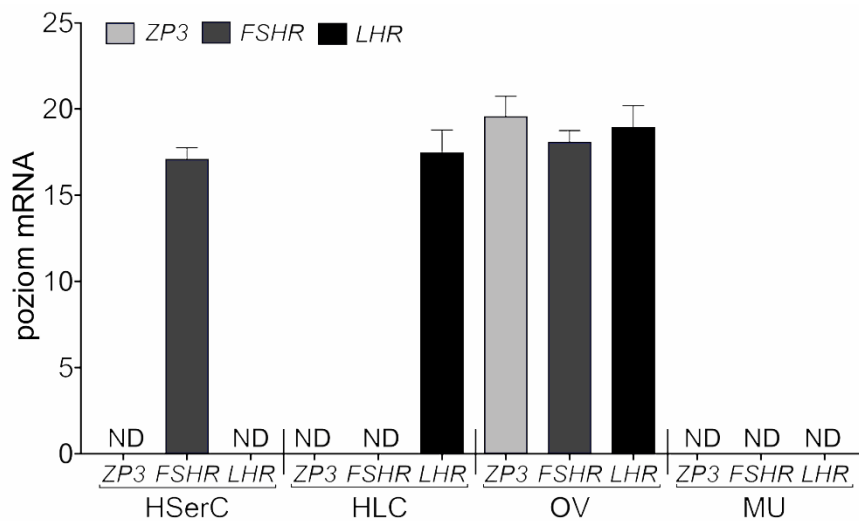


Rycina 9. Analiza ekspresji *Zp3* metodą RT-PCR zobrazowana elektroforezą w żelu agarozowym w komórkach GC-2spd(ts), BLTK-1, MSC-1, jajniku i mięśniu szkieletowym. BLTK-1 – linia komórkowa nowotworu komórek Leydiga, GC-2spd(ts) – linia komórkowa spermatocytów mysich; M – marker wielkości, MSC-1 – linia komórkowa komórek Sertolego myszy, MU – mięsień szkieletowy, OV- jajnik, H2O – woda wolna od nukleaz.

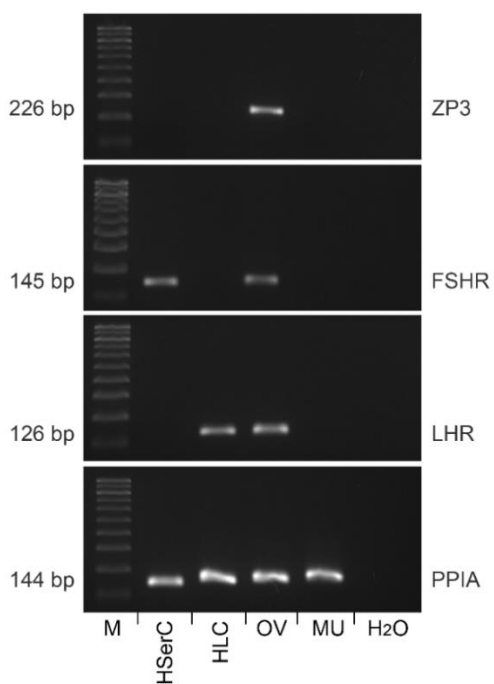


Rycina 10. Lokalizacja glikoproteiny ZP3 w komórkach spermatocytów mysich GC-2spd(ts). Rycina powyżej wskazuje pozytywne barwienie z przeciwciałami pierwszorzędowymi anti-ZP3, rycina poniżej stanowi kontrolę negatywną bez przeciwciała pierwszorzędowego. (Skala 10 μ m).

Badanie ekspresji mRNA *ZP3* nie wykazało obecności transkryptów ani w pierwotnych ludzkich komórkach Sertolego (HSerC) ani w pierwotnych komórkach Leydiga (HLC) (Ryc. 11-12). Ekspresja receptorów *FHSR* oraz *LHR* w tych komórkach stanowiła ich kontrolę pozytywną w badaniu: komórki Sertolego wykazały ekspresję *FHSR*, natomiast komórki Leydiga – *LHR*. Kontrolą pozytywną był jajnik, który wykazał ekspresję *ZP3*, *LHR* oraz *FHSR*, natomiast kontrolę negatywną – tkanka mięśnia szkieletowego człowieka, gdzie nie było ekspresji tych genów.

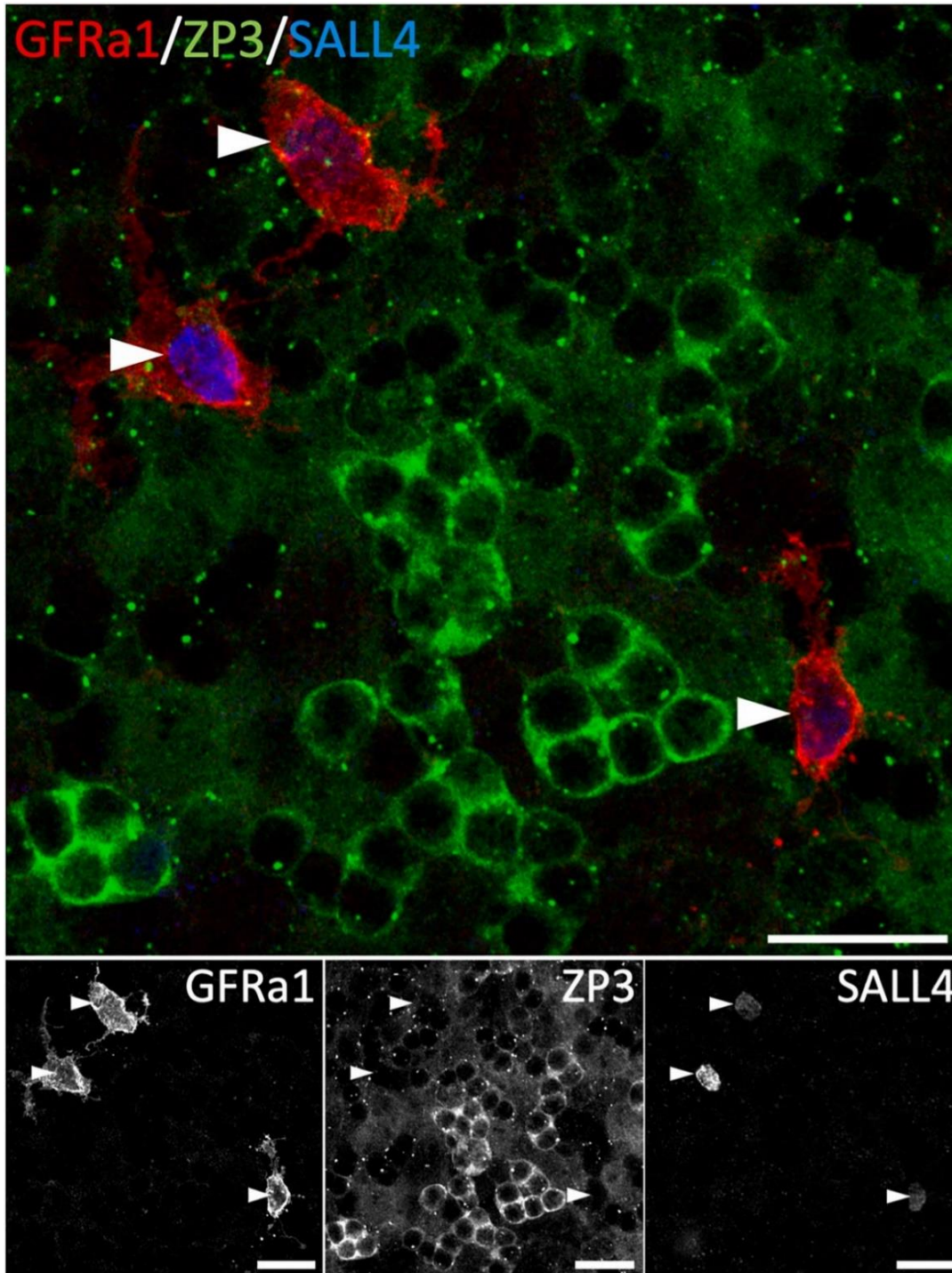


Rycina 11. Profil ekspresji ZP3, FSHR oraz LHR w ludzkich komórkach Sertolego (HSerc) i komórkach Leydiga (HLC) oraz zdrowym ludzkim jajnikach i mięśniach szkieletowych metodą qPCR w odniesieniu do genu referencyjnego PPIA.



Rycina 12. Profil ekspresji ZP3, FSHR oraz LHR w ludzkich komórkach Sertolego (HSerc) i komórkach Leydiga (HLC) zobrazowana elektroforezą w 2% żelu agarozowym.

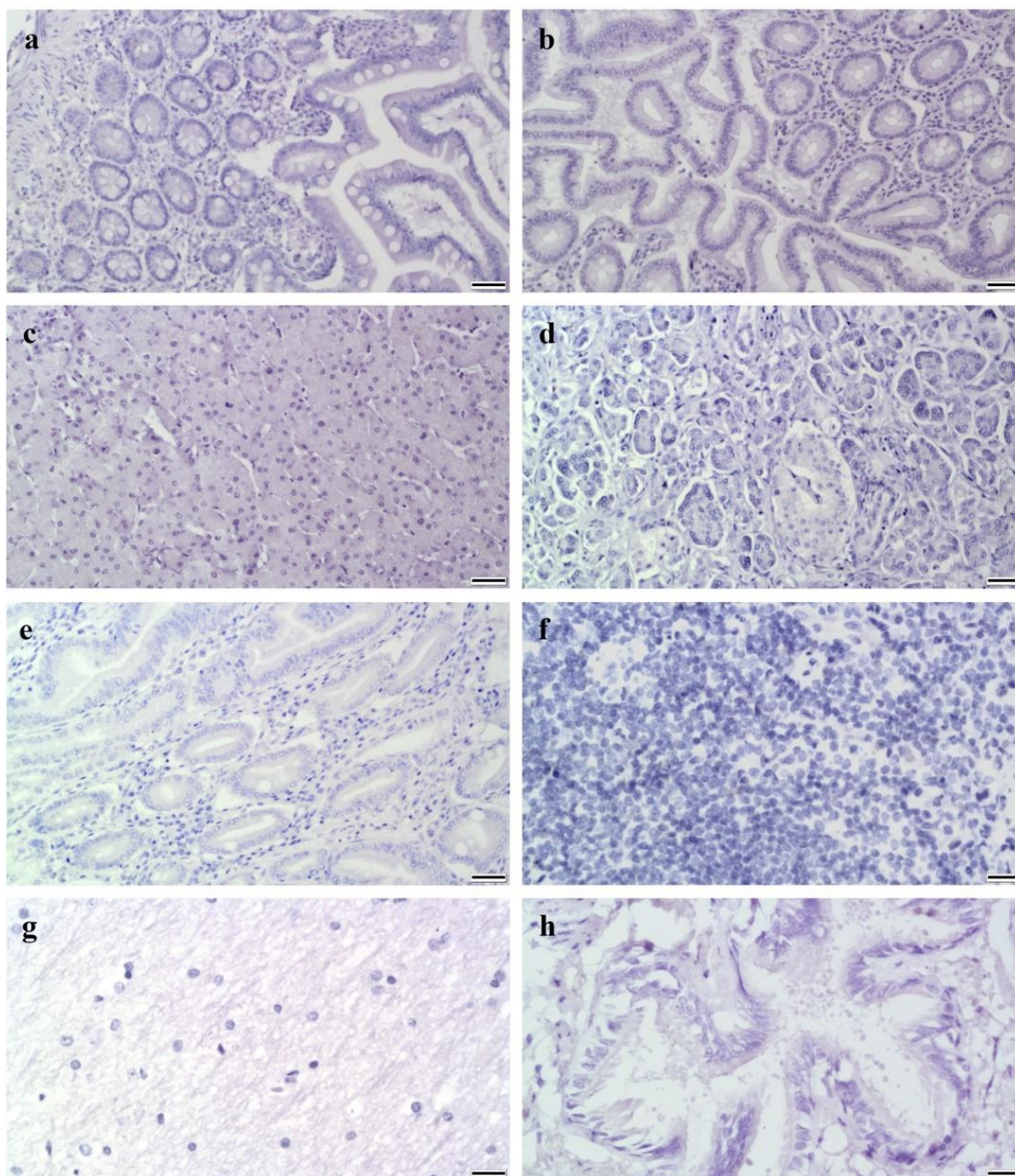
W celu sprawdzenia ekspresji ZP3 w komórkach macierzystych i progenitorowych (SSPCs) wykonałam barwienie całego kanalika mysich jąder z wykorzystaniem immunofluorescencji (Ryc. 13). Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej nie wykazało żadnego sygnału dla monoklonalnego przeciwciała anty-ZP3 w miejscu występowania komórek macierzystych i progenitorowych – barwionych odpowiednio z zastosowaniem markerów GFRA1 oraz SALL-4.

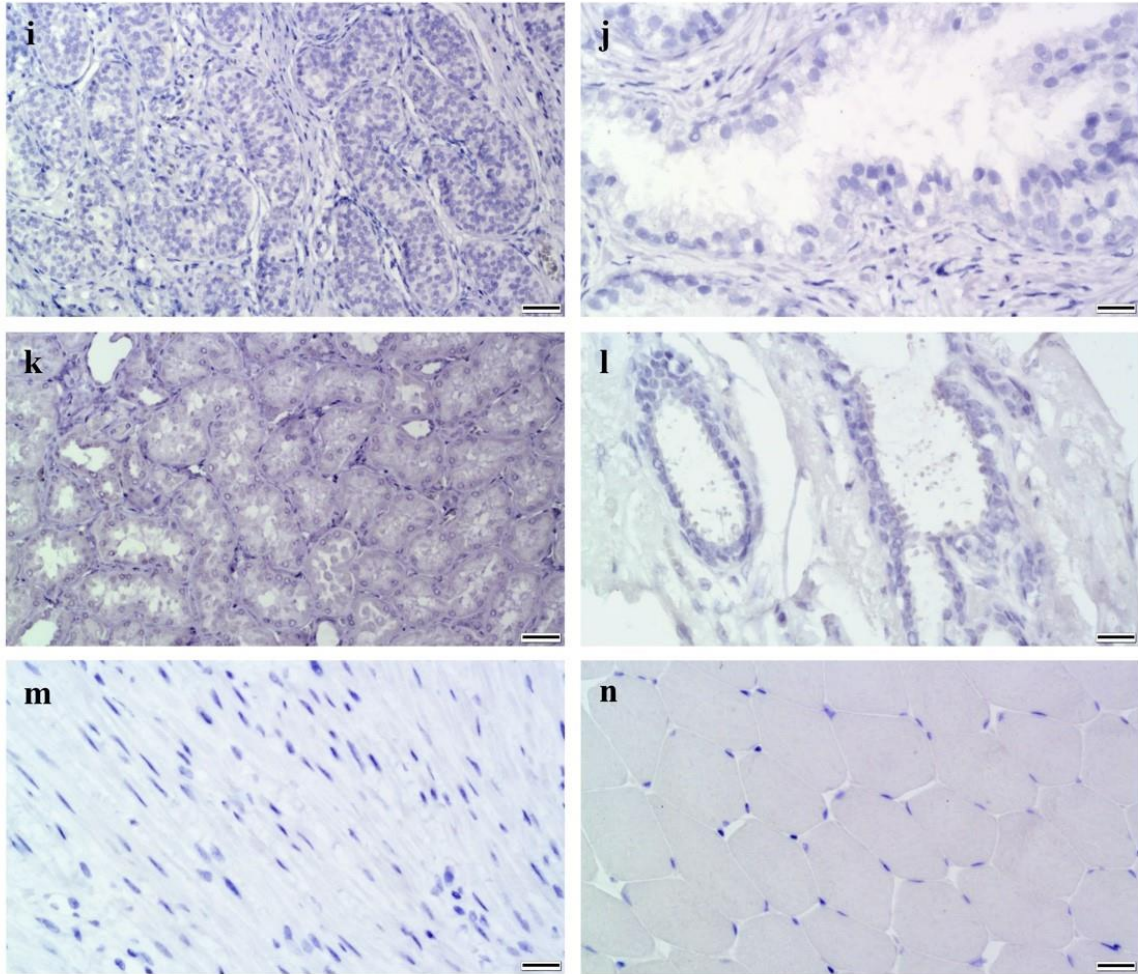


Rycina 13. Immunofluorescencyjna lokalizacja ZP3 w mysich w komórkach macierzystych i progenitorowych (SSPCs) wykonana techniką barwienia całego kanalika nasiennego (ang. whole-mount seminiferous tubule staining) i zobrazowana za pomocą mikroskopii konfokalnej. Barwienie wykonano z użyciem przeciwciał przeciwko SSPCs – GFRa1 (czerwone) anty-ZP3 (zielone) oraz SALL4 (niebieskie). Białe strzałki wskazują pozytywne barwienie nieodróżnicowanych spermatogonii As dla GFRa1/SALL4 a jednocześnie na negatywne barwienie dla ZP3.

4.2. Tkanki negatywne dla ZP3

IHC z użyciem przeciwciał anti-ZP3 w tkankach ludzkich (jelito cienkie, jelito grube, wątroba, trzustka, żołądek, węzeł chłonny, mózg, płuca, najądrza, prostata, nerka, piersć, myometrium, mięśnie szkieletowe) nie wykazało obecności ZP3 ww. tkankach (Ryc. 14).



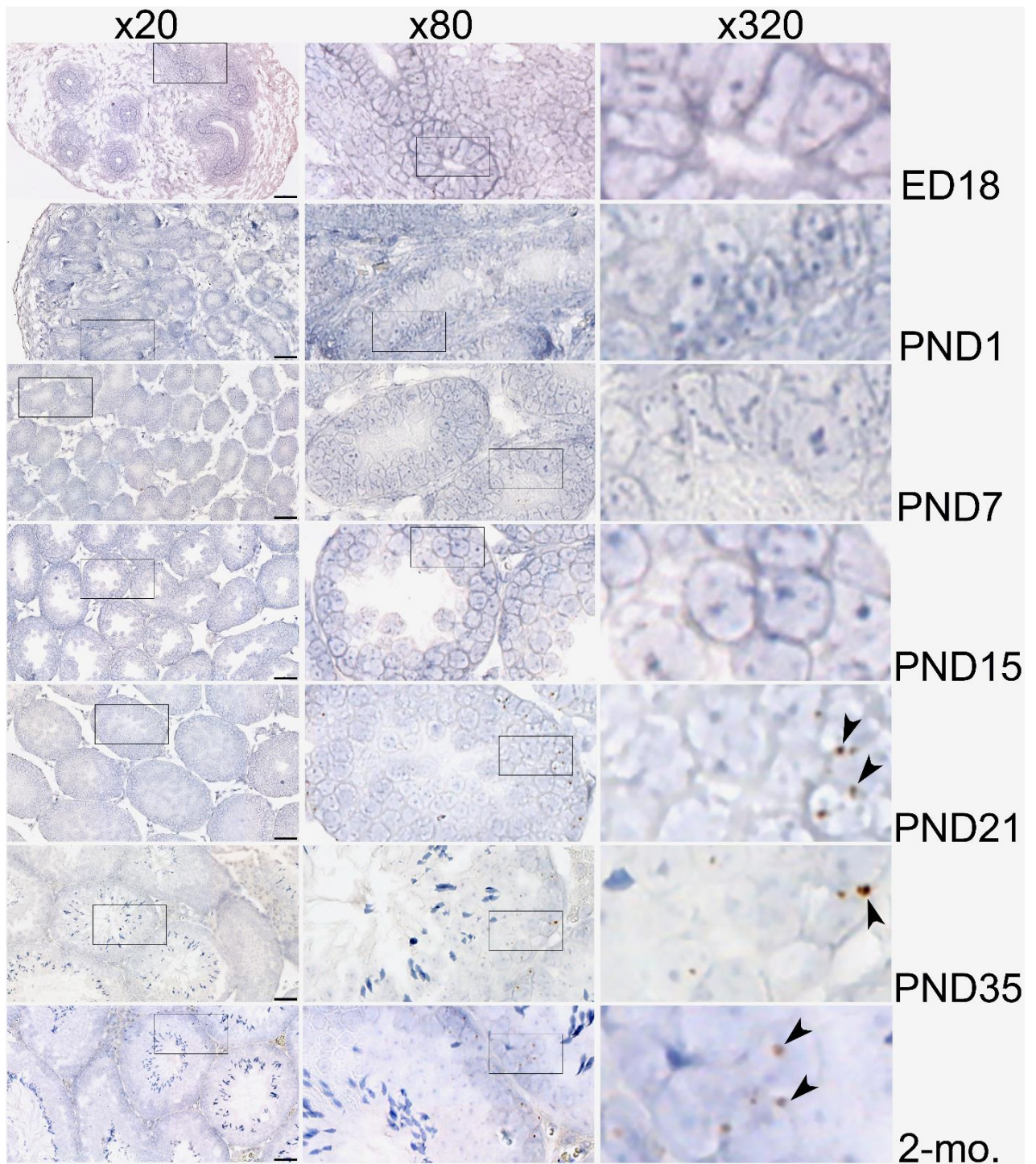


Rycina 14. Immunohistochemiczna lokalizacja ZP3 w zdrowych ludzkich tkankach: jelito cienkie (a), jelito grube (b), wątroba (c), śledziona (d), żołądek (e), węzeł chłonny (f), mózg (g), płuco (h), najądrza (i), prostata (j), nerka (k), piersć (l), miometrium (m), mięsień szkieletowy (n).

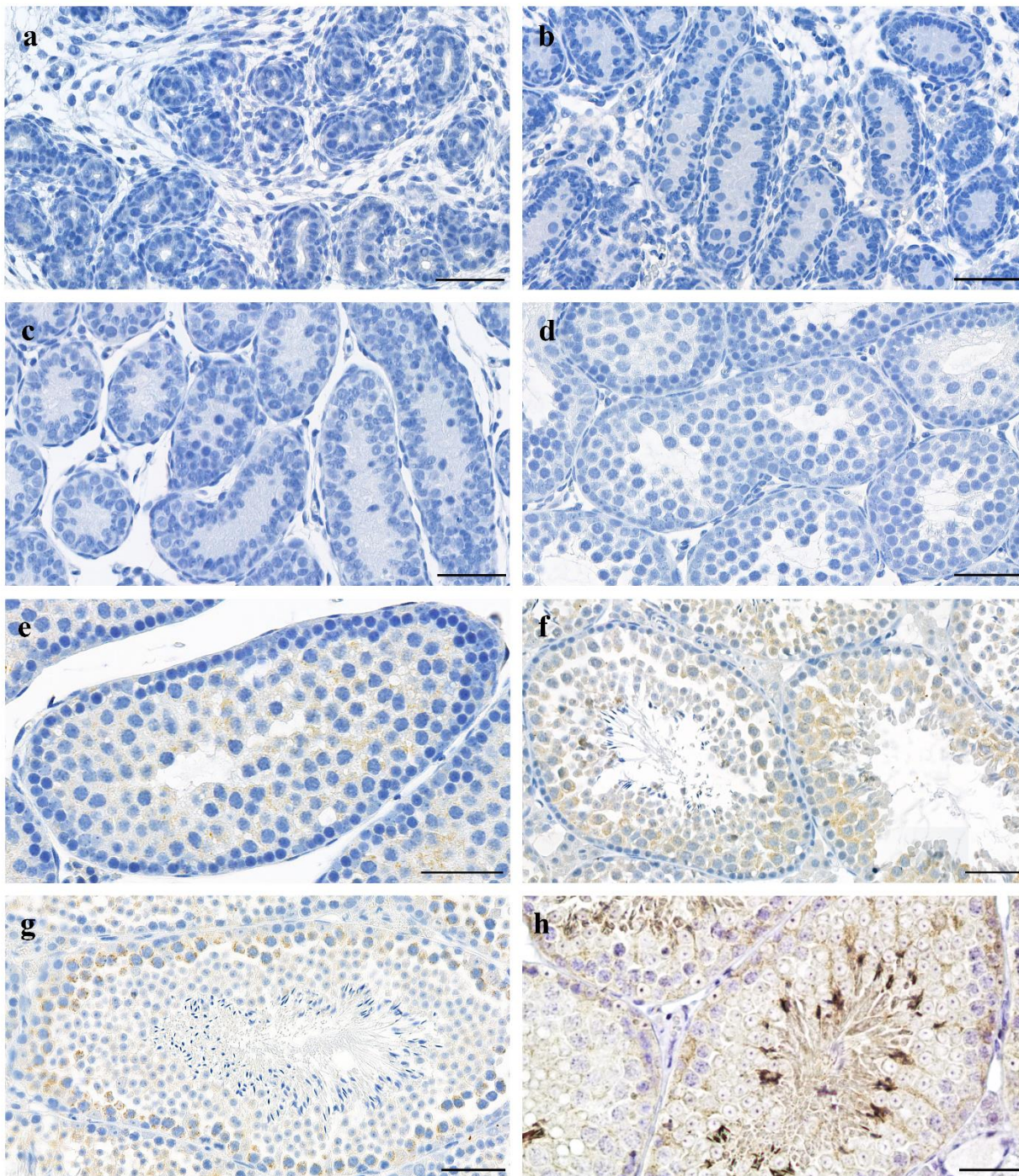
4.3. Ekspresja ZP3 w ontogenezie jądra u myszy.

W celu sprawdzenia ekspresji ZP3 podczas ontogenezy jądra u myszy, wykonałam barwienia immunohistochemiczne oraz metodą RNAscope *in situ* na tkankach mysich w poszczególnych grupach: ED18 – 18. dzień życia płodowego, PND1 – 1. dzień życia, PND7 – 7. dzień życia, PND15 – 15. dzień życia, PND21 – 21. dzień życia, PND35 – 35. dzień życia, 2-mo. – 2 miesiące życia, 6-mo. – 6 miesięcy. Wiek myszy wybrano na podstawie analizy zmian w stężeniach hormonów w czasie ontogenezy.

Barwienia wykazały znaczącą ekspresję transkryptów mRNA Zp3 w 21. dniu życia, 35. dniu życia oraz 2-miesięcznych (Ryc. 15) oraz białka ZP3 w jądrach w 21. dniu życia, 35. dniu życia oraz 2- i 6-miesięcznych (Ryc. 16 e-h). Nie wykazałam ekspresji ZP3 u myszy płodowych (18 ED), ani w grupach PND1., PND7. i PND15., odpowiednio 1-, 7-, i 15-dnia po urodzeniu (Ryc. 15 i 16 a-d).



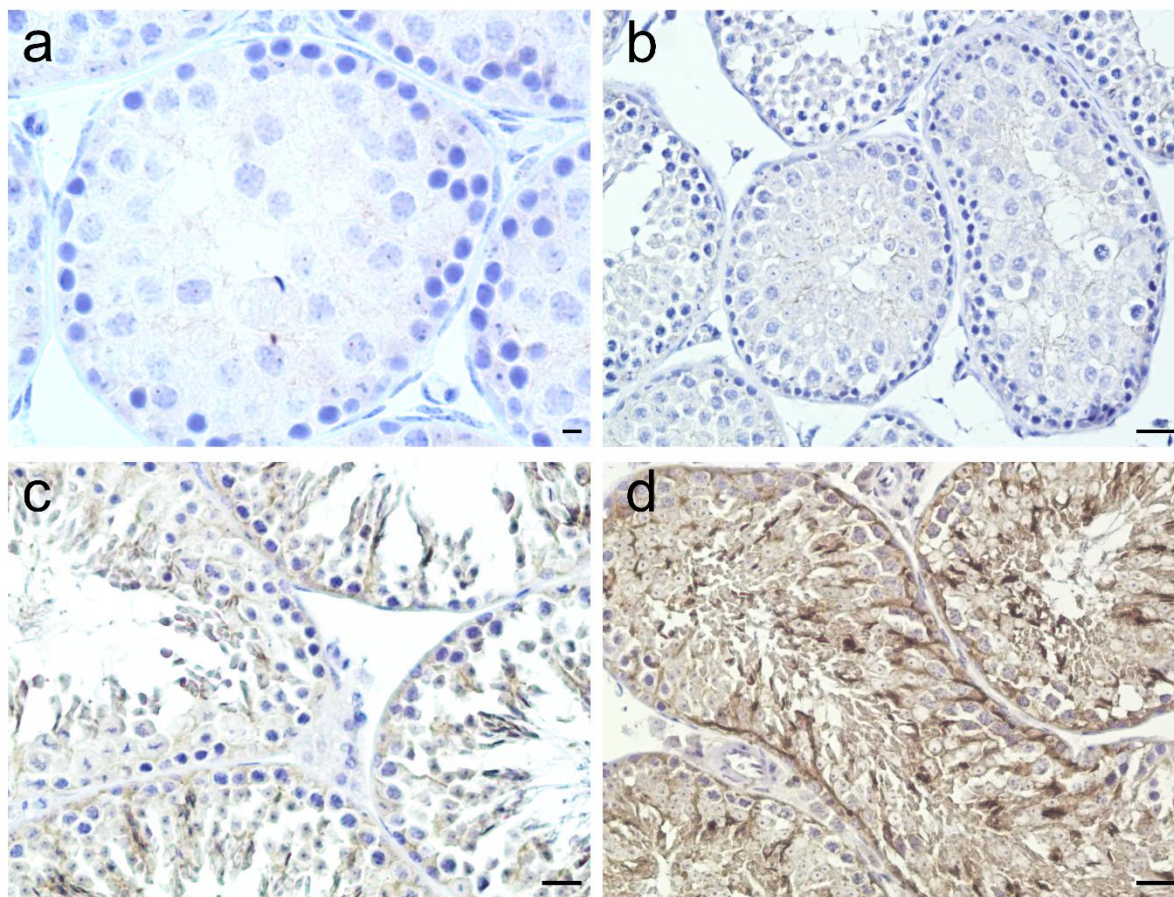
Rycina 15. Lokalizacja transkryptów mRNA Zp3 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): 18. dzień życia płodowego (ED), 1. dzień życia (PND), 7. dzień życia (PND), 15. dzień życia (PND), 21. dzień życia (PND), 35. dzień życia (PND), 2 miesiące życia. Czarne strzałki wskazują pozytywne barwienie glikoproteiny/transkryptów Zp3.



Rycina 16. Immunohistochemiczna lokalizacja białka ZP3 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): 18. dzień życia płodowego (ED) (a), 1. dzień życia (PND) (b), 7. dzień życia (PND) (c), 15. dzień życia (PND) (d), 21. dzień życia (PND) (e), 35. dzień życia (PND) (f), 2 miesiące życia (g), 6 miesięcy (h). (Skala 50 μ m).

4.4. Ekspresja ZP3 u myszy LuRKO $-/-$ i LuRKO $+/-$

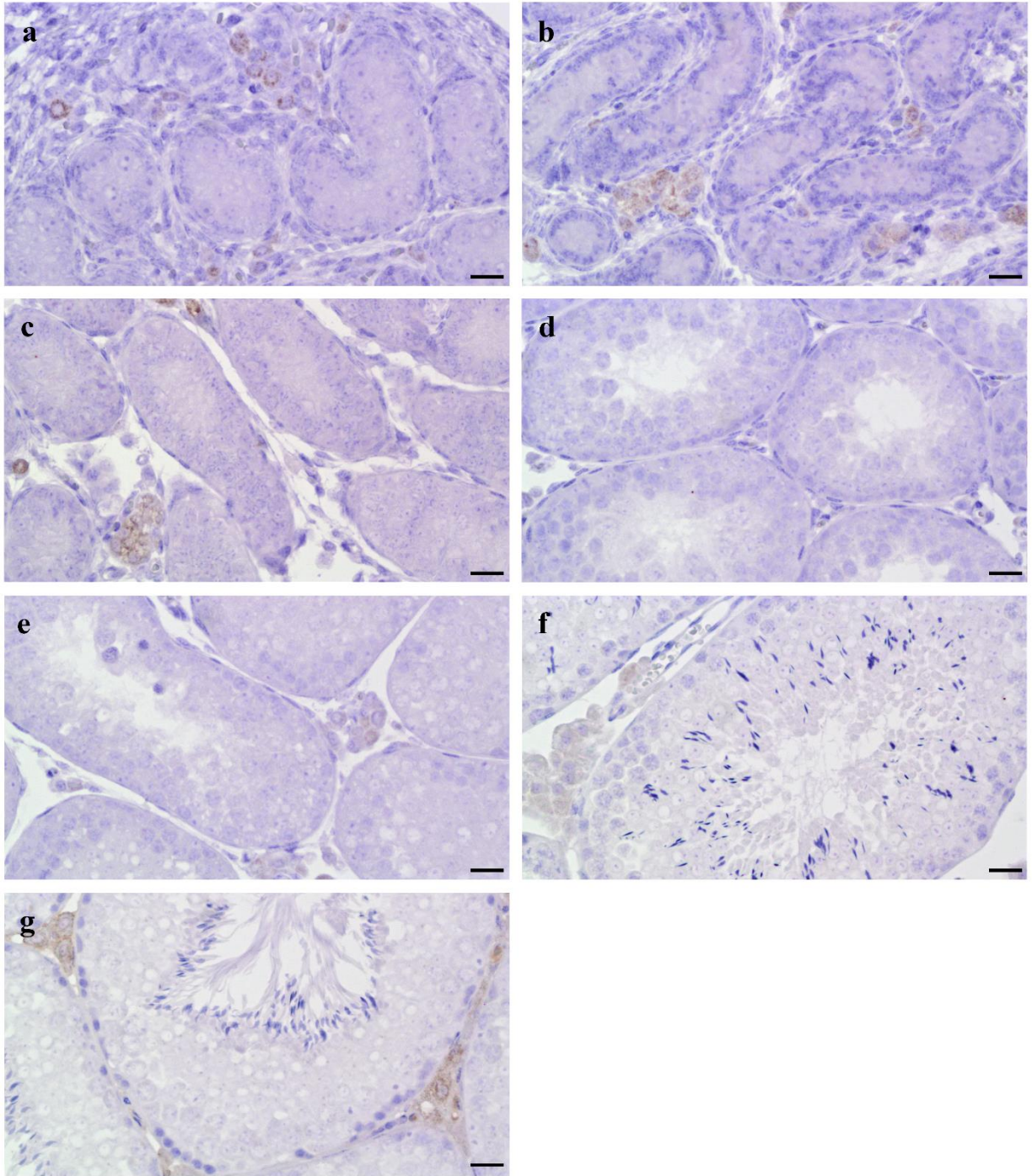
Sprawdziłam ekspresję Zp3 w jądrach myszy ze znokautowanym receptorem hormonu luteinizującego LuRKO $-/-$ oraz LuRKO $+/-$. Jako kontrole pozytywne wykorzystane były jądra myszy po stymulacji hCG. Wykazałam ekspresję ZP3 w jądrach u myszy LuRKO $+/-$ (Ryc. 17c), podczas gdy LuRKO $-/-$ (Ryc. 17 a-b) nie miały ekspresji Zp3.



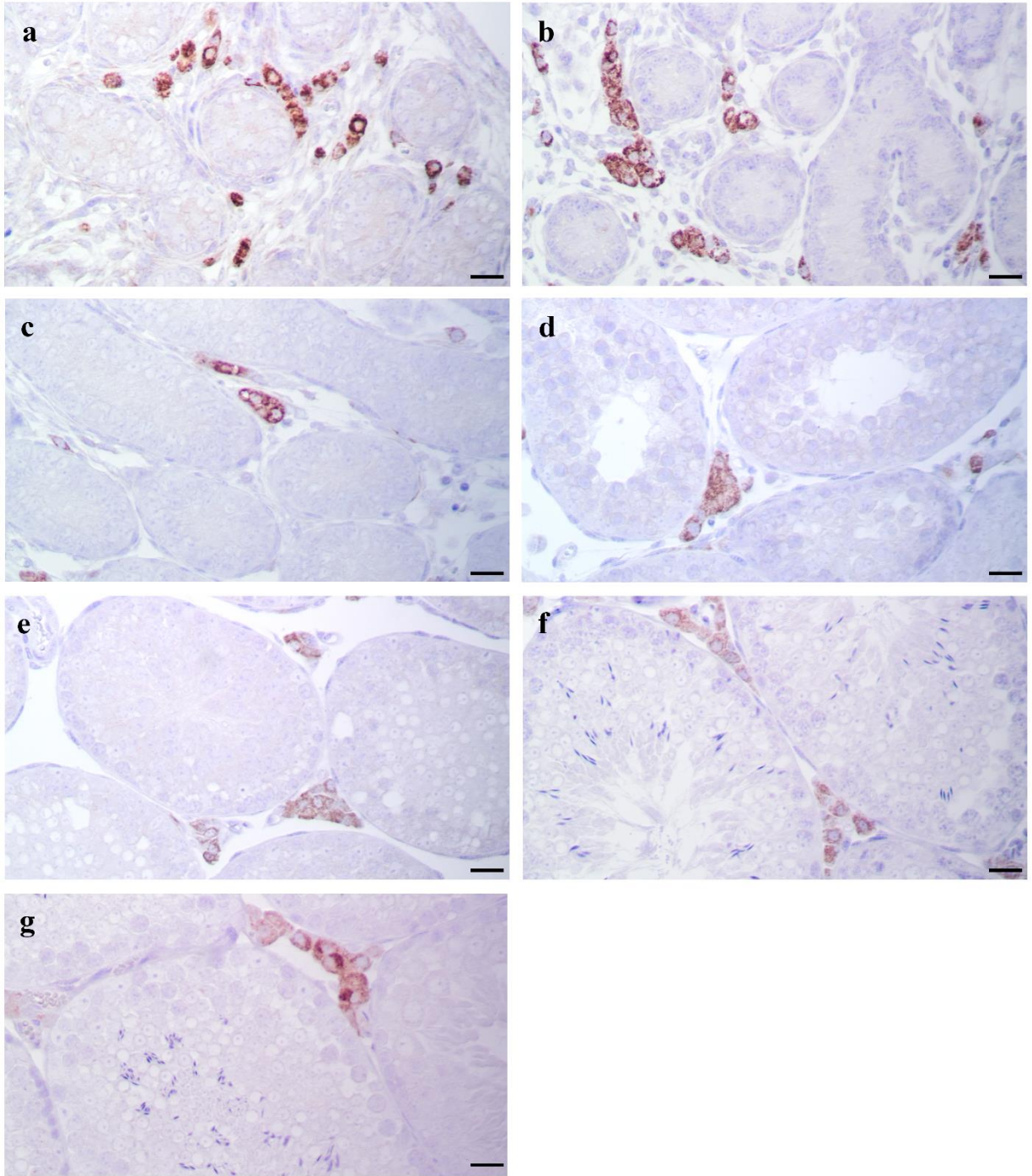
Rycina 17. Immunohistochemiczna lokalizacja białka ZP3 u myszy LuRKO $-/-$ (a-b), LuRKO $+/-$ (c) i hCG (d). (skala 20 μ m)

4.5. Profil ekspresji genów enzymów steroidogenezy w ontogenezie jądra u myszy.

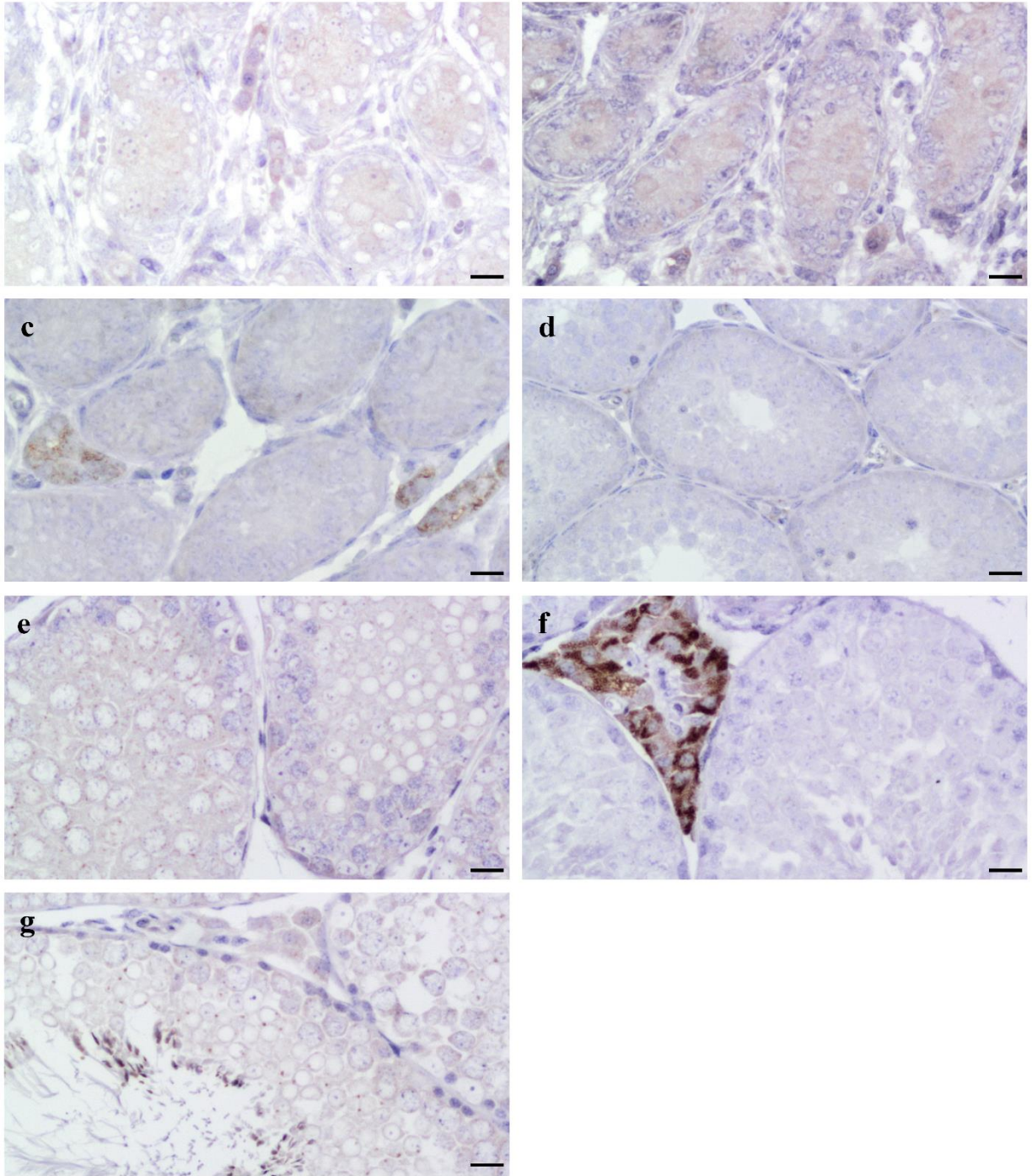
Za pomocą metod immunohistochemicznych dokonałam analizy ekspresji enzymów, steroidogenezy: STAR, CYP11A1, HSD17B3, HSD3B2, CYP19A1 wraz z rozwojem jądra w grupach: ED18 – 18. dzień życia płodowego, PND1 – 1. dzień życia, PND7 – 7. dzień życia, PND15 – 15. dzień życia, PND21 – 21. dzień życia, PND35 – 35. dzień życia, 2-mo. – 2 miesiące życia, (Ryc. 18-22). Ekspresję STAR miały grupy ED18, PND1, PND7, PND21, PND35 i 2-mo (Ryc. 18). Ekspresję enzymów: CYP11A1, HSD3B2 w komórkach Leydiga wykazałam we wszystkich grupach: ED18, PND1, PND7, PND15, PND21, PND35 i 2-mo (Ryc. 19 i 21). Ekspresję HSD17B3 w komórkach Leydiga i komórkach płciowych miały grupy ED18 i PND1, a wyłącznie w komórkach Leydiga w PND7, PND21, PND35, 2-mo (Ryc. 20). Ekspresję CYP19A1 wykazałam w jądrach u myszy: ED18, PND35 i 2-mo (Ryc. 22).



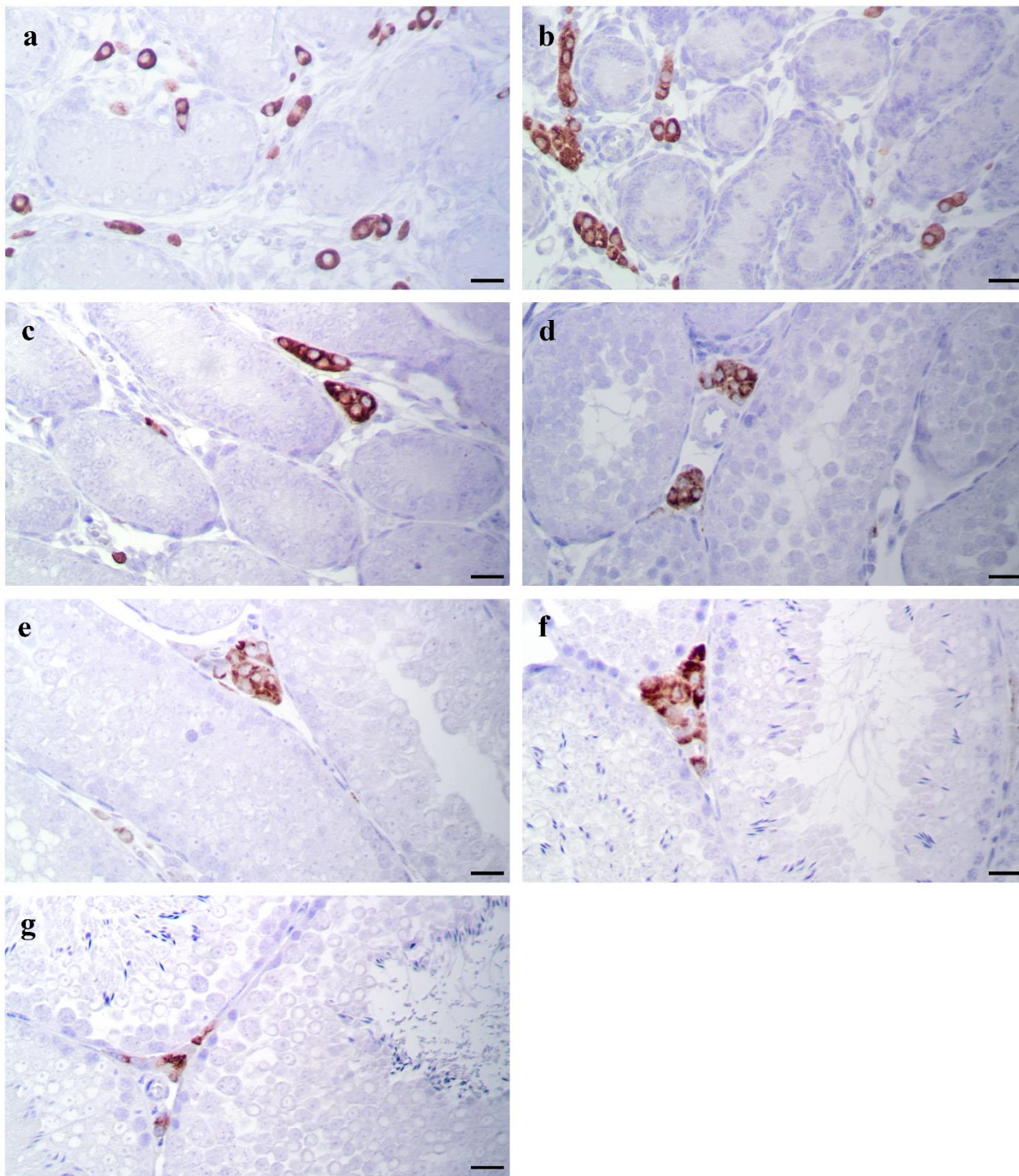
Rycina 18. Immunohistochemiczna lokalizacja STAR w ontogenezie jądra u myszy (n=6): 18. dzień życia płodowego (ED) (a), 1. dzień życia (PND) (b), 7. dzień życia (PND) (c), 15. dzień życia (PND) (d), 21. dzień życia (PND) (e), 35. dzień życia (PND) (f), 2 miesiące życia (g). (skala 20 μm)



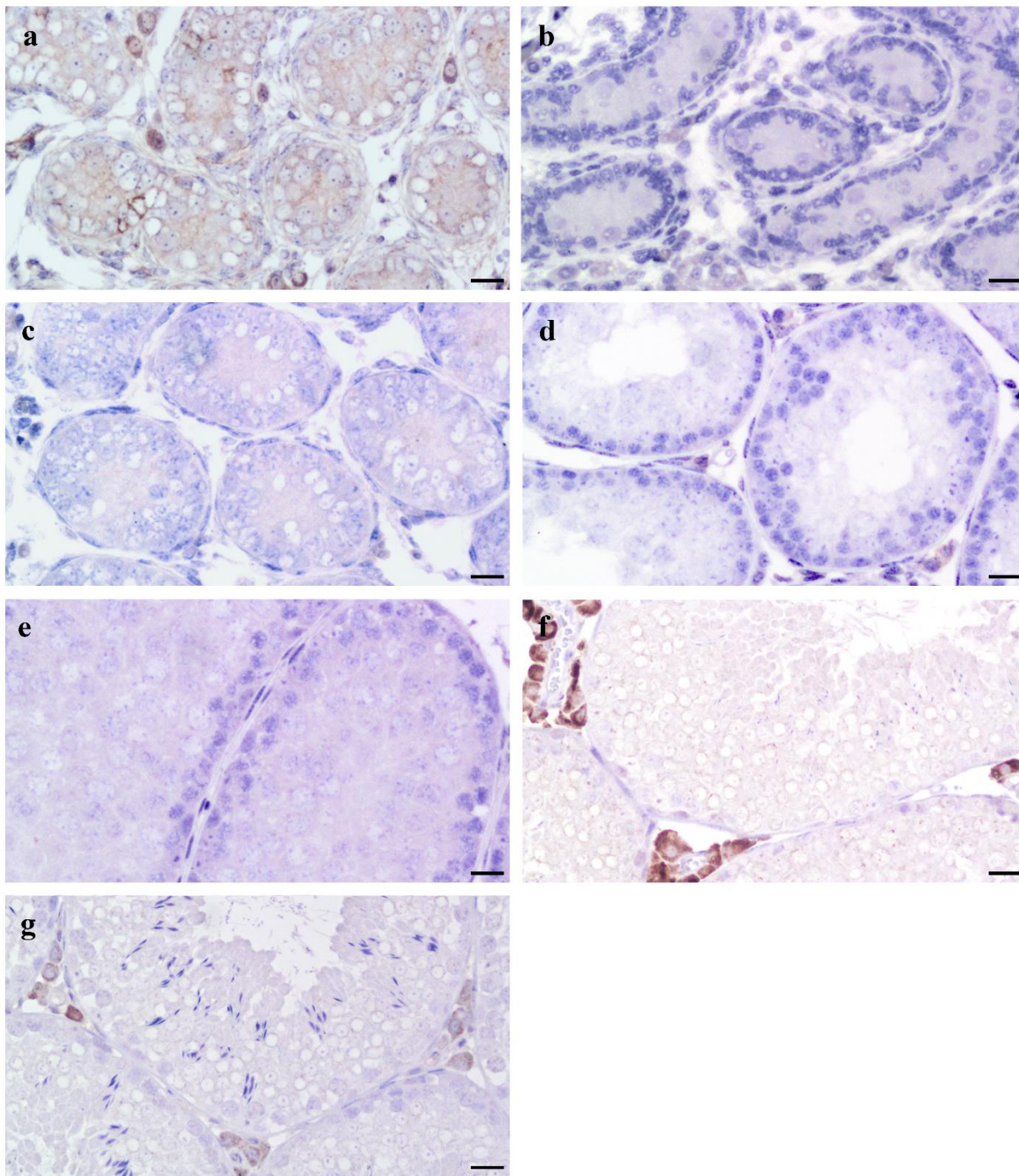
Rycina 19. Immunohistochemiczna lokalizacja CYP11A1 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): 18. dzień życia płodowego (ED) (a), 1. dzień życia (PND) (b), 7. dzień życia (PND) (c), 15. dzień życia (PND) (d), 21. dzień życia (PND) (e), 35. dzień życia (PND) (f), 2 miesiące życia (g). (skala 20 μ m)



Rycina 20. Immunohistochemiczna lokalizacja HSD17B3 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): 18. dzień życia płodowego (ED) (a), 1. dzień życia (PND) (b), 7. dzień życia (PND) (c), 15. dzień życia (PND) (d), 21. dzień życia (PND) (e), 35. dzień życia (PND) (f), 2 miesiące życia (g). (skala 20 μ m)



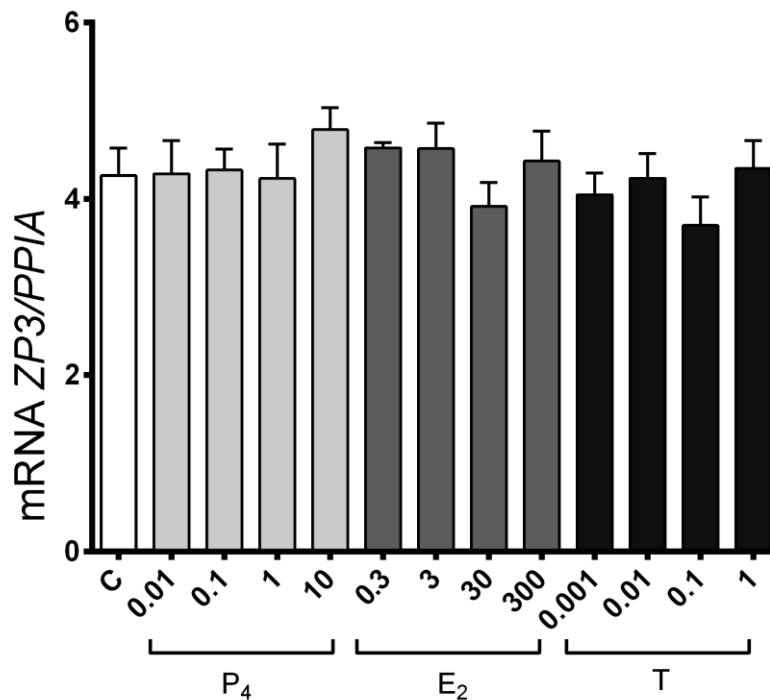
Rycina 21. Immunohistochemiczna lokalizacja HSD3B2 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): 18. dzień życia płodowego (ED) (a), 1. dzień życia (PND) (b), 7. dzień życia (PND) (c), 15. dzień życia (PND) (d), 21. dzień życia (PND) (e), 35. dzień życia (PND) (f), 2 miesiące życia (g). (skala 20 μ m)



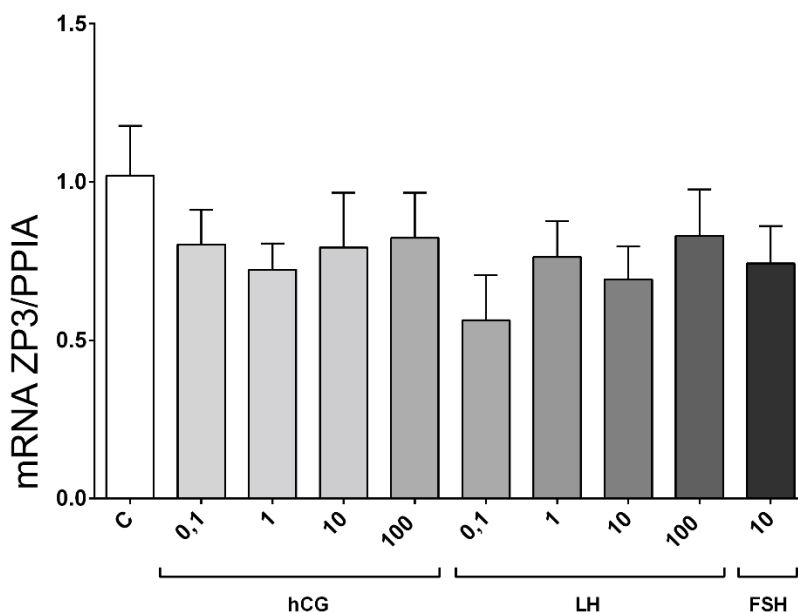
Rycina 22. Immunohistochemiczna lokalizacja CYP19A1 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): 18. dzień życia płodowego (ED) (a), 1. dzień życia (PND) (b), 7. dzień życia (PND) (c), 15. dzień życia (PND) (d), 21. dzień życia (PND) (e), 35. dzień życia (PND) (f), 2 miesiące życia (g). (skala 20 μ m)

4.6. Wpływ hormonów na ekspresję ZP3 w linii komórkowej GC-2spd(ts)

Sprawdziłam ekspresję ZP3 w linii komórkowej spermatocytów mysich, które były poddane stymulacji progesteronem (o stężeniu 0,01; 0,1; 1; 10 μ M), estradiolem (o stężeniu 3; 30; 100; 300 nM), testosteronem (o stężeniu 0,001; 0,01; 0,1; 1 μ M), hCG (o stężeniu 0,1; 1; 10 ng/ml), LH (o stężeniu 0,1; 1; 10; 100 mIU), i FSH (o stężeniu 10 IU). Kolumny reprezentują stosunek ekspresji Zp3 i Ppia \pm SEM. Progesteron, estradiol, testosteron, hCG, LH i FSH nie wpływa na ekspresję ZP3 w komórkach GC-2spd(ts) (Ryc. 23-24).



Rycina 23. Profil ekspresji *Zp3* w linii komórkowej GC-2spd(ts) po 24h stymulacji progesteronem (o stężeniu 0,01; 0,1; 1; 10 μ M), estradiolem (o stężeniu 3; 30; 100; 300 nM), testosteronem (o stężeniu 0,001; 0,01; 0,1; 1 μ M). Kolumny reprezentują stosunek ekspresji *Zp3* i *Ppia* \pm SEM. P₄ – progesteron, E₂ – estradiol, T- testosteron.



Rycina 24. Profil ekspresji *Zp3* w linii komórkowej GC-2spd(ts) po 24h stymulacji hCG (o stężeniu 0,1; 1; 10, 100 ng/ml), LH (o stężeniu 0,1; 1; 10; 100 mIU), i FSH (o stężeniu 10 IU). Kolumny reprezentują stosunek ekspresji *Zp3* i *Ppia* \pm SEM.

5. DYSKUSJA

Glikoproteina ZP3 jest jednym z elementów osłonki przejrzystej komórki jajowej i do niedawna uważano, że występuje wyłącznie w jajniku. Dane udostępnione za pośrednictwem Human Protein Atlas na stronie Internetowej (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000188372-ZP3/tissue>) wykazały ekspresję RNA ZP3 w niektórych zdrowych tkankach ludzkich (jajniki, piersi, jajowody, najądrza, prostata, przewód pokarmowy, mięśnie szkieletowe, mózg, nadnercza, przysadka, tkanka kostna i limfatyczna) oraz ekspresję białka ZP3 w dwunastnicy, jelicie cienkim i jajniku. Jednak żadne z tych badań nie wykazało ekspresji ZP3 w jądrze. Wykazano, że poza jajnikiem glikoproteina ZP3 może występować także w ludzkim raku jajnika, raku jajnika pochodzącego z komórek ziarnistych (GCT) u transgenicznych myszy *Inhα/Tag*, ludzkim GCT (Rahman, Bennink i in. 2012), ludzkim raku prostaty, raku jelita grubego oraz raku płuc (Buschmann, Fotiadis i in. 2004, Bennink 2016, Costa, Pereira i in. 2018, Coelingh Bennink, Rahman i in. 2019). Analiza ekspresji ZP3 wśród genów sekretomu różnych rodzajów nowotworów wykazała jego możliwy potencjał diagnostyczny (Robinson, Feizi i in. 2019). Udowodniono, że wykorzystanie immunizacji ZP3 mogłoby posłużyć do opracowania nowej, skutecznej immunoterapii w leczeniu guza jajnika pochodzącego z komórek ziarnistych (GCT). Na modelu *in vivo* z wykorzystaniem myszy transgenicznych wykazano, że wczesna immunoterapia przeciwko ZP3 zapobiega rozwojowi guza jajnika, z kolei wykonana później może zredukować masę guza nawet o 75% (Rahman, Bennink i in. 2012, Chrusciel, Doroszko i in. 2014). Powodzenie immunoterapii jest uzależnione od wybrania takiego antygenu, który posiada określone cechy, są to m. in. swoistość antygenu, nieindukowanie reakcji krzyżowych, a przede wszystkim brak niepożądanych efektów podczas stosowania.

W badaniach własnych z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych przeciwko-ZP3 w barwieniu immunohistochemicznym żadna z badanych zdrowych tkanek ludzkich (jelito cienkie, jelito grube, wątroba, trzustka, żołądek, węzeł chłonny, mózg, płuca, najądrza, prostata, nerka, pierś, myometrium, mięśnie szkieletowe) nie wykazała ekspresji ZP3. Brak ekspresji ZP3 w tych tkankach wyklucza potencjalne efekty uboczne off-target w immunoterapii z udziałem ZP3.

Nasz zespół badawczy niespodziewanie wykazał ekspresję ZP3 w zdrowym ludzkim i mysim jądrze na poziomie mRNA jak i białkowym (Pulawska i in. 2022). ZP3 okazało się być obecne w komórkach rozrodczych spermatogenezy: spermatogoniach, spermatocytach i spermatydach (okrągłych oraz wydłużonych) oraz w linii komórkowej spermatocytów mysich GC-2spd(ts). Komórki somatyczne jądra, takie jak komórki Sertolego i Leydiga nie miały ekspresji ZP3. Wykonałam barwienie całego kanalika nasiennego mysich jąder z wykorzystaniem immunofluorescencji w celu sprawdzenia ekspresji ZP3 w komórkach macierzystych i progenitorowych (SSPCs). Wykorzystane zostały markery GFR1 oraz SALL-4 oraz przeciwciała monoklonalne przeciwko-ZP3. Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej nie wykazało ekspresji białka ZP3 w komórkach macierzystych i progenitorowych. W literaturze niewiele jest danych na temat badań potwierdzających skuteczność immunizacji jądra z wykorzystaniem markeru przeciwko komórkom rozrodczym. Przeprowadzono badania na modelach zwierzęcych wykorzystując różne markery białkowe (Zhu i Naz 1997, Naz i Zhu 1998, Hardy i Mobbs 1999, O'rand, Widgren i in. 2004, Fayemi, Joo i in. 2006, O'rand, Widgren i in. 2006), jednak wciąż brak jest badań z udziałem u ludzi, a badania na zwierzętach nie są wystarczająco skuteczne. Wyniki niniejszych badań ekspresji ZP3 w jądrze zwiększają potencjał ZP3 jako docelowego antygeny w odwracalnej męskiej antykoncepcji. Brak ekspresji ZP3 w komórkach macierzystych jąder sugeruje, że immunizacja ZP3 w jądrze mogłaby mieć odwracalny efekt. Wyniki te zwiększają szanse na powodzenie wykorzystania immunizacji ZP3 w terapii, nie powodując uszkodzenia komórek somatycznych jądra, co jest istotne np. w przypadku immunoterapii nowotworów ZP3 u mężczyzn.

Wykazano, że osłonka przejrzysta jest strukturą silnie immunogenną i poszczególne jej komponenty były wykorzystywane w badaniach nad immunoantykoncepcją u ssaków (Shabanowitz 1990). W latach 70. XX wieku po raz pierwszy wykazano, że przeciwciała skierowane przeciwko *zona pellucida* hamują zapłodnienie (Shivers, Dudkiewicz i in. 1972). W latach późniejszych szczepienia te były z powodzeniem wykorzystywane do sterylizacji populacji dzikich zwierząt (Brown, Bowen i in. 1997, Kirkpatrick, Jr i in. 1997, McShea 1997, Fayrer-Hosken, Bertschinger i in. 1999). Uszkodzenie oocytów, wywołując autoimmunologiczne zapalenie jajników IAO za pośrednictwem przeciwciał ZP3-specyficznych i autoreaktywnych limfocytów-T,

prowadziło do nieodwracalnego zaburzenia funkcji jajników i bezpłodności (Mahi-Brown, Yanagimachi i in. 1988, Paterson, Koothan i in. 1992, Paterson, Wilson i in. 1998). W ostatnich latach pojawiło się zainteresowanie alternatywnymi metodami antykoncepcji m. in. immunologicznymi. W badaniach *in vivo* u samic myszy transgenicznych z ludzkim ZP3 wykazano, że przeciwciała anti-huZP3 indukowały antykoncepcję z możliwym odwracalnym efektem (Greenhouse, Castle i in. 1999).

Badania nad ekspresją ZP3 w ontogenezie i potencjalny związek ze spermatogenezą zwiększa szansę wykorzystania anti-ZP3 w antykoncepcji dla mężczyzn, która prawdopodobnie hamowałaby spermatogenezę. W celu sprawdzenia ekspresji ZP3 podczas ontogenezy jądra u myszy, wykorzystałam metody immunohistochemiczne oraz RNAscope *in situ* na tkankach mysich w poszczególnych grupach badanych: ED18 – 18. dzień życia płodowego, PND1 – 1. dzień życia, PND7 – 7. dzień życia, PND15 – 15. dzień życia, PND21 – 21. dzień życia, PND35 – 35. dzień życia, 2-mo. – 2 miesiące życia, 6-mo. – 6 miesięcy. Wiek myszy wybrałam na podstawie analizy zmian w stężeniach hormonów w czasie ontogenezy (Gondos 1980, Tapanainen, Kellokumpu-Lehtinen i in. 1981, Motelica-Heino, Castanier i in. 1988, Pereda, Zorn i in. 2006, O'shaughnessy, Baker i in. 2007). W badaniach własnych wykazałam, że ekspresja glikoproteiny ZP3 w jądrach u myszy pojawia się w 21. dniu życia, co koreluje z rozpoczynającą się spermatogenezą w okresie dojrzewania. Ekspresję ZP3 miały również myszy w 35. dniu życia a także 2- i 6-miesięczne. W grupach na wcześniejszym etapie życia (PND1, PND7, PND15), jak i 18. dnia życia płodowego, nie zaobserwowałam ekspresji ZP3 w jądrach u myszy.

Glikoproteina ZP3 spełnia kilka funkcji rozrodczych w układzie żeńskim, jednak niewiele jest danych na temat jej roli w innych procesach. Wykazano, że ZP3 może brać udział w procesie zaniku GVBD podczas mejozy w oocytach (Gao, Zhou i in. 2017, Jin, Yang i in. 2022). Regulacja ekspresji poszczególnych glikoprotein budujących osłonkę przejrzystą jest wciąż słabo zbadana. Wykazano, że czynnik transkrypcyjny FIG α (ang. Factor In the Germline alpha) może koordynować ekspresję genów ZP1, ZP2 i ZP3 podczas oogenezy (Liang, Soyak i in. 1997), a jego brak powoduje dysfunkcje podczas tworzenia pęcherzyków pierwotnych, skutkujące bezpłodnością u samic myszy (Soyak, Amleh i in. 2000). W badaniach u psów wykazano, że stymulacja hormonalna *in vitro* progesteronem i

estradiolem miała wpływ na poziom ekspresji glikoprotein ZP2, ZP3 i ZP4 (Kempisty, Woźna i in. 2012, Kempisty, Piotrowska i in. 2015).

W badaniach dokonałam analizy profilu ekspresji enzymów, zaangażowanych w steroidogenezę (StAR, CYP11A1, CYP17A1, 3 β -HSD, 17 β -HSD, CYP19A1) wraz z rozwojem jądra myszy w poszczególnych grupach: ED18 – 18. dzień życia płodowego, PND1 – 1. dzień życia, PND7 – 7. dzień życia, PND15 – 15. dzień życia, PND21 – 21. dzień życia, PND35 – 35. dzień życia, 2-mo. – 2 miesiące życia. Wykazałam, że ekspresja genów steroidogenezy, nie ulega znacznym zmianom w ontogenezie jądra. Na podstawie analizy profilu ekspresji genów tych enzymów można przypuszczać, że ekspresja ZP3 w jądrze prawdopodobnie nie jest zależna od steroidogenezy. Jednak sama ekspresja białka na poziomie molekularnym nie świadczy o jego aktywności biologicznej, należałoby sprawdzić aktywność enzymów w badaniach, a dodatkowo także zbadać ekspresję ZP3 po wykonaniu nokautu poszczególnych genów zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*.

Po wykazaniu ekspresji ZP3 w linii komórkowej spermatocytów mysich GC-2spd(ts), wykonałam badania nad mechanizmem działania ZP3 w jądrze i jego potencjalnych czynników regulacyjnych. Przeprowadziłam stymulację hormonalną *in vitro* w komórkach GC-2spd(ts). Hodowane komórki GC-2 poddane działaniu estradiolu, testosteronu, progesteronu, FSH, LH i hCG, nie wykazały żadnych istotnych statystycznie różnic w ekspresji ZP3. Dane te pokazują, że zmiany hormonalne nie powinny wpływać na poziom ekspresji ZP3, co jest korzystne w perspektywie wykorzystania ZP3 zarówno w celach terapeutycznych jak i w antykoncepcji. Jednak potrzebne są dokładne badania *in vivo* na modelu mysim, potwierdzające brak wpływu hormonów na poziomie organizmu.

Homozygotyczne samce myszy ze znokautowanym receptorem hormonu luteinizującego (LuRKO) oprócz zaburzenia rozwoju narządów płciowych i zmniejszonej produkcji hormonów płciowych, miały zatrzymaną spermatogenezę (Zhang, Poutanen i in. 2001). Model ten posłużył do badań nad rolą gonadotropin w procesach reprodukcyjnych. W badaniach własnych sprawdziłam ekspresję ZP3 u myszy LuRKO $-/-$ oraz LuRKO $+/-$. Pozytywną ekspresję miały myszy heterozygotyczne, z kolei homozygotyczne myszy nie miały ekspresji ZP3 w jądrze. Wyniki pozytywnej ekspresji ZP3 w ontogenezie u myszy, u których rozpoczyna się spermatogeneza (PND21) oraz brak ekspresji ZP3 u myszy LuRKO,

które są pozbawione całkowicie spermatogenezy, dowodzi, że ekspresja ZP3 ma związek ze spermatogenezą.

Obecnie dostępne metody antykoncepcji polegają na hamowaniu owulacji, przesuwaniu czasu wystąpienia owulacji (terapia hormonalna, wkładki wewnątrzmaciczne) u kobiet, lub blokowaniu transportu plemników w drogach rodnych (środki plemnikobójcze, bariery fizyczne). Wybór metod antykoncepcji jest szeroki, jednak nie zawsze skuteczny lub możliwy ze względów zdrowotnych. Popularne jest stosowanie prezerwatywy, jednak nie w pełni skuteczne. Alternatywą jest wazektomia, jednak jest to rozwiązanie inwazyjne, wywołujące dyskomfort i niezupełnie odwracalne. Ze względu na potrzebę ulepszonych metod męskiej antykoncepcji, podjęto wysiłki w celu opracowania hormonalnego środka antykoncepcyjnego analogicznego do pigułki estrogenowo-progesteronowej dla kobiet. Testosteron działa hamując wydzielanie LH i FSH z przysadki mózgowej w wyniku ujemnego sprzężenia zwrotnego. Zmniejsza produkcję plemników, ale w dużej grupie plemniki nadal zachowują zdolności zapładniające. W badaniach nad skutecznością hormonalnych preparatów (androgenowych lub w połączeniu z progestagenami) udało się osiągnąć efekt antykoncepcyjny u niektórych grup mężczyzn, jednak odnotowano skutki uboczne takie jak: zmiany profilu cholesterolu, zmiany nastroju, zaburzenie libido i przyrost masy. Podjęto intensywne badania nad niehormonalnymi preparatami antykoncepcyjnymi, które wydają się obiecujące w badaniach przedklinicznych, ale przed przeprowadzeniem badań na ludziach konieczne będą szersze badania określające ich skuteczność i bezpieczeństwo. W dalszym ciągu trwają liczne badania nad opracowaniem idealnej substancji, skutecznie hamującej zapłodnienie, a jednocześnie bezpiecznej w stosowaniu, wciąż jednak potrzeba dokładnych badań na szeroką skalę z udziałem ludzi.

Niniejsze badania charakteryzują ekspresję ZP3 w jądrach mysich i ludzkich na poziomie molekularnym, co zwiększa potencjał ZP3 jako docelowego antygeny w odwracalnej męskiej antykoncepcji. Nie wiadomo jednak jaki efekt przyniosłoby zastosowanie szczepionki przeciwko-ZP3 – trwały czy odwracalny. Wyniki barwienia w kanalikach nasiennych, w których wykazałam brak ekspresji ZP3 w komórkach macierzystych jąder sugerują, że immunizacja ZP3 w jądrze mogłaby być odwracalna, pod warunkiem odnowienia się komórek spermatogenezy wraz z upływem całego cyklu nabłonka plemnikotwórczego, czyli po 74 dniach (Heller i Clermont 1964). Wyniki badań ontogenezy

i brak ekspresji ZP3 u myszy LuRKO, które mają zablokowaną spermatogenezę, podkreśla funkcjonalne znaczenie glikoproteiny ZP3 podczas spermatogenezy. Brak ekspresji ZP3 w zdrowych tkankach (poza jajnikiem i jądrem) wyklucza potencjalne efekty uboczne off-target w immunoterapii nowotworowej z udziałem ZP3, jednak w przypadku nowotworów u mężczyzn należy uwzględnić obecność ZP3 w jądrze. Istnieje wiele obszarów, które wymagają dodatkowych badań, bez których trudno jest opracować nowe środki antykoncepcyjne i/lub leki terapeutyczne, które mogą być ukierunkowane na nabłonek kanalików nasiennych, w celu wywierania wpływu na rozwijające się komórki rozrodcze i/lub nowotwory. Podejście do badań wymaga szerszego spojrzenia na procesy spermatogenezy jak i steroidogenezy, a także zmian zachodzących na różnych etapach ontogenezy jądra.

6. WNIOSKI:

1. Ekspresja na poziomie białkowym ZP3 w jądrach u myszy i ludzi, jest obecna w spermatogoniach, spermatoocytach i spermatocytach, a także w linii komórkowej spermatoocytów mysich GC-2spd(ts).
2. W jajniku ekspresja ZP3 w jajniku występuje w pęcherzyku pierwotnym, wtórnym i antralnym.
3. Komórki somatyczne zdrowych jąder (Leydiga i Sertolego, oraz macierzyste i progenitorowe spermatogonia) nie mają ekspresji ZP3 na poziomie białkowym.
4. W ontogenezie jąder myszy ZP3 pojawia się w 21. dniu wraz z zainicjowaniem spermatogenezy.
5. U myszy LuRKO $-/-$, pozbawionych spermatogenezy nie dochodzi do ekspresji ZP3 w jądrach.
6. Hormony: estradiol, testosteron, progesteronem, FSH, LH i hCG, nie mają wpływu na poziom ekspresji ZP3 w komórkach spermatoocytów mysich GC-2spd(ts).
7. Ekspresja ZP3 pojawia się wraz z uruchomieniem spermatogenezy.

7. SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat regulacji rozwoju płci męskiej. SRY – ang. sex-determining region Y; SC - komórki Sertolego; DHH – czynnik „desert hedgehog”; PDGFA – płytkowy czynnik wzrostu; LC- komórki Leydiga; SOX9 – czynnik transkrypcyjny SRY-Box9; AMH – hormon anty-Müllerowski; DAX1 FOXL2 WNT4 T STAR – białko szybkiej regulacji steroidogenezy HSD3B2 CYP11A1 CYP17A1

Rycina 2. Schemat etapów spermatogenezy. Ad - spermatogonia ciemne, Ap - spermatogonia jasne, B- spermatogonia typu B, PL - spermatogonia preleptotenowe, L – spermatogonia leptotenowe, Z - spermatogonia zygotenowe, P - spermatogonia pachytenowe, Sa, Sb1, Sb2, Sc, Sd1, Sd2 - spermatydy

Rycina 3. Profil ekspresji ZP3 w zdrowych tkankach myszy typu dzikiego (WT) jądra, jajnika, śledziony, mięśnia szkieletowego. Kolumny reprezentują stosunek ekspresji genu ZP3 i Ppia ± SEM. Poziom istotności statystycznej: * $p \leq 0,05$; (A).

Rycina 4. Analiza ekspresji metodą RT-PCR zobrazowana elektroforezą w żelu agarozowym dla ZP3 oraz genu metabolizmu podstawowego Ppia w zdrowych tkankach jądra, jajnika, śledziony, mięśnia szkieletowego (B). M – marker wielkości, T, TE – jądro, OV – jajnik, SP – śledziona, MU- mięsień, H₂O – woda wolna od nukleaz.

Rycina 5. Lokalizacja ZP3 metodą RNAscope *in situ* hybridization w oocytach w poszczególnych etapach dojrzewania: (A) pierwotny (B) pierwszorzędowy (C) drugorzędowy, (D) antralny.

Rycina 6. Lokalizacja ZP3 metodami IHC oraz RNAscope *in situ* hybridization w jajniku (A) i jądrze (B) oraz transkryptów mRNA ZP3 w jajniku (C) i jądrze (D). Czarne strzałki wskazują pozytywne barwienie glikoproteiny/transkryptów ZP3, białe strzałki wskazują negatywne dla ZP3 komórki Sertolego, niebieskie strzałki wskazują negatywne dla ZP3 komórki Leydiga.

Rycina 7. Lokalizacja ZP3 metodami IHC oraz RNAscope *in situ* hybridization w ludzkim jajniku (A) i jądrze (B) oraz transkryptów mRNA ZP3 w jajniku (C) i jądrze (D). Czarne strzałki wskazują pozytywne barwienie glikoproteiny/transkryptów ZP3, białe strzałki wskazują negatywne dla ZP3 komórki Sertolego, niebieskie strzałki wskazują negatywne dla ZP3 komórki Leydiga.

Rycina 8. Immunofluorescencyjna lokalizacja vimentyny oraz ZP3 w jądrze ludzkim. Obraz wykonany za pomocą mikroskopii konfokalnej. Białe strzałki wskazują negatywne dla ZP3 komórki Sertolego.

Rycina 9. Analiza ekspresji ZP3 metodą RT-PCR zobrazowana elektroforezą w żelu agarozowym dla ZP3 oraz genu metabolizmu podstawowego Ppia w komórkach GC-2spd(ts), BLTK-1, MSC-1, jajniku i mięśniu szkieletowym (A).

Rycina 10. Immunocytochemiczna lokalizacja glikoproteiny ZP3 w komórkach spermatocytów mysich GC-2spd(ts). Rycina powyżej wskazuje pozytywne barwienie z przeciwciałami pierwszorzędowymi anti-ZP3, natomiast rycina poniżej stanowi kontrolę negatywną bez przeciwciała pierwszorzędowego (B). BLTK-1 – linia komórkowa nowotworu komórek Leydiga, GC-2spd(ts) – linia komórkowa spermatocytów mysich; M – marker wielkości, MSC-1 – linia

komórkowa komórek Sertolego myszy, MU – mięsień szkieletowy, OV- jajnik, H₂O – woda wolna od nukleaz.

Rycina 11. Profil ekspresji ZP3, FSHR oraz LHR w ludzkich komórkach Sertolego (HSerc) i komórkach Leydiga (HLC) oraz zdrowym ludzkim jajnikach i mięśniach szkieletowych metodą qPCR w odniesieniu do genu referencyjnego PPIA.

Rycina 12. Profil ekspresji ZP3, FSHR oraz LHR w ludzkich komórkach Sertolego (HSerc) i komórkach Leydiga (HLC) zobrazowana elektroforezą w 2% żelu agarozowym.

Rycina 13. Immunofluorescencyjna lokalizacja ZP3 w mysich w komórkach macierzystych i progenitorowych (SSPCs) wykonana techniką barwienia całego kanalik nasiennego (whole-mount seminiferous tubule staining) i zobrazowana za pomocą mikroskopii konfokalnej. Barwienie wykonano z użyciem przeciwciał przeciwko SSPCs – GFRa1 (czerwone) anty-ZP3 (zielone) oraz SALL4 (niebieskie). Białe strzałki wskazują pozytywne barwienie niezróżnicowanych spermatogonii As dla GFRa1/SALL4 a jednocześnie na negatywne barwienie dla ZP3.

Rycina 14. Immunohistochemiczna lokalizacja Zp3 w zdrowych ludzkich tkankach: jelito cienkie (a), jelito grube (b), wątroba (c), śledziona (d), żołądek (e), węzeł chłonny (f), mózg (g), płuco (h), najądrza (i), prostata (j), nerka (k), piers (l), miometrium (m), mięsień szkieletowy (n).

Rycina 15. Lokalizacja transkryptów mRNA *Zp3* w ontogenezie jądra u myszy (n=6): a – 18. dzień życia płodowego (ED), b – 1. dzień życia (PND), c – 7. dzień życia (PND), d – 15. dzień życia (PND), e – 21. dzień życia (PND), f – 35. dzień życia (PND), g – 2 miesiące życia. (skala 50 μm)

Rycina 16. Immunohistochemiczna lokalizacja białka Zp3 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): a – 18. dzień życia płodowego (ED), b – 1. dzień życia (PND), c – 7. dzień życia (PND), d – 15. dzień życia (PND), e – 21. dzień życia (PND), f – 35. dzień życia (PND), g – 2 miesiące życia. (skala 50 μm)

Rycina 17. Immunohistochemiczna lokalizacja białka Zp3 u myszy LuRKO -/- (a-b), LuRKO +/- (c) i hCG (d). (skala 20 μm).

Rycina 18. Immunohistochemiczna lokalizacja STAR w ontogenezie jądra u myszy (n=6): a – 18. dzień życia płodowego (ED), b – 1. dzień życia (PND), c – 7. dzień życia (PND), d – 15. dzień życia (PND), e – 21. dzień życia (PND), f – 35. dzień życia (PND), g – 2 miesiące życia. (skala 20 μm)

Rycina 19. Immunohistochemiczna lokalizacja CYP11A1 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): a – 18. dzień życia płodowego (ED), b – 1. dzień życia (PND), c – 7. dzień życia (PND), d – 15. dzień życia (PND), e – 21. dzień życia (PND), f – 35. dzień życia (PND), g – 2 miesiące życia. (skala 20 μm)

Rycina 20. Immunohistochemiczna lokalizacja HSD17B3 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): a – 18. dzień życia płodowego (ED), b – 1. dzień życia (PND), c – 7. dzień życia (PND), d – 15. dzień życia (PND), e – 21. dzień życia (PND), f – 35. dzień życia (PND), g – 2 miesiące życia. (skala 20 μm)

Rycina 21. Immunohistochemiczna lokalizacja HSD3B2 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): a – 18. dzień życia płodowego (ED), b – 1. dzień życia (PND), c – 7. dzień życia (PND), d – 15. dzień życia (PND), e – 21. dzień życia (PND), f – 35. dzień życia (PND), g – 2 miesiące życia. (skala 20 μm)

Rycina 22. Immunohistochemiczna lokalizacja CYP19A1 w ontogenezie jądra u myszy (n=6): a – 18. dzień życia płodowego (ED), b – 1. dzień życia (PND), c – 7. dzień życia (PND), d – 15. dzień życia (PND), e – 21. dzień życia (PND), f – 35. dzień życia (PND), g – 2 miesiące życia. (skala 20 μm)

Rycina 23. Profil ekspresji *Zp3* w linii komórkowej GC-2spd(ts) po 24h stymulacji progesteronem (o stężeniu 0,01; 0,1; 1; 10 μM), estradiolem (o stężeniu 3; 30; 100; 300 nM), testosteronem (o stężeniu 0,001; 0,01; 0,1; 1 μM). Kolumny reprezentują stosunek ekspresji *Zp3* i *Ppia* \pm SEM. P4 – progesteron, E2 –estradiol, T- testosteron.

Rycina 24. Profil ekspresji *Zp3* w linii komórkowej GC-2spd(ts) po 24h stymulacji hCG (o stężeniu 0,1; 1; 10, 100 ng/ml), LH (o stężeniu 0,1; 1; 10; 100 mIU), i FSH (o stężeniu 10 IU). Kolumny reprezentują stosunek ekspresji *Zp3* i *Ppia* \pm SEM.

8. SPIS TABEL

Tabela 1. Grupy eksperymentalne myszy do badania nad ontogenezą jądra.

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych w reakcji q-RT-PCR.

9. PIŚMIENICTWO

Bennink, H. J. T. C. (2016). Immunotherapeutic method for treating prostate cancer, Pantarhei Bioscience BV, Zeist, Netherlands. US patent 9295720B2.

Bleil, J. D., J. M. Greve and P. M. Wassarman (1988). "Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs." *Dev Biol* 128(2): 376-385.

Bleil, J. D. and P. M. Wassarman (1980). "Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida." *Dev Biol* 76(1): 185-202.

Bleil, J. D. and P. M. Wassarman (1983). "Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein." *Dev Biol* 95(2): 317-324.

Brown, R. G., W. D. Bowen, J. D. Eddington, W. C. Kimmins, M. Mezei, J. L. Parsons and B. Pohajdak (1997). "Evidence for a long-lasting single administration contraceptive vaccine in wild grey seals." *J Reprod Immunol* 35(1): 43-51.

Buschmann, T., N.-K. Fotiadis, M. Fuchs, S. Heim, T. Lehnher-Ilina, S. Lamer, J. Meuer, K. Rothmann-Cosic, V. Seibert, S. Tortola Perez, K. Stedronsky and Inventor (2004). Differentially expressed tumour-specific polypeptides for use in the diagnosis and treatment of cancer, CA patent CA2539490A1 <https://patents.google.com/patent/CA2539490A1/un> Genmab AS CA patent CA2539490A1.

Canosa, S., T. Adriaenssens, W. Coucke, P. Dalmaso, A. Revelli, C. Benedetto and J. Smitz (2017). "Zona pellucida gene mRNA expression in human oocytes is related to oocyte maturity, zona inner layer retardance and fertilization competence." *Mol Hum Reprod* 23(5): 292-303.

Cheng, C. Y. and D. D. Mruk (2012). "The blood-testis barrier and its implications for male contraception." *Pharmacol Rev* 64(1): 16-64.

Chiquoine, A. D. (1954). "The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo." *The Anatomical Record* 118(2): 135-146.

Chiu, P. C., B. S. Wong, M. K. Chung, K. K. Lam, R. T. Pang, K. F. Lee, S. B. Sumitro, S. K. Gupta and W. S. Yeung (2008). "Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa." *Biol Reprod* 79(5): 869-877.

Chrusciel, M., M. Doroszko, J. Stelmaszewska, X. Li, A. J. Ziecik, H. J. Coelingh-Bennink, I. Huhtaniemi and N. A. Rahman (2014). "Transgenic mice expressing inhibin α -subunit promoter (*inh α*)/Simian Virus 40 T-antigen (Tag) transgene as a model for the therapy of granulosa cell-derived ovarian cancer." *Reproductive Biology* 14(1): 25-31.

Clermont, Y. (1966). "Spermatogenesis in man: a study of the spermatogonial population." *Fertility and sterility* 17(6): 705-721.

Clermont, Y. (1972). "Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal." *Physiological reviews* 52(1): 198-236.

Coelingh Bennink, H. J. T., N. A. Rahman and Inventor (2019). Immunotherapeutic methods for treating and/or preventing lung cancer, WO2019086507A1 <https://patents.google.com/patent/WO2019086507A1/en>, Pantarhei Bioscience BV, Zeist, Netherlands,. WO2019086507A1.

Corbier, p., l. Dehennin, m. Castanier, a. Mebazaa, d. A. Edwards and j. Roffi (1990). "Sex Differences in Serum Luteinizing Hormone and Testosterone in the Human Neonate during the First Few Hours after Birth*." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 71(5): 1344-1348.

Costa, J., R. Pereira, J. Oliveira, Â. Alves, Â. Marques-Magalhães, A. Frutuoso, C. Leal, N. Barros, R. Fernandes, D. Queiroz Almeida, M. Barreiro, A. Barros, M. Sousa and R. Sá (2018). "Structural and molecular analysis of the cancer prostate cell line PC3: Oocyte zona pellucida glycoproteins." *Tissue Cell* 55: 91-106.

Coy, P. and M. Avilés (2010). "What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte?" *Biological Reviews* 85(3): 593-605.

Cross, N. L., P. Morales, J. W. Overstreet and F. W. Hanson (1988). "Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida." *Biol Reprod* 38(1): 235-244.

DE ROOIJ, D. G. and L. D. RUSSELL (2000). "All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask." *Journal of andrology* 21(6): 776-798.

Dell, A., H. R. Morris, R. L. Easton, M. Patankar and G. F. Clark (1999). "The glycobiology of gametes and fertilisation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/General Subjects* 1473(1): 196-205.

Dufau, M. L. (1988). "Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell." *Annual review of physiology* 50(1): 483-508.

Erskine, M., S. Tobet and M. Baum (1988). "Effect of birth on plasma testosterone, brain aromatase activity, and hypothalamic estradiol in male and female ferrets." *Endocrinology* 122(2): 524-530.

Fahrenkamp, E., B. Algarra and L. Jovine (2020). "Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy." *Molecular Reproduction and Development* 87(3): 326-340.

Fayemi, O., H. Joo and A. Hunter (2006). "Effect of sperm immunization of male rabbits on sperm quality conception rate and litter size." *Pakistan Veterinary Journal* 26(1): 36.

Fayrer-Hosken, R. A., H. J. Bertschinger, J. F. Kirkpatrick, D. Grobler, N. Lamberski, G. Honneyman and T. Ulrich (1999). "Contraceptive potential of the porcine zona pellucida vaccine in the African elephant (*Loxodonta africana*)." *Theriogenology* 52(5): 835-846.

Florman, H. M. and P. M. Wassarman (1985). "O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity." *Cell* 41(1): 313-324.

Forest, M. G. and A. M. Cathiard (1975). "Pattern of plasma testosterone and Δ^4 -androstenedione in normal newborns: evidence for testicular activity at birth." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 41(5): 977-980.

Forest, M. G., A. M. Cathiard and J. A. Bertrand (1973). "Evidence of testicular activity in early infancy." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 37(1): 148-151.

- Fujimoto, T., Y. Miyayama and M. Fuyuta (1977). "The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells." *The Anatomical Record* 188(3): 315-329.
- Gao, L. L., C. X. Zhou, X. L. Zhang, P. Liu, Z. Jin, G. Y. Zhu, Y. Ma, J. Li, Z. X. Yang and D. Zhang (2017). "ZP3 is Required for Germinal Vesicle Breakdown in Mouse Oocyte Meiosis." *Sci Rep* 7: 41272.
- Godin, I., C. Wylie and J. Heasman (1990). "Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture." *Development* 108(2): 357-363.
- Gondos, B. (1980). "Development and differentiation of the testis and male reproductive tract." *Testicular development, structure, and function*: 3-20.
- Goudet, G., S. Mugnier, I. Callebaut and P. Monget (2008). "Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates." *Biol Reprod* 78(5): 796-806.
- Greenhouse, S., P. E. Castle and J. Dean (1999). "Antibodies to human ZP3 induce reversible contraception in transgenic mice with 'humanized' zonae pellucidae." *Hum Reprod* 14(3): 593-600.
- Greve, J. M. and P. M. Wassarman (1985). "Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat." *Journal of molecular biology* 181(2): 253-264.
- Gupta, S. K., B. Bhandari, A. Shrestha, B. K. Biswal, C. Palaniappan, S. S. Malhotra and N. Gupta (2012). "Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization." *Cell Tissue Res* 349(3): 665-678.
- Habert, R., H. Lejeune and J. M. Saez (2001). "Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells." *Molecular and cellular endocrinology* 179(1-2): 47-74.
- Hacker, A., B. Capel, P. Goodfellow and R. Lovell-Badge (1995). "Expression of Sry, the mouse sex determining gene." *Development* 121(6): 1603-1614.

Hadžiselimovič, F., L. Thommen, J. Girard and B. Herzog (1986). "The significance of postnatal gonadotropin surge for testicular development in normal and cryptorchid testes." *The Journal of urology* 136(1): 274-276.

Hai, Y., J. Hou, Y. Liu, Y. Liu, H. Yang, Z. Li and Z. He (2014). The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier.

Hanley, N., D. Hagan, M. Clement-Jones, S. Ball, T. Strachan, L. Salas-Cortes, K. McElreavey, S. Lindsay, S. Robson and P. Bullen (2000). "SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development." *Mechanisms of development* 91(1-2): 403-407.

Hardy, C. M. and K. J. Mobbs (1999). "Expression of recombinant mouse sperm protein sp56 and assessment of its potential for use as an antigen in an immunocontraceptive vaccine." *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 52(2): 216-224.

Hayashi, T., T. Yamada, Y. Kageyama and K. Kihara (2004). "Expression failure of the notch signaling system is associated with the pathogenesis of testicular germ cell tumor." *Tumor Biology* 25(3): 99-105.

Heller, C. G. and Y. Clermont (1963). "Spermatogenesis in man: an estimate of its duration." *Science* 140(3563): 184-186.

Heller, C. H. and Y. Clermont (1964). "Kinetics of the germinal epithelium in man." *Recent Prog Horm Res* 20: 545-575.

Jin, Z., Q.-M. Yang, C.-Y. Xiao and L.-L. Gao (2022). "ZP3 and AIPL1 participate in GVBD of mouse oocytes by affecting the nuclear membrane localization and maturation of farnesylated prelamin A." *Zygote*: 1-9.

Kempisty, B., H. Piotrowska, D. Bukowska, M. Woźna, S. Ciesiółka, K. Wojtanowicz-Markiewicz, R. Włodarczyk, K. Jopek, M. Jeseta, M. Bruska, M. Nowicki, J. M. Jaśkowski, K. P. Brüssow and M. Zabel (2015). "Expression and cellular distribution of zona pellucida glycoproteins in canine oocytes before and after in vitro maturation." *Zygote* 23(6): 863-873.

- Kempisty, B., M. Woźna, H. Piotrowska, D. Bukowska, M. Jackowska, P. Antosik, J. M. Jaśkowski and K. P. Brüssow (2012). "The expression of genes encoding zona pellucida glycoproteins in canine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in media supplemented with progesterone and estradiol." *Theriogenology* 77(3): 684-693.
- Kirkpatrick, J. F., J. W. T. Jr, I. K. M. Liu, R. Fayerer-Hosken and A. T. Rutberg (1997). "Case studies in wildlife immunocontraception: wild and feral equids and white-tailed deer." *Reproduction, Fertility and Development* 9(1): 105-110.
- Koopman, P., A. Münsterberg, B. Capel, N. Vivian and R. Lovell-Badge (1990). "Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation." *Nature* 348(6300): 450-452.
- Liang, L., S. M. Soyal and J. Dean (1997). "FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes." *Development* 124(24): 4939-4947.
- Ma, X., Y. Dong, M. M. Matzuk and T. R. Kumar (2004). "Targeted disruption of luteinizing hormone β -subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(49): 17294-17299.
- Mahi-Brown, C. A., R. Yanagimachi, M. L. Nelson, H. Yanagimachi and N. Palumbo (1988). "Ovarian histopathology of bitches immunized with porcine zonae pellucidae." *Am J Reprod Immunol Microbiol* 18(3): 94-103.
- Makela, J. A., S. Cisneros-Montalvo, T. Lehtiniemi, O. Olotu, H. M. La, J. Toppari, R. M. Hobbs, M. Parvinen and N. Kotaja (2020). "Transillumination-Assisted Dissection of Specific Stages of the Mouse Seminiferous Epithelial Cycle for Downstream Immunostaining Analyses." *J Vis Exp*(164).
- McShea, W. J. (1997). "Immunocontraceptive efficacy and the impact of contraception on the reproductive behaviors of white-tailed deer." *J. Wildl Manag.* 61: 560-569.
- Millar, S. E., E. S. Lader and J. Dean (1993). "ZAP-1 DNA binding activity is first detected at the onset of zona pellucida gene expression in embryonic mouse oocytes." *Dev Biol* 158(2): 410-413.

Miyamoto, Y., H. Taniguchi, F. Hamel, D. W. Silversides and R. S. Viger (2008). "A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation." *BMC molecular biology* 9: 1-18.

Motelica-Heino, I., M. Castanier, P. Corbier, D. Edwards and J. Roffi (1988). "Testosterone levels in plasma and testes of neonatal mice." *Journal of steroid biochemistry* 31(3): 283-286.

Mruk, D. D. and C. Y. Cheng (2004). "Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis." *Endocrine reviews* 25(5): 747-806.

Nakata, H., T. Wakayama, Y. Takai and S. Iseki (2015). "Quantitative analysis of the cellular composition in seminiferous tubules in normal and genetically modified infertile mice." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 63(2): 99-113.

Naz, R. K. and X. Zhu (1998). "Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice." *Biology of Reproduction* 59(5): 1095-1100.

Nef, S., S. Verma-Kurvari, J. Merenmies, J.-D. Vassalli, A. Efstratiadis, D. Accili and L. F. Parada (2003). "Testis determination requires insulin receptor family function in mice." *Nature* 426(6964): 291-295.

O'rand, M., E. Widgren, P. Sivashanmugam, R. Richardson, S. Hall, F. French, C. VandeVoort, S. Ramachandra, V. Ramesh and A. Jagannadha Rao (2004). "Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with eppin." *Science* 306(5699): 1189-1190.

O'Shaughnessy, P. J., P. Baker, U. Sohnius, A. M. Haavisto, H. M. Charlton and I. Huhtaniemi (1998). "Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function." *Endocrinology* 139(3): 1141-1146.

O'Shaughnessy, P. J., H. Johnston, L. Willerton and P. J. Baker (2002). "Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice." *Journal of cell science* 115(17): 3491-3496.

O'rand, M., E. Widgren, Z. Wang and R. Richardson (2006). "Eppin: an effective target for male contraception." *Molecular and cellular endocrinology* 250(1-2): 157-162.

O'Shaughnessy, P., P. Baker, M. Heikkila, S. Vainio and A. McMahon (2000). "Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis—androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal Leydig cells." *Endocrinology* 141(7): 2631-2637.

O'shaughnessy, P., P. Baker, A. Monteiro, S. Cassie, S. Bhattacharya and P. Fowler (2007). "Developmental changes in human fetal testicular cell numbers and messenger ribonucleic acid levels during the second trimester." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92(12): 4792-4801.

O'Shaughnessy, P. J., L. Willerton and P. J. Baker (2002). "Changes in Leydig Cell Gene Expression During Development in the Mouse1." *Biology of Reproduction* 66(4): 966-975.

Oakberg, E. F. (1956). "Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium." *American Journal of Anatomy* 99(3): 507-516.

Ostrer, H., H. Huang, R. Masch and E. Shapiro (2007). "A cellular study of human testis development." *Sexual Development* 1(5): 286-292.

Paterson, M., P. T. Koothan, K. D. Morris, K. T. O'Byrne, P. Braude, A. Williams and R. J. Aitken (1992). "Analysis of the contraceptive potential of antibodies against native and deglycosylated porcine ZP3 in vivo and in vitro." *Biol Reprod* 46(4): 523-534.

Paterson, M., M. R. Wilson, K. D. Morris, M. van Duin and R. J. Aitken (1998). "Evaluation of the contraceptive potential of recombinant human ZP3 and human ZP3 peptides in a primate model: their safety and efficacy." *Am J Reprod Immunol* 40(3): 198-209.

Pereda, J., T. Zorn and M. Soto-Suazo (2006). "Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study." *Microscopy research and technique* 69(6): 386-395.

Rahman, N. A., H. J. Bennink, M. Chrusciel, V. Sharp, Y. Zimmerman, R. Dina, X. Li, A. Ellonen, A. Rivero-Müller, S. Dilworth, S. Ghaem-Maghani, O. Vainio and I. Huhtaniemi

(2012). "A novel treatment strategy for ovarian cancer based on immunization against zona pellucida protein (ZP) 3." *FASEB J* 26(1): 324-333.

Rankin, T., M. Familiari, E. Lee, A. Ginsberg, N. Dwyer, J. Blanchette-Mackie, J. Drago, H. Westphal and J. Dean (1996). "Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile." *Development* 122(9): 2903-2910.

Rankin, T., P. Talbot, E. Lee and J. Dean (1999). "Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss." *Development* 126(17): 3847-3855.

Robinson, J. L., A. Feizi, M. Uhlén and J. Nielsen (2019). "A systematic investigation of the malignant functions and diagnostic potential of the cancer secretome." *Cell reports* 26(10): 2622-2635. e2625.

Roffi, J. (1977). "Stimulation de la sécrétion de LH et de FSH et augmentation du poids testiculaire à la naissance chez le rat."

Russell, L. D., R. A. Ettlin, A. P. S. Hikim and E. D. Clegg (1993). *Histological and histopathological evaluation of the testis*, Wiley Online Library.

Sasaki, K., S. Yokobayashi, T. Nakamura, I. Okamoto, Y. Yabuta, K. Kurimoto, H. Ohta, Y. Moritoki, C. Iwatani and H. Tsuchiya (2015). "Robust in vitro induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells." *Cell stem cell* 17(2): 178-194.

Sato, M., T. Kimura, K. Kurokawa, Y. Fujita, K. Abe, M. Masuhara, T. Yasunaga, A. Ryo, M. Yamamoto and T. Nakano (2002). "Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells." *Mechanisms of development* 113(1): 91-94.

Savchuk, I., M. L. Morvan, J.-P. Antignac, M. Kurek, B. Le Bizec, O. Söder and K. Svechnikov (2019). "Ontogenesis of human fetal testicular steroidogenesis at early gestational age." *Steroids* 141: 96-103.

Scott, H. M., G. R. Hutchison, I. K. Mahood, N. Hallmark, M. Welsh, K. De Gendt, G. Verhoeven, P. O'Shaughnessy and R. M. Sharpe (2007). "Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis." *Endocrinology* 148(5): 2027-2036.

Shabanowitz, R. B. (1990). "Mouse antibodies to human zona pellucida: evidence that human ZP3 is strongly immunogenic and contains two distinct isomer chains." *Biol Reprod* 43(2): 260-270.

Shima, Y., K. Miyabayashi, S. Haraguchi, T. Arakawa, H. Otake, T. Baba, S. Matsuzaki, Y. Shishido, H. Akiyama and T. Tachibana (2013). "Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes." *Molecular endocrinology* 27(1): 63-73.

Shivers, C., A. Dudkiewicz, L. Franklin and E. Fussell (1972). "Inhibition of sperm-egg interaction by specific antibody." *Science* 178(4066): 1211-1213.

Soyal, S. M., A. Amleh and J. Dean (2000). "FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation." *Development* 127(21): 4645-4654.

Svingen, T. and P. Koopman (2013). "Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations." *Genes & development* 27(22): 2409-2426.

Tam, P. and M. Snow (1981). "Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos."

Tapanainen, J., P. Kellokumpu-Lehtinen, L. Pelliniemi and I. Huhtaniemi (1981). "Age-related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 52(1): 98-102.

Töpfer-Petersen, E. (1999). "Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization." *Human reproduction update* 5(4): 314-329.

Valdes-Socin, H., R. Salvi, A. F. Daly, R. C. Gaillard, P. Quatresooz, P.-M. Tebeu, F. P. Pralong and A. Beckers (2004). "Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene." *New England Journal of Medicine* 351(25): 2619-2625.

van den Driesche, S., R. M. Sharpe, P. T. Saunders and R. T. Mitchell (2014). Regulation of the germ stem cell niche as the foundation for adult spermatogenesis: a role for miRNAs? *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier.

Wassarman, P. (1982). "The role of zona pellucida glycoproteins as regulators of sperm-egg interactions in the mouse." *Cellular Recognition*: 845-863.

- Wassarman, P. M. (1987). "The zona pellucida: a coat of many colors." *Bioessays* 6(4): 161-166.
- Wassarman, P. M. and E. S. Litscher (2004). "Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida." *International Journal of Developmental Biology* 52(5-6): 665-676.
- Wassarman, P. M. and S. Mortillo (1991). "Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida." *Int Rev Cytol* 130: 85-110.
- Weber, S., D. Eckert, D. Nettersheim, A. J. Gillis, S. Schäfer, P. Kuckenberger, J. Ehlermann, U. Werling, K. Biermann and L. H. Looijenga (2010). "Critical function of AP-2gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance." *Biology of reproduction* 82(1): 214-223.
- Western, P. S., D. C. Miles, J. A. Van Den Bergen, M. Burton and A. H. Sinclair (2008). "Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells." *Stem cells* 26(2): 339-347.
- Yeh, S., M.-Y. Tsai, Q. Xu, X.-M. Mu, H. Lardy, K.-E. Huang, H. Lin, S.-D. Yeh, S. Altuwajri and X. Zhou (2002). "Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(21): 13498-13503.
- Zhang, F.-P., M. Poutanen, J. Wilbertz and I. Huhtaniemi (2001). "Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice." *Molecular endocrinology* 15(1): 172-183.
- Zhang, Y., F. Ai, J. Zheng and B. Peng (2017). "Associations of GATA4 genetic mutations with the risk of congenital heart disease: A meta-analysis." *Medicine* 96(18).
- Zhu, X. and R. K. Naz (1997). "Fertilization antigen-1: cDNA cloning, testis-specific expression, and immunocontraceptive effects." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(9): 4704-4709.

KOMISJA BIOETYCZNA
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO w BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. (085) 748 54 07, (085) 686 52 20, fax. (085) 748 55 08
prorektorkl@umb.edu.pl

Białystok, 27-06-2019

Uchwała nr: R-I-002/323/2019

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Ekspresja ZP3 w jajnikach, jądrach i innych tkankach u ludzi i myszy” przez Weronikę Lebedzińską wraz z zespołem badawczym z UMB.

Z-ca Przewodniczącej Komisji Bioetycznej UMB


dr n. farm. Krzysztof Chrzanowski