

ZNACZENIE I REGULACJA SYGNALIZACJI NOTCH W GONADZIE MĘSKIEJ

THE ROLE AND REGULATION OF NOTCH SIGNALLING IN THE MALE GONAD

Sylwia Lustofin , Alicja Kamińska , Anna Hejmej*

Zakład Endokrynologii, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

*Autor do korespondencji/corresponding author:

Anna Hejmej, Zakład Endokrynologii, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 5034

e-mail: anna.hejmej@uj.edu.pl

Otrzymano/received: 30.01.2024 r. Zaakceptowano/accepted: 12.04.2024 r.

DOI: [10.26404/PAO_2353-8791.2023.05](https://doi.org/10.26404/PAO_2353-8791.2023.05)



Sylwia Lustofin – dr n. biol., absolwentka Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Autorka i współautorka publikacji naukowych oraz doniesień na zjazdach krajowych i międzynarodowych, dotyczących molekularnych aspektów hormonalnej regulacji komórek męskiego układu rozrodczego. Laureatka Nagrody Młodych Polskiego Towarzystwa Andrologicznego im. Prof. Michała Bokińca, za osiągnięcie naukowe w 2023 r. Wykonawca projektów Narodowego Centrum Nauki oraz Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Członek Polskiego Towarzystwa Andrologicznego, Towarzystwa Biologii Rozrodu oraz grupy badawczej sieci *Andronet* (Europejski Program Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych).

Sylwia Lustofin – PhD in biological sciences, graduated from the Jagiellonian University in Cracow. Author and co-author of scientific publications as well as presentations on national and international congresses on molecular aspects of hormonal regulation of cells of the male reproductive system. Laureate of Polish Society of Andrology Award for young scientists named by Prof. Bokiniec, for scientific achievements in 2023. Contractor of projects from the National Science Center and the Faculty of Biology of the Jagiellonian University. Member of the Polish Society of Andrology, the Society for Reproductive Biology and the *Andronet* network research group (European Cooperation in Science and Technology).



Access to articles is based on the License Creative Commons BY NC ND 3.0 Polska:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.pl>

■ Streszczenie

Szlak sygnałowy Notch, zaangażowany w zależną od kontaktu komunikację międzykomórkową (tzw. komunikację jukstakrynową), pełni kluczową rolę w rozwoju i utrzymaniu homeostazy tkanek zwierząt oraz człowieka. Badania prowadzone w ostatnich dekadach przyczyniły się do scharakteryzowania ekspresji komponentów tego szlaku oraz dowiodły jego znaczenia w gonadzie męskiej ssaków. Nieliczne dotąd doniesienia sugerują też możliwość udziału zaburzeń szlaku Notch w patogenezie chorób jąder. W artykule przedstawiono podsumowanie prac, które pozwoliły na zrozumienie roli szlaku Notch w kształtowaniu populacji komórek linii płciowej oraz komórek Leydiga w okresie płodowym. Omówiono także udział tego szlaku w regulacji funkcji nabłonka plemnikotwórczego i tkanki śródmiąższowej w rozwoju pourodeniowym oraz w dojrzałym jądrze. Ostatnią część artykułu poświęcono mechanizmom kontroliującym sygnalizację Notch w gonadzie męskiej ssaków, szczególną uwagę zwracając na wyniki najnowszych badań, wskazujących na znaczenie hormonu folikulotropowego, androgenów i estrogenów w regulacji aktywności tego szlaku.

Słowa kluczowe: sygnalizacja Notch, gonada męska, androgeny, estrogeny, hormon folikulotropowy

■ Abstract

The Notch signalling pathway, involved in contact-dependent intercellular communication (so-called juxtacrine communication), plays a key role in tissue development and homeostasis in animals and humans. Research conducted in recent decades has contributed to characterizing the expression of Notch pathway components and demonstrated their importance in the male gonad in mammals. Few reports thus far suggest that perturbations in Notch signalling are involved in the pathogenesis of testicular diseases. The article summarizes studies that allowed to understand the role of the Notch pathway in shaping the population of germ cells and Leydig cells in the foetal period. The significance of this pathway in the regulation of seminiferous epithelium and interstitial tissue in postnatal development and in the mature testis is also discussed. The last part of the paper is devoted to the mechanisms controlling Notch signalling in the mammalian male gonad. The main focus is put on the results of the latest research, indicating the importance of follicle-stimulating hormone, androgens, and oestrogens in modulating the activity of Notch pathway.

Key words: Notch signalling, male gonad, androgens, oestrogens, follicle-stimulating hormone

■ Skróty / Abbreviations

ADAM – białko zawierające domenę dezintegryny i metaloproteinazy (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*); ANK – powtórzenia ankiry-nowe (ang. *ankyrin repeats*); APH-1 – podjednostka γ-sekretazy APH-1 (ang. *anterior pharynx defective 1*); AR – receptor androgenowy (ang. *androgen receptor*); ARP2 – białko związane z aktyną 2 (ang. *actin-related protein 2*); BAX – regulator apoptozy X związany z BCL-2 (ang. *BCL-2 associated X apoptosis regulator*); BCL-2 – regulator apoptozy BCL-2 (ang. *BCL-2 apoptosis regulator*); bHLH – motyw helisa-pętla-helisa (ang. *basic helix-loop-helix*); CRD – domena bogata w cysteinę (ang. *cysteine rich domain*); DAPT – inhibitor γ-sekretazy DAPT (ang. *N-[N-(3,5-Difluorophenacyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester*); DLK-1 – niekanoniczny ligand Notch podobny do Delta 1 (ang. *Delta-like non-canonical Notch ligand 1*); DLL - białka podobne do Delta (ang. *Delta-like*); DNER – receptor pokrewny EGF podobny do Delta/Notch (ang. *Delta/Notch-like EGF-related receptor*); DSL – domena lub białko Delta/Serrate/Lag2 (ang. *Delta/Serrate/Lag2*); EDCs – związki zaburzające gospodarkę hormonalną (ang. *endocrine disrupting chemicals*); EDS – etanodimetanosulfonian (ang. *ethanodimethanesulfonate*); EGF-like – motywy o budowie podobnej do nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor – like*); EPS8 – substrat 8 dla kinazy receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor pathway substrate 8*); ER α – receptor estrogenowy α (ang. *oestrogen receptor α*); ER β – receptor estrogenowy β (ang. *oestrogen receptor β*); FGF4 – czynnik wzrostu fibroblastów 4 (ang. *fibroblast growth factor 4*); Fas – receptor śmierci Fas (ang. *Fas cell surface death receptor*); FasL – ligand receptora Fas (ang. *Fas ligand*); FSH – hormon folikulotropowy (ang. *follicle-stimulating hormone*); GCT – nowotwory jąder wywodzące się z komórek płciowych (ang. *germ cell tumors*); GDNF – glejopochodny czynnik neurotroficzny (ang. *glial cell-derived neurotrophic factor*); GFP – białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescence protein*); GPER – receptor estrogenowy sprzężony z białkiem G (ang. *G-protein coupled oestrogen receptor*); HD – domena heterodimeryzacji (ang. *heterodimerization domain*); HES – czynniki transkrypcyjne z rodziny Hes (ang. *hairy and enhancer of split*); HEY – czynniki transkrypcyjne z rodziny Hey (ang. *Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif*); JAG - białka Jagged (ang. *Jagged*); JEDI – białko podobne do Jagged i Delta (ang. *Jagged and Delta protein*); Lfng – glikozylotransferaza Lunatic fringe (ang. *lunatic fringe*); LNR – sekwencja bogata w cysteinę (ang. *Lin-12/Notch repeat*); MAML1 – czynnik transkrypcyjny Mastermind-like 1 (ang. *mastermind-like protein 1*); MIB1 – ligaza ubikwitynowa Mindbomb 1 (ang. *mind-bomb1*); NECD – domena zewnętrzkomórkowa receptora Notch (ang. *Notch extracellular domain*); NF-κB – jądrowy czynnik transkrypcyjny kappaB (ang. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*); NICD – domena wewnętrzkomórkowa receptora Notch (ang. *Notch intracellular domain*); PDZL – domena PSD-95/Dlg/ZO-1 (ang. *PSD-95/Dlg/ZO-1 ligand*); PEN-2 – wzmacniacz preseniliny 2 (ang. *presenilin enhancer 2*); PEST – sekwencja peptydowa bogata w proline, kwas glutaminowy, serynę i treoninę (ang. *proline (P), glutamid acid (E), serine (S), threonine (T)*); POFUT1 – białkowa O-fukozylotransferaza 1 (ang. *protein O-fucosyltransferase 1*); POGLUT1 – białkowa O-glukozylotransferaza 1 (ang. *protein O-glucosyltransferase 1*); RAM – domena związana z białkiem RBP-J (ang. *RBP-J – associated molecule domain*); RBP-J – czynnik transkrypcyjny RBP-J (ang. *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*); RQ – względna liczba kopii genu (ang. *relative quantification*); RT-qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją (ang. *reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction*); SF1 – steroidogenny czynnik 1 (ang. *steroidogenic factor 1*); SMAD – białko z rodziną SMAD (ang. *suppressor of mothers against decapentaplegic*); StAR – białko natychmiastowo regulujące steroidogenezę (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*); TAD – domena transaktywująca (ang. *transcriptional activation domain*); TGF-β3 – transformujący czynnik wzrostu β3 (ang. *transforming growth factor β3*); TNFα – czynnik martwicy nowotworu α (ang. *tumor necrosis factor α*); ZIP9 – błonowy receptor androgenowy ZIP9 (ang. *Zrt- and Irt-like protein 9*)

■ Wprowadzenie / Introduction

Komunikacja zależna od kontaktu jest jednym z podstawowych mechanizmów interakcji międzykomórkowych w tkankach zwierzęcych i ludzkich. W przeciwieństwie do sygnalizacji parakrynowej, która wymaga obecności dyfundującego produktu pośredniego (np. czynnika wzrostu, cytokiny), bezpośredni kontakt pomiędzy sąsiadującymi komórkami umożliwia wiązanie cząsteczek sygnałowej (liganda), zlokalizowanej w błonie jednej z komórek, z białkiem receptorowym, znajdującym się w błonie drugiej komórki. Ten typ komunikacji określa się mianem sygnalizacji jukstakrynowej ([Fagotto i Gumbiner, 1996](#); [Mattes i Scholpp, 2018](#)). Jednym z najlepiej dotąd poznanych mechanizmów oddziaływań jukstakrynowych jest szlak sygnałowy Notch, ewolucyjnie konserwatywny sposób komunikacji, funkcjonujący zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców ([Artavanis-Tsakonas i wsp., 1999](#)). Swoja nazwę szlak ten zawdzięcza opisanemu po raz pierwszy w 1914 roku fenotypowi muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) z mutacją genu kodującego receptor Notch. Charakterystyczną cechą mutantów są bowiem wcięcia nadające ich skrzydłom „karbowany” wygląd (ang. *notch* – karb, nacięcie) ([Dexter, 1914](#); [Mohr, 1919](#)). Badania zmierzające do wyjaśnienia molekularnego mechanizmu oraz roli szlaku Notch u kręgowców zapoczątkowało odkrycie homologa *Notch* u *Xenopus* ([Coffman i wsp., 1990](#)). W kolejnych latach wykazano, że szlak sygnałowy Notch odgrywa kluczową rolę w specyfikacji losu komórek na wczesnych etapach rozwoju oraz w tkankach dorosłych organizmów. Transdukcja sygnału w tym szlaku przebiega bez udziału wtórnego przekazników, a zasadniczą rolę odgrywa w niej proteoliza receptorów Notch ([Siebel i Lendahl, 2017](#); [Tiemeijer i wsp., 2022](#)).

U człowieka mutacje genów, kodujących podstawowe elementy szlaku Notch, takie jak receptory, ligandy, czynniki transkrypcyjne i geny docelowe, wywołują szereg rzadkich chorób genetycznych (skatalogowanych w bazie *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM), m.in. zespół Adamsa-Olivera, zespół Alagille'a, zespół Hajdu-Cheneya, zespół Fallota, chorobę zastawki aortalnej, autosomalną dominującą dysplazję kręgowo-żebrową, dziedziczną demencję wielozawałową, zespół Lehmana, czy miofibromatozę noworodków ([McKusick, 2024](#)). Coraz więcej dowodów wskazuje, że nieprawidłowa regulacja sygnalizacji Notch może mieć związek z zaburzeniami neuropsychiatrycznymi i metabolicznymi ([Salazar i Yamamoto, 2018](#)). Mutacje somatyczne w genach tego szlaku oraz zakłócenia jego regulacji są także związane z rozwojem i progresją nowotworów ([Zhou i wsp., 2022](#)). W 2004 roku [Hayashi i wsp.](#) opisali zależność między różnymi podtypami histologicznymi nowotworów jąder wywodzących się z komórek płciowych (GCT, ang. *germ cell tumors*) a wzorem ekspresji białek sygnalizacji Notch. Te badania oraz późniejsze analizy wykazały m.in. zanik ekspresji liganda Jagged2 (JAG2) i receptora Notch1 w nasieniakach. W tym typie

Contact-dependent communication is one of the basic mechanisms of intercellular interactions in animal and human tissues. Unlike paracrine signalling, which requires the presence of a diffusing intermediate product (e.g., growth factor or cytokine), direct contact between neighbouring cells enables the binding of a signalling molecule (ligand) located in the membrane of one cell with a receptor protein present in the membrane of the adjacent cell. This type of communication is called juxtacrine signalling ([Fagotto and Gumbiner, 1996](#); [Mattes and Scholpp, 2018](#)). One of the best characterized mechanisms of juxtacrine interactions is the Notch signalling pathway, an evolutionarily conserved mode of communication that functions in both invertebrates and vertebrates ([Artavanis-Tsakonas et al., 1999](#)). This pathway owes its name to the phenotype of a fruit fly (*Drosophila melanogaster*) with a mutation in the gene encoding the Notch receptor, which was first described in 1914. The typical feature of these mutant fruit flies is indentations that give their wings a “notch-like” appearance ([Dexter, 1914](#); [Mohr, 1919](#)). Research aimed at elucidating the molecular mechanism and the role of the Notch pathway in vertebrates was initiated by the discovery of a Notch homologue in *Xenopus* ([Coffman et al., 1990](#)). In subsequent years, it has been shown that the Notch signalling pathway plays a key role in cell fate specification at early stages of development and in the tissues of adult organisms. Signal transduction in the Notch pathway occurs without secondary messengers, and proteolysis of Notch receptors plays an essential role in this pathway ([Siebel and Lendahl, 2017](#); [Tiemeijer et al., 2022](#)).

In humans, mutations in genes encoding basic elements of the Notch pathway, such as receptors, ligands, transcription factors, and target genes, cause a number of rare genetic diseases (identified in the *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM database), including Adams-Oliver syndrome, Alagille syndrome, Hajdu-Cheney syndrome, Fallot syndrome, aortic valve disease, autosomal dominant spondylocostal dysostosis, hereditary multi-infarct dementia, Lehman syndrome, or infantile myofibromatosis ([McKusick, 2024](#)). Increasing evidence indicates that abnormal regulation of Notch signalling may be associated with neuropsychiatric and metabolic disorders ([Salazar and Yamamoto, 2018](#)). Somatic mutations in genes in the Notch pathway and dysregulation of Notch signalling are also associated with the development and progression of cancer ([Zhou et al., 2022](#)). In 2004, [Hayashi et al.](#) described the relationship between various histological subtypes of germ cell tumours (GCTs) and the expression pattern of Notch pathway proteins. These studies and subsequent analyses have shown a loss of expression of the Jagged2 (JAG2) ligand and Notch1 receptor in seminomas, whereas Notch2 and Notch4

nowotworu, a także w wewnętrzkanalikowym raku jądra wykrywano natomiast Notch2 i Notch4 (*Hayashi i wsp., 2004a; Adamah i wsp., 2006*). Utratę ekspresji Notch1 i/lub JAG2 stwierdzono w spermatydach pacjentów zazoospermią nieobturacyjną wywołaną zatrzymaniem dojrzewania komórek spermatogenezy (ang. *spermatogenesis maturation arrest*) (*Hayashi i wsp., 2004b*). Zmiany poziomu ekspresji receptorów Notch1 i Notch2 opisano również w jądrach szczurów z doświadczalnie indukowanymi żyłakami powrózka nasiennego (*Sahin i wsp., 2005*). Obserwacje te, a także pojawiające się równocześnie doniesienia dotyczące ekspresji komponentów szlaku Notch w poszczególnych populacjach komórek gonady męskiej wskazywały, że komunikacja międzykomórkowa z udziałem tego szlaku może pełnić istotną rolę w rozwoju i funkcji jądra. Jednak dopiero badania ostatniej dekady prowadzone na modelach zwierzęcych przyniosły wyjaśnienie niektórych aspektów działania szlaku Notch w gonadzie męskiej ssaków.

Mechanizm aktywacji szlaku sygnałowego Notch Mechanism of Notch signalling activation

U ssaków kanoniczny szlak sygnałowy Notch jest związany z aktywacją jednego z czterech receptorów Notch (Notch1, Notch2, Notch3 i Notch4) zaliczanych do glikoprotein transbłonowych typu 1 (*Bray, 2016*). Białka te syntetyzowane są w siateczce śródplazmatycznej w formie prekursorowej i następnie w aparacie Golgiego ulegają obróbce proteolitycznej z udziałem konwertazy białkowej – furyny. Powstałe dwie związane niekowalejcyjnie podjednostki są transportowane do błony komórkowej i stanowią dojrzałą, heterodimeryczną postać receptora obecną na powierzchni komórki (*Sachan i wsp., 2023*). Dojrzały receptor zbudowany jest z domeny zewnętrzkomórkowej (NECD, ang. *Notch extracellular domain*), domeny transbłonowej (TMD, ang. *transmembrane domain*) oraz domeny wewnętrzkomórkowej (NICD, ang. *Notch intracellular domain*). Domena NECD składa się z (i) 29-36 powtórzeń motywów podobnych do nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF-like, ang. *epidermal growth factor-like*), kluczowych dla wiązania liganda, (ii) trzech sekwencji bogatych w cysteinę (LNR, ang. *Lin-12/Notch repeat*), które zapobiegają niezależnej od liganda aktywacji receptora oraz (iii) domeny heterodimeryzacji (HD, ang. *heterodimerization domain*). Z kolei NICD zbudowana jest z domeną RAM (ang. *RBP-J – associated molecule domain*) oraz domeną zawierającą powtórzenia ankiry (ANK, ang. *ankyrin repeats*), które są odpowiedzialne za interakcję NICD z białkiem RBP-J (ang. *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*), należącym do kompleksu białkowego wiążącego DNA. Z domeną ANK sąsiaduje sygnał lokalizacji jądrowej. Dalej zlokalizowana jest domena transaktywująca (TAD, ang. *transcriptional activation domain*), obecna jedynie w strukturze receptorów Notch1 i Notch2. Na końcu części wewnętrzkomórkowej receptora występuje domena PEST (ang. *proline*

are commonly detected in seminoma and carcinoma *in situ* (*Hayashi et al., 2004a; Adamah et al., 2006*). Loss of Notch1 and/or JAG2 expression has been found in spermatids of patients with nonobstructive azoospermia caused by spermatogenesis maturation arrest (*Hayashi et al., 2004b*). Changes in the expression of the Notch1 and Notch2 receptors have also been described in the testes of rats with experimentally induced varicocele (*Sahin et al., 2005*). These observations, as well as concurrent reports on the expression of Notch pathway components in particular populations of male gonad cells, indicate that intercellular communication involving this pathway may play an important role in testis development and function. However, not until the past decade has research conducted on animal models elucidated some aspects of the role of the Notch pathway in the mammalian male gonad.

In mammals, the canonical Notch signalling pathway is associated with the activation of one of four Notch receptors (Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4), which are classified as type 1 transmembrane glycoproteins (*Bray, 2016*). These proteins are synthesized in the endoplasmic reticulum in a precursor form and then undergo proteolytic processing in the Golgi apparatus by furin-like convertase. Two noncovalently bound subunits are transported to the cell membrane and constitute the mature, heterodimeric form of the receptor present on the cell surface (*Sachan et al., 2023*). The mature receptor is composed of the Notch extracellular domain (NECD), the transmembrane domain (TMD), and the Notch intracellular domain (NICD). The NECD consists of the following components: (i) 29-36 repeats of epidermal growth factor-like (EGF-like) motifs necessary for ligand binding; (ii) three cysteine-rich sequences (LNR, Lin-12/Notch repeat) that prevent ligand-independent activation of the receptor; and (iii) a heterodimerization domain (HD). The NICD is composed of the recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region (RBP-J)-associated molecule (RAM) and the ankyrin repeat-containing (ANK) domains, which are responsible for the interaction of the NICD with RBP-J, a DNA-binding protein. A nuclear localization signal is adjacent to the ANK domain. The transactivation domain (TAD) is present only in the structure of the Notch1 and Notch2 receptors. The cytoplasmic C-terminus of the NICD contains proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T) (PEST) domains, which participate in the regulation of Notch protein degradation (*Hori et al., 2013; Andersson and Lendahl, 2014; Sachan et al., 2023*) (Figure 1).

(P), glutamid acid (E), serine (S), threonine(T)), uczestnicząca w regulacji degradacji białka Notch ([Hori i wsp., 2013; Andersson i Lendahl, 2014; Sachan i wsp., 2023](#)) (Rycina 1).

Przed wbudowaniem w błonę komórkową receptory Notch podlegają w aparacie Golgiego modyfikacjom potranslacyjnym, które są istotne dla aktywacji szlaku Notch ([Fortini, 2009](#)). Powtórzenia EGF-like w obrębie NECD ulegają O-fukozylacjach przy udziale O-fukozylotransferazy POFUT1 (ang. *protein O-fucosyltransferase 1*) oraz O-glikozylacji katalizowanej przez O-glukozylotransferazę POGLUT1 (ang. *protein O-glucosyltransferase 1*) ([Varshney i Stanley, 2018](#)). Trzecim istotnym typem modyfikacji jest wydłużanie O-fukozy poprzez przyłączanie reszt N-acetyloglukozaminy, które katalizowane jest przez rodzinę glikozylotransferaz Fringe (u ssaków są to białka Lunatic, Manic i Radical fringe). Ten rodzaj modyfikacji moduluje zdolność receptorów Notch do wiązania różnych ligandów oraz może brać udział w regulacji aktywacji receptora ([Pandey i wsp., 2021](#)).

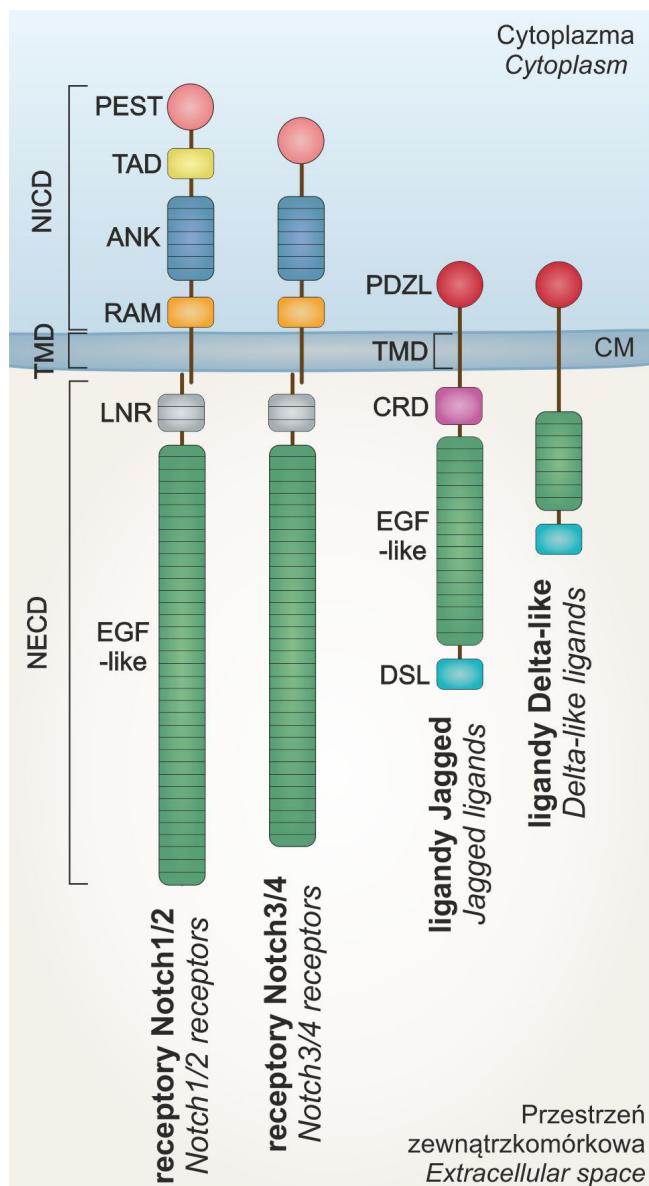
Rolę ligandów receptorów Notch pełnią białka DSL (ang. *Delta/Serrate/Lag2*), które – podobnie jak receptory – są transbłonowymi białkami typu 1. U ssaków ze względu na liczbę powtórzeń EGF-like w domenie zewnętrzkomórkowej oraz obecność lub brak domeny bogatej w cysteinę (CRD, ang. *cysteine rich domain*) wyróżnia się ligandy Jagged (JAG1 i JAG2) oraz Delta-like (DLL1, DLL3, DLL4). W pobliżu N-końca każdego liganda znajduje się domena DSL, która wraz z pierwszymi powtórzeniami EGF-like uczestniczy w oddziaływanach z receptorem ([D'Souza i wsp., 2008](#)). W części wewnętrzkomórkowej ligandów JAG1, DLL1 i DLL4 występuje domena PDZL (ang. *PSD-95/Dlg/ZO-1 ligand*), która uczestniczy w interakcjach z innymi białkami, m.in. białkami połączeń przylegania ([Chillakuri i wsp., 2012](#)) (Rycina 1). Nowo zsyntetyzowane i wbudowane w błonę komórkową białka DSL podlegają procesowi endocytozy i recyklingu, które warunkują zdolność do aktywacji receptora, prawdopodobnie dzięki grupowaniu ligandów w miejscach większej dostępności receptorów lub obróbce proteolitycznej tych białek ([D'Souza i wsp., 2010; Kandachar i Roegiers, 2012](#)).

W kanonicznym szlaku Notch, ligand obecny w błonie komórki wysyłającej sygnał wiąże się z receptorem w komórce odbierającej sygnał, co zapoczątkowuje endocytozę liganda przy udziale ligaz ubikwitynowych (u ssaków głównie ligazy MIB1, ang. *mindbomb1*) ([Guo i wsp., 2016](#)). Generuje to siłę ciągnącą, która wywołuje zmiany konformacyjne receptora, umożliwiające proteolityczne odcięcie domeny NECD przez metaloproteinazy z rodziny ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*) ([Musse i wsp., 2012; Sprinzak i Blacklow, 2021](#)). Uwolniona domena NECD wraz z ligandem ulega endocytozie do komórki wysyłającej sygnał. Kolejne cięcie proteolityczne katalizowane jest przez kompleks γ-sekretazy, składający się z preseniliny 1, nikastryny, białka PEN-2 (ang. *presenilin enhancer 2*) oraz białka APH-1 (ang. *anterior pharynx defective 1*). Prowadzi to do uwolnienia po wewnętrznej stronie błony komórkowej domeny

Before being incorporated into the cell membrane, Notch receptors undergo posttranslational modifications in the Golgi apparatus, which are important for the activation of the Notch pathway ([Fortini, 2009](#)). EGF-like repeats within the NECD undergo O-fucosylation by protein O-fucosyltransferase 1 (POFUT1) and O-glycosylation catalysed by protein O-glucosyltransferase 1 (POGLUT1) ([Varshney and Stanley, 2018](#)). The third important type of modification is O-fucose elongation by the addition of N-acetylglucosamine residues, which is catalysed by the Fringe family of glycosyltransferases (Lunatic, Manic, and Radical fringe proteins in mammals). This type of modification modulates the ability of Notch receptors to bind various ligands and may be involved in the regulation of receptor activation ([Pandey et al., 2021](#)).

Canonical ligands for Notch receptors are type 1 transmembrane proteins belonging to the Delta/Serrate/Lag2 (DSL) protein family. In mammals, Jagged (JAG1 and JAG2) and Delta-like (DLL1, DLL3, and DLL4) ligands are distinguished on the basis of the number of EGF-like repeats in the extracellular domain and the presence or absence of a cysteine-rich domain (CRD). The DSL domain is located near the N-terminus of each ligand. This domain, together with the first EGF-like repeats, participates in interactions with the Notch receptor ([D'Souza et al., 2008](#)). The cytoplasmic region of the JAG1, DLL1, and DLL4 ligands contains a PSD-95/Dlg/ZO-1-ligand (PDZL) motif, which interacts with other proteins, including adherens junction proteins ([Chillakuri et al., 2012](#)) (Figure 1). DSL proteins, which are newly synthesized and incorporated into the cell membrane, undergo endocytosis and recycling processes, which determine their ability to activate the receptor. These processes possibly occur due to the clustering of ligands in places of greater receptor accessibility or proteolytic processing of these proteins ([D'Souza et al., 2010; Kandachar and Roegiers, 2012](#)).

In the canonical Notch pathway, a ligand present in the membrane of the signal-sending cell binds to the receptor in the signal-receiving cell, which initiates ubiquitin ligase-mediated endocytosis of the ligand. In mammals, the mindbomb1 (MIB1) ligase is involved in this process ([Guo et al., 2016](#)). Endocytosis generates a pulling force that induces conformational changes in the receptor, enabling proteolytic cleavage of the NECD by enzymes of the a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family ([Musse et al., 2012; Sprinzak and Blacklow, 2021](#)). The released NECD bound to the ligand is endocytosed into the signal-sending cell. The subsequent proteolytic cleavage of the receptor is catalysed by the γ-secretase complex, which consists of presenilin 1, nicastrin, presenilin enhancer 2 (PEN-2), and anterior pharynx defective 1 (APH-1). This leads to the intracellular release of the NICD and its translocation to the cell nucleus, where it binds to the RBP-J transcription factor. Next, the corepressors associated with



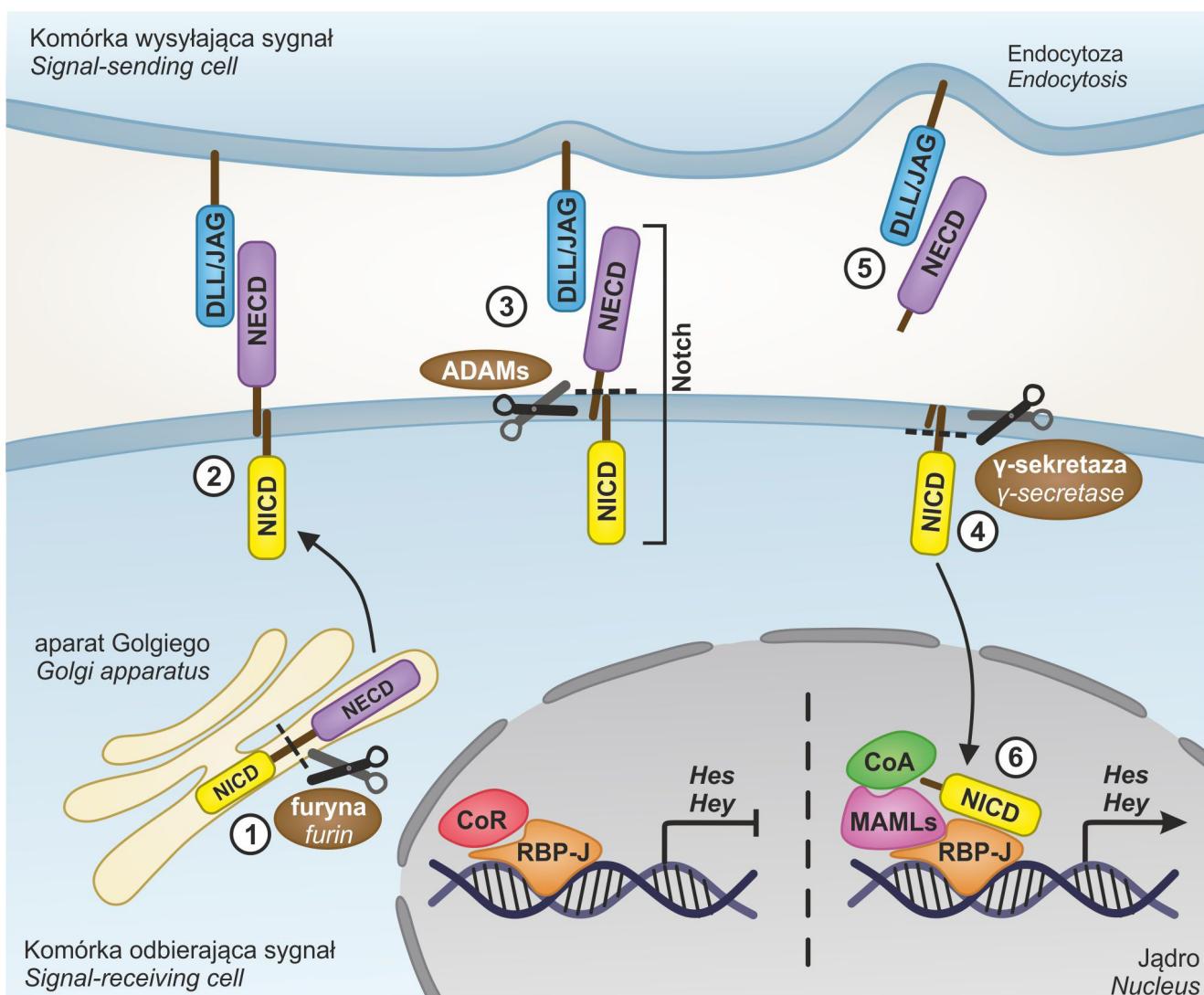
Ryc. 1. Struktura receptorów Notch oraz ligandów Delta/Serrate/LAG2. ANK – domena złożona z powtórzeń ankirynowych, CM – błona komórkowa, CRD – domena bogata z cysteiny, DSL – domena Delta/Serrate/LAG2, EGF-like – motywy o budowie podobnej do nabłonkowego czynnika wzrostu, LNR – sekwencje Lin-12/Notch, NECD – domena zewnętrzkomórkowa receptora Notch, NICD – domena wewnętrzkomórkowa receptora Notch, PEST – sekwencja peptydowa bogata w proline, kwas glutaminowy, serynę i treoninę, PDZL – domena PSD-95/Dlg/ZO-1, RAM – domena wiążąca się z białkiem RBP-J, TAD – domena transaktywująca, TMD – domena transbłonowa.

Fig. 1. Structure of Notch receptors and Delta/Serrate/LAG2 ligands. ANK – ankyrin repeats, CM – cellular membrane, CRD – cysteine rich domain, DSL – Delta/Serrate/Lag2 domain, EGF-like – epidermal growth factor-like repeats, LNR – Lin-12/Notch repeats, NECD – Notch extracellular domain, NICD – Notch intracellular domain, PEST – proline (P), glutamic acid (E), serine (S) and threonine (T) sequence, PDZL – PSD-95/Dlg/ZO-1 ligand, RAM – RBP-J, TAD – transcriptional activation domain, TMD – transmembrane domain.

NICD, która następnie ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym RBP-J. Efektem tej interakcji jest oddysocjowanie związanych z RBP-J korepresorów i jednoczesna rekrutacja koaktywatorów transkrypcji, m.in. białka MAML1 (ang. *mastermind-like protein 1*) (Giaimo i wsp., 2021). Kompleks transkrypcyjny reguluje ekspresję docelowych genów efektorowych szlaku Notch, do których zalicza się m.in. czynniki transkrypcyjne o budowie helisa-pętla-helisa (bHLH, ang. *basic helix-loop-helix*) należące do dwóch rodzin: Hes (ang. *hairy and enhancer of split*) i Hey (ang. *Hes related family bHLH transcription factor with YRPW*

(YRPW) (Fischer and Gessler, 2007) (Figure 2).

RBP-J are dissociated, and the transcription coactivators, including mastermind-like protein 1 (MAML1), are simultaneously recruited (Giaimo et al., 2021). The transcription complex regulates the expression of target effector genes of the Notch pathway, which include transcription factors with a basic helix-loop-helix structure (bHLH) belonging to two families, namely, hairy and enhancer of split (Hes) and Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif (Hey). These proteins act as transcriptional regulators, mainly with repressor characteristics (Fischer and Gessler, 2007) (Figure 2).



Ryc. 2. Mechanizm aktywacji kanonicznego szlaku sygnalowego Notch. Nowo zsyntetyzowany receptor Notch podlega cięciu proteolitycznemu z udziałem furyny w aparacie Golgiego (1), skąd jest transportowany do błony komórkowej (2). Związanie zlokalizowanego w błonie komórki wysyłającej sygnał liganda Delta-like (DLL) lub Jagged (JAG) z receptorem Notch generuje siłę ciągnącą, co skutkuje zmianami konformacyjnymi receptora, umożliwiającymi dwuetapowe cięcie proteolityczne, najpierw przez metaloproteinazy ADAMs (3), a następnie przez kompleks γ -sekretazy (4). Część zewnętrzkomórkowa receptora Notch (NECD) wraz z ligandem ulega endocytozie przez komórkę wysyłającą sygnał (5), a uwolniona domena wewnętrzkomórkowa Notch (NICD) ulega translokacji do jądra komórkowego. Po związaniu NICD z czynnikiem transkrypcyjnym RBP-J następuje oddysocjowanie corepressorów (CoR) i rekrutacja koaktywatorów (CoA) m.in. białek Mastermind-like (MAMLs). Tak powstały kompleks transkrypcyjny reguluje ekspresję genów docelowych, głównie z rodzin Hes oraz Hey (6).

Fig. 2. Mechanism of the canonical Notch signalling activation. The newly synthesized Notch receptor undergoes proteolytic cleavage by a furin protease in the Golgi apparatus (1), from where it is transported to the cell membrane (2). Binding of Delta-like (DLL) or Jagged (JAG) ligand located in the signal-sending cell membrane to the Notch receptor generates a pulling force, which results in conformational changes of the receptor enabling two-step proteolytic cleavage, first by the disintegrin-like and metalloproteinases (ADAMs) (3) and then by the γ -secretase complex (4). Extracellular domain of the Notch receptor (NECD) along with the ligand is endocytosed by the signal-sending cell (5), while released Notch intracellular domain (NICD) is translocated to the cell nucleus. After binding of NICD to the recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region (RBP-J), corepressors (CoRs) are dissociated, whereas coactivators (CoA) – including Mastermind-like proteins (MAMLs) – are recruited. The resulting transcription complex regulates the expression of target genes, mainly from the hairy and enhancer of split (Hes) or Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif (Hey) families (6).

motif). Białka kodowane przez te geny pełnią rolę regulatorów transkrypcji, głównie o właściwościach represorów (Fischer i Gessler, 2007) (Rycina 2).

W przedstawionym powyżej mechanizmie ligand aktywuje receptor obecny w błonie komórki sąsiedniej (ang. *trans-activation*). Opisano jednak także wiązanie liganda z receptorem znajdującym się na powierzchni tej samej komórki (Fleming, 2020). Chociaż oddziaływanie to powoduje zazwyczaj hamowanie aktywacji receptorów Notch (ang. *cis-inhibition*), ostatnie badania

In the mechanism presented above, the ligand activates a receptor present in the membrane of the neighbouring cell (*trans-activation*). However, binding of the ligand to a receptor located on the surface of the same cell has also been described (Fleming, 2020). Although this interaction usually inhibits the activation of Notch receptors (*cis-inhibition*), recent studies have indicated that stimulation of the pathway (*cis-activation*) is also possible (Nandagopal et al., 2019). Moreover, it has been shown that the interplay between two Notch

wskazują też na możliwość aktywacji szlaku (ang. *cis-activation*) ([Nandagopal i wsp., 2019](#)). Wykazano ponadto, że interakcja pomiędzy dwoma receptorami Notch obecnymi w tej samej komórce może wpływać hamującą na ich aktywność ([James i wsp., 2014](#)). W związku z tym nawet niewielka zmiana względnego poziomu ekspresji ligandów i/lub receptorów może wpływać na trans- lub cis-interakcje, a w konsekwencji na przełączanie pomiędzy różnymi stanami aktywności sygnalizacji Notch ([Sprinzak i wsp., 2010](#)).

Poza kanonicznym szlakiem Notch, badania ostatnich dwóch dekad wskazują na możliwość aktywacji tego szlaku w sposób niekanoniczny, w którym transdukcja sygnału zachodzi niezależnie od co najmniej jednego elementu kanonicznego szlaku Notch ([Heitzler, 2010](#)). Wykazano istnienie niekanonicznych ligandów aktywujących szlak Notch, takich jak Dlk-1 (ang. *Delta-like non-canonical Notch ligand 1*), DNER (ang. *Delta/Notch-like EGF-related receptor*), czy JEDI (ang. *Jagged and Delta protein*), które przypominają ligandy Delta-like, ale w swojej budowie nie mają motywu DSL ([D'Souza i wsp., 2010](#)). Opisano też niezależną od wiążania liganda aktywację receptorów Notch oraz interakcję pomiędzy szlakiem Notch a czynnikami transkrypcyjnymi biorącymi udział w innych ścieżkach sygnałowych, m.in. NF-kB (ang. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) i SMAD (ang. *suppressor of mothers against decapentaplegic*) ([Blokzijl i wsp., 2003; Osipo i wsp., 2008; Palmer i Deng, 2015](#)).

receptors present in the same cell can inhibit their activity ([James et al., 2014](#)). Therefore, even a minor change in the relative expression level of ligands and/or receptors can influence trans- or cis-interactions and consequently induce the switch between different states of Notch signalling activity ([Sprinzak et al., 2010](#)).

Research over the past two decades has provided evidence that in addition to canonical Notch signalling, a noncanonical pathway exists in which signal transduction occurs independently of at least one component of canonical Notch signalling ([Heitzler, 2010](#)). The activation of the Notch pathway by noncanonical ligands, such as Delta-like noncanonical Notch ligand 1 (Dlk-1), Delta/Notch-like EGF-related receptor (DNER), or Jagged and Delta protein (JEDI), has been demonstrated. These ligands resemble Delta-like proteins but lack the DSL motif ([D'Souza et al., 2010](#)). Ligand-independent activation of Notch receptors, as well as interactions between the Notch pathway and transcription factors involved in other signalling pathways [such as nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells (NF-kB) and suppressor of mothers against decapentaplegic (SMAD)], have also been described ([Blokzijl et al., 2003; Osipo et al., 2008; Palmer and Deng, 2015](#)).

Lokalizacja komponentów kanonicznego szlaku Notch w gonadzie męskiej ssaków Localization of canonical Notch pathway components in the mammalian male gonad

Pierwsze doniesienia dotyczące ekspresji komponentów szlaku Notch (detekcja mRNA *Notch1*, *Notch3* i *Jag2*) w gonadzie męskiej ssaków pojawiły się pod koniec ubiegłego wieku ([Lardelli i wsp., 1994; Luo i wsp., 1997; Hayashi i wsp., 2001](#)). Dalsze badania potwierdziły obecność mRNA komponentów tego szlaku w jądrach myszy już podczas rozwoju embrionalnego. W płodowych komórkach Sertolego wykazano ekspresję genów *Notch1*, *Hey1*, *HeyL* i *Hes5* ([Tang i wsp., 2008; Garcia i wsp., 2013](#)). Obecność receptora Notch2 została stwierdzona zarówno w komórkach Sertolego, jak i w komórkach Leydiga, ale wzór ekspresji tego białka zmieniał się wraz z rozwojem gonady ([Tang i wsp., 2008; DeFalco i wsp., 2013](#)). W tkance interstycjalnej wykryto też transkrypty *Jag1*, *Notch3* i *Hes1*, a w komórkach śródblonka naczyń płodowych – *Dll4*, *Jag1*, *Jag2*, *Notch1* i *Notch4* ([Tang i wsp., 2008; DeFalco i wsp., 2013; Wen i wsp., 2016](#)). Wykorzystanie transgenicznych myszy, wykazujących ekspresję białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescence protein*) w komórkach z aktywnym szlakiem Notch pozwoliło ustalić, że sygnalizacja ta w płodowym jądrze działa przede wszystkim w komórkach tkanki interstycjalnej oraz komórkach Sertolego, natomiast wyraźnie niższą jej aktywność stwierdzano w komórkach linii płciowej ([DeFalco i wsp., 2013](#)).

The first reports on the expression of Notch pathway genes (*Notch1*, *Notch3*, and *Jag2* mRNA) in mammalian male gonads were published at the end of the 20th century ([Lardelli et al., 1994; Luo et al., 1997; Hayashi et al., 2001](#)). Further studies have confirmed the presence of Notch pathway-related mRNAs in mouse testes during embryonic development. Foetal Sertoli cells have been shown to express *Notch1*, *Hey1*, *HeyL*, and *Hes5* ([Tang et al., 2008; Garcia et al., 2013](#)). The presence of the Notch2 receptor has been found in both Sertoli cells and Leydig cells, and the expression pattern of this protein changes with the development of the testis ([Tang et al., 2008; DeFalco et al., 2013](#)). The transcripts of *Jag1*, *Notch3*, and *Hes1* have also been detected in interstitial tissue, while *Dll4*, *Jag1*, *Jag2*, *Notch1*, and *Notch4* have been detected in foetal perivascular cells ([Tang et al., 2008; DeFalco et al., 2013; Wen et al., 2016](#)). The use of transgenic mice expressing green fluorescence protein (GFP) in cells with an active Notch pathway has demonstrated that this signalling acts primarily in interstitial tissue and Sertoli cells in the foetal testis, and it has significantly lower activity in germ cells ([DeFalco et al., 2013](#)).

Based on immunohistochemical analyses, [Dirami et al. \(2001\)](#) demonstrated the presence of the Notch1,

We wczesnym rozwoju pourodzeniowym myszy, w oparciu o analizy immunohistochemiczne, *Dirami i wsp.* (2001) wykazali w spermatogoniach obecność białek Notch1, Notch2 i Notch3 oraz liganda DLL1. W komórkach Sertolego tych samców wykryto natomiast Notch2 oraz JAG1. Z kolei *Murta i wsp.* (2013) uwidocznili ekspresję Notch3 i DLL4 w spermatogoniach w pierwszych dniach po urodzeniu, zaś obecność Notch1 i Notch2 stwierdzili dopiero w dalszym rozwoju, w komórkach rozpoczynających podział meiotyczny. W komórkach Sertolego tych myszy wykazano immunoekspresję Notch3 i DLL4, zaś w komórkach Leydiga – Notch2, Notch3, DLL1 i DLL4.

W okresie okołodojrzewaniowym oraz w jądrze dojrzałych płciowo myszy i szczurów wykazano ekspresję mRNA *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Dll1*, *Dll4*, *Jag1*, *Jag2*, a także *Hes1*, *Hes2*, *Hes5*, *Hey1* (*Hayashi i wsp.*, 2004c; *Hasegawa i wsp.*, 2012; *Murta i wsp.*, 2013; *Kamińska i wsp.*, 2020b). W komórkach Sertolego wykryto obecność białek Notch1, DLL1, DLL4, JAG1, HES1, HES5 oraz HEY1, natomiast w komórkach plemnikotwórczych dodatkowo stwierdzono ekspresję Notch2, Notch3 oraz Notch4 (*Mori i wsp.*, 2003; *Murta i wsp.*, 2013; *Kamińska i wsp.*, 2018; 2020b). W komórkach Leydiga dojrzałych gryzoni wykazano obecność białek Notch1, Notch2 i Notch3, DLL4, HES1, HES5 i HEY1 (*Sahin i wsp.*, 2005; *Murta i wsp.*, 2013; *Kamińska i wsp.*, 2018; 2020b) (Tabela 1). Ostatnio ustalono też wzór ekspresji komponentów szlaku Notch w jądrach nornicy rudej (*Myodes glareolus*), gryzonii o rozrodcie sezonowym, u którego aktywność rozrodcza uwarunkowana jest długością dnia świetlnego. W komórkach Sertolego i w komórkach plemnikotwórczych obecna była aktywna forma Notch1 oraz białka HES1 i HEY1, natomiast ekspresję Notch2 i Notch3 wykazywały tylko komórki płciowe. Zauważono, że wzrost poziomu ekspresji Notch1 i HEY1, a jednocześnie obniżenie Notch3 i HES1 związane było z ekspozycją nornic na długi fotoperiod, a tym samym z nasileniem aktywności osi podwzgórze-przysadka-jądra (*Lustofin i wsp.*, 2022b).

Należy jednak podkreślić, że dane literaturowe dotyczące rozmieszczenia komponentów szlaku Notch w komórkach gonady męskiej gryzoni nie są spójne. Może to wynikać z wielu czynników, takich jak metody utrwalania i przygotowania tkanek lub komórek do analiz, czy przeciwciała wykorzystane w analizach western blot i immunohistochemicznych. Warto również zaznaczyć, że ekspresja komponentów szlaku Notch podlega dynamicznym zmianom w różnych populacjach komórek gonady męskiej nie tylko w trakcie rozwoju, ale także w cyklu nabłonka plemnikotwórczego u dojrzałych samców gryzoni. *Murta i wsp.* (2013) stwierdzili na przykład, że receptor Notch1 jest obecny w okrągłych spermatydach w stadiach VII–VIII, kiedy komórki te zaczynają się wydłużać, natomiast DLL1 ulega ekspresji tylko w wydłużających się spermatydach w stadiach IX–III.

Obecność białek szlaku Notch potwierdzono także w ludzkim jądrze. Ekspresję Notch2 wykryto w komórkach Sertolego, a DLL3 w prespermatogoniach

Notch2, Notch3, and DLL1 proteins in spermatogonia, as well as the presence of Notch2 and JAG1 proteins in Sertoli cells during early postnatal murine development. However, *Murta et al.* (2013) showed that Notch3 and DLL4 are expressed in spermatogonia in the first days after birth, whereas the presence of Notch1 and Notch2 in germ cells is not detected until the beginning of meiotic division. In these mice, the immunoexpression of Notch3 and DLL4 is detected in Sertoli cells, whereas the expression of Notch2, Notch3, DLL1, and DLL4 is detected in Leydig cells.

The mRNA expression of *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Dll1*, *Dll4*, *Jag1*, *Jag2*, *Hes1*, *Hes2*, *Hes5*, and *Hey1* has been demonstrated in the testes of peripubertal and adult mice and rats (*Hayashi et al.*, 2004c; *Hasegawa et al.*, 2012; *Murta et al.*, 2013; *Kamińska et al.*, 2020b). The Notch1, DLL1, DLL4, JAG1, HES1, HES5, and HEY1 proteins have been detected in both Sertoli and germ cells, while the expression of Notch2, Notch3, and Notch4 has only been detected in germ cells (*Mori et al.*, 2003; *Murta et al.*, 2013; *Kamińska et al.*, 2018; 2020b). The protein expression of Notch1, Notch2, Notch3, DLL4, HES1, HES5, and HEY1 has been reported in the Leydig cells of mature rodents (*Sahin et al.*, 2005; *Murta et al.*, 2013; *Kamińska et al.*, 2018; 2020b) (Table 1). Recently, the expression pattern of Notch pathway components has been determined in the testes of the bank vole (*Myodes glareolus*), a seasonally breeding rodent whose reproductive activity is determined by daylight length; the active forms of the Notch1, HES1, and HEY1 proteins are present in both Sertoli cells and germ cells, while only germ cells express Notch2 and Notch3. Moreover, an increase in the expression of Notch1 and HEY1, as well as a simultaneous decrease in Notch3 and HES1 levels, are associated with the exposure of voles to a long photoperiod and are thus correlated with the activation of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis (*Lustofin et al.*, 2022b).

It should be emphasized, however, that the literature data on the distribution of Notch pathway components in rodent testicular cells are not consistent. This inconsistency may result from many factors, such as methods of cell/tissue fixation and preparation for analyses or antibodies used in western blot and immunohistochemistry. Notably, the expression of Notch pathway components is subject to dynamic changes in various populations of testicular cells, not only during development but also during the seminiferous epithelium cycle in adult rodents. For example, *Murta et al.* (2013) reported that the Notch1 receptor is expressed in round spermatids at stages VII–VIII, when they start to elongate, while DLL1 is expressed only in elongated spermatids at stages IX–III.

The presence of Notch pathway proteins has also been confirmed in the human testis. Notch2 expression has been detected in neonatal Sertoli cells, and DLL3 has been detected in neonatal prespermatogonia (*Sohni et*

Tabela 1. Ekspresja komponentów szlaku Notch w poszczególnych populacjach komórek dojrzałej gonady męskiej gryzoni i człowieka. W jądrze myszy wykryto też mRNA *Dll3* (*Sharma i wsp.*, 2017), a u człowieka i naczelnego mRNA *NOTCH4*, *DLL1*, *DLL3*, *HES1*, *HES2*, *HES4*, *HES6* i *HES7* (*Uhlén i wsp.*, 2015; *Ramaswamy i wsp.*, 2017), jednak nie określono komórkowej lokalizacji tych transkryptów.

Białko	Gryzonie			Człowiek			Bibliografia
	KL	KS	KP	KL	KS	KP	
Notch1	+	+	+	+	+	+	<i>Hayashi i wsp.</i> , 2001; <i>Mori i wsp.</i> , 2003; <i>Sahin i wsp.</i> , 2005; <i>Hasegawa i wsp.</i> , 2012; <i>Murta i wsp.</i> , 2013; <i>Huang i wsp.</i> , 2013; <i>Uhlén i wsp.</i> , 2015; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2018; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2020b; <i>Kumar i wsp.</i> , 2020; <i>Lustofin i wsp.</i> , 2022b
Notch2	+	+*	+		+	+	<i>Mori i wsp.</i> , 2003; <i>Sahin i wsp.</i> , 2005*; <i>Murta i wsp.</i> , 2013; <i>Uhlén i wsp.</i> , 2015; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2020b; <i>Lustofin i wsp.</i> , 2022b
Notch3	+	+*	+	+	+	+	<i>Mori i wsp.</i> , 2003*; <i>Sahin i wsp.</i> , 2005; <i>Murta i wsp.</i> , 2013; <i>Murta i wsp.</i> , 2014; <i>Uhlén i wsp.</i> , 2015; <i>Lustofin i wsp.</i> , 2022b
Notch4			+				<i>Uyttendaele i wsp.</i> , 1996; <i>Mori i wsp.</i> , 2003
DLL1		+	+				<i>Murta i wsp.</i> , 2013; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2020b
DLL4	+	+	+	+			<i>Murta i wsp.</i> , 2013; <i>Murta i wsp.</i> , 2014; <i>Uhlén i wsp.</i> , 2015; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2018; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2020b
JAG1	(+)	+	+	+	+	+	<i>Hasegawa i wsp.</i> , 2012; <i>Murta i wsp.</i> , 2013; <i>Murta i wsp.</i> , 2014; <i>Uhlén i wsp.</i> , 2015; <i>Okada i wsp.</i> , 2016; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2020b; <i>Kumar i wsp.</i> , 2020
JAG2			+	+	+	+	<i>Hayashi i wsp.</i> , 2001; <i>Hasegawa i wsp.</i> , 2012; <i>Uhlén i wsp.</i> , 2015
HES1	+	+	+				<i>Hasegawa i wsp.</i> , 2012; <i>Murta i wsp.</i> , 2013; <i>Uhlén i wsp.</i> , 2015; <i>Garcia i wsp.</i> , 2017; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2020b; <i>Kumar i wsp.</i> , 2020; <i>Lustofin i wsp.</i> , 2022b
HES5	+	+	+				<i>Murta i wsp.</i> , 2013; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2018; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2020b
HEY1	+	+	+				<i>Garcia i wsp.</i> , 2017; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2018; <i>Kamińska i wsp.</i> , 2020b; <i>Lustofin i wsp.</i> , 2022b
HEY2			+				<i>Uhlén i wsp.</i> , 2015
HEYL	(+)		+				<i>Uhlén i wsp.</i> , 2015; <i>Garcia i wsp.</i> , 2017

KL – komórki Leydiga, KS – komórki Sertolego, KP – komórki plemnikotwórcze, + potwierdzona ekspresja białka, (+) potwierdzona tylko ekspresja mRNA, *ekspresja potwierdzona tylko we wskazanych pracach.

Table 1. Expression of Notch pathway components in specific cell populations of the mature male gonad in rodents and humans. *Dll3* mRNA expression was also detected in mouse testis (*Sharma et al.*, 2017), whereas *NOTCH4*, *DLL1*, *DLL3*, *HES1*, *HES2*, *HES4*, *HES6*, and *HES7* mRNA was found in human and primate testis (*Uhlén et al.*, 2015; *Ramaswamy et al.*, 2017), however the cellular localization of these transcripts has not been determined.

Protein	Rodents			Humans			References
	LC	SC	GC	LC	SC	GC	
Notch1	+	+	+	+	+	+	<i>Hayashi et al.</i> , 2001; <i>Mori et al.</i> , 2003; <i>Sahin et al.</i> , 2005; <i>Hasegawa et al.</i> , 2012; <i>Murta et al.</i> , 2013; <i>Huang et al.</i> , 2013; <i>Uhlén et al.</i> , 2015; <i>Kamińska et al.</i> , 2018; <i>Kamińska et al.</i> , 2020b; <i>Kumar et al.</i> , 2020; <i>Lustofin et al.</i> , 2022b
Notch2	+	+*	+		+	+	<i>Mori et al.</i> , 2003; <i>Sahin et al.</i> , 2005*; <i>Murta et al.</i> , 2013; <i>Uhlén et al.</i> , 2015; <i>Kamińska et al.</i> , 2020b; <i>Lustofin et al.</i> , 2022b
Notch3	+	+*	+	+	+	+	<i>Mori et al.</i> , 2003*; <i>Sahin et al.</i> , 2005; <i>Murta et al.</i> , 2013; <i>Murta et al.</i> , 2014; <i>Uhlén et al.</i> , 2015; <i>Lustofin et al.</i> , 2022b
Notch4			+				<i>Uyttendaele et al.</i> , 1996; <i>Mori et al.</i> , 2003
DLL1		+	+				<i>Murta et al.</i> , 2013; <i>Kamińska et al.</i> , 2020b
DLL4	+	+	+	+			<i>Murta et al.</i> , 2013; <i>Murta et al.</i> , 2014; <i>Uhlén et al.</i> , 2015; <i>Kamińska et al.</i> , 2018; <i>Kamińska et al.</i> , 2020b
JAG1	(+)	+	+	+	+	+	<i>Hasegawa et al.</i> , 2012; <i>Murta et al.</i> , 2013; <i>Murta et al.</i> , 2014; <i>Uhlén et al.</i> , 2015; <i>Okada et al.</i> , 2016; <i>Kamińska et al.</i> , 2020b; <i>Kumar et al.</i> , 2020
JAG2			+	+	+	+	<i>Hayashi et al.</i> , 2001; <i>Hasegawa et al.</i> , 2012; <i>Uhlén et al.</i> , 2015
HES1	+	+	+				<i>Hasegawa et al.</i> , 2012; <i>Murta et al.</i> , 2013; <i>Uhlén et al.</i> , 2015; <i>Garcia et al.</i> , 2017; <i>Kamińska et al.</i> , 2020b; <i>Kumar et al.</i> , 2020; <i>Lustofin et al.</i> , 2022b
HES5	+	+	+				<i>Murta et al.</i> , 2013; <i>Kamińska et al.</i> , 2018; <i>Kamińska et al.</i> , 2020b
HEY1	+	+	+				<i>Garcia et al.</i> , 2017; <i>Kamińska et al.</i> , 2018; <i>Kamińska et al.</i> , 2020b; <i>Lustofin et al.</i> , 2022b
HEY2			+				<i>Uhlén et al.</i> , 2015
HEYL	(+)		+				<i>Uhlén et al.</i> , 2015; <i>Garcia et al.</i> , 2017

LC – Leydig cells, SC – Sertoli cells, GC – germ cells, + confirmed protein expression, (+) confirmed mRNA expression only, *expression confirmed only in the indicated papers.

noworodków (*Sohni i wsp.*, 2019). W jądrach dojrzałych mężczyzn w komórkach linii płciowej *Hayashi i wsp.* (2001) opisali obecność białek Notch1 i JAG2. Według danych zmieszczonych w bazie „The Human Protein Atlas” zarówno komórki Sertolego, jak i komórki linii płciowej wykazują ekspresję mRNA i białek Notch1, Notch2, Notch3 i JAG2. Ponadto, w komórkach plemnikotwórczych ujawniono ekspresję białek efektorowych HES5, HEY2 oraz HEYL. W komórkach Leydiga stwierdzono obecność Notch1, Notch3, DLL4, JAG1, JAG2, HEY2 i HEYL. W jądrze wykryto też transkrypty NOTCH4, DLL1, DLL3, HES1 i HES6, jednakże brak dotąd danych dotyczących ekspresji odpowiednich białek. Warto też zauważyć, że białka Notch1, Notch2, DLL4, JAG1, JAG2, HEY2 oraz HEYL ulegają ekspresji w najędrzach dojrzałych mężczyzn (*Uhlén i wsp.*, 2015).

Rola szlaku sygnałowego Notch w gonadzie męskiej Role of Notch signalling in the male gonad

Chociaż już w pierwszych latach XXI w. uzyskano modele mysie z delecją genów kodujących poszczególne ligandy, receptory i geny efektorowe szlaku Notch, rola tego szlaku w gonadzie męskiej pozostawała przez długi czas trudna do ustalenia. Wynikało to w znacznej mierze z pewnej redundancji tych białek i związanej z tym możliwości działania kompensacyjnego w przypadku wyłączenia funkcji pojedynczych komponentów szlaku (*Luna-Escalante i wsp.*, 2018). U myszy z całkowitym nokautem pojedynczych genów kodujących receptory Notch3 i Notch4 lub białka efektorowe HES5, HEY1 i HEYL nie obserwowano zaburzeń rozwoju, ani funkcji gonady męskiej (*Ohtsuka i wsp.*, 1999; *Krebs i wsp.*, 2000; 2003; *Fischer i wsp.*, 2004; 2007). Nieprawidłowości nie stwierdzono też w gonadzie samców myszy z selektywnym nokautem *Notch1* w komórkach Sertolego lub komórkach linii płciowej (*Batista i wsp.*, 2012; *Huang i wsp.*, 2013).

W przypadku całkowitego nokautu genów *Notch1*, *Notch2*, *Jag1*, *Jag2*, *Dll1*, *Dll3*, *Dll4*, *Hes1*, *Hes7* i *Hey2* niemożliwa była ocena funkcji rozrodczych samców, ponieważ myszy wykazywały fenotyp letalny w okresie embryonalnym lub przeddojrzewaniowym (*Swiatek i wsp.*, 1994; *Ishibashi i wsp.*, 1995; *Jiang i wsp.*, 1998; *Hamada i wsp.*, 1999; *Xue i wsp.*, 1999; *Bessho i wsp.*, 2001; *Donovan i wsp.*, 2002; *Dunwoodie i wsp.*, 2002; *Duarte i wsp.*, 2004; *Fischer i wsp.*, 2007; *Sörensen i wsp.*, 2009). Zauważono jednak, że delecja *Hes1* wiązała się ze wzrostem liczbą komórek Leydiga oraz utratą komórek linii płciowej w płodowym jądrze (*Tang i wsp.*, 2008). Również warunkowy nokaut *Notch2* w komórkach somatycznych gonady prowadził do zwiększenia liczby komórek Leydiga w jądrach noworodków myszy (*Liu i wsp.*, 2016). Obserwacje te wskazywały na możliwość udziału szlaku Notch w rozwoju tkanki interstycjalnej jądra. Dalsze badania potwierdziły znaczenie sygnalizacji Notch w procesie różnicowania się płodowej populacji komórek Leydiga. Nie tylko wspomniana delecja genów *Hes1* i *Notch2*, ale też

al., 2019). *Hayashi et al.* (2001) evaluated the expression of the Notch1 and JAG2 proteins in germ cells in the testes of adult men. According to the Human Protein Atlas (HPA) database, Notch1, Notch2, Notch3, and JAG2 mRNA and protein expression are present in both Sertoli cells and germ cells. In addition, HES5, HEY2, and HEYL effector proteins are expressed in germ cells, whereas Notch1, Notch3, DLL4, JAG1, JAG2, HEY2, and HEYL are expressed in Leydig cells. NOTCH4, DLL1, DLL3, HES1, and HES6 transcripts have also been detected in human testes, but data regarding the expression of the corresponding proteins is not available. Notably, the Notch1, Notch2, DLL4, JAG1, JAG2, HEY2, and HEYL proteins are expressed in the epididymis of adult men (*Uhlén et al.*, 2015).

Although mouse models with the deletion of genes encoding individual ligands, receptors, and effector genes of the Notch pathway were generated at the beginning of the 21st century, the role of this pathway in the male gonad remains unclear. This is largely due to a certain redundancy of these proteins and the possibility of compensatory action when the functions of individual components of the pathway are deleted (*Luna-Escalante et al.*, 2018). In mice with complete knockout of single genes encoding the Notch3 and Notch4 receptors or the HES5, HEY1, and HEYL effector proteins, no disturbances in the development or function of the male gonad are observed (*Ohtsuka et al.*, 1999; *Krebs et al.*, 2000; 2003; *Fischer et al.*, 2004; 2007). Abnormalities have not been detected in the gonads of male mice with selective knockout of *Notch1* in Sertoli cells or germ cells (*Batista et al.*, 2012; *Huang et al.*, 2013).

Complete knockout of the *Notch1*, *Notch2*, *Jag1*, *Jag2*, *Dll1*, *Dll3*, *Dll4*, *Hes1*, *Hes7*, and *Hey2* genes makes it impossible to assess the reproductive function of males because the mice show a lethal phenotype during the embryonic or prepubertal period (*Swiatek et al.*, 1994; *Ishibashi et al.*, 1995; *Jiang et al.*, 1998; *Hamada et al.*, 1999; *Xue et al.*, 1999; *Bessho et al.*, 2001; *Donovan et al.*, 2002; *Dunwoodie et al.*, 2002; *Duarte et al.*, 2004; *Fischer et al.*, 2007; *Sörensen et al.*, 2009). However, *Hes1* deletion is associated with an increase in the number of Leydig cells and a loss of germ cells in the foetal testis (*Tang et al.*, 2008). Additionally, conditional knockout of *Notch2* in somatic cells of the testis leads to an increase in Leydig cell number in newborn mice (*Liu et al.*, 2016). These observations indicate that the Notch pathway is involved in the development of interstitial tissue in the testis. Further studies have confirmed the importance of Notch signalling in the differentiation of foetal Leydig cells. Both the

zahamowanie aktywności szlaku Notch poprzez zastosowanie inhibitora γ -sekretazy powodowało wzrost liczby komórek Leydiga w płodowych jądrach. Przeciwnie, konstytutywna aktywacja sygnalizacji Notch w somatycznych komórkach progenitorowych gonad skutkowała zmniejszeniem populacji komórek Leydiga, a jednocześnie wzrostem liczby niezróżnicowanych komórek mezenchymalnych. Obserwacje te wskazywały, że aktywna sygnalizacja Notch ogranicza różnicowanie płodowych komórek Leydiga ([Tang i wsp., 2008](#)). Kolejne prace dowiodły, że za aktywację szlaku Notch w progenitorach komórek Leydiga odpowiada ligand JAG1, ulegający ekspresji w okołonaczyniowych komórkach śródmiąższych ([DeFalco i wsp., 2013](#)). Zauważono ponadto zależność ekspresji JAG1 od poziomu testosteronu. Wysokie stężenie tego hormonu indukowało ekspresję JAG1 w tkance śródmiążsowej, co uruchamiało sygnalizację Notch, tym samym hamując różnicowanie komórek progenitorowych. Niski poziom testosteronu wiązał się natomiast z inhibicją sygnalizacji Notch i wzmożonym różnicowaniem płodowych komórek Leydiga wytwarzających androgeny. Opisany mechanizm ma zatem charakter ujemnego sprzężenia zwrotnego, które warunkuje utrzymanie równowagi między zróżnicowanymi płodowymi komórkami Leydiga a ich progenitorami ([DeFalco i wsp., 2013](#)). Dalsze badania wykazały, że aktywacja receptora Notch2 w okołonaczyniowych komórkach mezenchymalnych przez śródłonkowe ligandy (prawdopodobnie DLL4) utrzymuje pulę progenitorów zapewniając ich samoodnowę lub utrzymanie stanu niezróżnicowanego. Obserwacje te wskazują na udział szlaku Notch w interakcji między komórkami śródłonka a okołonaczyniowymi progenitorami komórek Leydiga ([Kumar i DeFalco, 2018](#)).

Wyniki doświadczeń w układach *in vitro* sugerują, że sygnalizacja Notch może być też zaangażowana w regulację rozwoju i funkcji dorosłej populacji komórek Leydiga. Stwierdzono, że inhibicja aktywności szlaku Notch w mysiej linii komórek Leydiga TM3 spowodowała zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 i zahamowanie proliferacji tych komórek ([Lu i wsp., 2019](#)). Kilka prac wskazuje też na udział sygnalizacji Notch w kontroli steroidogenezy. [George i wsp. \(2015\)](#) wykazali, że aktywacja receptorów Notch ogranicza syntezę steroidów w linii nowotworowej komórek Leydiga MA-10. Przeciwny efekt aktywacji szlaku Notch opisali natomiast [Zhang i wsp. \(2023\)](#) w linii komórkowej TM3. Eksperymentalna nadekspresja *Notch1* w tych komórkach nasilała ekspresję enzymów steroidogennych oraz białek StAR (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*) i SF1 (ang. *steroidogenic factor 1*), nadekspresja *Notch3* wiązała się ze wzrostem poziomu transkryptu *Star*, a zastosowanie inhibitora szlaku Notch obniżyło ekspresję białek steroidogennych. Należy jednak zauważyć, że zahamowanie aktywności szlaku Notch *in vivo*, wywołane długotrwałą ekspozycją myszy na inhibitor γ -sekretazy DAPT (ang. *N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester*), nie miało wpływu na stężenie testosteronu w surowicy dojrzałych samców myszy ([Murta i wsp., 2014](#)).

abovementioned deletion of the *Hes1* and *Notch2* genes, as well as the blockade of Notch pathway activity using a γ -secretase inhibitor, result in an increase in the number of Leydig cells in the foetal testes. In contrast, constitutive activation of Notch signalling in gonadal somatic progenitors results in a reduction in the Leydig cell population while increasing the number of undifferentiated mesenchymal cells. These observations indicate that active Notch signalling limits the differentiation of foetal Leydig cells ([Tang et al., 2008](#)). Subsequent research has shown that the JAG1 ligand, which is expressed in perivascular interstitial cells, is responsible for the activation of the Notch pathway in Leydig cell progenitors ([DeFalco et al., 2013](#)). Moreover, a relationship between JAG1 expression and testosterone levels has been observed. High concentrations of this hormone induce JAG1 expression in the interstitium, which triggers Notch signalling, thereby inhibiting progenitor cell differentiation. Low testosterone levels are associated with inhibition of Notch signalling and increased differentiation of foetal androgen-producing Leydig cells. The described negative feedback mechanism determines the maintenance of the balance between differentiated foetal Leydig cells and their progenitors ([DeFalco et al., 2013](#)). Further studies have shown that activation of the Notch2 receptor in perivascular mesenchymal cells by endothelial ligands (probably DLL4) maintains the progenitor pool, ensuring their self-renewal or maintenance of an undifferentiated state. These observations indicate the involvement of the Notch pathway in the interaction between endothelial cells and perivascular Leydig cell progenitors ([Kumar and DeFalco, 2018](#)).

In vitro eksperymenty sugerują, że sygnalizacja Notch może być również zaangażowana w regulację rozwoju i funkcji komórek Leydig w dorosłym organizmie. Inhibicja aktywności szlaku Notch w myszej linii komórek Leydiga TM3 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 i zahamowanie proliferacji tych komórek ([Lu et al., 2019](#)). Wielu badań wykazało, że aktywacja receptorów Notch ogranicza syntezę steroidów w linii nowotworowej komórek Leydiga MA-10. Przeciwny efekt aktywacji szlaku Notch opisali natomiast [George et al. \(2015\)](#) w linii komórkowej TM3. Eksperymentalna nadekspresja *Notch1* w tych komórkach nasilała ekspresję enzymów steroidogennych oraz białek StAR (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*) i SF1 (ang. *steroidogenic factor 1*), nadekspresja *Notch3* wiązała się ze wzrostem poziomu transkryptu *Star*, a zastosowanie inhibitora szlaku Notch obniżyło ekspresję białek steroidogennych. Należy jednak zauważyć, że zahamowanie aktywności szlaku Notch *in vivo*, wywołane długotrwałą ekspozycją myszy na inhibitor γ -sekretazy DAPT (ang. *N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester*), nie miało wpływu na stężenie testosteronu w surowicy dojrzałych samców myszy ([Murta i wsp., 2014](#)).

W oparciu o dotychczas uzyskane dane znaczenie aktywności szlaku Notch w komórkach Leydiga w okresie pourodeniowym i w dojrzałym jądrze pozostaje zatem wciąż niejasne. Warto też zaznaczyć, że białka DSL ulegające ekspresji w komórkach Leydiga mogą potencjalnie pełnić regulacyjną rolę w biosyntezie androgenów, działając w sposób niezależny od aktywacji sygnalizacji Notch. Stwierdzono bowiem, że nadekspresja wewnętrzkomórkowej domeny JAG1 w mysich komórkach Leydiga tłumila ekspresję genów kodujących białka steroidogenne, w konsekwencji obniżając produkcję testosteronu (Kumar i wsp., 2020).

Przeżywanie, proliferacja oraz różnicowanie komórek linii płciowej podczas rozwoju osobniczego, a także w trakcie spermatogenezy w dojrzałym jądrze, są precyzyjnie kontrolowane przez somatyczne komórki nabłonka nasiennego, jakimi są komórki Sertolego (Thumfart i Mansuy, 2023). Jednocześnie komórki plemnikotwórcze wpływają na szereg aspektów funkcjonowania komórek Sertolego. Ze względu na ścisły fizyczny kontakt między obydwoma typami komórek we wzajemne oddziaływanie zaangażowane są nie tylko wydzielane przez te komórki czynniki parakrynowe, ale także bezpośrednie interakcje międzykomórkowe, takie jak połączenia szczelinowe oraz komunikacja jukstakrynowa (Kidder i Cyr, 2016; Hofmann i McBeath, 2022).

Dowód na udział szlaku Notch w kontroli nabłonka plemnikotwórczego ssaków dostarczył cykl doświadczeń z wykorzystaniem transgenicznych myszy z konstytutywną ekspresją wewnętrzkomórkowej domeny receptora Notch1 (N1ICD, ang. *Notch1 intracellular domain*) oraz myszy z nokautem genu *Rbpj* (kodującego kluczowy mediator kanonicznego szlaku Notch) w komórkach Sertolego (Garcia i wsp., 2013; 2014; 2017; Garcia i Hofmann, 2013). Zauważono, iż komórki Sertolego myszy z konstytutywną ekspresją N1ICD, mimo prawidłowej morfologii w okresie płodowym, wykazywały defekty funkcjonalne, które przyczyniały się do przedwcześniego różnicowania gonocytów, a następnie ich apoptozy. Prowadziło to do utraty komórek linii płciowej tuż po urodzeniu, i w konsekwencji późniejszej bezpotędności tych samców. Analizy molekularne wykazały, że nasilona aktywność receptora Notch1 w komórkach Sertolego powodowała represję genu *Gdnf*, kodującego glejopochodny czynnik neurotroficzny (GDNF, ang. *glial cell-derived neurotrophic factor*) (kontrolujący zdolność spermatoginalnych komórek macierzystych do samo-odnowy) oraz genu *Cyp26b1*, kodującego enzym inaktywujący kwas retinowy (niezbędny do inicjacji mejozy) (Garcia i wsp., 2013; Garcia i Hofmann, 2013). Przeciwnie, nokaut genu *Rbpj* w komórkach Sertolego prowadził do zwiększonej ekspresji *Gdnf* i *Cyp26b1* oraz znacznego wzrostu liczby przed- i pomejotycznych komórek płciowych. Skutkiem tego był początkowy wzrost objętości gonad, a później ich niewydolność i atrofia (Garcia i wsp., 2014). Wyniki opisanych badań ujawniły zatem decydującą rolę sygnalizacji Notch w utrzymaniu niszy spermatoginalnych komórek macierzystych poprzez

t-butyl ester (DAPT) γ -secretase inhibitor has no effect on serum testosterone concentrations in mature males (Murta et al., 2014).

Based on the data obtained thus far, the significance of Notch pathway activity in Leydig cells in the postnatal period and in the mature testis is still unclear. Notably, DSL proteins expressed in Leydig cells may play a regulatory role in androgen biosynthesis, acting independently of the activation of Notch signalling. Overexpression of the intracellular domain of JAG1 in mouse Leydig cells suppresses the expression of genes encoding steroidogenic proteins, consequently reducing testosterone production (Kumar et al., 2020).

The survival, proliferation, and differentiation of germ cells during testis development and in the mature male gonad are precisely controlled by somatic cells of the seminiferous epithelium, namely, Sertoli cells (Thumfart and Mansuy, 2023). Moreover, germ cells influence the function of Sertoli cells. Due to the close physical contact between both types of cells, mutual interactions involve not only paracrine factors secreted by these cells but also direct intercellular interactions, such as gap junctions and juxtacrine communication (Kidder and Cyr, 2016; Hofmann and McBeath, 2022).

Evidence for the involvement of the Notch pathway in the control of mammalian spermatogenic epithelium has been provided by a series of experiments using transgenic mice with constitutive expression of the Notch1 intracellular domain (N1ICD) and mice with knockout of the *Rbpj* gene (encoding a key mediator of the canonical Notch pathway) in Sertoli cells (Garcia et al., 2013; 2014; 2017; Garcia and Hofmann, 2013). Despite normal morphology in the foetal period, Sertoli cells from mice with constitutive N1ICD expression exhibit functional defects that contribute to the premature differentiation of gonocytes and their apoptosis, resulting in the loss of germ cells shortly after birth and subsequent infertility. Molecular analyses have demonstrated that increased activity of the Notch1 receptor in Sertoli cells leads to the repression of the *Gdnf* gene, encoding glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) (which controls spermatogonial stem cell self-renewal), and the *Cyp26b1* gene, encoding retinoid acid-inactivating enzyme (retinoic acid is necessary for the initiation of meiosis) (Garcia et al., 2013; Garcia and Hofmann, 2013). In contrast, *Rbpj* knockout in Sertoli cells leads to the upregulation of *Gdnf* and *Cyp26b1*, as well as a significant increase in the number of pre- and postmeiotic germ cells, which initially results in an increase in gonadal volume followed by testicular failure and atrophy (Garcia et al., 2014).

The results of these studies reveal a key role of Notch signalling in maintaining the spermatogonial stem cell niche by regulating the expression of factors controlling self-renewal and differentiation. Further experiments have confirmed the involvement of the

regulację ekspresji czynników kontrolujących samo-odnowę i różnicowanie tych komórek. Dalsze prace potwierdziły udział białek efektorowych szlaku Notch HES1 i HEY1 w regulacji ekspresji GDNF i CYP26B1 w komórkach Sertolego. Dowiodły ponadto znaczenia białka JAG1, ulegającego ekspresji w niezróżnicowanych spermatogoniach typu A, w kontroli aktywności szlaku Notch w komórkach Sertolego, także u dojrzałych płciowo samców (Garcia i wsp., 2017; Parekh i wsp., 2019). Według ostatnich doniesień szlak Notch współdziała z sygnalizacją czynnika martwicy nowotworu α (TNFa, ang. *tumor necrosis factor α*) w regulacji produkcji czynnika GDNF przez komórki Sertolego (Di Persio i wsp., 2021).

Kolejne prace przyczyniły się do ujawnienia roli szlaku Notch w regulacji sygnalizacji androgenowej i białek bariery krew–jądro w komórkach Sertolego. Wykazano bowiem, że zablokowanie aktywności szlaku Notch prowadzi do wzrostu ekspresji jądrowych oraz błonowych receptorów androgenowych, tj. AR (ang. *androgen receptor*) i ZIP9 (ang. *Zrt- and Irt-like protein 9*), w mysiej linii komórek Sertolego TM4 (Kamińska i wsp., 2020c). Opisano również specyficzną rolę dwóch ligandów szlaku Notch, JAG1 i DLL1, w zależnej od ZIP9 i AR regulacji ekspresji białek bariery krew–jądro, klaudyny 5 i klaudyny 11. W odpowiedzi na aktywację szlaku Notch przez JAG1 dochodziło do obniżenia poziomu klaudyny 5, co korelowało ze spadkiem ekspresji ZIP9. Natomiast ekspozycja komórek na DLL1 spowodowała obniżenie ekspresji klaudyny 11, któremu towarzyszyła redukcja poziomu AR. Udział obu receptorów androgenowych w tym mechanizmie potwierdzono wykorzystując technikę wyciszania ekspresji genów (Kamińska i wsp., 2020c). Co więcej, w komórkach Sertolego wykazano ostatnio możliwość bezpośrednich interakcji efektora szlaku Notch, HEY1, z promotorem genu *Ar* oraz białkiem AR (Kamińska i wsp., 2024). Warto zauważyć, że ekspresja klaudyny 11 w kanaliku nasiennym gryzoni jest regulowana przez antagonistyczne działanie testosteronu (który aktywując AR, stymuluje ekspresję tego białka) oraz pomejotycznych komórek płciowych (negatywnie regulujących poziom klaudyny 11) (Florin i wsp., 2005). Można zatem postawić hipotezę, że hamujący wpływ pomejotycznych komórek płciowych na ekspresję klaudyny 11, wynika – przynajmniej w pewnym stopniu – z udziału obecnego w wydłużających się spermatydach liganda DLL1 w aktywacji szlaku Notch w komórkach Sertolego.

Ostatnio zaproponowano też rolę sygnalizacji Notch w kontroli metabolizmu komórek Sertolego. Xu i wsp. (2022) przedstawili dowody na zaangażowanie szlaku Notch w regulację glikolizy i produkcji mleczanów w tych komórkach. Interesujące wyniki, wskazujące na znaczenie szlaku Notch w mechanizmach molekularnych związanych z tolerancją immunologiczną zależną od komórek Sertolego, uzyskali Campese i wsp. (2014). Stwierdzili oni udział rozpuszczalnej formy liganda JAG1, wydzielanej przez komórki Sertolego, w aktywacji szlaku Notch w limfocytach, co przyczynia się do ich konwersji w komórki T regulatorowe.

HES1 and HEY1 Notch pathway effector proteins in the regulation of GDNF and CYP26B1 expression in Sertoli cells. The importance of the JAG1 protein, which is expressed in undifferentiated type A spermatogonia, has also been demonstrated in the control of Notch pathway activity in Sertoli cells in sexually mature males (Garcia et al., 2017; Parekh et al., 2019). Recently, the interaction of the Notch pathway with tumour necrosis factor α (TNFa) signalling in the regulation of GDNF production by Sertoli cells has been reported (Di Persio et al., 2021).

A study focusing on the role of the Notch pathway in the regulation of androgen signalling and blood–testis barrier proteins in Sertoli cells has demonstrated that blocking Notch pathway activity leads to the upregulation of nuclear and membrane androgen receptors, i.e., the androgen receptor (AR) and Zrt- and Irt-like protein 9 (ZIP9), in the mouse TM4 Sertoli cell line (Kamińska et al., 2020c). The specific role of JAG1 and DLL1 in the ZIP9- and AR-dependent regulation of the expression of claudin 5 and claudin 11, blood–testis barrier proteins, has also been documented. Activation of the Notch pathway by JAG1 reduces claudin 5 expression, which correlates with a decrease in ZIP9 expression. Exposure of Sertoli cells to DLL1 decreases the expression of claudin 11, which is accompanied by a reduction in the level of AR. Gene silencing experiments have confirmed the involvement of both androgen receptors in this regulation (Kamińska et al., 2020c). Moreover, physical interactions between the HEY1 Notch effector and the promoter of the *Ar* gene or AR protein have been recently reported in Sertoli cells (Kamińska et al., 2024). Notably, the expression of claudin 11 in the seminiferous tubules of rodents is regulated by the antagonistic effect of testosterone (which stimulates the expression of this protein by activating the AR) and postmeiotic germ cells (which negatively regulate the expression of claudin 11) (Florin et al., 2005). Therefore, it can be hypothesized that the inhibitory effect of postmeiotic germ cells on the expression of claudin 11 results—at least to some extent—from the presence of the DLL1 ligand in elongating spermatids and the activation of the Notch pathway in Sertoli cells.

Recently, a role for Notch signalling in the control of Sertoli cell metabolism has also been proposed. Xu et al. (2022) reported the involvement of the Notch pathway in the regulation of glycolysis and lactate production in these cells. Interestingly, Campese et al. (2014) suggested the importance of the Notch pathway in molecular mechanisms related to Sertoli cell-dependent immune tolerance; they demonstrated that the soluble form of JAG1 secreted by Sertoli cells activates the Notch pathway in lymphocytes, leading to their conversion into regulatory T cells.

In addition to the role of Notch signalling in Sertoli cells, the role of the Notch pathway in the direct control of germ cell fate has also been described. Mice with

W nabłonku plemnikotwórczym poza działaniem sygnalizacji Notch w komórkach Sertolego, opisano też rolę tego szlaku w bezpośredniej kontroli losów komórek linii płciowej. Myszy z warunkową aktywacją N1ICD w tych komórkach wykazywały postępujące z wiekiem osłabienie spermatogenezy, zmniejszenie masy jąder i liczby plemników. U samców tych wykryto wzrost ekspresji genu efektorowego *Hes5* oraz nasilenie apoptozy komórek plemnikotwórczych. Sugeruje to, że sygnalizacja Notch w męskich komórkach płciowych jest istotna dla ich przeżywania i różnicowania (Huang i wsp., 2013). Udział szlaku Notch w kontroli losów komórek linii płciowej został też stwierdzony w gonadzie męskiej ryb i ptaków (Zuo i wsp., 2018; Moreno Acosta i wsp., 2023).

Należy zaznaczyć, że wobec niektórych obserwacji fizjologiczne znaczenie aktywacji szlaku sygnałowego Notch w komórkach plemnikotwórczych pozostaje wciąż niejasne. W oparciu o doświadczenia z wykorzystaniem transgenicznych myszy, wykazujących ekspresję GFP w komórkach z aktywną sygnalizacją Notch, Garcia i wsp. (2013) stwierdzili, że kanoniczny szlak sygnałowy Notch jest aktywny w gonadzie męskiej w okresie okołoporodowym wyłącznie w komórkach Sertolego. Co więcej, wyniki najnowszych badań Sambe i wsp. (2023) z zastosowaniem trzech transgenicznych linii myszy sugerują, że sygnalizacja z udziałem receptora Notch1 nie wpływa na rozwój męskich komórek płciowych. Stąd też konieczność podjęcia dalszych prac, które pozwolą jednoznacznie ustalić rolę szlaku Notch i jego poszczególnych komponentów w komórkach spermatogenezy.

Niemniej jednak wyniki doświadczeń *in vivo* z wykorzystaniem inhibitora γ-sekretazy DAPT pokazały, iż ograniczenie aktywności szlaku Notch u dojrzałych płciowo myszy prowadzi do nieprawidłowości morfologicznych i funkcjonalnych gonady męskiej. Blokada sygnalizacji Notch zaburzała bowiem wzór ekspresji białek tego szlaku w jądrach i przebieg spermatogenezy, a także indukowała defekty morfologiczne plemników najadrzowych (Murta i wsp., 2014). Powstawanie komórek wielojadrzastych i wzmożona apoptoza komórek płciowych przechodzących końcowe etapy podziału meiotycznego mogą wskazywać na udział sygnalizacji Notch w regulacji mejozy. Zakłócenia procesu wydłużania spermatyd i przedwczesne uwalnianie tych komórek do światła kanalików nasieniowych mogą natomiast świadczyć o roli szlaku Notch w kontroli adhezji spermatyd do komórek Sertolego (Murta i wsp., 2014). Wpływ sygnalizacji Notch na ekspresję białek zaangażowanych w regulację apoptozy komórek plemnikotwórczych (Fas, ang. *Fas cell surface death receptor*; FasL, ang. *Fas ligand*; BCL-2, ang. *BCL-2 apoptosis regulator*; BAX, ang. *BCL-2 associated X apoptosis regulator*) oraz w kontrole formowania apikalnych specjalizacji powierzchniowych w przebiegu spermiogenezy (nektyna-2; afadyna; ARP2, ang. *actin-related protein 2*; EPS8, ang. *epidermal growth factor receptor pathway substrate 8*) potwierdzają wyniki najnowszych badań (Kamińska i wsp., 2024). Warto wspomnieć, że u myszy ograniczenie sygnalizacji

conditional activation of N1ICD in germ cells exhibit progressive impairment of spermatogenesis and decreased testicular weight and sperm number, while increased expression of *Hes5* and enhanced germ cell apoptosis are detected in their testes. These observations suggest that Notch signalling in male germ cells is important for their survival and differentiation (Huang et al., 2013). The involvement of the Notch pathway in the control of germ cell fate has also been demonstrated in the male gonads of fish and birds (Zuo et al., 2018; Moreno Acosta et al., 2023).

Despite the abovementioned findings, the physiological significance of Notch signalling pathway activation in male germ cells remains unclear. Based on experiments using transgenic mice expressing GFP in cells with active Notch signalling, Garcia et al. (2013) detected the activity of the canonical Notch signalling pathway only in Sertoli cells in perinatal male gonad. Based on research using three transgenic mouse lines, Sambe et al. (2023) suggested that Notch1 signalling is not necessary for the development of male germ cells. Hence, further work that clearly determines the role of the Notch pathway and its individual components in germ cells is needed.

In vivo experiments have shown that suppression of Notch pathway activity in sexually mature mice with the DAPT γ-secretase inhibitor leads to morphological and functional abnormalities of the male gonad, resulting in disrupted testicular expression patterns of Notch pathway proteins, spermatogenesis disorders, and morphological abnormalities of epididymal sperm (Murta et al., 2014). The formation of multinucleated cells and increased apoptosis of germ cells undergoing the final stages of meiotic division in these males may indicate the involvement of Notch signalling in the regulation of meiosis. Disturbances in the process of spermatid elongation and premature release of these cells into the lumen of the seminiferous tubules point to the role of the Notch pathway in controlling the adhesion of spermatids to Sertoli cells (Murta et al., 2014). Recent studies have confirmed the role of Notch signalling in the regulation of proteins involved in the control of germ cell apoptosis (Fas cell surface death receptor, Fas ligand, BCL-2 apoptosis regulator, and BCL-2 associated X apoptosis regulator BAX) and the formation of apical ectoplasmic specializations during spermiogenesis (nectin-2, afadin, actin-related protein 2, and epidermal growth factor receptor pathway substrate 8) (Kamińska et al., 2024).

In mice, inhibition of Notch signalling activity *in vivo* disrupts the expression pattern of Notch pathway components in the epididymal epithelium and epididymal spermatozoa, as well as significantly reduces sperm motility. However, these males are fertile, which may be explained by the partial blockade of Notch signalling observed in this experimental model (Murta et al., 2016).

Notch *in vivo* zaburzało też wzór ekspresji komponentów szlaku Notch w nabłonku najadrza i plemnikach najadrzowych oraz znacząco zmniejszało ruchliwość plemników. Nie stwierdzono jednak spadku płodności tych samców, co – według autorów – można tłumaczyć jedynie częściową blokadą sygnalizacji Notch uzyskaną w tym modelu doświadczalnym ([Murta i wsp., 2016](#)).

Znaczenie sygnalizacji Notch dla męskiej płodności może wynikać z udziału tego szlaku w rozwoju i funkcji sieci jądra, przewodzików wyprowadzających oraz najadrza. [Lupien i wsp. \(2006\)](#) zauważyli, że transgeniczna ekspresja konstytutywnie aktywnej formy receptora Notch1 w jądrze, najadrzu i nasieniowodzie prowadzi do nieprawidłowego różnicowania i hiperplazji nabłonka przewodzików wyprowadzających i przewodu najadrza, czego konsekwencją jest zaburzony rozwój przewodzików wyprowadzających, ich niedrożność oraz bezpłodność. Z kolei u samców myszy z mutacją genu *Lfng* (ang. *lunatic fringe*) – kodującego glikozylotransferazę zaangażowaną w potranslacyjną modyfikację receptorów Notch – stwierdzano brak połączenia między siecią jądra a przewodzikami wyprowadzającymi, co świadczyć może o roli szlaku Notch w rozwoju tych struktur ([Hahn i wsp., 2009](#)). Na taką możliwość wskazują też obserwacje, że szlak Notch reguluje w komórkach plemnikotwórczych myszy produkcję czynnika wzrostu fibroblastów 4 (FGF4, ang. *fibroblast growth factor 4*), który – oddziałując na drodze lumikrynowej – warunkuje prawidłowy rozwój sieci jądra ([Cao i wsp., 2022](#)).

Podsumowując, wyniki dotychczasowych badań wskazują, że utrzymanie prawidłowej aktywności szlaku Notch w płodowym jądrze ssaków kontroluje rozwój populacji płodowych komórek Leydig'a oraz warunkuje losy komórek linii płciowej, a także wpływa na formowanie sieci jądra i przewodzików wyprowadzających. W rozwoju pourodzeniowym oraz dojrzałej gonadzie męskiej opisano znaczenie sygnalizacji Notch w regulacji steroidogenezy, kontroli funkcji komórek Sertolego, utrzymaniu niszy spermatoginalnych komórek macierzystych, przebiegu mejozy i spermogenezy, a także parametrów funkcjonalnych plemników. Dostępne dane są jednak w znacznej mierze fragmentaryczne, a tym samym udział szlaku Notch w kontroli wymienionych procesów wymaga potwierdzenia w toku dalszych badań.

The importance of Notch for male fertility may result from the involvement of this pathway in the development and function of the rete testis, efferent ductules, and epididymis. [Lupien et al. \(2006\)](#) noted that transgenic expression of a constitutively active form of the Notch1 receptor in the testis, epididymis, and vas deferens leads to disrupted differentiation and hyperplasia of the efferent ductules and epididymal epithelium, resulting in impaired development and obstruction of the efferent ductules, as well as infertility. In male mice with a mutation of the *Lfng* gene (encoding a glycosyltransferase involved in the posttranslational modification of Notch receptors), the connection between the rete testis and the efferent ductules is lacking, which may indicate the role of Notch in the development of these structures ([Hahn et al., 2009](#)). This finding is also supported by the observation that the Notch pathway in germ cells controls the production of fibroblast growth factor 4 (FGF4), which acts as a lumicrine factor that governs the development of the rete testis ([Cao et al., 2022](#)).

In summary, these results indicate that maintaining the proper activity of the Notch pathway in the foetal testis controls the development of the foetal Leydig cell population, determines the fate of germ cells, and regulates the formation of the rete testis and efferent ductules. In postnatal development and in the mature male gonad, the importance of Notch signalling in the regulation of steroidogenesis, Sertoli cell function, spermatogonial stem cell niche maintenance, meiosis, spermiogenesis, and sperm functional parameters has been described. Because the available data are largely fragmentary, the role of the Notch pathway in the control of the above-mentioned processes requires confirmation by further research.

Hormonalna regulacja szlaku sygnałowego Notch w gonadzie męskiej ssaków Hormonal regulation of the Notch signalling pathway in the mammalian male gonad

Badania prowadzone w ostatnich latach dowiodły, że ekspresja komponentów i aktywność szlaku Notch w gonadzie męskiej pozostają pod kontrolą hormonalną. Wspomniane w poprzednim rozdziale prace [DeFalco i wsp. \(2013\)](#) dowiodły, że poziom ekspresji JAG1 i aktywność szlaku Notch w tkance śródmiąższowej płodowych jąder zależy od lokalnego stężenia testosteronu. Doświadczenia, polegające na ograniczeniu sygnalizacji androgenowej poprzez zastosowanie anty-androgenu

Recent research has provided evidence that the expression of components and activity of the Notch pathway in the male gonad remain under hormonal control. [DeFalco et al. \(2013\)](#) reported that the level of JAG1 expression and Notch pathway activity in the interstitium of foetal testes depend on the local testosterone concentration. Experimental inhibition of androgen signalling (with the anti-androgen flutamide) or testosterone production (using ethane dimethanesulfonate EDS, which causes

flutamidu lub zahamowanie produkcji testosteronu (z wykorzystaniem etanodimetanosulfonianu EDS, powodującego selektywną eliminację komórek Leydig'a) pozwoliły na wykazanie udziału androgenów w regulacji ekspresji ligandów DLL1, DLL4 i JAG1, receptorów Notch1 i Notch2 oraz białek efektorowych szlaku Notch, HES1, HES5 i HEY1 w jądrze szczurów w okresie dojrzewania płciowego ([Kamińska i wsp., 2020b](#)).

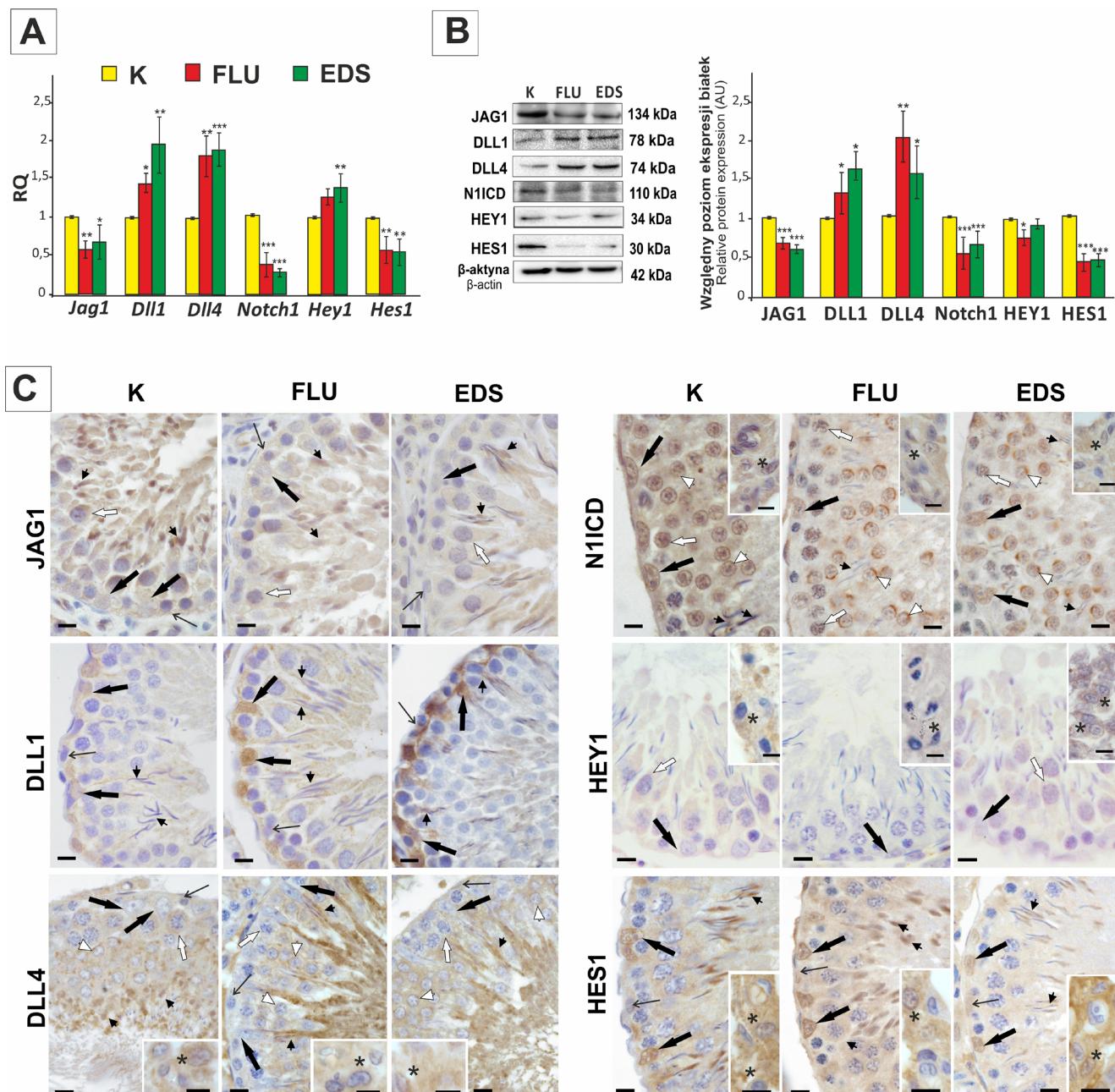
Sygnalizacja androgenowa jest także regulatorem ekspresji mRNA i białek komponentów szlaku Notch w jądrze dojrzałych płciowo szczurów ([Rycina 3](#)). U samców poddanych działaniu flutamidu i EDS obserwowano zaburzenia ekspresji ligandów JAG1, DLL1 i DLL4. Analiza immunohistochemiczna ujawniła wzrost ekspresji DLL1 głównie w komórkach Sertolego, natomiast w wydłużonych spermatozydach - zmniejszenie intensywności sygnału JAG1, a nasilenie ekspresji DLL4. W obydwu modelach doświadczalnych stwierdzono obniżenie względnej ekspresji receptora *Notch1*, jego aktywnej formy N1ICD oraz białka efektorowego HES1, a po ekspozycji na flutamid - również spadek poziomu HEY1. Osłabienie immunoekspresji N1ICD obserwowano głównie w komórkach Sertolego, immunoekspresja HES1 po zastosowaniu flutamidu obniżała się w komórkach Leydig'a, natomiast po ekspozycji na EDS - w nabłonku nasiennym. Z kolei sygnał HEY1 ulegał redukcji w obu przedziałach jądra przede wszystkim u szczurów poddanych działaniu flutamidu. Wyniki tych badań wskazują, że sygnalizacja androgenowa kontroluje ekspresję ligandów oraz aktywację szlaku Notch w jądrze dorosłych szczurów, zarówno w kanale plemnikotwórczym, jak i tkance śródmiąższowej. Obserwowane różnice w odpowiedzi komórek na flutamid i EDS mogą świadczyć o zaangażowaniu w tę regulację nie tylko klasycznego receptora androgenowego AR ([Rycina 3](#)).

Częściowe wyjaśnienie mechanizmów biorących udział w kontroli szlaku Notch przez androgeny przyniosły wyniki badań z wykorzystaniem modeli *in vitro* (linii i pierwotnych hodowli komórkowych). Stwierdzono stymulujący wpływ testosteronu na ekspresję *Notch1* oraz poziom jego aktywnej formy, a także na aktywność transkrypcyjną czynnika RBP-J, wskazujące na wzrost aktywności kanonicznej ścieżki Notch. Zastosowanie farmakologicznych antagonistów receptorów androgenowych AR i ZIP9 (flutamidu i bicalutamidu) oraz wyciszenie ekspresji genów kodujących te receptory w komórkach Sertolego gryzoni pozwoliło wykazać, że AR i ZIP9 pełnią różne, ale uzupełniające się role w kontroli szlaku Notch. Regulacja ekspresji genu efektorowego *Hey1* zależała bowiem od sygnalizacji z udziałem AR, natomiast genu *Hes1* – od aktywności ZIP9 ([Kamińska i wsp., 2020a](#)). Kolejno podjęte badania przyczyniły się do wykazania kontroli białek DSL w komórkach Sertolego przez androgeny. Wyniki komplementarnych analiz ujawniły, że testosteron hamuje ekspresję białek JAG1 i DLL1, działając odpowiednio przez ZIP9 lub AR. Ekspresja DLL4 była natomiast stymulowana przez testosteron w sposób niezależny od tych receptorów. Pomimo, iż mechanizm

selective elimination of Leydig cells) demonstrates the involvement of androgens in the regulation of ligands (DLL1, DLL4, and JAG1), Notch receptors (Notch1 and Notch2), and Notch pathway effector proteins (HES1, HES5, and HEY1) in the testes of pubertal rats ([Kamińska et al., 2020b](#)).

Androgen signalling also regulates the mRNA and protein expression of Notch pathway components in the testes of sexually mature rats ([Figure 3](#)). Disturbed expression of JAG1, DLL1, and DLL4 ligands has been observed in males exposed to flutamide and EDS. Immunohistochemical analysis has revealed an increase in DLL1 immunoexpression mainly in Sertoli cells, while decreased JAG1 and increased DLL4 signal intensity have been detected in elongated spermatids. In both experimental models, there is a decrease in the relative expression of the *Notch1* receptor and its active form (N1ICD) and effector protein HES1, whereas a reduced level of HEY1 is found only after exposure to flutamide. The immunoexpression of N1ICD is decreased mainly in Sertoli cells, and the immunoexpression of HES1 is decreased in Leydig cells after flutamide treatment and in the seminiferous epithelium after EDS exposure. Moreover, the HEY1 signal is reduced in both testicular compartments, primarily in rats exposed to flutamide. These results indicate that androgen signalling controls the expression of ligands and the activation of the Notch pathway in the adult rat testis, both in the spermatogenic tubules and in the interstitium. The differences in the response of cells to flutamide and EDS suggest that in addition to the classical AR, other receptor(s) are involved in this regulation ([Figure 3](#)).

Research using *in vitro* models (cell lines and primary cell cultures) has provided an explanation of the mechanisms involved in the control of the Notch pathway by androgens. Testosterone stimulates the expression of *Notch1* and N1ICD, as well as the transcriptional activity of the RBP-J, indicating an increase in the activity of the canonical Notch pathway. The use of AR and ZIP9 pharmacological antagonists (flutamide and bicalutamide), and silencing the expression of genes encoding these receptors in rodent Sertoli cells has demonstrated that AR and ZIP9 play different but complementary roles in the control of the Notch pathway. The regulation of *Hey1* expression depends on AR signalling, while the regulation of *Hes1* expression depends on the activation of ZIP9 by testosterone ([Kamińska et al., 2020a](#)). Additional studies have revealed that androgens control DSL proteins in Sertoli cells. Complementary analyses have demonstrated that testosterone inhibits the expression of JAG1 and DLL1, through ZIP9 and AR, respectively, whereas DLL4 expression is stimulated by testosterone in a manner independent of these receptors. Although the mechanism of DLL4 regulation has not yet been determined, it can be assumed that it is mediated by other androgen-activated receptors



Ryc. 3. Ekspresja i lokalizacja komponentów szlaku Notch w jądrze dojrzałych płciowo szczurów w warunkach ograniczonej dostępności androgenów. Samce szczurów Wistar (80-90-dniowe; n = 6/grupa) otrzymywały iniekcje flutamidu (FLU; 50 mg/kg masy ciała/dzień przez 7 dni), etanodimetanosulfonianu (EDS; 75 mg/kg masy ciała, jednorazowo), nośnika (olej kukurydziany lub dimetylosulfotlenek:woda; nie pokazano) albo soli fizjologicznej (K, grupa kontrolna). Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (189/2018, 85/2019). Względna ekspresję mRNA w jądrach określono za pomocą analizy RT-qPCR. Histogramy przedstawiają poziom mRNA Jag1, Dll1, Dll4, Notch1, Hey1 i Hes1 znormalizowany względem poziomu ekspresji genów referencyjnych (Rn18s, B2m i Actb). RQ - względna liczba kopii genu (A). Ekspresję białek JAG1, DLL1, DLL4, N1ICD, HEY1 i HES1 określono na podstawie analizy western blot; histogramy przedstawiają względny poziom poszczególnych białek znormalizowany względem poziomu β-aktyny (B). n = 6/grupa; średnia ± SD, *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 (test Dunnet'a). Lokalizację białek JAG1, DLL1, DLL4, N1ICD, HEY1 i HES1 w komórkach gonady męskiej uwidoczniono z zastosowaniem analizy immunohistochemicznej. Czarne strzałki – komórki Sertolego, otwarte strzałki – spermatogonia, białe strzałki – spermatoцитy, białe gręty – spermatydy okrągłe, czarne gręty – spermatydy wydłużone, czarne gwiazdki – komórki Leydig'a. Wstawniki – tkanka śródmiąższowa. Skala = 10 µm (C). W analizach wykorzystano startery i przeciwciała pierwszorzędowe wymienione w artykule Kamińska i wsp. (2020b).

Fig. 3. Expression and localization of Notch pathway components in the mature rat testis following androgen deprivation. Male Wistar rats (80-90 days old; n = 6/group) received injections of flutamide (FLU; 50 mg/kg body weight/day for 7 days), ethanedimethanesulfonate (EDS; 75 mg/kg body weight, once), vehicle (corn oil or dimethyl sulfoxide:water; not shown) or saline (K, control group). Experiments were approved by the 2nd Local Institutional Animal Care and Use Committee in Krakow (189/2018, 85/2019). Relative mRNA expression in the testes was determined using RT-qPCR analysis. The histograms represent mRNA expression of Jag1, Dll1, Dll4, Notch1, Hey1 and Hes1 normalised to the mean expression of the reference genes (Rn18s, B2m and Actb). RQ - relative quantification (A). The expression of JAG1, DLL1, DLL4, N1ICD, HEY1, and HES1 proteins was determined using western blot; the histograms present relative level of studied proteins normalised against its corresponding actin data point (B). n = 6/group; mean ± SD, *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 (Dunnett test). The localization of JAG1, DLL1, DLL4, N1ICD, HEY1, and HES1 proteins in the cells of male gonad was visualised using immunohistochemical analysis. Black arrows – Sertoli cells, open arrows – spermatogonia, white arrows – spermatoocytes, white arrowheads – round spermatids, black arrowheads – elongated spermatids, black asterisks – Leydig cells. Scale bar = 10 µm (C). Primers and primary antibodies listed in the paper by Kamińska et al. (2020b) were used in the analyses.

regulacji DLL4 nie został dotąd ustalony, można przypuszczać, że pośredniczą w nim inne receptory aktywowane przez androgeny ([Lustofin i wsp., 2022a](#)). Kwestia ta wymaga jeszcze wyjaśnienia.

Poza bezpośrednim działaniem w komórkach gonady męskiej, androgeny (testosteron i androstendion) są też substratem do lokalnej syntezy estrogenów. Hormony te powstają w jądrze dojrzałych płciowo gryzoni przede wszystkim w komórkach Leydiga i komórkach plemnikotwórczych, w wyniku aktywności aromatazy, a ich działanie odbywa się za pośrednictwem wewnętrzkomórkowych receptorów estrogenowych: receptora estrogenowego α (ER α , ang. *oestrogen receptor α*) i receptora estrogenowego β (ER β , ang. *oestrogen receptor β*) oraz błonowego receptora estrogenowego GPER (ang. *G-protein coupled oestrogen receptor*) ([Carreau i wsp., 2011; Lucas i wsp., 2010](#)). Doświadczenia, w których komórki Sertolego gryzoni poddano działaniu 17 β -estradiolu, specyficznych antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780 i G15) lub wyciszoną ekspresję tych receptorów, wykazały, że w odróżnieniu od testosteronu, estrogeny wywierają stymulujący wpływ na ekspresję wszystkich trzech badanych białek DSL. Wzrost ekspresji JAG1 i DLL1 indukowany był głównie z udziałem ER α , zaś poziom DLL4 był kontrolowany przez ER β i GPER ([Lustofin i wsp., 2022a](#)). Ponadto, wyniki najnowszych badań wskazują, że również ekspresja i aktywacja receptora Notch1 oraz genów efektorowych szlaku Notch podlegają kontroli przez estrogeny (dane niepublikowane). Podsumowując, uzyskane dotąd dane wskazują na współdziałanie jądrowych i błonowych receptorów androgenowych i estrogenowych zarówno w kontroli ekspresji białek DSL, jak i aktywacji szlaku Notch w komórkach Sertolego. Równowaga między sygnalizacją androgenową a estrogenową jest zatem istotna dla utrzymania właściwego poziomu aktywności szlaku Notch, a jej zaburzenia mogą zakłócać działanie tego szlaku w gonadzie męskiej.

Zmiany ekspresji komponentów szlaku Notch były na przykład obserwowane w odpowiedzi na działanie środowiskowych związków o aktywności hormonalnej (EDCs, ang. *endocrine disrupting chemicals*). Wykazano, że substancje o potwierdzonej aktywności estrogenowej lub anty-androgenowej, takie jak bisfenol A i ftalan dibutylu, zaburzały ekspresję białek N1ICD, DLL4, HEY1 i HES5 w eksplantach jąder dojrzałych szczurów *ex vivo* ([Kamińska i wsp., 2018](#)). Zmiany ekspresji białek Notch1 i HES1 w jądrach szczurów wywoływał również ftalan di-2-etyloheksylu ([Tang i wsp., 2018](#)). Ostatnie badania dowodzą, że bisfenol A oraz antyandrogennie działający acetaminofen, mogą modyfikować aktywność sygnalizacji Notch w gonadzie męskiej gryzoni również w trakcie rozwoju embrionalnego ([Park i wsp., 2021; Liu i wsp., 2023](#)).

W świetle dotychczasowych badań fizjologiczna regulacja aktywności szlaku Notch w kanaliku nasiennym wydaje się być związana nie tylko z działaniem steroidów

([Lustofin et al., 2022a](#)). Nevertheless, this issue requires further research.

In addition to direct effects on the male gonad, androgens (testosterone and androstenedione) are also substrates for the local synthesis of oestrogens. In the testes of sexually mature rodents, oestrogens are produced as a result of aromatase activity primarily in Leydig cells and germ cells, and their action is mediated by intracellular oestrogen receptors [oestrogen receptor α (ER α) and oestrogen receptor β (ER β)] and a membrane oestrogen receptor [G-protein coupled oestrogen receptor (GPER)] ([Carreau et al., 2011; Lucas et al., 2010](#)). The experimental exposure of rodent Sertoli cells to 17 β -oestradiol, a specific antagonist of oestrogen receptors (ICI 182,780 and G15), or a specific siRNA (to knockdown oestrogen receptor expression) has revealed that oestrogen has a stimulatory effect on the expression of all tested DSL proteins. The increase in JAG1 and DLL1 expression is induced mainly by ER α , while the increase in DLL4 expression is controlled by ER β and GPER ([Lustofin et al., 2022a](#)). Moreover, recent studies have indicated that the expression and activation of the Notch1 receptor and effector genes of the Notch pathway are also controlled by oestrogens (unpublished data). In summary, the data obtained thus far indicate the interaction of nuclear and membrane androgen and oestrogen receptors in both the control of DSL protein expression and the activation of the Notch pathway in Sertoli cells. The balance between androgen and oestrogen signalling is therefore important for maintaining the appropriate level of Notch pathway activity, and disturbance of this balance may disrupt the function of Notch signalling in the male gonad.

Changes in the expression of Notch pathway components have been observed in response to environmental endocrine disrupting chemicals (EDCs). Compounds with confirmed oestrogenic or antiandrogenic activity, such as bisphenol A and dibutyl phthalate, impair the expression of N1ICD, DLL4, HEY1, and HES5 in *ex vivo* testicular explants of mature rats ([Kamińska et al., 2018](#)). Di-2-ethylhexyl phthalate induces changes in Notch1 and HES1 expression in rat testes ([Tang et al., 2018](#)). Recent studies have indicated that bisphenol A and acetaminophen, an antiandrogenic agent, can affect the activity of Notch signalling in the male gonad during embryonic development ([Park et al., 2021; Liu et al., 2023](#)).

According to previous research, the physiological regulation of Notch pathway activity in the seminiferous tubules involves not only the action of sex steroids but also the influence of follicle-stimulating hormone (FSH).

In the peripubertal period and in seasonally breeding rodents (e.g., Djungarian hamster *Phodopus sungorus* and bank vole *Myodes glareolus*) induction or recovery of reproductive activity is also associated with a significant increase in FSH secretion ([Lerchl et al., 1993](#);

płciowych, ale również z wpływem hormonu folikulotropowego (FSH, ang. *follicle-stimulating hormone*).

Okres okołopokwitaniowy, a w przypadku gryzoni o rozrodzie sezonowym (np. chomik dżungarski *Phodopus sungorus*, nornica ruda *Myodes glareolus*) także wejście w fazę aktywności rozrodczej, wiąże się z wyraźnym wzrostem wydzielania FSH (*Lerchl i wsp.*, 1993; *Hejmej i wsp.*, 2013). Doświadczenia przeprowadzone na szczurach, u których zahamowano aktywność osi podwzgórzowo-przysadkowej poprzez iniekcje antagonisty gonadoliberyny, cetroreliksu, a następnie zastosowano substytucję FSH, pozwoliły po raz pierwszy zidentyfikować tę gonadotropinę jako czynnik regulujący sygnalizację Notch w nabłonku nasiennym gryzoni w okresie dojrzewania płciowego. Badania z użyciem samców nornicy rudej eksponowanych na krótki fotoperiod (co spowodowało fizjologiczny spadek wydzielania FSH), a następnie otrzymujących iniekcje FSH, przyczyniły się do wykazania zależności między stężeniami FSH w surowicy a ekspresją komponentów szlaku Notch w jądrach sezonowo rozmnażających się gryzoni. Wyniki tych prac oraz dane z doświadczeń *in vitro*, dowiodły, że w komórkach Sertolego FSH kontroluje przede wszystkim ścieżkę Notch1-HES1 (*Lustofin i wsp.*, 2022b). Chociaż w odpowiedzi na działanie FSH dynamicznym zmianom podlega też ekspresja *Hey1*, inne czynniki wydają się odgrywać dominującą rolę w regulacji tego genu (*Sadate-Ngatchou i wsp.*, 2004; *Lustofin i wsp.*, 2022b). Zarówno u szczurów, jak i nornic stwierdzono ponadto pośredni wpływ FSH na komórki linii płciowej związanej z kontrolą ekspresji receptorów Notch3 w spermatogoniach, spermatocytach i okrągłych spermatydach (*Lustofin i wsp.*, 2022b). Obserwacje te sugerują istnienie wspólnego mechanizmu działania FSH na sygnalizację Notch w nabłonku plemnikotwórczym podczas inicjacji oraz wznowienia spermatogenezy u gryzoni.

Rolę gonadotropin w kontroli sygnalizacji Notch u naczelnego potwierdzają wyniki badań z wykorzystaniem rezusów (*Macaca mulatta*). Stymulacja niedojrzałych płciowo samców gonadotropinami skutkowała wzrostem ekspresji mRNA *HEY1*, a spadkiem mRNA *HES7* i *HEYL*. Nie stwierdzono natomiast zmian poziomu transkryptów ligandów, receptorów Notch i pozostałych genów efektorowych z rodziny Hes (*Ramaswamy i wsp.*, 2017). Należy zauważyć, że ze względu na wzrost sekrecji testosteronu (wywołany podaniem rekombinowanej lutropiny) opisane efekty mogą przynajmniej częściowo wynikać z działania tego steroidu.

Poza regulacją hormonalną szlak Notch podlega kontroli przez czynniki parakrynowe. *Okada i wsp.* (2016) wykazali pobudzający wpływ TNF α na ekspresję JAG1 w komórkach Sertolego myszy. Najnowsze badania *Xu i wsp.* (2022) ujawniły natomiast, że transformujący czynnik wzrostu β 3 (TGF- β 3, ang. *transforming growth factor β 3*) hamuje ekspresję JAG1 i HES1 oraz aktywność sygnalizacji Notch, co modyfikuje produkcję mleczanów przez komórki Sertolego szczura.

Hejmej et al., 2013). Experimental inhibition of the hypothalamic-pituitary axis activity in pubertal rats by injections of cetrorelix, a gonadotropin-releasing hormone antagonist, followed by FSH substitution has revealed the role of FSH as a factor regulating Notch signalling in the seminiferous epithelium. Studies using male bank voles exposed to a short photoperiod (causing a physiological decrease in FSH secretion) followed by FSH injections have demonstrated the relationship between serum FSH concentrations and the expression of Notch pathway components in the testes of seasonally breeding rodents. These results and data from *in vitro* experiments suggest that FSH primarily controls the Notch1-HES1 pathway in Sertoli cells (*Lustofin et al.*, 2022b). Although *Hey1* expression also undergoes dynamic changes in response to FSH, other factors play a dominant role in the regulation of this gene (*Sadate-Ngatchou et al.*, 2004; *Lustofin et al.*, 2022b). In both rats and voles, an indirect effect of FSH on germ cells related to the control of Notch3 receptor expression in spermatogonia, spermatocytes, and round spermatids has been reported (*Lustofin et al.*, 2022b). These observations suggest the existence of a common mechanism by which FSH affects Notch signalling in the spermatogenic epithelium during the initiation and resumption of spermatogenesis in rodents.

The role of gonadotropins in the control of Notch signalling in primates has been confirmed by studies using rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Stimulation of immature males with gonadotropins results in an increase in the expression of *HEY1* mRNA and a decrease in *HES7* and *HEYL* mRNA, but no changes in the transcript levels of DSL ligands, Notch receptors, or other effector genes of the Hes/Hey family are detected (*Ramaswamy et al.*, 2017). Due to the increase in testosterone secretion caused by the administration of recombinant lutropin, the described effects may at least partially result from the action of androgens.

In addition to hormonal regulation, the Notch pathway is controlled by paracrine factors. *Okada et al.* (2016) demonstrated the stimulatory effect of TNF α on JAG1 expression in mouse Sertoli cells. Moreover, *Xu et al.* (2022) recently reported that transforming growth factor β 3 (TGF- β 3) inhibits the expression of JAG1 and HES1, as well as the activity of Notch signalling, which modifies the production of lactate by rat Sertoli cells.

■ Wnioski / Conclusions

Badania ostatniej dekady przyczyniły się do wykazania udziału zależnej od kontaktu komunikacji międzykomórkowej opartej o szlak sygnałowy Notch w przebiegu płodowego rozwoju poszczególnych populacji komórek gonady męskiej, przede wszystkim komórek Leydiga oraz komórek linii płciowej. Pojawiające się w ostatnich latach doniesienia świadczą także o znaczeniu tego szlaku w dojrzałym jądrze. Wskazują one, że właściwa aktywność sygnalizacji Notch warunkuje funkcje komórek Sertolego i ich wrażliwość na androgeny, odpowiada za utrzymanie niszy spermatoginalnych komórek macierzystych, dalsze losy i przeżywalność komórek płciowych w nabłonku nasiennym oraz parametry plemników najadrzowych, a także ekspresję białek steroidogennych w tkance śródmiąższowej gonady. Dostępne dane wciąż nie są jednak wystarczające do uzyskania pełnego obrazu roli sygnalizacji Notch w procesach steroidogenezy i spermatogenezy. Ostatnio wykazano, że utrzymanie prawidłowego poziomu ekspresji komponentów szlaku Notch w jądrze gryzoni zależy od aktywności osi podwzgórze-przysadka-jądra oraz lokalnego działania steroidów płciowych. Nie można zatem wykluczyć, że zakłócenia zależnej od sygnalizacji Notch komunikacji międzykomórkowej w gonadzie męskiej stanowią jeden z czynników leżących u podłożu dysfunkcji jądra wywołanych zaburzeniami hormonalnymi.

Kończąc, warto podkreślić, że znaczenie szlaku Notch dla funkcji męskiego układu płciowego wydaje się być znacznie szersze, wykraczające poza kontrolę procesów przebiegających w samej gonadzie. Stwierdzono, że u myszy regulowana przez testosteron oraz insulinopodobny czynnik 3 ekspresja *Notch1* w jądrowodzie warunkuje prawidłowy rozwój tej struktury, a tym samym może być istotna dla przebiegu zstępowania jąder ([Yuan i wsp., 2006](#); [Kaftanovskaya i wsp., 2011](#)). Najnowsze badania wskazują zaś na udział sygnalizacji JAG1/Notch w formowaniu populacji neuronów GnRH. Potwierdzono jednocześnie występowanie patogennych wariantów genu *JAG1* w grupie pacjentów z wrodzonym hipogonadyzmem hipogonadotropowym i zespołem Kallmanna ([Cotellessa i wsp., 2023](#)). Poświęcono też wiele uwagi roli szlaku Notch w rozwoju prostaty oraz w patogenezie raka tego gruczołu. Wyniki tych badań zostały przedyskutowane w innych pracach przeglądowych ([Deng i wsp., 2016](#); [Lefort i wsp., 2016](#); [O'Brien i Marignol, 2017](#); [Anusewicz i wsp., 2021](#)).

■ Finansowanie / Funding

W artykule zaprezentowano wyniki własnych badań finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (program OPUS13, projekt nr 2017/25/B/NZ4/01037).

Research in the past decade has contributed to revealing the significance of contact-dependent intercellular communication based on the Notch pathway in the foetal development of individual cell populations of the male gonad, primarily Leydig cells and germ cells. Reports published in recent years have also pointed to the importance of this pathway in the mature testis. These findings indicate that the proper activity of Notch signalling has the following biological roles: determines the functions of Sertoli cells and their sensitivity to androgens; maintains the spermatogonal stem cell niche; controls the fate and survival of germ cells in the seminiferous epithelium; controls the parameters of epididymal sperm; and regulates the expression of steroidogenic proteins in the interstitial tissue of the testis. However, the available data are still not sufficient to obtain a complete picture of the role of Notch signalling in the processes of steroidogenesis and spermatogenesis. Recently, it has been shown that the expression of Notch pathway components in rodent testes depends on the activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis and the local action of sex steroids. Therefore, it cannot be ruled out that disruption of Notch signalling-dependent intercellular communication in the male gonad is one of the factors underlying testicular dysfunction caused by hormonal disorders.

Finally, it is worth emphasizing that the importance of the Notch pathway for the functions of the male reproductive system is much broader, going beyond the control of processes taking place in the gonad itself. In mice, the regulation of *Notch1* expression by testosterone and insulin-like factor 3 determines the proper development of the gubernaculum and thus may be important for testicular descent ([Yuan et al., 2006](#); [Kaftanovskaya et al., 2011](#)). Recent research has indicated the involvement of JAG1/Notch signalling in the formation of GnRH neurons. Pathogenic variants of the *JAG1* gene have been confirmed in a group of patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome ([Cotellessa et al., 2023](#)). Much attention has also been given to the role of the Notch pathway in prostate cancer development and pathogenesis. The results of these studies have been discussed in other reviews ([Deng et al., 2016](#); [Lefort et al., 2016](#); [O'Brien and Marignol, 2017](#); [Anusewicz et al., 2021](#)).

This article presents the results of research financed by the National Science Centre (Program OPUS13, Grant no. 2017/25/B/NZ4/01037).

Piśmiennictwo / References

- Adamah D.J., Gokhale P.J., Eastwood D.J., Rajpert De-Meyts E., Goepel J., Walsh J.R. i wsp.*: Dysfunction of the mitotic:meiotic switch as a potential cause of neoplastic conversion of primordial germ cells. *Int J Androl.* 2006, 29, 219–227. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00569.x. PMID: 16466543.
- Andersson E.R., Lendahl U.*: Therapeutic modulation of Notch signalling – are we there yet? *Nat Rev Drug Discov.* 2014, 13, 357–378. doi: 10.1038/nrd4252. PMID: 24781550.
- Anusewicz D., Orzechowska M., Bednarek A.K.*: Notch Signaling Pathway in Cancer—Review with Bioinformatic Analysis. *Cancers (Basel).* 2021, 13, 768. doi: 10.3390/cancers13040768. PMID: 33673145.
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., Lake R.J.*: Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999, 284, 770–776. doi: 10.1126/science.284.5415.770. PMID: 10221902.
- Batista F., Lu L., Williams S.A., Stanley P.*: Complex N-glycans are essential, but core 1 and 2 mucin O-glycans, O-fucose glycans, and NOTCH1 are dispensable, for mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2012, 86, 179. doi: 10.1095/biolreprod.111.098103. PMID: 22492969.
- Bessho Y., Sakata R., Komatsu S., Shiota K., Yamada S., Kageyama R.*: Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev.* 2001, 15, 2642–2647. doi: 10.1101/gad.930601. PMID: 11641270.
- Blokzijl A., Dahlqvist C., Reissmann E., Falk A., Moliner A., Lendhal U. i wsp.*: Cross-talk between the Notch and the TGF- β signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J. Cell Biol.* 2003, 163, 723–728. doi: 10.1083/jcb.200305112. PMID: 14638857.
- Bray S.J.*: Notch signalling in context. *Nat Rev Mol.* 2016, 17, 722–735. doi: 10.1038/nrm.2016.94. PMID: 27507209.
- Campese A.F., Grazioli P., de Cesaris P., Riccioli A., Bellavia D., Pelullo M. i wsp.*: Mouse Sertoli cells sustain de novo generation of regulatory T cells by triggering the notch pathway through soluble JAGGED1. *Biol Reprod.* 2014, 90, 53. doi: 10.1095/biolreprod.113.113803. PMID: 24478388.
- Cao Y., Liu L., Lin J., Sun P., Guo K., Li S. i wsp.*: Dysregulation of Notch-FGF signaling axis in germ cells results in cystic dilation of the rete testis in mice. *J Cell Commun Signal.* 2022, 16, 75–92. doi: 10.1007/s12079-021-00628-0. PMID: 34101112.
- Carreau S., Bouraima-Lelong H., Delalande C.*: Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis.* 2011, 1, 90–94. doi: 10.4161/spmg.1.2.16766. PMID: 22319655.
- Chillakuri C.R., Sheppard D., Lea S.M., Handford P.A.*: Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies. *Semin Cell Dev Biol.* 2012, 23, 421–428. doi: 10.1016/j.semcd.2012.01.009. PMID: 22326375.
- Coffman C., Harris W., Kintner C.*: Xotch, the Xenopus homolog of Drosophila notch. *Science.* 1990, 249, 1438–1441. doi: 10.1126/science.2402639. PMID: 2402639.
- Cotellessa L., Marelli F., Duminuco P., Adamo M., Papadakis G.E., Bartoloni L. i wsp.*: Defective jagged-1 signaling affects GnRH development and contributes to congenital hypogonadotropic hypogonadism. *JCI Insight.* 2023, 8, e161998. doi: 10.1172/jci.insight.161998. PMID: 36729644.
- DeFalco T., Saraswathula A., Briot A., Iruela-Arispe M.L., Capel B.*: Testosterone levels influence mouse fetal Leydig cell progenitors through notch signaling. *Biol Reprod.* 2013, 88, 91. doi: 10.1095/biolreprod.112.106138. PMID: 23467742.
- Deng G., Ma L., Meng Q., Ju X., Jiang K., Jiang P. i wsp.*: Notch signaling in the prostate: critical roles during development and in the hallmarks of prostate cancer biology. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016, 142, 531–547. doi: 10.1007/s00432-015-1946-x. PMID: 25736982.
- Dexter J.S.*: The analysis of a case of continuous variation in Drosophila by a study of its linkage relations. *Am Nat.* 1914, 48, 712–758. doi: 10.1086/279446.
- Di Persio S., Starace D., Capponi C., Saracino R., Fera S., Filippini A. i wsp.*: TNF- α inhibits GDNF levels in Sertoli cells, through a NF- κ B-dependent, HES1-dependent mechanism. *Andrology.* 2021, 9, 956–964. doi: 10.1111/andr.12959. PMID: 33314792.
- Dirami G., Ravindranath N., Achi M.V., Dym M.*: Expression of Notch pathway components in spermatogonia and Sertoli cells of neonatal mice. *J Androl.* 2001, 22, 944–952. doi: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb03434.x. PMID: 11700858.
- Donovan J., Kordylewska A., Jan Y.N., Utset M.F.*: Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in Hey2 mutant mice. *Curr Biol.* 2002, 12, 1605–1610. doi: 10.1016/s0960-9822(02)01149-1. PMID: 12372254.
- D'Souza B., Meloty-Kapella L., Weinmaster G.*: Canonical and Non-Canonical Notch Ligands. *Curr Top Dev Biol.* 2010, 92, 73–129. doi: 10.1016/S0070-2153(10)92003-6. PMID: 20816393.
- D'Souza B., Miyamoto A., Weinmaster G.*: The many facets of Notch ligands. *Oncogene.* 2008, 27, 5148–5167. doi: 10.1038/onc.2008.229. PMID: 18758484.
- Duarte A., Hirashima M., Benedito R., Trindade A., Diniz P., Bekman E. i wsp.*: Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes Dev.* 2004, 18, 2474–2478. doi: 10.1101/gad.1239004. PMID: 15466159.
- Dunwoodie S.L., Clements M., Sparrow D.B., Sa X., Conlon R.A., Bedington R.S.*: Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene Dll3 are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development.* 2002, 129, 1795–1806. doi: 10.1242/dev.129.7.1795. PMID: 11923214.
- Fagotto F., Gumbiner B.M.*: Cell contact-dependent signaling. *Dev Biol.* 1996, 180, 445–454. doi: 10.1006/dbio.1996.0318. PMID: 8954717.
- Fischer A., Gessler M.*: Delta-Notch – and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 4583–4596. doi: 10.1093/nar/gkm477. PMID: 17586813.
- Fischer A., Schumacher N., Maier M., Sendtner M., Gessler M.*: The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev.* 2004, 18, 901–911. doi: 10.1101/gad.291004. PMID: 15107403.
- Fischer A., Steidl C., Wagner T.U., Lang E., Jakob P.M., Friedl P. i wsp.*: Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition. *Circ Res.* 2007, 100, 856–863. doi: 10.1161/01.RES.0000260913.95642.3b. PMID: 17303760.
- Fleming R.J.*: Ligand-induced cis-inhibition of Notch signaling: The role of an extracellular region of serrate. *Adv Exp Med Biol.* 2020, 1227, 29–49. doi: 10.1007/978-3-030-36422-9_3. PMID: 32072497.
- Florin A., Maire M., Bozec A., Hellani A., Chater S., Bars R. i wsp.*: Androgens and postmeiotic germ cells regulate claudin-11 expression in rat Sertoli cells. *Endocrinology.* 2005, 146, 1532–1540. doi: 10.1210/en.2004-0834. PMID: 15591150.
- Fortini M.E.*: Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell.* 2009, 16, 633–647. doi: 10.1016/j.devcel.2009.03.010. PMID: 19460341.
- Garcia T.X., DeFalco T., Capel B., Hofmann M.C.*: Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence. *Dev Biol.* 2013, 377, 188–201. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.01.031. PMID: 23391689.
- Garcia T.X., Farmaha J.K., Kow S., Hofmann M.C.*: RBPJ in mouse Sertoli cells is required for proper regulation of the testis stem cell niche. *Development.* 2014, 141, 4468–4478. doi: 10.1242/dev.113969. PMID: 25406395.
- Garcia T.X., Hofmann M.C.*: NOTCH signaling in Sertoli cells regulates gonocyte fate. *Cell Cycle.* 2013, 12, 2538–2545. doi: 10.4161/cc.25627. PMID: 23907117.
- Garcia T.X., Parekh P., Gandhi P., Sinha K., Hofmann M.C.*: The NOTCH ligand JAG1 regulates GDNF expression in Sertoli cells. *Stem Cells Dev.* 2017, 26, 585–598. doi: 10.1089/scd.2016.0318. PMID: 28051360.
- George R.M., Hahn K.L., Rawls A., Viger R.S., Wilson-Rawls J.*: Notch signaling represses GATA4-induced expression of genes involved in steroid biosynthesis. *Reproduction.* 2015, 150, 383–394. doi: 10.1530/REP-15-0226. PMID: 26183893.
- Giaimo B.D., Gagliani E.K., Kovall R.A., Borggrefe T.*: Transcription factor RBPJ as a molecular switch in regulating the Notch response. *Adv Exp Med Biol.* 2021, 1287, 9–30. doi: 10.1007/978-3-030-55031-8_2. PMID: 33034023.
- Guo B., McMillan B.J., Blacklow S.C.*: Structure and function of the Mind bomb E3 ligase in the context of Notch signal transduction. *Curr Opin Struct Biol.* 2016, 41, 38–45. doi: 10.1016/j.sbi.2016.05.012. PMID: 27285058.

- Hahn K.L., Beres B., Rowton M.J., Skinner M.K., Chang Y., Rawls A. *i wsp.*: A deficiency of lunatic fringe is associated with cystic dilation of the rete testis. *Reproduction*. 2009, 137, 79–93. doi: 10.1530/REP-08-0207. PMID: 18801836.
- Hamada Y., Kadokawa Y., Okabe M., Ikawa M., Coleman J.R., Tsujimoto Y.: Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development*. 1999, 126, 3415–3424. doi: 10.1242/dev.126.15.3415. PMID: 10393120.
- Hasegawa K., Okamura Y., Saga Y.: Notch signaling in Sertoli cells regulates cyclical gene expression of Hes1 but is dispensable for mouse spermatogenesis. *Mol Cell Biol*. 2012, 32, 206–215. doi: 10.1128/MCB.06063-11. PMID: 22087762.
- Hayashi T., Kageyama Y., Ishizaka K., Xia G., Kihara K., Oshima H.: Requirement of Notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. *J Androl*. 2001, 22, 999–1011. doi: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb03441.x. PMID: 11700865.
- Hayashi T., Yamada T., Kageyama Y., Kihara K.: Expression failure of the notch signaling system is associated with the pathogenesis of testicular germ cell tumor. *Tumour Biol*. 2004a, 25, 99–105. doi: 10.1159/000079140. PMID: 15361705.
- Hayashi T., Yamada T., Kageyama Y., Negishi T., Kihara K.: Expression failure of the Notch signaling system is associated with the pathogenesis of maturation arrest in male infertility patients. *Fertil Steril*. 2004b, 81, 697–699. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.08.026. PMID: 15037425.
- Hayashi T., Yoshinaga A., Ohno R., Ishii N., Kamata S., Yamada T.: Expression of the p63 and Notch signaling systems in rat testes during postnatal development: comparison with their expression levels in the epididymis and vas deferens. *J Androl*. 2004c, 25, 692–698. doi: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb02843.x. PMID: 15292098.
- Heitzler P.: Biodiversity and noncanonical Notch signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2010, 92, 457–481. doi: 10.1016/S0070-2153(10)92014-0. PMID: 20816404.
- Hejmej A., Kotula-Balak M., Chojnacka K., Kuras P., Lydka-Zarzycka M., Bilińska B.: Photoperiod-dependent effects of 4-tert-octylphenol on adherens and gap junction proteins in bank vole seminiferous tubules. *Int J Endocrinol*. 2013, 2013, 134589. doi: 10.1155/2013/134589. PMID: 23737770.
- Hofmann M.C., McBeath E.: Sertoli cell-germ cell interactions within the niche: paracrine and juxtacrine molecular communications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022, 13, 897062. doi: 10.3389/fendo.2022.897062. PMID: 35757413.
- Hori K., Sen A., Artavanis-Tsakonas S.: Notch signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2013, 126, 2135–2140. doi: 10.1242/jcs.127308. PMID: 23729744.
- Huang Z., Rivas B., Agoulnik A.I.: NOTCH1 gain of function in germ cells causes failure of spermatogenesis in male mice. *PLoS One*. 2013, 8, e71213. doi: 10.1371/journal.pone.0071213. PMID: 23936265.
- Ishibashi M., Siew-Lan A., Shiota K., Nakanishi S., Kageyama R., Guillemin F.: Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev*. 1995, 9, 3136–3148. doi: 10.1101/gad.9.24.3136. PMID: 8543157.
- James A.C., Szot J.O., Iyer K., Major J.A., Pursglove S.E., Chapman G. *i wsp.*: Notch4 reveals a novel mechanism regulating Notch signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1843, 1272–1284. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.03.015. PMID: 24667410.
- Jiang R., Lan Y., Chapman H.D., Shawber C., Norton C.R., Serreze D.V. *i wsp.*: Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev*. 1998, 12, 1046–1057. doi: 10.1101/gad.12.7.1046. PMID: 9531541.
- Kaftanovskaya E.M., Feng S., Huang Z., Tan Y., Barbara A.M., Kaur S. *i wsp.*: Suppression of insulin-like3 receptor reveals the role of β -catenin and Notch signaling in gubernaculum development. *Mol Endocrinol*. 2011, 25, 170–183. doi: 10.1210/me.2010-0330. PMID: 21147849.
- Kamińska A., Lustofin S., Brzostkwinia M., Duliban M., Cyran-Gryboś J., Bilińska B., Hejmej A.: Androgens and Notch signaling cooperate in seminiferous epithelium to regulate genes related to germ cell development and apoptosis. *Reprod Biol*. 2024, 24, 100878. doi: 10.1016/j.repbio.2024.100878. PMID: 38490111.
- Kamińska A., Marek S., Padyak L., Brzostkwinia M., Bilińska B., Hejmej A.: Crosstalk between androgen-ZIP9 signaling and Notch pathway in rodent Sertoli cells. *Int J Mol Sci*. 2020a, 21, 8275. doi: 10.3390/ijms21218275. PMID: 33167316.
- Kamińska A., Marek S., Padyak L., Brzostkwinia M., Pawlicki P., Bilińska B. *i wsp.*: Disruption of androgen signaling during puberty affects Notch pathway in rat seminiferous epithelium. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020b, 18, 30. doi: 10.1186/s12958-020-00582-3. PMID: 32299422.
- Kamińska A., Padyak L., Marek S., Górowska-Wójtowicz E., Kotula-Balak M., Bilińska B. *i wsp.*: Bisphenol A and dibutyl phthalate affect the expression of juxtacrine signaling factors in rat testis. *Chemosphere*. 2018, 199, 182–190. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.02.011. PMID: 29438945.
- Kamińska A., Padyak L., Marek S., Wróbel K., Kotula-Balak M., Bilińska B. *i wsp.*: Notch signaling regulates nuclear androgen receptor AR and membrane androgen receptor ZIP9 in mouse Sertoli cells. *Andrology*. 2020c, 8, 457–472. doi: 10.1111/andr.12691. PMID: 31468707.
- Kandachar V., Roegiers F.: Endocytosis and control of Notch signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2012, 24, 534–540. doi: 10.1016/j.ceb.2012.06.006. PMID: 22818956.
- Kidder G.M., Cyr D.G.: Roles of connexins in testis development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2016, 50, 22–30. doi: 10.1016/j.semcd.2015.12.019. PMID: 26780117.
- Krebs L.T., Xue Y., Norton C.R., Shutter J.R., Maguire M., Sundberg J.P. *i wsp.*: Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev*. 2000, 14, 1343–1352. doi: 10.1101/gad.14.11.1343. PMID: 10837027.
- Krebs L.T., Xue Y., Norton C.R., Sundberg J.P., Beatus P., Lendahl U. *i wsp.*: Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. *Genesis*. 2003, 37, 139–143. doi: 10.1002/gen.10241. PMID: 14595837.
- Kumar D.L., DeFalco T.: A perivascular niche for multipotent progenitors in the fetal testis. *Nat Commun*. 2018, 9, 4519. doi: 10.1038/s41467-018-06996-3. PMID: 30375389.
- Kumar S., Park H.S., Lee K.: Jagged1 intracellular domain modulates steroidogenesis in testicular Leydig cells. *PLoS One*. 2020, 15, e0244553. doi: 10.1371/journal.pone.0244553. PMID: 33378407.
- Lardelli M., Dahlstrand J., Lendahl U.: The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev*. 1994, 46, 123–136. doi: 10.1016/0925-4773(94)90081-7. PMID: 7918097.
- Lefort K., Ostano P., Mello-Grand M., Calpini V., Scatolini M., Farsetti A. *i wsp.*: Dual tumor suppressing and promoting function of Notch1 signaling in human prostate cancer. *Oncotarget*. 2016, 7, 48011–48026. doi: 10.18632/oncotarget.10333. PMID: 27384993.
- Lechler A., Sotiriadou S., Behre H.M., Pierce J., Weinbauer G.F., Kliesch S. *i wsp.*: Restoration of spermatogenesis by follicle-stimulating hormone despite low intratesticular testosterone in photoinhibited hypogonadotropic Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Biol Reprod*. 1993, 49, 1108–1116. doi: 10.1095/biolreprod49.5.1108. PMID: 8286578.
- Liu C., Rodriguez K., Yao H.H.: Mapping lineage progression of somatic progenitor cells in the mouse fetal testis. *Development*. 2016, 143, 3700–3710. doi: 10.1242/dev.135756. PMID: 27621062.
- Liu Y., Liu Y., Chen S., Kong Z., Guo Y., Wang H.: Prenatal exposure to acetaminophen at different doses, courses and time causes testicular dysplasia in offspring mice and its mechanism. *Chemosphere*. 2023, 345, 140496. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.140496. PMID: 37865203.
- Lu E., Feng F., Wen W., Tong X., Li X., Xiao L. *i wsp.*: Notch signaling inhibition induces G0/G1 arrest in murine Leydig cells. *Andrologia*. 2019, 51, e13413. doi: 10.1111/and.13413. PMID: 31523838.
- Lucas T.F., Royer C., Siu E.R., Lazari M.F., Porto C.S.: Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells. *Biol Reprod*. 2010, 83, 307–317. doi: 10.1095/biolreprod.110.084160. PMID: 20445128.
- Luna-Escalante J.C., Formosa-Jordan P., Ibañez M.: Redundancy and cooperation in Notch intercellular signaling. *Development*. 2018, 145, dev154807. doi: 10.1242/dev.154807. PMID: 29242285.
- Luo B., Aster J.C., Hasserjian R.P., Kuo F., Sklar J.: Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Mol Cell Biol*. 1997, 17, 6057–6067. doi: 10.1128/MCB.17.10.6057. PMID: 9315665.
- Lupien M., Diévert A., Morales C.R., Hermo L., Calvo E., Kay D.G. *i wsp.*: Expression of constitutively active Notch1 in male genital tracts results in ectopic growth

- and blockage of efferent ducts, epididymal hyperplasia and sterility. *Dev Biol.* 2006, 300, 497–511. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.09.010. PMID: 17046738.
- Lustofin S., Kamińska A., Brzozkwinia M., Cyran J., Kotula-Balak M., Bilińska B. i wsp.*: Nuclear and membrane receptors for sex steroids are involved in the regulation of Delta/Serrate/LAG-2 proteins in rodent Sertoli cells. *Int J Mol Sci.* 2022a, 23, 2284. doi: 10.3390/ijms23042284. PMID: 35216398.
- Lustofin S., Kamińska A., Pardyak L., Pawlicki P., Brzozkwinia M., Szprengiel I. i wsp.*: Follicle-stimulating hormone regulates Notch signalling in seminiferous epithelium of continuously and seasonally breeding rodents. *Reprod Fertil Dev.* 2022b, 34, 560–575. doi: 10.1071/RD21237. PMID: 35143740.
- Mattes B., Scholpp S.*: Emerging role of contact-mediated cell communication in tissue development and diseases. *Histochem Cell Biol.* 2018, 150, 431–442. doi: 10.1007/s00418-018-1732-3. PMID: 30255333.
- McKusick V.A.*: Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), 2024. <https://omim.org/>, data wejścia: 10.01.2024 r.
- Mohr O.L.*: Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in Drosophila. *Genetics.* 1919, 4, 275–282. doi: 10.1093/genetics/4.3.275. PMID: 17245926.
- Moreno Acosta O.D., Boan A.F., Hattori R.S., Fernandino J.I.*: Notch pathway is required for protection against heat stress in spermatogonial stem cells in medaka. *Fish Physiol Biochem.* 2023, 49, 487–500. doi: 10.1007/s10695-023-01200-w. PMID: 37126120.
- Mori S., Kadokawa Y., Hoshinaga K., Marunouchi T.*: Sequential activation of Notch family receptors during mouse spermatogenesis. *Dev Growth Differ.* 2003, 45, 7–13. doi: 10.1046/j.1440-169x.2003.00670.x. PMID: 12630942.
- Murta D., Batista M., Silva E., Trindade A., Henrique D., Duarte A. i wsp.*: Dynamics of Notch pathway expression during mouse testis post-natal development and along the spermatogenic cycle. *PLoS One.* 2013, 8, e72767. doi: 10.1371/journal.pone.0072767. PMID: 24015274.
- Murta D., Batista M., Silva E., Trindade A., Henrique D., Duarte A. i wsp.*: Notch signaling in the epididymal epithelium regulates sperm motility and is transferred at a distance within epididymosomes. *Andrology.* 2016, 4, 314–327. doi: 10.1111/andr.12144. PMID: 26825631.
- Murta D., Batista M., Trindade A., Silva E., Henrique D., Duarte A. i wsp.*: In vivo Notch signaling blockade induces abnormal spermatogenesis in the mouse. *PLoS One.* 2014, 9, e113365. doi: 10.1371/journal.pone.0113365. PMID: 25412258.
- Musse A.A., Meloty-Kapella L., Weinmaster G.*: Notch ligand endocytosis: mechanistic basis of signaling activity. *Semin Cell Dev Biol.* 2012, 23, 429–436. doi: 10.1016/j.semcd.2012.01.011. PMID: 22306180.
- Nandagopal N., Santat L.A., Elowitz M.B.*: Cis-activation in the Notch signaling pathway. *Elife.* 2019, 8, e37880. doi: 10.7554/elife.37880. PMID: 30628888.
- O'Brien R., Marignol L.*: The Notch-1 receptor in prostate tumorigenesis. *Cancer Treat Rev.* 2017, 56, 36–46. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.04.003. PMID: 28457880.
- Ohtsuka T., Ishibashi M., Gradwohl G., Nakanishi S., Guillemot F., Kageyama R.*: Hes1 and Hes5 as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* 1999, 18, 2196–2207. doi: 10.1093/emboj/18.8.2196. PMID: 10205173.
- Okada R., Hara T., Sato T., Kojima N., Nishina Y.*: The mechanism and control of Jagged1 expression in Sertoli cells. *Regen Ther.* 2016, 3, 75–81. doi: 10.1016/j.reth.2016.02.005. PMID: 31245476.
- Osipo C., Golde T.E., Osborne B.A., Miele L.A.*: Off the beaten pathway: the complex cross talk between Notch and NF-kappaB. *Lab Invest.* 2008, 88, 11–7. doi: 10.1038/labinvest.3700700. PMID: 18059366.
- Palmer W.H., Deng W.M.*: Ligand-independent mechanisms of Notch activity. *Trends Cell Biol.* 2015, 25, 697–707. doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.010. PMID: 26437585.
- Pandey A., Niknejad N., Jafar-Nejad H.*: Multifaceted regulation of Notch signaling by glycosylation. *Glycobiology.* 2021, 31, 8–28. doi: 10.1093/glycob/cwaa049. PMID: 32472127.
- Parekh P.A., Garcia T.X., Waheed R., Jain V., Gandhi P., Meistrich M.L. i wsp.*: Undifferentiated spermatogonia regulate *Cyp26b1* expression through NOTCH signaling and drive germ cell differentiation. *FASEB J.* 2019, 33, 8423–8435. doi: 10.1096/fj.201802361R. PMID: 30991836.
- Park H.J., Lee W.Y., Do J.T., Park C., Song H.*: Evaluation of testicular toxicity upon fetal exposure to bisphenol A using an organ culture method. *Chemosphere.* 2021, 270, 129445. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129445. PMID: 33421752.
- Ramaswamy S., Walker W.H., Aliberti P., Sethi R., Marshall G.R., Smith A. i wsp.*: The testicular transcriptome associated with spermatogonia differentiation initiated by gonadotrophin stimulation in the juvenile rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Hum Reprod.* 2017, 32, 2088–2100. doi: 10.1093/humrep/dex270. PMID: 28938749.
- Sachan N., Sharma V., Mutsuddi M., Mukherjee A.*: Notch signalling: multifaceted role in development and disease. *FEBS J.* 2023. doi: 10.1111/febs.16815. PMID: 37166442.
- Sadate-Ngatchou P.I., Pouchnik D.J., Griswold M.D.*: Follicle-stimulating hormone induced changes in gene expression of murine testis. *Mol Endocrinol.* 2004, 18, 2805–2816. doi: 10.1210/me.2003-0203. PMID: 15297604.
- Sahin Z., Bayram Z., Celik-Ozenci C., Akkoyunlu G., Seval Y., Erdogan T. i wsp.*: Effect of experimental varicocele on the expressions of Notch 1, 2, and 3 in rat testes: an immunohistochemical study. *Fertil Steril.* 2005, 83, 86–94. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.09.006. PMID: 15652892.
- Salazar J.L., Yamamoto S.*: Integration of Drosophila and human genetics to understand Notch signaling related diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2018, 1066, 141–185. doi: 10.1007/978-3-319-89512-3_8. PMID: 30030826.
- Sambe N., Yoshihara M., Nishino T., Sugiura R., Nakayama T., Louis C. i wsp.*: Analysis of Notch1 signaling in mammalian sperm development. *BMC Res Notes.* 2023, 16, 108. doi: 10.1186/s13104-023-06378-z. PMID: 37337280.
- Sharma S.K., Pourat J., Abdel-Attı D., Carlin S.D., Piersigilli A., Bankovich A.J. i wsp.*: Noninvasive interrogation of DLL3 expression in metastatic small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2017, 77, 3931–3941. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0299. PMID: 28487384.
- Siebel C., Lendahl U.*: Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiol Rev.* 2017, 97, 1235–1294. doi: 10.1152/physrev.00005.2017. PMID: 28794168.
- Sohni A., Tan K., Song H.W., Burow D., de Rooij D.G., Laurent L. i wsp.*: The Neonatal and Adult Human Testis Defined at the Single-Cell Level. *Cell Rep.* 2019, 26, 1501–1517.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.045. PMID: 30726734;
- Sørensen I., Adams R.H., Gossler A.*: DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood.* 2009, 113, 5680–5688. doi: 10.1182/blood-2008-08-174508. PMID: 19144989.
- Sprinzak D., Blacklow S.C.*: Biophysics of Notch signaling. *Annu Rev Biophys.* 2021, 50, 157–189. doi: 10.1146/annurev-biophys-101920-082204. PMID: 33534608; PMCID: PMC8105286.
- Sprinzak D., Lakhanpal A., Lebon L., Santat L.A., Fontes M.E., Anderson G.A. i wsp.*: Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature.* 2010, 465, 86–90. doi: 10.1038/nature08959. PMID: 20418862.
- Swiatek P.J., Lindsell C.E., del Amo F.F., Weinmaster G., Gridley T.*: Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev.* 1994, 8, 707–719. doi: 10.1101/gad.8.6.707. PMID: 7926761.
- Tang H., Brennan J., Karl J., Hamada Y., Raetzman L., Capel B.*: Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis. *Development.* 2008, 135, 3745–3753. doi: 10.1242/dev.024786. PMID: 18927153.
- Tang X., Wu S., Shen L., Wei Y., Cao X., Wang Y. i wsp.*: Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced testicular toxicity through Nrf2-mediated Notch1 signalling pathway in Sprague-Dawley rats. *Environ Toxicol.* 2018, 33, 720–728. doi: 10.1002/tox.22559. PMID: 29663635.
- Thumfart K.M., Mansuy I.M.*: What are Sertoli cells? Historical, methodological, and functional aspects. *Andrology.* 2023, 11, 849–859. doi: 10.1111/andr.13386. PMID: 36651593.
- Tiemeijer L.A., Sanlidag S., Bouting C.V.C., Sahlgren C.M.*: Engineering tissue morphogenesis: taking it up a Notch. *Trends Biotechnol.* 2022, 40, 945–957. doi: 10.1016/j.tibtech.2022.01.007. PMID: 35181146.
- Uhlen M., Fagerberg L., Hallström B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A. i wsp.*: Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015, 347, 1260419. doi: 10.1126/science.1260419. PMID: 25613900.
- Uyttendaele H., Marazzi G., Wu G., Yan Q., Sasoon D., Kitajewski J.*: Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mam-

- malian Notch gene. *Development*. 1996, 122, 2251–2259. doi: 10.1242/dev.122.7.2251. PMID: 8681805.
- Varshney S., Stanley P.*: Multiple roles for O-glycans in Notch signalling. *FEBS Lett.* 2018, 592, 3819–3834. doi: 10.1002/1873-3468.13251. PMID: 30207383.
- Wen Q., Wang Y., Tang J., Cheng C.Y., Liu Y.X.*: Sertoli cell Wt1 regulates peritubular myoid cell and fetal Leydig cell differentiation during fetal testis development. *PLoS One*. 2016, 11, e0167920. doi: 10.1371/journal.pone.0167920. PMID: 28036337.
- Xu Y., Jiang S., Hu Y., Zhang Q., Su W.*: TGF- β 3 induces lactate production in Sertoli cell through inhibiting the Notch pathway. *Andrology*. 2022, 10, 1644–1659. doi: 10.1111/andr.13288. PMID: 36057850.
- Xue Y., Gao X., Lindsell C.E., Norton C.R., Chang B., Hicks C.* i wsp.: Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet*. 1999, 8, 723–730. doi: 10.1093/hmg/8.5.723. PMID: 10196361.
- Yuan F.P., Lin D.X., Rao C.V., Lei Z.M.*: Cryptorchidism in LhrKO animals and the effect of testosterone-replacement therapy. *Hum Reprod*. 2006, 21, 936–942. doi: 10.1093/humrep/dei433. PMID: 16361283.
- Zhang H., Wang W., Wu Z., Zheng Y., Li X., Han S.* i wsp.: Effect of Notch signal pathway on steroid synthesis enzymes in TM3 cells. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2023. doi: 10.2174/1871530323666230418113852. PMID: 37106514.
- Zhou B., Lin W., Long Y., Yang Y., Zhang H., Wu K.* i wsp.: Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022, 7, 95. doi: 10.1038/s41392-022-00934-y. PMID: 35332121.
- Zuo Q., Zhang C., Jin K., Jing J., Sun C., Ahmed M.F.* i wsp.: NICD-mediated notch transduction regulates the different fate of chicken primordial germ cells and spermatogonial stem cells. *Cell Biosci*. 2018, 8, 40. doi: 10.1186/s13578-018-0238-y. PMID: 29951200.