

Hiiren kivesten kehitykseen ja hedelmällisyyteen vaikuttavat geneettiset ja hormonaaliset tekijät

Sakke Simonen

Biologia (fysiologia ja genetiikka)

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

2.9.2024

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Biologia

Tekijä(t): Sakke Simonen

Otsikko: Hiiren kivesten kehitykseen ja hedelmällisyyteen vaikuttavat geneettiset ja hormonaaliset tekijät

Ohjaaja(t): Riitta Nissinen

Sivumäärä: 25 sivua + liitteet 0 sivua

Päivämäärä: 2.9.2024

Hiiren kivesten kehitys on moniosainen, monimutkainen prosessi, jota säätelevät useat proteiinit, sekä parakriiniset ja endokriiniset hormonit. Hedelmöitystä nopeasti seuraten alkion sukupuoli määräytyy tarkan geneettisen säätelyn seurauksena. Tästä seuraa kivesten eri solujen erilaistuminen ja järjestäytyminen kehittyvissä kiveksissä. Läpi kehityksen, kivesten solujen erilaistumista, kasvua ja toimintaa säätelevät ympäröivän kudoksen tuottamat tekijät, sekä umpirauhasten erittämät hormonit, joiden kautta hypothalamus säätelee kivesten toimintaa ja kehitystä. Useiden tekijöiden vaikutus riippuu siitä, milloin niitä tuotetaan ja tätä säädellään tarkasti. Koiraan lisääntymiskyvyn määrää onnistunut kivesten kehitys, joka takaa tehokkaan siittiöntuotannon. Useista kivesten kehityksen säätelijöistä on tehty syventäviä katsauksia, ja tämä katsaus pyrkii kokoamaan yleisen kuvan siitä, miten nämä tekijät vaikuttavat kivesten kehitykseen ja koiraan hedelmällisyyteen syventymättä yksittäiseen tekijään. Katsaus kiinnittää erityistä huomiota gonadotropiinien ja androgeenien vaikutukseen kivesten kehityksessä, sekä kertoo Leydigin solujen, Sertolin solujen ja sukusolujen vuorovaikutuksesta keskenään. Katsaus nostaa esille vaihtoehtoisia teorioita kivesten kehityksessä ja keskittyy niistä involuutioteoriaan.

Avainsanat: sukupuolen määräytyminen, solujen erilaistuminen, solujen proliferaatio, hedelmällisyys, gonadotropiinit, androgeenit

SISÄLLYS

Johdanto	1
1 Kivesten fysiologia	1
2 Kivesten kehitys.....	3
2.1 Fetaalinen vaihe	4
2.1.1 Sukupuolen määräytyminen.....	4
2.1.2 Somaattisten solujen ja sukusolujen erilaistuminen	5
2.1.3 Anti-mullerian hormoni	6
2.2 Syntymänjälkeinen vaihe	7
2.2.1 Leydigin solujen kehitys	7
2.2.2 Veri–kiveseste.....	8
3 Kivesten kehityksen säätely	9
3.1 Kivesten ylläpito ja sukusolujen määrä	9
3.2 Leydigin solujen säätely	10
3.2.1 Hedgehog-ligandit.....	10
3.2.2 PDGF	10
3.2.3 Notch-signaalitie	11
3.3 Hormonit.....	11
3.4 Androgeenit.....	13
Pohdinta	14
Lähdeluettelo.....	17

JOHDANTO

Fysiologiassa kehitys tarkoittaa eliön rakenteiden muodostumista, mikä tapahtuu järjestelmällisesti geenitasolla. Solut tuottavat proteiineja, joilla ne vaikuttavat ympäristössään oleviin soluihin ja nämä solut yhdessä muodostavat kudoksia ja elimiä. Prosessi ei eroa lajista toiseen, vaikka elinten rakenne ja toiminta voivat olla hyvin erilaisia. Tämän takia on tärkeää tutkia ja ymmärtää, miten kehitys tapahtuu eri lajeissa, jotta voimme soveltaa siitä saatua tietoa muualla. Katsauksessa hiiren kivesten kehitykseen ja hedelmällisyyteen keskeisimminkin vaikuttavat geneettiset ja hormonaaliset tekijät on esitelty. Nämä tekijät on valittu sen perusteella, kuinka voimakkaasti ne vaikuttavat hiiren kykyyn tuottaa lisääntymiskykyisiä jälkeläisiä. Lukuisat geenit ja signaalitiet ohjaavat tukikudoksen ja sukusolujen kehitystä kiveksissä. Kehitys lähtee kohdusta ja päättyy sukukypsyyteen. Kivesten kehitys vaikuttaa sukupuoliominaisuuksien kehitykseen ja lisääntymiskykyyn, sillä kivekset tuottavat sukupuolihormoneja, sekä tarjoavat kasvuympäristön sukusoluille. Sukusolujen kehitys vaatii monivaiheisen ja hienovaraisen prosessin, joten häiriöt kehityksen aikana laskevat hedelmällisyyttä ja voivat johtaa hedelmättömyyteen. Kivesten kehityksessä kriittisimmät vaiheet ovat fetaalinen ja neonataalinen vaihe. Fetaalisessa vaiheessa bipotentiaalisella sukuelinharjanteella tapahtuu sukupuolen määräytyminen, missä primaaristen sukupuolielinten somaattisten solujen kohtalo määrättyy ja kivesten järjestäytyminen alkaa. Neonataalisessa vaiheessa kehittyneet kivekset kasvavat koossa ja läpikäyvät rakenteellisia muutoksia, jotka antavat kiveksille kyvyn tuottaa onnistuneesti siittiöitä. Fetaalista vaihetta säätelevät kaksi toisiaan kohtaan antagonistista signaalitietä ja neonataalista vaihetta puolestaan säätelevät suuremmissa osassa umpieritteiset hormonit ja kivesten tuottamat androgeenit.

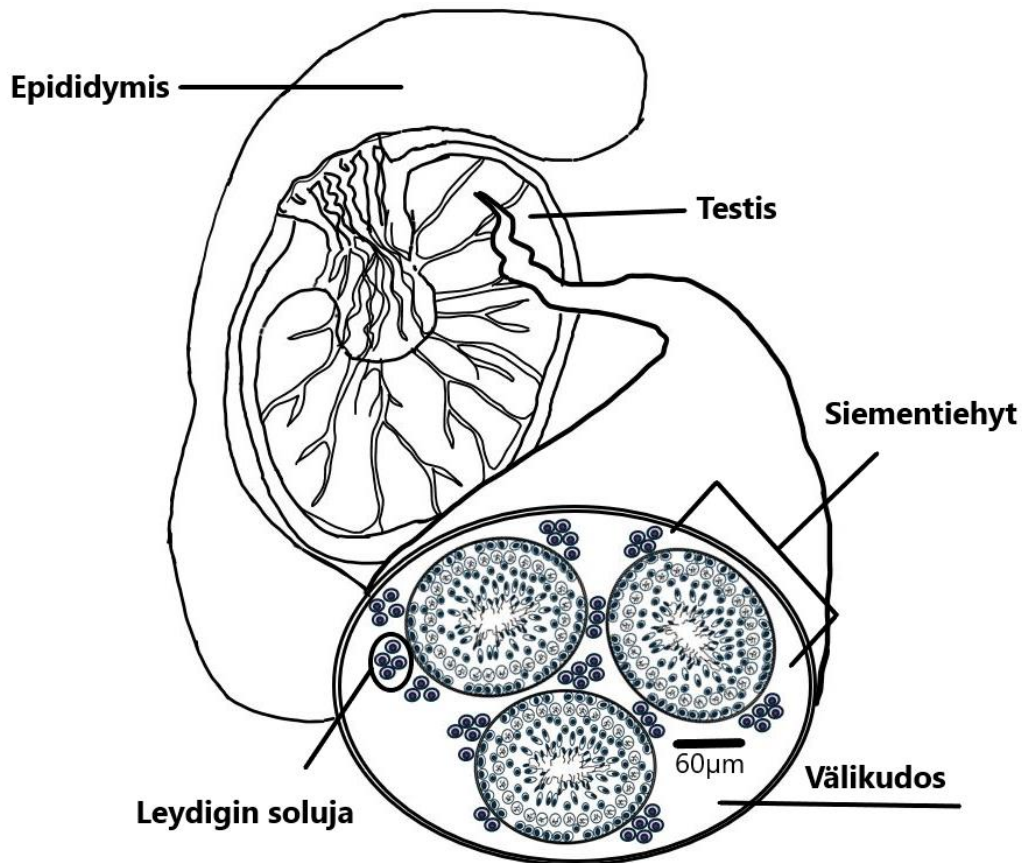
1 KIVESTEN FYSIOLOGIA

Kivekset ovat koirashiiren primariset sukupuolielimet, jotka tuottavat siittiöitä ja ovat ainoa steroidogeneettinen elin lisämunuaisten lisäksi. Kivesten rakenne koostuu lohkoista, joissa välikudos on järjestäytynyt tuhansien siementiehyiden ympärille (Kuva 1).

Siementiehyet koostuvat lähes täysin Sertolin soluista ja kehittyvistä sukusoluista. Sertolin solut vuoraavat siementiehyen reunoja ja toimivat kasvualustoina sukusoluille, jotka kehittyvät Sertolin solujen lomassa (Kuva 2). Sukusolut läpikäyvät spermatogeneesin kulkiessaan siementiehyen basaalikerroksesta kohti siementiehyen keskustaa, missä ne vapautuvat siementiehyen luumeniin pidentyneinä spermatideina, eli spermatozoana spermiaatiassa (Katsaus Jan ym., 2012). Siementiehyiden lumenit yhtyvät kanavaan nimeltä *rete testis*, mihin kaikista lohkoista valmistuvat spermatozoat kerääntyvät ja sieltä ne kulkeutuvat epididymikseen, jossa ne kypsyvät lopullisesti.

Siementiehyiden välissä oleva kudos eli välikudos tukee siementiehyiden toimintaa tuomalla ravinteita ja hapetta verisuoniston välityksellä siementiehyen epiteelisoluille. Suurin osa

välikudoksesta koostuu Leydigin soluista, jotka tuottavat androgeeneja, kuten testosteronia, mitkä osallistuvat kivesten kehityksen ja spermatogeneesin säätelyyn.

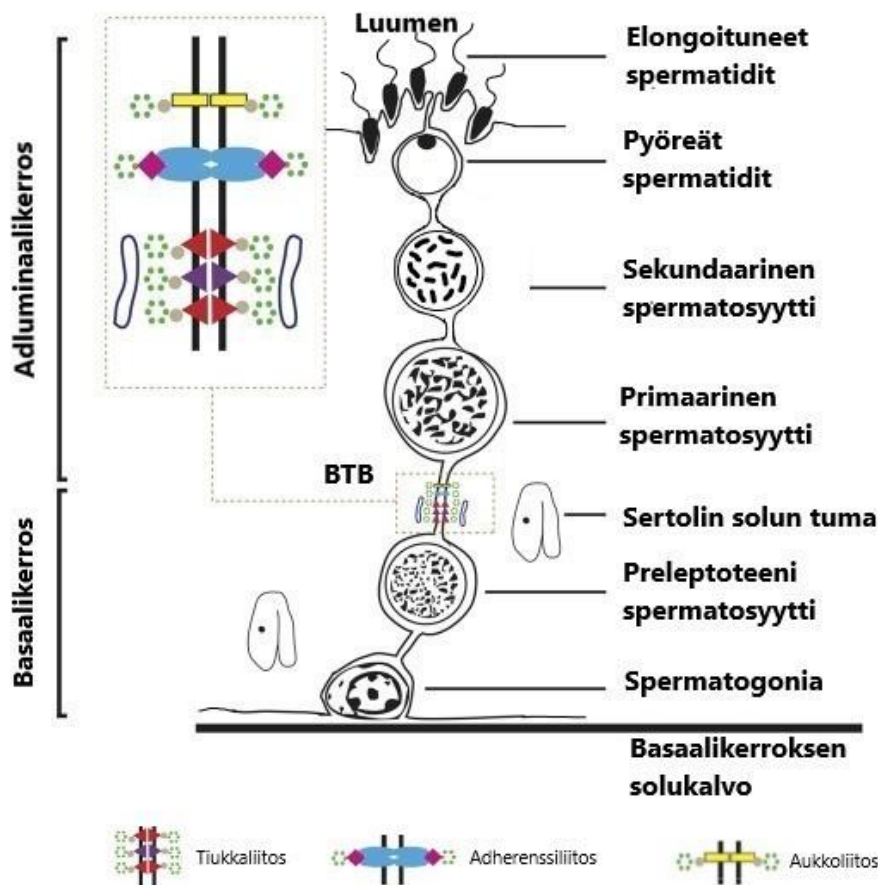


Kuva 1: Kiveksen poikkileikkaus

Siementiehyessä on kaksi kerrosta: basaali- ja adluminaalinen kerros, sekä siementiehyen lumen (Kuva 2). Basaalikerroksessa sijaitsevat mitoottisesti uusiutuvat sukukantosolut, joista osa jatkaa mitoottista jakautumista, kun taas loput siirtyvät spermatogeneettiseen sykliin spermatogonioina. Spermatogoniot jatkavat meioosin profaasiin, siirtyvät adluminaaliseen kerrokseen, missä ne käyvät meioottiset jaot ja kypsyvät spermiogeneesissä pidentyneiksi spermateiksi (Jan ym., 2012). Spermateitit lopuksi vapautuvat siementiehyen lumeniin.

Basaali- ja adluminaalikerrosta erottaa veri-kiveseste (engl. *Blood-testis barrier, BTB*), joka on muodostunut vierekkäisten Sertolin solujen välille useiden molekulaaristen sidosten välityksellä (Katsaus Luaces ym., 2023). BTB säätelee aineiden siirtymistä adluminaaliseen kerrokseen ja eristää sen immuunijärjestelmästä, sekä luo uniikin mikroympäristön basaali- ja adluminaalikerrokseen (Katsaus Wong & Cheng, 2005). Tätä kaksiosaista mikroympäristöä tarvitaan spermatogeneesin eri vaiheissa. BTB päästää preleptoteenispermatoosyyttejä, biomolekyylejä ja ravinteita läpi tiettyjen reaktioteiden kautta, jotka muokkaavat BTB:n rakennetta (Wong & Cheng, 2005; Yan ym., 2008). Jokaista siementiehyttä ympäröi epiteelikerros, joka sijaitsee basaalikerroksen ja välikudoksen rajapinnassa. Tämä epiteelikerros muodostuu peritubulaarisista myoidisoluista, mitkä säätelevät siementiehyiden

aineenvaihduntaa, supistuksia, rakenteellista kestävyyttä, sekä osallistuvat Sertolin solujen säätelyyn (Katsaus Maekawa ym., 1996). Yhdessä nämä rakenteet mahdollistavat jatkuvan siittiöiden tuotannon ja suojaavat siementiehytä kudosaauriolta.



Kuva 2: Siementiehyen ja veri–kivesesteen rakenne. Kuva muokattu lähteestä Luaces ym., 2023.

2 KIVESTEN KEHITYS

Hormonaaliset ja geneettiset tekijät säätelevät kivesten kehitysvaiheita. Hormonaalisessa säätelyssä aivolisäkkeen ja muiden umpirauhasten tuottamat hormonit säätelevät solujen toimintaa ja kehitystä. Geneettisessä säätelyssä kivesten solujen tuottamat proteiinit ja RNA-transkriptit säätelevät solujen toimintaa ja kehitystä. Mitä aikaisemmassa vaiheessa kehitystä esiintyy häiriöitä, sitä vakavampia seuraamuksia sillä voi olla koiraan elin- ja lisääntymiskykyyn.

Hiiren kivesten kehityksen keskeisimmät vaiheet ovat fetaalinen vaihe ja ensimmäiset kolme syntymänjälkeistä viikkoa, eli neonataalinen vaihe. Fetaalisessa vaiheessa välikudos, siementiehyet ja näiden välinen peritubulaarinen myoidisolukerros muodostuvat. Neonataalisessa vaiheessa kivekset kasvavat voimakkaasti ja kivesten rakenteet saavat lopullisen muotonsa, mutta ne jatkavat kasvuaan vielä aikuisuuteen. Neonataalisen vaiheen jälkeen kivesten rakenteissa ei havaita uusien rakenteiden järjestäytymistä (Wilhelm ym.,

2007). Läpi fetaalisen vaiheen ja syntymänjälkeisen eli postnataalisen vaiheen kivekset ovat vastuussa aivojen ja kehon maskulinisaatiosta, mikä tapahtuu androgeenien säätelemänä (Wu & Shah, 2011; Chang ym., 2013). Sukukypsyyden saavutettuaan, kivesten pääasiallinen tehtävä vaihtuu sukupuolikehityksestä androgeenituotantoon ja spermatogeneesiin ylläpitoon.

2.1 Fetaalinen vaihe

Kivekset kehittyvät bipotentiaalisesta sukuelinharjanteesta (*engl. Genital ridge*), josta kehittyy joko kivekset, tai munasarjat riippuen sukupuolen määräytymisestä. Koiraalla sukuelinharjanteen soluista kehittyy Sertolin soluja ja Leydigin soluja, naaraalla puolestaan kehittyy granuloosasoluja ja teekasoluja (Wilhelm ym., 2007). Bipotentiaalisen sukuelinharjanteen kehityspäätöksen jälkeen koirassa Sertolin solut ohjaavat Leydigin solujen kehitystä, naaraan lisääntymiskanavien eli paramesonefristen tai mullerian kanavien (*engl. Mullerian ducts*) hajotusta, sekä kivesten järjestäytymistä (Wilhelm ym., 2007). Ensimmäiset Leydigin solut eivät pysty tuottamaan testosteronia, vaan ne tuottavat testosteronin esiasetta androstenedionia, joka muutetaan testosteroniksi Sertolin soluissa (Shima ym., 2013). Kivesten tuottamat androgeenit ovat vastuussa sekä sukupuoliominaisuuksien kehityksestä, että aivojen maskulinisaatiosta alkiossa. Testosteroni ylläpitää koiraan lisääntymiskanavia eli mesonefrisia, tai wolffian kanavia (*engl. Wolffian ducts*) ja ohjaa niiden kehitystä ja kasvua epididymikseksi, siemenjohtimiksi (*vasa deferentia*) ja siemenrauhasiksi (*engl. Seminal vesicles*) (Welsh ym., 2006, 2009).

Siementiehyet ja välikudos järjestäytyvät osissa. Ensin sukusolut kulkeutuvat passiivisesti sukuelinharjanteelle takasuolesta (Bendel-Stenzel ym., 1998), sitten *Sry* (*Sex-determining region Y, Sry*) -geenin ilmennys aikaansaa Sertolin solujen erilaistumisen ja proliferaation sukuelinharjanteen koeloomisesta epiteelialueesta (Karl & Capel, 1998; Schmahl ym., 2000). Sitten Sertolin solut järjestäytyvät sukusolujen ympärille, sekä *Sry* aikaansaa tulevan välikudoksen solujen ja peritubulaaristen myoidisolujen siirtymän urogenitaaliselle harjanteelle (Wilhelm ym., 2007). Peritubulaarinen myoidisolukerrokseen muodostaa ohuen epiteelisolukerroksen kivesjohtojen ympärille, mikä säätelee sukusolujen kulkeutumista siementiehyissä, sekä antaa rakenteellista kestävyyttä siementiehyille (Maekawa ym., 1996).

2.1.1 Sukupuolen määräytyminen

Sukupuolen määräytymisessä on kolme vaihetta: Sertolin solujen, tai granuloosasolujen erilaistuminen, Leydigin solujen, tai teekasolujen erilaistuminen, ja wolffian kanavien, tai mullerian kanavien kehittyminen bipotentiaalisesta sukuelinharjanteesta. Näissä vaiheissa toimivat signaalitiet suosivat joko naaraan kehitystä, tai koiraan kehitystä, ja tapahtumaa ohjaavat kaksi toisistaan itsenäistä ja toisiaan inhiboivaa signaalitietä. Tiedyt geenit ohjaavat sukuelinharjanteen kehitystä kiveksiksi ja ylläpitävät Sertolin solujen ja Leydigin solujen erilaistumista, kun taas toiset geenit ohjaavat ja ylläpitävät naaraan vastaavien rakenteiden kehitystä (Katsaus She & Yang, 2017).

Kivesten kehitys alkaa ensimmäisten Sertolin solujen erilaistumisesta ja *Sry*-geenin ilmennyksestä E10.5 (*engl. Embryonic day, E*) alkaen (Hacker ym., 1995). Y-kromosomissa sijaitseva *Sry*-geeni toimii mestarisäätelijänä, joka aikaansaa kivesten kehityksen

sukuelinharjanteesta (Koopman ym., 1991). *Sry* ja *Sfl* (engl. *Steroidogenic factor 1*, *Sfl*, *Nr5a1 tai Ad4bp*) yhdessä laukaisevat *Sox9* (engl. *SRY-box transcription factor 9*, *Sox9*) ilmennyksen Sertolin soluissa (Sekido & Lovell-Badge, 2008). Koska kivesten somaattisista soluista vain Sertolin solut ilmentävät sukupuolenmääräytymisgeeniä *Sry* ja *Sox9*-geeniä (Sekido ym., 2004), niin Sertolin solujen uskotaan olevan vastuussa kivesten kehityksen säätelystä.

Sox9 säätelee koiraan sukupuolen määräytymistä yhdessä usean geenin, kuten *Sfl*, *Sox8*, *Sox10* ja *Fgf9* (engl. *Fibroblast growth factor 9*, *Fgf9*) kanssa (She & Yang, 2017). Useat näistä geneeistä toimivat antagonistisesti munasarjojen kehitystä ohjaavia geenejä kohtaan, sekä osa geneeistä hallitsevat kivesjohtojen (engl. *Testis cords*) järjestäytymistä, mullerian kanavien degeneraatiota, sekä Sertolin solujen tai Leydigin solujen kehitystä. Vaikka *Sry* ilmennys rajoittuu hyvin lyhyelle aikavälille välillä E10.5-E12.5 (Hacker ym., 1995), niin transgeeniset hiiritutkimukset XX-hiirillä ovat osoittaneet *Sry*-geenin toiminnan olevan välttämätön ja yksinään riittävä koirasfenotyypin kehitykselle (Koopman ym., 1991). *Sry* laukaiseman *Sox9*-ilmennyspiikin jälkeen *Sox9* ilmennystä ylläpidetään E11.5 eteenpäin ilman *Sry*:n ilmennystä (Sekido & Lovell-Badge, 2008) ja *Sox9* ylläpitoon osallistuu positiivinen palauteketju *Fgf9*-geenin kanssa (Kim ym., 2006).

Sfl eli *Nr5a1* on keskeinen geeni, jota ekspressoidaan kivesten somaattisissa soluissa ja lisämunuaisissa, missä se vaikuttaa primaaristen sukuelinten ja lisämunuaisien kehityksessä (Luo ym., 1994; Payne & Youngblood, 1995). Luo ym. (1994) osoittivatkin, että *Nr5a1*-null hiirillä ei kehity lisämunuaisia sekä gonadeja. Iso syy tähän on se, että *Nr5a1*-geeni on kriittinen steroidogeneettisten solujen kehitykseen. *Nr5a1*-geenin alhainen ilmennys johtaa täydelliseen Leydigin solujen katoon FLE-null (engl. *FLC-specific enhancer of Nr5a1*, *FLE*) -hiirissä, mikä johtaa hypoandrogenismiin (Shima ym., 2018). Wolffian kanavat degeneroituvat hypoandrogenismin seurauksena, eikä tällöin epididymis kehity (Welsh ym., 2006, 2009). *Nr5a1*-geeni todennäköisesti toimii proliferaation säätelijänä, sillä sitä ekspressoidaan Sertolin ja Leydigin solujen kehityksen aikana, mutta ei Sertolin soluissa tai Leydigin soluissa, kun ne ovat lopettaneet jakautumisensa (Barsoum ym., 2013).

Wtl (engl. *Wilm's tumor 1*, *Wtl*) ilmennys on myös välttämätöntä normaalille kivesten ja lisämunuaisien kehitykselle sekä toiminnalle. Alkiovaiheessa *Wtl* ilmennys lisää *Sry* ilmennystä, mikä vaikuttaa Sertolin solujen proliferaatioon FGF9 välityksellä (Bradford ym., 2009). *WT1KO*-hiiret ovat homotsygootteina letaaleja, sekä heterotsygootteina urogenitaalinen harjanne käy apoptoosin gestaatiopäivänä 11 eivätkä lisämunuaiset kehity normaalisti (Kreidberg ym., 1993). *Wtl*-geenin keskeinen rooli on steroidogeneettisten solujen erilaistumisen säätely (Wen ym., 2014).

2.1.2 Somaattisten solujen ja sulusolujen erilaistuminen

Kivesten somaattisista soluista Sertolin solujen ja Leydigin solujen erilaistuminen ei ole pysyvää, vaan erilaistuminen voi purkautua ja Sertolin soluista kehittyä granuloosasoluja. Sertolin solujen ja granuloosasolujen välillä nähdään antagonistinen säätelyketju, joka päättää solujen erilaistumisesta läpi hiiren elämän. Granuloosasolujen kehitystä säätelee positiivisesti *Foxl2*-geeni, joka inhiboi *Sox9* ilmennystä, kun taas Sertolin solujen kehitystä säätelee positiivisesti *Dmrt1*-geeni, joka ylläpitää *Sox9*-ilmennystä (Matson ym., 2011; Takasawa ym.,

2014). Toisen säätelyketjun estyessä, kehitys etenee vastakkaiseen suuntaan ja nähdään erilaistumisen purkautuminen ja uudelleenerilaistuminen. Poistogeenisissä *Foxl2* naaraissa *Sox9* ja sen alavirran geenien ilmennys kasvaa ja aikaansaa aikuisessa naaraassa Sertolin solujen kehityksen granuloosasoluista (Takasawa ym., 2014). Vastakkainen vaikutus nähdään *Dmrt1*-null-hiirissä, missä Sertolin soluista kehittyvät granuloosasolut (Matson ym., 2011). In vitro -tutkimukset ovat myös osoittaneet, että *Dmrt1* ylläpitää Sertolin soluja, sekä edistää Sertolin solujen kehitystä (Xu ym., 2019). *Dmrt1* ja *Foxl2* välillä on täten antagonistinen suhde. Nämä stroomasolut puolestaan vaikuttavat sukusolujen kohtaloon.

Primordiaaliset sukusolut kulkeutuvat kehittyvien kivesten alueelle urogenitaaliselle harjanteelle takasuolesta ja useimmat näistä sukusoluista kulkeutuvat harjanteelle E11.5 mennessä, missä niiden ympärille muodostuvat kivesjohdot, jotka voidaan tunnistaa E12.5 eteenpäin (Bendel-Stenzel ym., 1998). Kivesten kehityspäätöksen jälkeen alkaa sukusolujen kehittyminen oogonioiksi tai spermatogonioiksi. Kivesjohtojen sisällä mitoottisesti lisääntyvät sukusolut erilaistuvat T1-prospermatogonioiksi ja pysähtyvät interfaasin G0-G1-vaiheeseen. Prospermatogonioiden kohtalo ei ole lopullinen ja niiden siirtymä ensimmäisen jaon meioosiin tapahtuu kahden toisiinsa antagonistisen signaalireitin avulla: CYP26B1/RA (*engl. Retinoic acid, RA*) ja FGF9/RA-reitti (Barrios ym., 2010; Bowles ym., 2010). Munasarjoissa retinoidihappo laukaisee sukusolun siirtymän meioosiin primaarisesti oosyytiksi, kun taas Sertolin solujen tuottama CYP26B1 hajottaa retinoidihapon, inhiboiden sukusolujen siirtymistä meioosiin koiraisissa (Bowles ym., 2006). Sukusolujen kehitys riippuu näiden signaalireittien säätelystä, ja FGF9 edistää sukusolujen siirtymää mitoottiseen arestiin sekä koiraan sukusolumarckkerien ilmennystä (Gustin ym., 2016). Sukupuolen määräytymisen määräävä tekijä voi olla kilpailu *Wnt4* ja *Fgf9* geenin välillä, missä *Sox9*:n yksi rooli olisi *Fgf9*-ilmennyksen lisääminen ja *Wnt4*-ilmennyksen estäminen (Kim ym., 2006). *Fgf9*-ilmennys ei ole välttämätön naaraiden sukupuolikehitykselle, mutta se on välttämätön koiraiden kehitykselle. *Wnt4* on puolestaan kriittinen naaraiden sukupuolikehitykselle, mutta ei koiraiden (Vainio ym., 1999).

2.1.3 Anti-mullerian hormoni

Kehittyvässä alkiossa muodostuvat kummankin sukupuolen lisääntymiskanavat, joista mullerian kanavat hajoavat koiraisissa, kun taas wolffian kanavat hajoavat naaraissa (Wilhelm ym., 2007). Mullerian kanavat hajoavat anti-mullerian hormonin (*engl. Anti-mullerian hormone, AMH*) vaikutuksesta. AMH erittyy Sertolin soluista lähes heti niiden erilaistumisen jälkeen ja sen erityis jatkuu sukukypsyyteen asti (Josso ym., 1993). AMH:n erityis vaatii, että Sertolin solu ilmentää samanaikaisesti *Sfl*-, *Wtl*- ja *Sox9*-geeniä (Josso ym., 2001). Ilman *Sox9*:n ilmennystä mullerian kanavia ei hajoteta ja wolffian kanavat degeneroituvat ilman testosteronia (Barrionuevo ym., 2006; Welsh ym., 2009). Tosin AMH:n tuotannossa nähdään redundanssia ja *Sox10*-geeni voi yhdessä *Sfl*-geenin kanssa laukaista AMH:n tuotannon (Polanco ym., 2010).

AMH on TGF- β -proteiiniperheeseen kuuluva kasvutekijä, joka välittää vaikutuksensa AMH-reseptorien välityksellä (MacLaughlin ym., 1992; Nachtigal & Ingraham, 1996). AMH-reseptorit ovat seriini-treoniinikinaaseja, jotka laukaisevat spesifin AMH-signaalivälitystien,

joka aikaansaa mullerian kanavien degeneraation (Mishina ym., 1999). Syntymän jälkeen kivesten tuottama testosteroni estää AMH:n tuotantoa (Al-Attar ym., 1997).

2.2 Syntymänjälkeinen vaihe

Syntymän jälkeen kivesten koostumus läpikäy merkittävän muutoksen, missä fetaaliset Leydigin solut (*engl. Fetal Leydig cell, FLC*) korvautuvat aikuisilla Leydigin soluilla (*engl. Adult Leydig cell, ALC*) ja Sertolin solujen välille muodostuu veri-kiveseste, minkä jälkeen kivekset pystyvät tuottamaan siittiöitä.

2.2.1 Leydigin solujen kehitys

Leydigin solujen kehitys alkaa adrenogonadaalisesta SF1+-kantasolulinjasta, joka myös tuottaa adrenokortikaalisia soluja, joita löydetään myös lisämunuaisista (Hatano ym., 1996). Leydigin solujen erilaistuminen tästä linjasta riippuu Sertolin solujen tuottamista tekijöistä, sekä SF1+-kantasolujen ilmentämistä geeneistä, kuten *Wtl*, joka ohjaa Leydigin solujen erilaistumista sekä fetaalisessa, että neonataalisessa vaiheessa (Wen ym., 2014).

Leydigin solut erotetaan kahteen ryhmään riippuen solujen geneettisistä ja morfologisista ominaisuuksista. Fetaalisessa ja neonataalisessa vaiheessa vallitsevana solutyypinä ovat FLC-solut, jotka korvautuvat syntymänjälkeisessä vaiheessa ALC-soluilla (Hazra ym., 2013). Kiveksiin jää myös pieni kanta FLC-soluja, mitkä voidaan havaita aikuiskoiraassa (Shima ym., 2015). Ensimmäiset Leydigin solut erilaistuvat E10.5 SF1+/WT1+-kantasoluista koeloomisen epiteelialueen jakautuessa (Schmahl ym., 2000; Barsoum & Yao, 2010). Pääosa FLC-soluista erilaistuvat E11.5-E13.5 aikana (Yao ym., 2002).

FLC-soluilla on kaksi erilaistumisastetta (Barsoum & Yao, 2010). SF1+/WT1+-kantasolu ensin kehittyy FLC-soluksi, sitten siitä voi kehittyä terminaalisesti erilaistunut FLC-solu. SF1+/WT1+-kantasolut, FLC-solut ja terminaalisesti erilaistuneet FLC-solut voidaan erottaa toisistaan SF1-tekijän tuotannon ja steroidogeneettisen 3 β HSD-entsyymin tuotannon avulla (Barsoum ym., 2013). SF1+-kantasolut ovat SF1⁺/3 β HSD⁻, FLC-solut puolestaan SF1⁺/3 β HSD⁺ ja terminaalisesti erilaistuneet FLC-solut ovat SF⁻/3 β HSD⁺ (Barsoum ym., 2013). 3 β HSD on steroidogeneettinen entsyymi, mitä Leydigin solut tarvitsevat testosteronin esiasteen, progesteronin tuottamiseen (Payne & Youngblood, 1995).

Aikuisten Leydigin solujen kehitys on puolestaan kiistanalainen aihe. FLC-solujen ja ALC-solujen alkuperästä on ristiriitaisia tuloksia, eikä asiasta ole yksimielisyyttä (Ge ym., 2006; Barsoum ym., 2013; Inoue ym., 2016). Leydigin solujen erilaistumisesta on kolme teoriaa, jotka näen tarpeen mainita (Katsaus. Ensimmäisen teorian mukaan pääosa FLC-soluista läpikäyvät apoptoosin aikaisin neonataalisessa vaiheessa ja jäljelle jääneet FLC-solut erilaistuvat ALC-soluiksi ja jakautuvat tuottaen lisää ALC-soluja. Toisen teorian mukaan FLC- ja ALC-solut kehittyvät toisistaan itsenäisistä kantasolupopulaatioista ja FLC-solut läpikäyvät apoptoosin aikaisin neonataalisessa vaiheessa. Kolmannen teorian mukaan FLC- ja ALC-solut kehittyvät samasta SF1+-solukannasta, mutta terminaalisesti erilaistuneista FLC-soluista ei voi kehittyä ALC-soluja. Nämä solut voivat kuitenkin involuution eli erilaistumisen purkautumisen jälkeen erilaistua ALC-soluiksi (Svingen & Koopman, 2013). Tämä teoria on

nimeltään involuutihypoteesi, johon keskityn tässä katsauksessa, sillä se on kerännyt huomattavasti suosiota viime vuosina.

Neonataalisessa vaiheessa siementiehyiden reuna-alueiden SF1+/WT1+-kantasoluista kehittyy Leydigin kantasoluja (*engl. Stem Leydig cell, SLC*), joista kehittyy ALC-soluja kolmen kehitysvaiheen jälkeen (Habert ym., 2001; Ge ym., 2006; Liu ym., 2016). SLC-solut erilaistuvat progenitorisiksi Leydigin soluiksi (*engl. Progenitor Leydig cell, PLC*) ja PLC-solut erilaistuvat varhaisiksi Leydigin soluiksi (*engl. Immature Leydig cell, ILC*). ILC-soluista kehittyy lopuksi ALC-soluja. Ensimmäiset SLC-solut voidaan havaita neonataaleissa kiveksissä PND7 (*engl. Postnatal day, PND*) alkaen ja pääosa ALC-soluista on kehittynyt PND56 mennessä (H. Chen ym., 2009).

ALC-solujen kehityksen neljä vaihetta eroavat morfologiassa, proliferaatiossa, androgeenien tuotannossa ja geenien ilmennyksessä (Ye ym., 2017). Vain ALC-solut tuottavat ja erittävät testosteronia. Kehitysvaiheiden välillä on huomattavia eroja proliferaatiossa. PLC-solut jakautuvat mitoottisesti eniten ja määräävät ALC-solujen määrän, koska ILC-solut läpikäyvät vain yhden mitoottisen syklin erilaistuessaan ALC-soluksi (Ge & Hardy, 1997). ALC-solut eivät normaalisti jakaudu, mutta tiedetään, että ne kykenevät palautumaan kokeellisen ablaation jälkeen (H. Chen ym., 1996). ALC-solujen kehitysvaiheista on puhuttu syvemmin Ye ym. (2017) katsauksessa.

2.2.2 Veri–kiveseste

Veri–kiveseste muodostuu PND15 ja PND19 välissä rotissa ja sen muodostus seuraa paikallisten sukusolujen meioosin vaiheita, eli veri–kiveseste muodostuu asynkronisesti läpi siementiehyen paikallisten sukusolujen kehitysvaiheiden mukaan (Bergmann & Dierichs, 1983). Veri–kiveseste on monimutkainen molekulaarinen rakenne, joka koostuu pääasiassa Sertolin solujen välisistä tiukka-, adherenssi- ja aukkoliitoksista, jotka estävät vapaan aineenvaihdunnan siementiehyen basaali- ja adluminaalisen kerroksen välillä ja antavat siementiehyille niille tärkeän mikroympäristön (Wong & Cheng, 2005; Cheng & Mruk, 2012). Veri–kiveseste muodostuu täysin erilaistuneiden Sertolin solujen välille ja veri–kivesesteen valmistuttua lopullinen Sertolin solukanta on muodostunut, eivätkä Sertolin solut jatka proliferaatiota tämän jälkeen Katsaus (Sharpe ym., 2003).

Preleptoteenivaiheen spermatoosyyttien tarvitsee kulkea veri–kivesesteen läpi siirtyessään leptoteenivaiheeseen ilman että BTB rakenne päästäisi muita biomolekyylejä läpi, joten veri–kiveseste muuttaa muotoaan sukusolujen liikkeen mukana. Tämä on sitä varten, että kaikki meioottiset jaot tapahtuisivat immuunijärjestelmältä eristetyssä tilassa. Tätä siirtymää varten BTB:n rakenne käy jatkuvaa muutosta. Aktiivinen liitosproteiinien tuotanto, hajotus ja kuljetus muokkaavat veri–kivesesteen rakennetta, mitä säädellään androgeeneilla ja sytokiineilla, kuten testosteronilla ja TGFβ:llä (*engl. Transforming growth factor β, TGFβ*) (Yan ym., 2008).

Testosteroni edistää veri–kivesesteen uudelleenjärjestäytymistä lisäämällä endosytoitujen kalvoproteiinien kuljetusta solukalvolle. Sytokiinit, kuten TGFβ puolestaan edistävät veri–kivesesteen hajotusta merkitsemällä endosytoituja kalvoproteiineja, kuten tiukkaliitosten okludiinia ja basaalikerroksen N-kadheriinia kuljetettaviksi endosomeihin, missä ne tuhoataan

(Yan ym., 2008). Sytokiinit myös estävät integraalisten kalvoproteiinien tuotantoa, mikä hidastaa BTB:n uudelleenjärjestäytymistä (Xia ym., 2006).

Veri-kivesesteen tarvitsee eristää meioottiset jaot immuunijärjestelmän lymfosyyteilta. jotta lymfosyytit eivät reagoisi sukusolujen antigeenien kanssa ja aiheuttaisi immunologista reaktiota siementiehyeissä. Spermatoosyyttien tiedetään ekspressoivan proto-onkogeeneja ja muita meioottisia geenejä, jotka toimivat autoantigeeneina, mitkä voivat laukaista voimakkaan immuunireaktion kohdatessaan lymfosyyttejä (Francavilla ym., 2007). Spermatoogoniot ja preleptoteenispermatoosyytit, jotka sijaitsevat basaalikerroksessa myös ekspressoivat autoantigeeneja, jotka voisivat synnyttää voimakkaita immuunireaktioita, jos ne pääsisivät vapaasti adluminaalikerrokseen (Yule ym., 1988).

3 KIVESTEN KEHITYKSEN SÄÄTELY

3.1 *Kivesten ylläpito ja sukusolujen määrä*

Leydigin solut ja Sertolin solut yhdessä hypotalamuksen kanssa säätelevät spermatoogeneesiä ja kivesten ylläpitoa. Sertolin solut toimivat sukusolujen kasvualustoina ja määräävät kehittyvien sukusolujen määrän (Rebourcet ym., 2017). Rebourcet ym. (2017) osoittivat, että Sertolin solujen kokeellinen poisto eli ablaatio laskee sekä sukusolujen, että Leydigin solujen määrää. Sertolin solujen ablaatio hidastaa myös kivesten verisuoniston kehitystä, sillä Sertolin solut ja Leydigin solut edistävät hiussuonten muodostusta parakriinisilla tekijöillä (Collin & Bergh, 1996; Rebourcet ym., 2016). Vähentynyt verenkierto laskee gonadotropiinin siirtymistä kiveksissä, mikä vähentää Leydigin soluissa tapahtuvaa steroidogeneesiä. Alentunut testosteronituotanto taas heikentää verenkiertoa entisestään, koska testosteroni säätelee kivesten verenkiertoa aktiivomalla sileän lihaksen supistuksia (Welsh ym., 2010). Sertolin solujen ablaatio vähentää kivesten kokoa siis kahdesta syystä: Ablaatio vähentää Sertolin solujen, Leydigin solujen ja sukusolujen määrää, sekä hidastaa välikudoksen nesteensiirtoa, mikä heikentää ympäröivän kudoksen kehitystä. Sertolin soluilla on siis selvä vaikutus kivesten ylläpidossa ja Leydigin solujen, että sukusolujen määrässä.

Tähän verrattuna Leydigin solujen osittaisen ablaation seuraukset ovat pienemmät, sillä Leydigin solut pystyvät nostamaan tarvittaessa merkittävästi steroidogeneesin määrää ja takaamaan normaalin testosteronituotannon, mikä on niiden pääasiallinen tehtävä (Rebourcet ym., 2019). Puolestaan sukusoluilla ei nähdä aktiivista roolia kivesten kehityksessä. Sukukantasolujen ei havaita vaikuttavan verenkierron kehitykseen tai ylläpitoon (Rebourcet ym., 2016), eikä sukusolujen nähdä vaikuttavan Leydigin solujen steroidogeneesiin (O'Shaughnessy ym., 2008). Spermatoosidien määrä kuitenkin vaikuttaa Sertolin solujen mRNA-tuotantoon, eli Sertolin solujen mRNA-transkriptien tuotanto on sidoksissa kehittyvien sukusolujen määrään (O'Shaughnessy ym., 2008).

3.2 Leydigin solujen säätely

Morfologisten erojen ja samasta kantasolukannasta erilaistumisen takia fetaalisten Leydigin solujen ja aikuisten Leydigin solujen kehitysvaiheiden ajallinen säätely on tärkeää. FLC-solujen erilaistumisen säätely vaikuttaa ALC-solujen määrään neonataalisessa vaiheessa, koska FLC-soluista voi kehittyä ALC-soluja, jos ne eivät ole terminaalaisesti erilaistuneita (Shima ym., 2018). Puolestaan neonataalisessa vaiheessa ALC-solukannan neljän kehitysvaiheen säätely vaikuttaa lopulliseen ALC-solujen määrään. Leydigin solujen erilaistumista säätelevät tiedetysti ainakin Hedgehog-ligandit, PDGF-kasvutekijät, Notch-signaali, androgeenit ja hormonit (Joyce ym., 1993; Gnessi ym., 2000; Baker & O'Shaughnessy, 2001; Yao ym., 2002; Barsoum ym., 2009; Stanley ym., 2011).

3.2.1 Hedgehog-ligandit

Sertolin solut säätelevät SF1+/WT1+-kantasolujen erilaistumista Leydigin kantasoluiksi hedgehog-ligandeilla (*Hedgehog*, *hh*), joita Sertolin solut alkavat tuottamaan *Sry*-geenin ilmennyksen jälkeen (Yao ym., 2002; Barsoum ym., 2009). DHH-ligandin (*engl. Desert hedgehog*, *DHH*) tuotantoa usein seurataan Hh-signaaliintia tutkittaessa. DHH:n on löydetty lisäävän *Sfl* ilmennystä, sekä DHH ja SF1 yhdessä näyttävät riittävän Leydigin solujen erilaistumiseen sukuelinharjanteesta ilman Sertolin solujen vaikutusta (Barsoum ym., 2009). Dhh-null koiraiden kiveksissä ei havaita ALC-soluja, sekä DHH vaikuttaa siementiehyitä ympäröivien peritubulaaristen myoidisolujen kehitykseen (Clark ym., 2000). Dhh-null hiirillä alhainen ALC-solujen määrä ei selity täysin hypoandrogenismilla, vaan DHH:lla on vaikutus ALC-solujen kehitykseen. DHH vaikuttaa pääsääntöisesti Leydigin solujen proliferaatioon, eikä sillä ole tiedetysti vaikutusta Leydigin kantasolujen liikkeeseen koeloomiselle epiteelialueelle toisella embryonaalisella viikolla (Li ym., 2016). Dhh-null hiirillä kuitenkin kehittyy FLC-soluja, eikä DHH siis ole välttämätön niiden erilaistumiseen (Clark ym., 2000).

Vaikka Hedgehog-signaaliintia ei ole välttämätön FLC-solujen erilaistumiseen, se silti vaikuttaa oleellisesti prepubertaalien kivesten solukoostumukseen hiiren eri kehitysvaiheissa. Hh-signaalitien ektooppinen aktivaatio edistää SF1+/WT1+-kantasolujen erilaistumista FLC-soluiksi ja niiden kehitystä terminaaliseksi FLC-soluiksi (Barsoum ym., 2009). Koska ALC-solut kehittyvät samasta SF1+/WT1+-kantasolukannasta kuin FLC-solut, sekä terminaaliset FLC-solut eivät kehity ALC-soluiksi, niin hh-signaalitien ektooppinen aktivaatio laskee prepubertaalissa vaiheessa kehittyvien ALC-solujen määrää, joka kuitenkin normalisoituu myöhemmässä iässä (Barsoum ym., 2013). Leydigin solut todennäköisesti tuottavat tiettyjä markkereita, joiden tuotanto ei muutu solumäärän laskiessa, mitkä sitten viestivät solujen määrästä. Tällaista markkeria ei ole tietääkseni löydetty.

3.2.2 PDGF

PDGF:t (*engl. Platelet-derived growth factor*, *PDGF*) ovat kasvutekijöitä, jotka säätelevät mesenkymaalisolujen ja epiteelisolujen välistä vuorovaikutusta ja ne osallistuvat useiden elinten ja kudosten muodostukseen. Niillä on moninaisia vaikutuksia kivesten kehityksessä, ja ne edistävät Leydigin solujen kehitystä (Katsaus Basciani ym., 2010). Sertolin solujen erittämät PDGF-ligandit sitoutuvat PDGF-reseptoreihin, PDGF- α ja PDGF- β , jotka ovat

tyrosiinikinaasireseptoreja. Nämä PDGF-reseptorit laukaisevat monia transkriptionaalisia muutoksia solussa fosforyloimalla proteiineja (Basciani ym., 2010). PDGF-proteiiniperheestä PDGFA osallistuu kivesten kehityksessä siementiehyen järjestäytymiseen, sekä vaikuttaa Leydigin solujen erilaistumiseen. PDGFA-reseptoreja on löydetty ALC-solujen kantasoluista (Ge ym., 2006), sekä PDGFA säätelee Leydigin solujen ylläpitoa aikuisessa hiiressä (Gnessi ym., 2000). Pdgfa-null hiirissä siementiehyet ja välikudos eivät järjestäydy normaalisti, sekä kiveksissä havaitaan merkittävästi vähemmän erilaistuneille Leydigin soluille spesifejä transkripteja, mikä kertoo vaillinaisesta erilaistumisesta (Brennan ym., 2003).

3.2.3 Notch-signaalitie

Koska SF1+-kantasoluista voi erilaistua useita eri solutyyppejä, niin niiden erilaistumista tarvitsee myös aktiivisesti estää. Inhiboimalla SF1+-kantasolujen erilaistumista, kiveksiin jää niin sanotusti hätävarasto erilaistumattomia kantasoluja. Notch-signaalitie on yleisesti kasvua rajoittava signaalitie, missä leikattu Notch-reseptori toimii transkriptiotekijänä ja vaikuttaa monien kudosten kehityksessä ja ylläpidossa (Zhou ym., 2022). Notch-signaalitien yliaktivaatio nähdään mRNA-transkriptien tuotannossa kahdella tavalla: Leydigin soluille spesifien steroidogeneettisten mRNA-transkriptien CYP17A1 ja CYP11A1 tuotanto laskee ja erilaistumattomien SF1+-kantasolujen mRNA-transkriptien, kuten LHX9 tuotanto kasvaa (Tang ym., 2008). Notch-signaloinnin nähdään siis inhiboivan SF1+-kantasolujen erilaistumista FLC-soluiksi fetaalisessa vaiheessa. Tang ym. (2008) eivät havainneet Notch-signaloinnin vaikuttavan Sertolin solujen määrään, tai niiden mRNA-transkriptien tuotantoon, mutta Notch-signaalitien ektooppinen aktivaatio vähensi kivesjohtojen kasvua, sekä laski sukukantasolujen määrää. Koska Notch-signaloinnilla ei ollut huomattavaa vaikutusta Sertolin solujen määrään, Tang ym. (2008) ehdottivat, että nämä vaikutukset olisivat seurausta Leydigin solujen alentuneesta määrästä.

Notch-signalointi hidastaa Leydigin solujen erilaistumista myös neonataalisessa vaiheessa. ALC-solujen kehitysvaiheista vähemmän jakautuvat Leydigin kantasolut ja ALC-solut tuottavat eniten Notch-ligandeja, kun taas Notch-signalointi on heikointa proliferatiivisesti aktiivisissa progenitorisissa Leydigin soluissa (Stanley ym., 2011).

3.3 *Hormonit*

Aivolisäkkeen etuosa tuottaa kolmea glykoproteiinia: LH, FSH ja TSH, jotka vaikuttavat kivesten kehityksessä. Hypotalamuksen erittämä gonadotropiineja vapauttava hormoni eli GnRH (*engl. Gonadotropin-releasing hormone, GnRH*) säätelee gonadotropiinien LH ja FSH eritystä ja TSH säätelee lisäkilpirauhashormonin eritystä.

Lutenisoiva hormoni eli LH säätelee positiivisesti steroidogeneesiä nostamalla cAMP (*syklinen adenosiinimonofosfaatti, cAMP*) -tuotantoa, mikä nostaa steroidogeneettisten entsyymien tuotantoa (Zirkin & Papadopoulos, 2018). Tutkitusti LH-tuotanto pystyy nostamaan testosteronitasoa hiirissä, joissa steroidogeneesi on heikentynyttä seuraten Leydigin solujen ablaatiota (Rebourcet ym., 2019). LH:n steroidogeneettinen vaikutus on välttämätön koiraan sukupuoliominaisuuksien kehitykselle ja spermatiidien kehitykselle syntymänjälkeisessä vaiheessa, tosin se ei ole välttämätön sukupuolen määräytymiselle fetaalisessa vaiheessa

(O'Shaughnessy ym., 1998; Zhang ym., 2001). LH vaikuttaa suoraan soluihin LH-reseptorien välityksellä. Vaikka fetaaliset Leydigin solut tuottavat LH-reseptoreja E16.0 eteenpäin, LH ei vaikuta alkion maskulinisaatioon, eikä sen ole osoitettu vaikuttavan FLC-solujen kehitykseen fetaalisessa vaiheessa (O'Shaughnessy ym., 1998). Syntymänjälkeisessä vaiheessa taas LH vaikuttaa Leydigin solujen steroidogeneesiin ja erilaistumiseen (Baker & O'Shaughnessy, 2001). LH ja GnRH vaikuttavat myös nesteensiirtoon kiveksissä nostamalla aineenvaihduntaa soluliitoksissa (Collin & Bergh, 1996).

Follikkeleja stimuloiva hormoni eli FSH stimuloi sukusolujen ja Sertolin solujen proliferaatiota, lisää Leydigin solujen androgeenituotantoa, ylläpitää sukusoluja ja edistää spermatosyyttien etenemistä varhaisessa meioosissa (Meachem ym., 2005; O'Shaughnessy ym., 2010). FSH lisää LH-reseptorien tuotantoa, mikä kohottaa steroidogeneesiä (Chen ym., 1976). Kohonnut androgeenituotanto sitten edistää Leydigin solujen proliferaatiota ja erilaistumista, sekä spermatogeneesiä (De Gendt ym., 2004, 2005). Vaikutuksistaan huolimatta FSH ei ole välttämätön koiraan lisääntymiselle. FSH-null mutanteissa naaraat ovat yleensä infertiilejä ja koiraat ovat fertiilejä (Kumar ym., 1997; Tapanainen ym., 1997). FSH:n erityis ei itsestään vaikuta steroidogeneesiin, vaan FSH:n sitoutuminen FSH-reseptoriin säätelee steroidogeneesiä. FSH β KO-hiirissä Leydigin solujen kehitys ja testosteronituotanto onkin normaalia (Baker ym., 2003). FSH-reseptoreja tuotetaan vain Sertolin soluissa (Heckert & Griswold, 1991).

FSH-reseptoreilla (FSHR) on merkittävä vaikutus kivesten kehityksessä, mikä ei välttämättä vaadi FSH läsnäoloa, tosin FSH-reseptorit ovat välttämättömiä vain naaraan lisääntymiselle. FSHRKO-naarashiiret ovat infertiilejä, kun taas koiraiden kivesten koko ja hedelmällisyys on alentunut, mutta koiraat ovat lisääntymiskykyisiä (Dierich ym., 1998; Abel ym., 2000; Krishnamurthy ym., 2000). FSH β KO-hiirillä on osoitettu, että FSH-reseptorit edistävät Leydigin solujen proliferaatiota ja steroidogeneesiä syntymänjälkeisessä vaiheessa riippumatta FSH-tuotannosta, sekä että FSH-reseptoreilla on konstitutiivisia vaikutuksia, jotka riittävät Leydigin solujen normaaliin kehitykseen, kunhan LH-tasot ovat riittävät (Baker ym., 2003). FSH-reseptorien puute laskee steroidogeneettisten mRNA-transkriptien CYP11A1, 3 β HSD ja StAR tuotantoa, mutta ei FSH:n puute (Baker ym., 2003). FSHRKO-hiirissä LH-tasot eivät eroa kontrollista merkittävästi, mutta testosteronituotanto laskee syntymää seuraten merkittävästi (Migrenne ym., 2012). Migrenne ym. (2012) osoittivat, että FSHRKO-hiirillä FLC-solujen määrä ja testosteronituotanto on normaalia syntymän aikaan, joten FSH-reseptorien puute vaikuttaa joko ALC-solujen määrään ja/tai steroidogeneesiin.

FSH-reseptorit vaikuttavat fetaalisessa vaiheessa Sertolin solujen proliferaatioon ja FSHRKO-hiirillä nähdään 22 % vähemmän Sertolin soluja syntymän aikaan (Migrenne ym., 2012). FSHR-aktivaatio tutkitusti lisää cAMP-aktivoitujen geenien ilmennystä, jotka koiraisissa ja naaraisissa on sidottu hedelmällisyyteen (Dierich ym., 1998). Lisäksi FSHR-aktivaatio koiraisissa vaikuttaa spermiogeneesiin, sillä FSHRKO-hiirissä spermatidien DNA-kondensaatio spermiogeneesissä on vaillinnaista, mikä laskee siittiöiden laatua (Krishnamurthy ym., 2000).

FSH tai FSHR riittävät tuottamaan kiveksissä normaalin määrän Sertolin soluja muiden gonadotropiinien puuttuessa, mutta normaalin spermatogeneesin takaaminen vaatii LH:n

vaikutusta, ja LHR-null hiirissä sukusolujen määrä on vain noin puolet wt (*engl. Wild type, wt*) -hiiristä (Allan ym., 2004). FSH ja LH toimivat siis synergisesti spermatogeneesin tukemisessa ja kummankin tuotanto tuottaa lisääntymisen kannalta parhaan fenotyypin, mitä tukee aikaisempi kirjallisuus (Kerr ym., 1992).

Kolmas hormoni, joka vaikuttaa kivesten kehityksessä selkeästi on lisäkilpirauhashormoni (*engl. Thyroid hormone, TH*), joka erittyy lisäkilpirauhasta stimuloivan hormonin (*engl. Thyroid-stimulating hormone, TSH*) säätelemänä ja vaikuttaa suoraan primaaristen sukupuoliominaisuuksien kehitykseen ja spermatogeneesiin. TH vaikuttaa kivesten kehitykseen neonataalisessa vaiheessa, nimellisesti TH kiihdyttää Leydigin solujen erilaistumista (Siril Ariyaratne ym., 2000) ja säätelee Sertolin solujen proliferaatiota (Joyce ym., 1993; Buzzard ym., 2000). TH:n määrää säädellään kiveksissä tyypin 3 deiodinaasilla (D3), jonka puute johtaa liian aikaiseen TH-toimintaan ja tyrotoksikoosiin, mikä häiritsee normaalia kivesten kehitystä ja alentaa lopullista Sertolin solujen määrää aikaistamalla niiden proliferatiivista arestia. (Martinez ym., 2016). D3KO-hiirissä siementiehyiden ympärystymä on suurempi, mutta kivesten koko on pienempi, sekä siittiötuotanto on laskenut kontrolleihin verrattaessa (Martinez ym., 2016). Puolestaan vaillinnainen TH-viestintä hidastaa Sertolin solujen maturaatiota, ja TH-viestinnän vaikutuksia voidaan havaita jo neonataalisissa hiirissä, missä Sertolin solujen proliferaatio päättyy normaalisti PND15-PND20 välillä. Hiirissä, joissa TH α reseptoria tuottava geeni on mutatoitunut ja TH ei sitoudu normaalisti, niin proliferaatio jatkuu vielä PND25 jälkeenkin, mutta tällöin Sertolin soluissa nähdään kohonnutta apoptoosia ja lopullinen Sertolin solujen määrä on alentunut (Joyce ym., 1993).

3.4 Androgeenit

Androgeenit ovat vastuussa sukupuoliominaisuuksien kehityksestä ja yleisesti koiraan maskulinisaatiosta (Wu & Shah, 2011; Chang ym., 2013). Androgeenit vaikuttavat kivesten kehitykseen androgeenireseptorien (*engl. Androgen receptor, AR*) välityksellä. Androgeenireseptoreja tuotetaan tasaisesti välikudoksessa ja siementiehyissä, missä niiden vaikutus vaihtelee kohdesolun mukaan. FLC-solut tuottavat AR-reseptoreja, mutta AR-mutaatiot eivät vaikuta alkion maskulinisaatioon, tai FLC-solujen proliferaatioon ja steroidogeneesiin (O'Shaughnessy ym., 2002). Puolestaan ALC-solut tuottavat AR-reseptoreja ja AR-signaali vaikuttaa suoraan niiden kehitykseen, sekä steroidogeneesiin (Yeh ym., 2002; O'Shaughnessy ym., 2002, 2019; Xu ym., 2007). Gonadotropiinien toiminta on myös riippuvainen AR-signaloinnista. Jos hypogonadotropisia (hpg) hiiriä stimuloidaan hCG:llä, joka on LH-homologi, niin testosteronituotanto nousee huomattavasti enemmän kuin hpg.ARKO-hiirissä, joilta puuttuvat AR-reseptorit (O'Shaughnessy ym., 2019). Lisäksi Sertolin solujen AR-reseptorit ohjaavat epäsuorasti ALC-solujen kehitystä (Hazra ym., 2013).

AR-signaali represso steroidogeneesiä: AR-signaali vähentää LH-reseptorien tuotantoa sekä steroidogeneettisten geenien *Hsd3b1*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1* ja *Star* ilmennystä (Eacker ym., 2007). Steroidogeneesi laskee, koska steroidogeneettisen entsyymin StAR (*engl. Steroidogenic acute regulatory protein, StAR*) -tuotantoa säätelee positiivisesti LH, ja StAR-tuotanto on steroidogeneesin nopeuden määrittävä vaihe (Zirkin & Papadopoulos, 2018). Toisaalta AR-

signalointi estää AMH-tuotantoa, mikä yleisesti lisää steroidogeneesiä ja edistää Leydigin solujen kehitystä (Josso ym., 2001). Eli kun AR-signalointia tutkitaan osissa, sen vaikutus hämärtyy, sillä se repressoii, tai kohottaa steroidogeneesiä riippuen tutkitusta vuorovaikutuksesta. AR-signalointi on kuitenkin tärkeää ALC-solujen kehityksessä, ja AR-null aikuishiirissä ALC-solujen vaillinnainen erilaistuminen laskee testosteronituotantoa, sekä vaikuttaa kivesten ja epididymiksen painoon negatiivisesti (O'Shaughnessy ym., 2002; Yeh ym., 2002). AR-mutaatiot myös laskevat verenkiertoa kiveksissä (Welsh ym., 2010), joka voi myös vaikuttaa AR-null-hiirten kehitykseen.

Sertolin solujen AR (*engl. Sertoli Cell androgen receptor, SCAR*) -signaloinnin vaikutukset Leydigin soluihin alkavat neonataalisessa vaiheessa. Hazra ym. (2013) tutkimuksen mukaan Sertolin solujen AR-signalointi vaikuttaa Leydigin solujen kehitykseen ja steroidogeneesiin riippuen hiiren kehitysvaiheesta. Normaalia aikaisempi SCAR-signalointi syntymänjälkeisessä vaiheessa edistää Leydigin solujen erilaistumista, mutta hidastaa niiden proliferaatiota johtaen alhaisempaan Leydigin solujen määrään aikuisessa hiiressä (Hazra ym., 2013).

Sertolin solujen tuottamat AR-reseptorit ovat välttämättömiä spermatogeneesille, sillä niiden puute johtaa häiriöihin aikaisessa meioosissa, mikä johtaa infertiliteettiin SCARKO-hiirissä (*engl. Sertoli Cell androgen receptor knock-out, SCARKO*) (Chang ym., 2004; De Gendt ym., 2004; Chen ym., 2016). Chen ym. (2016) tutkisivat SCAR-reseptorien roolia primaaristen spermatosyyttien profaasissa ja havaitsivat, että SCAR-signalointi vaikuttaa profaasissa synapsin muodostukseen ja tekijäinvaihduntaan. Virheellinen tekijäinvaihdunta johtaa sitten meioottiseen arestiin ja sukusolut läpikäyvät apoptoosin (Chen ym., 2016). SCAR-signalointi myös säätelee soluadheesiota Sertolin solujen ja sukusolujen välillä spermatogeneesin aikana. Sertolin solu-sukusoluadheesion puute voisi selittää, miksi spermatosyyttien liike siementiehyissä on nopeampaa SCARKO-hiirissä kuin kontrolleissa (De Gendt ym., 2004). Puolestaan LCARKO (*engl. Leydig Cell androgen receptor knock-out, LCARKO*) -hiirissä alentunut testosteronituotanto johtaa häiriöihin spermogeneesissä, ja useimmat sukusolut arrostoituvat toisen meioottisen jaon jälkeen pyöreinä spermatideina (Xu ym., 2007). Testosteroni myös säätelee BTB permeabiliteettia ja uudelleenjärjestäytymistä vaikuttamalla liitosproteiinien tuotantoon Sertolin soluissa (Meng ym., 2005; Yan ym., 2008), mikä voi vaikuttaa spermatogeneesin etenemiseen.

Vakavat AR-mutaatiot voivat johtaa AIS eli androgeeni-insensitiivisyssyndroomaan, missä koiraan sekundaariset sukupuoliominaisuudet eivät kehity normaalisti, sekä koiraat ja naaraat ovat infertiilejä (Kerkhofs ym., 2009). Koiraat muistuttavat ulkoisesti naaraita ja kivekset eivät laskeudu, kun taas osittainen AIS johtaa ulkoisesti koiraisiin hiiriin, jotka ovat infertiilejä (Kerkhofs ym., 2009).

POHDINTA

Kivesten kehityksessä Leydigin solujen ja Sertolin solujen väliset vuorovaikutukset vaikuttavat merkittävästi kivesten kehitykseen, kun taas sukusoluille ei ole löydetty aktiivista roolia kivesten somaattisten solujen kehityksessä. Sukusolut eivät esimerkiksi osallistu kivesjohtojen

järjestäytymiseen, tai Leydigin solujen kehitykseen. Sukusolut säätelevät kuitenkin jossain määrin AMH eritystä, sillä kehittyvissä siementiehyissä Sertolin solujen AMH-eritys lakkaa nopeasti sen jälkeen, kun sukusolut ovat siirtyneet meioosiin (Al-Attar ym., 1997). Tutkimukset ovat myös nostaneet mielenkiinnon kohti ennen tuntemattomia vuorovaikutuksia. Nykyään tiedetään, että aikuisista hiiristä löydetään sekä FLC-, että ALC-soluja, mutta FLC-solujen vaikutus aikuisishiirissä on laajalti tuntematon. Su ym. (2018) tutkivat tätä vaikutusta rotissa ja heidän tutkimuksensa osoitti, että FLC-solut voisivat vaikuttaa steroidogeneesiin. Seuraten Leydigin solujen ablaatiota neonataalisissa rotissa, rottien FLC-solut eivät palautuneet, vaan korvautuivat ALC-soluilla. Aikuisten koerottien siemenrauhasten paino, sekä testosteronituotanto olivat pienempiä verrattaessa kontrolliin (Su ym., 2018). Tämä viittaisi siihen, että FLC-solut säätelevät ALC-solujen steroidogeneesiä, ja joko suoraan tai epäsuorasti niiden proliferaatiota, mutta varmuutta asiasta ei ole vielä.

Kivesten kehityksen geneettinen säätely on monimutkaista. Ensimmäisten Sertolin solujen erilaistuminen koeloomisesta epiteelialueesta vaatii *Sry*, *Sfl* ja *Wtl* ilmennystä (Xu ym., 2019). *Sry* ja *Sfl* aikaansaavat *Sox9* ilmennyksen (Sekido & Lovell-Badge, 2009), jonka jälkeen *Sox9* yhdessä *Sfl* ja *Wtl* kanssa aikaansaavat AMH-tuotannon, joka hajottaa mullerian kanavat (Josso ym., 2001). Lisäksi nämä geenit ylläpitävät toistensa ilmennystä. *Wtl* ylläpitää *Sfl* ilmennystä (Takasawa ym., 2014), sekä sukupuolen määräytymisen jälkeen *Wtl* todennäköisesti ylläpitää *Sox9* ilmennystä ja vaikuttaa kivesjohtojen kehitykseen (Gao ym., 2006). *Sfl* on puolestaan kriittinen geeni, jonka riittävä ilmennys on välttämätöntä Leydigin solujen erilaistumiselle (Shima ym., 2018).

Geenien ilmennys muuttuu kehityksen aikana, ja se on tarkkaa. *Sry*:tä ilmennetään hyvin lyhyen aikaa ja sen tärkein tehtävä oletetaan olevan *Sox9* ilmennyksen nopea kasvatus sukupuolenmääräytymisen alussa (Hacker ym., 1995). *Sfl* taas toimii todennäköisesti proliferaation säätelijänä ja sitä ilmennetään kehittyvissä FLC-soluissa, mutta ei enää terminaalaisesti erilaistuneissa FLC-soluissa (Barsoum ym., 2013). Puolestaan ALC-soluissa *Sfl* ilmennyksen nähdään vaikuttavan progenitorisolujen proliferaatioon tai ylläpitoon, eikä asiasta ole vielä varmuutta (Karpova ym., 2015). Osa geneistä taas toimivat sekä proliferaation säätelyssä, että solun toiminnan ylläpidossa ja näitä ilmennetään kokoaikaisesti solun elinkierron ajan. *Wtl* ilmennetään kokoaikaisesti Sertolin soluissa, missä se säätelee *Sfl* ja *Sox9:n* ilmennystä, sekä osallistuu solun ylläpitoon ja spermatogeneesin edistämiseen (Bandiera ym., 2015).

Hormonien vaikutus riippuu kehitysvaiheesta. Gonadotropiinien ei nähdä vaikuttavan Leydigin solujen kehitykseen ja testosteronituotantoon fetalisessa vaiheessa, vaikka ne tuottavat LH-reseptoreja, mutta syntymänjälkeisessä vaiheessa gonadotropiinit vaikuttavat sekä Leydigin solujen kehitykseen, että testosteronituotantoon (O'Shaughnessy ym., 1998; Baker & O'Shaughnessy, 2001). Gonadotropiinit FSH ja LH lisäävät androgeenien tuotantoa, mikä edistää Leydigin solujen proliferaatiota ja kehitystä, sekä lisäävät nesteensiirtoa kiveksissä (O'Shaughnessy ym., 2002; Welsh ym., 2010). FSH:n ja LH:n vaikutukset ovat merkittävimmät neonataalisessa vaiheessa, milloin Leydigin solujen proliferaatio on voimakasta ja ALC-solukanta määräytyy (Baker & O'Shaughnessy, 2001). Neonataalisessa vaiheessa Sertolin solujen lopullista erilaistumista säätelee taas lisämunaishormoni (Joyce

ym., 1993). Mikä tarvitsisi lisätutkimusta olisi, mitkä tekijät säätelevät gonadotropiinien vaikutusta eri kehitysvaiheissa ja etenkin, miksi LH:lla ei ole selvää vaikutusta alkion steroidogeesissä ja maskulinisaatiossa, vaikka sen toimintamalli syntymänjälkeisessä vaiheessa on hyvin tiedossa (Zirkin & Papadopoulos, 2018).

Kivesten kehitystä ja alkion maskulinisaatiota ohjaavat myös suuressa osin kivesten tuottamat androgeenit. Kivesten tuottama testosteroni vaikuttaa ALC-solujen kehitykseen (De Gendt ym., 2005; Hazra ym., 2013), spermatogeesiin (Chang ym., 2004; De Gendt ym., 2004; Chen ym., 2016) ja veri–kivesesteen uudelleenjärjestäytymiseen (Meng ym., 2005; Yan ym., 2008), huomioimattakaan testosteronin toimintaa wolffian kanavien kehityksessä ja aivojen maskulinisaatiossa (Welsh ym., 2006, 2009; Wu & Shah, 2011).

LÄHDELUETTELO

- Abel, M. H., Wootton, A. N., Wilkins, V., Huhtaniemi, I., Knight, P. G., & Charlton, H. M. (2000). The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*, 141(5), 1795–1803. <https://doi.org/10.1210/endo.141.5.7456>
- Al-Attar, L., Noël, K., Dutertre, M., Belville, C., Forest, M. G., Burgoyne, P. S., Josso, N., & Rey, R. (1997). Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *Journal of Clinical Investigation*, 100(6), 1335–1343. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC508311/>
- Allan, C. M., Garcia, A., Spaliviero, J., Zhang, F. P., Jimenez, M., Huhtaniemi, I., & Handelsman, D. J. (2004). Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinology*, 145(4), 1587–1593. <https://doi.org/10.1210/EN.2003-1164>
- Baker, P. J., & O’Shaughnessy, P. J. (2001). Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* (Cambridge, England), 122(2), 227–234. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220227>
- Baker, P. J., Pakarinen, P., Huhtaniemi, I. T., Abel, M. H., Charlton, H. M., Kumar, T. R., & O’Shaughnessy, P. J. (2003). Failure of normal Leydig cell development in follicle-stimulating hormone (FSH) receptor-deficient mice, but not FSHbeta-deficient mice: role for constitutive FSH receptor activity. *Endocrinology*, 144(1), 138–145. <https://doi.org/10.1210/EN.2002-220637>
- Barrionuevo, F., Bagheri-Fam, S., Klattig, J., Kist, R., Taketo, M. M., Englert, C., & Scherer, G. (2006). Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biology of Reproduction*, 74(1), 195–201. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045930>
- Barrios, F., Filipponi, D., Pellegrini, M., Paronetto, M. P., Di Siena, S., Geremia, R., Rossi, P., De Felici, M., Jannini, E. A., & Dolci, S. (2010). Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on Nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 6), 871–880. <https://doi.org/10.1242/jcs.057968>
- Barsoum, I. B., Bingham, N. C., Parker, K. L., Jorgensen, J. S., & Yao, H. H.-C. (2009). Activation of the Hedgehog Pathway in the Mouse Fetal Ovary Leads to Ectopic Appearance of Fetal Leydig Cells and Female Pseudohermaphroditism. *Developmental biology*, 329(1), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.02.025>
- Barsoum, I. B., Kaur, J., Ge, R. S., Cooke, P. S., & Yao, H. H.-C. (2013). Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice. *The FASEB Journal*, 27(7), 2657–2666. <https://doi.org/10.1096/fj.12-225060>
- Barsoum, I. B., & Yao, H. H.-C. (2010). Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *Journal of Andrology*, 31(1), 11–15. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.008318>
- Basciani, S., Mariani, S., Spera, G., & Gnassi, L. (2010). Role of platelet-derived growth factors in the testis. *Endocrine Reviews*, 31(6), 916–939. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0004>
- Bendel-Stenzel, M., Anderson, R., Heasman, J., & Wylie, C. (1998). The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 9(4), 393–400. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0204>

- Bergmann, M., & Dierichs, R. (1983). Postnatal formation of the blood-testis barrier in the rat with special reference to the initiation of meiosis. *Anatomy and Embryology*, 168(2), 269–275. <https://doi.org/10.1007/BF00315821>
- Bowles, J., Feng, C.-W., Spiller, C., Davidson, T.-L., Jackson, A., & Koopman, P. (2010). FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. *Developmental Cell*, 19(3), 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.08.010>
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H., & Koopman, P. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5773), 596–600. <https://doi.org/10.1126/science.1125691>
- Bradford, S. T., Wilhelm, D., Bandiera, R., Vidal, V., Schedl, A., & Koopman, P. (2009). A cell-autonomous role for WT1 in regulating Sry in vivo. *Human Molecular Genetics*, 18(18), 3429–3438. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp283>
- Bremner, W. J., Millar, M. R., Sharpe, R. M., & Saunders, P. T. (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology*, 135(3), 1227–1234. <https://doi.org/10.1210/ENDO.135.3.8070367>
- Brennan, J., Tilmann, C., & Capel, B. (2003). Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes & Development*, 17(6), 800–810. <https://doi.org/10.1101/gad.1052503>
- Buzzard, J. J., Morrison, J. R., O'Bryan, M. K., Song, Q., & Wreford, N. G. (2000). Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of Reproduction*, 62(3), 664–669. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.3.664>
- Chang, C., Chen, Y.-T., Yeh, S.-D., Xu, Q., Wang, R.-S., Guillou, F., Lardy, H., & Yeh, S. (2004). Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 6876–6881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307306101>
- Chang, C., Lee, S. O., Wang, R. S., Yeh, S., & Chang, T. M. (2013). Androgen receptor (AR) physiological roles in male and female reproductive systems: lessons learned from AR-knockout mice lacking AR in selective cells. *Biology of reproduction*, 89(1). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.113.109132>
- Chen, H., Ge, R.-S., & Zirkin, B. R. (2009). Leydig cells: From stem cells to aging. *Molecular and cellular endocrinology*, 306(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.01.023>
- Chen, H., Huhtaniemi, I., & Zirkin, B. R. (1996). Depletion and repopulation of Leydig cells in the testes of aging brown Norway rats. *Endocrinology*, 137(8), 3447–3452. <https://doi.org/10.1210/endo.137.8.8754773>
- Chen, S. R., Hao, X. X., Zhang, Y., Deng, S. L., Wang, Z. P., Wang, Y. Q., Wang, X. X., & Liu, Y. X. (2016). Androgen receptor in Sertoli cells regulates DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis of spermatocytes partially through intercellular EGF-EGFR signaling. *Oncotarget*, 7(14), 18722–18735. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.7916>
- Chen, Y. I., Payne, A. H., & Kelch, R. P. (1976). FSH stimulation of Leydig cell function in the hypophysectomized immature rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 153(3), 473–475. <https://doi.org/10.3181/00379727-153-39571>
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacological Reviews*, 64(1), 16–64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>

- Clark, A. M., Garland, K. K., & Russell, L. D. (2000). Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1825–1838. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1825>
- Collin, O., & Bergh, A. (1996). Leydig cells secrete factors which increase vascular permeability and endothelial cell proliferation. *International Journal of Andrology*, 19(4), 221–228. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00466.x>
- De Gendt, K., Atanassova, N., Tan, K. A. L., de França, L. R., Parreira, G. G., McKinnell, C., Sharpe, R. M., Saunders, P. T. K., Mason, J. I., Hartung, S., Ivell, R., Denolet, E., & Verhoeven, G. (2005). Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. *Endocrinology*, 146(9), 4117–4126. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0300>
- De Gendt, K., Swinnen, J. V., Saunders, P. T. K., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lécureuil, C., Heyns, W., Carmeliet, P., Guillou, F., Sharpe, R. M., & Verhoeven, G. (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1327–1332. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308114100>
- Dierich, A., Sairam, M. R., Monaco, L., Fimia, G. M., Gansmuller, A., Lemeur, M., & Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13612–13617. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.23.13612>
- Eacker, S. M., Shima, J. E., Connolly, C. M., Sharma, M., Holdcraft, R. W., Griswold, M. D., & Braun, R. E. (2007). Transcriptional profiling of androgen receptor (AR) mutants suggests instructive and permissive roles of AR signaling in germ cell development. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(4), 895–907. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0113>
- Francavilla, F., Santucci, R., Barbonetti, A., & Francavilla, S. (2007). Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 12, 2890–2911. <https://doi.org/10.2741/2280>
- Gao, F., Maiti, S., Alam, N., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., Lécureuil, C., Guillou, F., & Huff, V. (2006). The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), 11987–11992. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600994103>
- Ge, R. S., & Hardy, M. P. (1997). Decreased cyclin A2 and increased cyclin G1 levels coincide with loss of proliferative capacity in rat Leydig cells during pubertal development. *Endocrinology*, 138(9), 3719–3726. <https://doi.org/10.1210/endo.138.9.5387>
- Ge, R.-S., Dong, Q., Sottas, C. M., Papadopoulos, V., Zirkin, B. R., & Hardy, M. P. (2006). In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2719–2724. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507692103>
- Giachini, C., Nuti, F., Turner, D. J., Laface, I., Xue, Y., Daguin, F., Forti, G., Tyler-Smith, C., & Krausz, C. (2009). TSPY1 Copy Number Variation Influences Spermatogenesis and Shows Differences among Y Lineages. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(10), 4016–4022. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1029>
- Gnessi, L., Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Spera, G., Wang, C., Bondjers, C., Karlsson, L., & Betsholtz, C. (2000). Leydig Cell Loss and Spermatogenic Arrest in Platelet-

- Derived Growth Factor (Pdgf)-a-Deficient Mice. *The Journal of Cell Biology*, 149(5), 1019–1026. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2174827/>
- Gustin, S. E., Stringer, J. M., Hogg, K., Sinclair, A. H., & Western, P. S. (2016). FGF9, activin and TGF β promote testicular characteristics in an XX gonad organ culture model. *Reproduction (Cambridge, England)*, 152(5), 529–543. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0293>
- Habert, R., Lejeune, H., & Saez, J. M. (2001). Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179(1–2), 47–74. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00461-0](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00461-0)
- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development (Cambridge, England)*, 121(6), 1603–1614. <https://doi.org/10.1242/dev.121.6.1603>
- Hatano, O., Takakusu, A., Nomura, M., & Morohashi, K. (1996). Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 1(7), 663–671. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.00254.x>
- Hazra, R., Jimenez, M., Desai, R., Handelsman, D. J., & Allan, C. M. (2013). Sertoli cell androgen receptor expression regulates temporal fetal and adult Leydig cell differentiation, function, and population size. *Endocrinology*, 154(9), 3410–3422. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2273>
- Heckert, L. L., & Griswold, M. D. (1991). Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(5), 670–677. <https://doi.org/10.1210/mend-5-5-670>
- Inoue, M., Shima, Y., Miyabayashi, K., Tokunaga, K., Sato, T., Baba, T., Ohkawa, Y., Akiyama, H., Suyama, M., & Morohashi, K. (2016). Isolation and Characterization of Fetal Leydig Progenitor Cells of Male Mice. *Endocrinology*, 157(3), 1222–1233. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1773>
- Jan, S. Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M. M., & Vormer, T. L. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1822(12), 1838–1850. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.008>
- Josso, N., Cate, R. L., Picard, J. Y., Vigier, B., di Clemente, N., Wilson, C., Imbeaud, S., Pepinsky, R. B., Guerrier, D., & Boussin, L. (1993). Anti-müllerian hormone: the Jost factor. *Recent Progress in Hormone Research*, 48, 1–59. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571148-7.50005-1>
- Josso, N., di Clemente, N., & Gouédard, L. (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179(1–2), 25–32. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00467-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00467-1)
- Joyce, K. L., Porcelli, J., & Cooke, P. S. (1993). Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *Journal of Andrology*, 14(6), 448–455.
- Karl, J., & Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, 203(2), 323–333. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9068>
- Karpova, T., Ravichandiran, K., Insisienmay, L., Rice, D., Agbor, V., & Heckert, L. L. (2015). Steroidogenic Factor 1 Differentially Regulates Fetal and Adult Leydig Cell Development in Male Mice. *Biology of Reproduction*, 93(4), 83. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131193>
- Kerkhofs, S., Denayer, S., Haelens, A., & Claessens, F. (2009). Androgen receptor knockout and knock-in mouse models. *Journal of Molecular Endocrinology*, 42(1), 11–17. <https://doi.org/10.1677/JME-08-0122>

- Kerr, J. B., Maddocks, S., & Sharpe, R. M. (1992). Testosterone and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. *Cell and Tissue Research*, 268(1), 179–189. <https://doi.org/10.1007/BF00338067>
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.-C., Poulat, F., Behringer, R. R., Lovell-Badge, R., & Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4 Act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination. *PLoS Biology*, 4(6), e187. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040187>
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351(6322), 117–121. <https://doi.org/10.1038/351117a0>
- Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., & Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74(4), 679–691. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90515-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90515-r)
- Krishnamurthy, H., Danilovich, N., Morales, C. R., & Sairam, M. R. (2000). Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biology of Reproduction*, 62(5), 1146–1159. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1146>
- Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*, 15(2), 201–204. <https://doi.org/10.1038/ng0297-201>
- Li, X., Wang, Z., Jiang, Z., Guo, J., Zhang, Y., Li, C., Chung, J., Folmer, J., Liu, J., Lian, Q., Ge, R., Zirkin, B. R., & Chen, H. (2016). Regulation of seminiferous tubule-associated stem Leydig cells in adult rat testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(10), 2666–2671. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519395113>
- Liu, C., Rodriguez, K., & Yao, H. H.-C. (2016). Mapping lineage progression of somatic progenitor cells in the mouse fetal testis. *Development (Cambridge, England)*, 143(20), 3700–3710. <https://doi.org/10.1242/dev.135756>
- Luaces, J. P., Toro-Urrego, N., Otero-Losada, M., & Capani, F. (2023). What do we know about blood-testis barrier? current understanding of its structure and physiology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1114769. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1114769>
- Luo, X., Ikeda, Y., & Parker, K. L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77(4), 481–490. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90211-9)
- MacLaughlin, D. T., Hudson, P. L., Graciano, A. L., Kenneally, M. K., Ragin, R. C., Manganaro, T. F., & Donahoe, P. K. (1992). Mullerian duct regression and antiproliferative bioactivities of mullerian inhibiting substance reside in its carboxy-terminal domain. *Endocrinology*, 131(1), 291–296. <https://doi.org/10.1210/endo.131.1.1612008>
- Maekawa, M., Kamimura, K., & Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of Histology and Cytology*, 59(1), 1–13. <https://doi.org/10.1679/aohc.59.1>
- Martinez, M. E., Karaczyn, A., Stohn, J. P., Donnelly, W. T., Croteau, W., Peeters, R. P., Galton, V. A., Forrest, D., St Germain, D., & Hernandez, A. (2016). The Type 3 Deiodinase Is a Critical Determinant of Appropriate Thyroid Hormone Action in the Developing Testis. *Endocrinology*, 157(3), 1276–1288. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1910>

- Matson, C. K., Murphy, M. W., Sarver, A. L., Griswold, M. D., Bardwell, V. J., & Zarkower, D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, 476(7358), 101–104. <https://doi.org/10.1038/nature10239>
- Meachem, S. J., Ruwanpura, S. M., Ziolkowski, J., Ague, J. M., Skinner, M. K., & Loveland, K. L. (2005). Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *The Journal of Endocrinology*, 186(3), 429–446. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06121>
- Meng, J., Holdcraft, R. W., Shima, J. E., Griswold, M. D., & Braun, R. E. (2005). Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16696–16700. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506084102>
- Migrenne, S., Moreau, E., Pakarinen, P., Dierich, A., Merlet, J., Habert, R., & Racine, C. (2012). Mouse Testis Development and Function Are Differently Regulated by Follicle-Stimulating Hormone Receptors Signaling During Fetal and Prepubertal Life. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053257>
- Mishina, Y., Whitworth, D. J., Racine, C., & Behringer, R. R. (1999). High specificity of Müllerian-inhibiting substance signaling in vivo. *Endocrinology*, 140(5), 2084–2088. <https://doi.org/10.1210/endo.140.5.6705>
- Nachtigal, M. W., & Ingraham, H. A. (1996). Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a *kex2*/subtilisin-like endoprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7711–7716. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7711>
- Nyby, J. G. (2008). Reflexive testosterone release: a model system for studying the nongenomic effects of testosterone upon male behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(2), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.09.001>
- O’Shaughnessy, P. J., Baker, P., Sohnius, U., Haavisto, A. M., Charlton, H. M., & Huhtaniemi, I. (1998). Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology*, 139(3), 1141–1146. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5788>
- O’Shaughnessy, P. J., Hu, L., & Baker, P. J. (2008). Effect of germ cell depletion on levels of specific mRNA transcripts in mouse Sertoli cells and Leydig cells. *Reproduction* (Cambridge, England), 135(6), 839–850. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0012>
- O’Shaughnessy, P. J., Johnston, H., Willerton, L., & Baker, P. J. (2002). Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 17), 3491–3496. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.17.3491>
- O’Shaughnessy, P. J., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K., & Abel, M. H. (2010). Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction* (Cambridge, England), 139(1), 177–184. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0377>
- O’Shaughnessy, P. J., Mitchell, R. T., Monteiro, A., O’Hara, L., Cruickshanks, L., der Grinten, H. C., Brown, P., Abel, M., & Smith, L. B. (2019). Androgen receptor expression is required to ensure development of adult Leydig cells and to prevent development of steroidogenic cells with adrenal characteristics in the mouse testis. *BMC Developmental Biology*, 19(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12861-019-0189-5>
- Payne, A. H., & Youngblood, G. L. (1995). Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biology of Reproduction*, 52(2), 217–225. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.2.217>
- Peng, L., Leung, E. H. W., So, J., Mak, P. H. S., Lee, C.-L., Tan, H., Lee, K.-F., & Chan, S. Y. (2020). TSPYL1 regulates steroidogenic gene expression and male factor fertility in mice. *F&S Science*, 1(2), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.xfss.2020.08.001>

- Polanco, J. C., Wilhelm, D., Davidson, T. L., Knight, D., & Koopman, P. (2010). Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Human molecular genetics*, 19(3), 506–516. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDP520>
- Rebourcet, D., Darbey, A., Monteiro, A., Soffientini, U., Tsai, Y. T., Handel, I., Pitetti, J.-L., Nef, S., Smith, L. B., & O’Shaughnessy, P. J. (2017). Sertoli Cell Number Defines and Predicts Germ and Leydig Cell Population Sizes in the Adult Mouse Testis. *Endocrinology*, 158(9), 2955–2969. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00196>
- Rebourcet, D., Monteiro, A., Cruickshanks, L., Jeffery, N., Smith, S., Milne, L., O’Shaughnessy, P. J., & Smith, L. B. (2019). Relationship of transcriptional markers to Leydig cell number in the mouse testis. *PloS One*, 14(7), e0219524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219524>
- Rebourcet, D., Wu, J., Cruickshanks, L., Smith, S. E., Milne, L., Fernando, A., Wallace, R. J., Gray, C. D., Hadoke, P. W. F., Mitchell, R. T., O’Shaughnessy, P. J., & Smith, L. B. (2016). Sertoli Cells Modulate Testicular Vascular Network Development, Structure, and Function to Influence Circulating Testosterone Concentrations in Adult Male Mice. *Endocrinology*, 157(6), 2479–2488. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1156>
- Schmahl, J., Eicher, E. M., Washburn, L. L., & Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development (Cambridge, England)*, 127(1), 65–73. <https://doi.org/10.1242/dev.127.1.65>
- Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., & Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Developmental Biology*, 274(2), 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.011>
- Sekido, R., & Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, 453(7197), 930–934. <https://doi.org/10.1038/nature06944>
- Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., & Fisher, J. S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction (Cambridge, England)*, 125(6), 769–784. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769>
- She, Z.-Y., & Yang, W.-X. (2017). Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development? *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 63, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.07.032>
- Shima, Y., Matsuzaki, S., Miyabayashi, K., Otake, H., Baba, T., Kato, S., Huhtaniemi, I., & Morohashi, K. (2015). Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen-Independent Subpopulation in the Postnatal Testis. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 29(11), 1581–1593. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1200>
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Haraguchi, S., Arakawa, T., Otake, H., Baba, T., Matsuzaki, S., Shishido, Y., Akiyama, H., Tachibana, T., Tsutsui, K., & Morohashi, K. (2013). Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 27(1), 63–73. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1256>
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Sato, T., Suyama, M., Ohkawa, Y., Doi, M., Okamura, H., & Suzuki, K. (2018). Fetal Leydig cells dedifferentiate and serve as adult Leydig stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 145(23), dev169136. <https://doi.org/10.1242/dev.169136>
- Siril Ariyaratne, H. B., Ian Mason, J., & Mendis-Handagama, S. M. (2000). Effects of thyroid and luteinizing hormones on the onset of precursor cell differentiation into leydig progenitor cells in the prepubertal rat testis. *Biology of Reproduction*, 63(3), 898–904. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.3.898>

- Stanley, E. L., Johnston, D. S., Fan, J., Papadopoulos, V., Chen, H., Ge, R.-S., Zirkin, B. R., & Jelinsky, S. A. (2011). Stem Leydig cell differentiation: gene expression during development of the adult rat population of Leydig cells. *Biology of Reproduction*, 85(6), 1161–1166. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091850>
- Su, D.-M., Feng, Y., Wang, L., Wu, Y.-L., Ge, R.-S., & Ma, X. (2018). Influence of fetal Leydig cells on the development of adult Leydig cell population in rats. *The Journal of Reproduction and Development*, 64(3), 223–231. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-102>
- Svingen, T., & Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes & Development*, 27(22), 2409–2426. <https://doi.org/10.1101/gad.228080.113>
- Takasawa, K., Kashimada, K., Pelosi, E., Takagi, M., Morio, T., Asahara, H., Schlessinger, D., Mizutani, S., & Koopman, P. (2014). FOXL2 transcriptionally represses Sfl expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice. *The FASEB Journal*, 28(5), 2020–2028. <https://doi.org/10.1096/fj.13-246108>
- Tang, H., Brennan, J., Karl, J., Hamada, Y., Raetzman, L., & Capel, B. (2008). Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis. *Development (Cambridge, England)*, 135(22), 3745–3753. <https://doi.org/10.1242/dev.024786>
- Tapanainen, J. S., Aittomäki, K., & Huhtaniemi, I. T. (1997). New insights into the role of follicle-stimulating hormone in reproduction. *Annals of Medicine*, 29(4), 265–266. <https://doi.org/10.3109/07853899708999345>
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397(6718), 405–409. <https://doi.org/10.1038/17068>
- Welsh, M., Saunders, P. T. K., Marchetti, N. I., & Sharpe, R. M. (2006). Androgen-dependent mechanisms of Wolffian duct development and their perturbation by flutamide. *Endocrinology*, 147(10), 4820–4830. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0149>
- Welsh, M., Sharpe, R. M., Moffat, L., Atanassova, N., Saunders, P. T. K., Kilter, S., Bergh, A., & Smith, L. B. (2010). Androgen Action via Testicular Arteriole Smooth Muscle Cells Is Important for Leydig Cell Function, Vasomotion and Testicular Fluid Dynamics. *PLoS ONE*, 5(10), e13632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013632>
- Welsh, M., Sharpe, R. M., Walker, M., Smith, L. B., & Saunders, P. T. K. (2009). New insights into the role of androgens in wolffian duct stabilization in male and female rodents. *Endocrinology*, 150(5), 2472–2480. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0529>
- Wen, Q., Zheng, Q.-S., Li, X.-X., Hu, Z.-Y., Gao, F., Cheng, C. Y., & Liu, Y.-X. (2014). Wt1 dictates the fate of fetal and adult Leydig cells during development in the mouse testis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 307(12), E1131–1143. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00425.2014>
- Wilhelm, D., Palmer, S., & Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87(1), 1–28. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2006>
- Wong, C.-H., & Cheng, C. Y. (2005). The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 71, 263–296. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)71008-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)71008-5)
- Wu, M. V., & Shah, N. M. (2011). Control of masculinization of the brain and behavior. *Current opinion in neurobiology*, 21(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.09.014>
- Xia, W., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2006). Differential interactions between transforming growth factor-beta3/TbetaR1, TAB1, and CD2AP disrupt blood-testis barrier and Sertoli-germ cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16799–16813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601618200>

- Xu, C., Mohsin, A., Luo, Y., Xie, L., Peng, Y., Wang, Q., Hang, H., Zhuang, Y., & Guo, M. (2019). Differentiation roadmap of embryonic Sertoli cells derived from mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1180-6>
- Xu, Q., Lin, H.-Y., Yeh, S.-D., Yu, I.-C., Wang, R.-S., Chen, Y.-T., Zhang, C., Altuwaijri, S., Chen, L.-M., Chuang, K.-H., Chiang, H.-S., Yeh, S., & Chang, C. (2007). Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine*, 32(1), 96–106. <https://doi.org/10.1007/s12020-007-9015-0>
- Yan, H. H. N., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2008). Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(6), 1945–1959. <https://doi.org/10.1096/fj.06-070342>
- Yao, H. H.-C., Whoriskey, W., & Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes & Development*, 16(11), 1433–1440. <https://doi.org/10.1101/gad.981202>
- Ye, L., Li, X., Li, L., Chen, H., & Ge, R.-S. (2017). Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem Leydig Cells. *Frontiers in Physiology*, 8, 430. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00430>
- Yeh, S., Tsai, M. Y., Xu, Q., Mu, X. M., Lardy, H., Huang, K. E., Lin, H., Yeh, S. Der, Altuwaijri, S., Zhou, X., Xing, L., Boyce, B. F., Hung, M. C., Zhang, S., Gan, L., & Chang, C. (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13498–13503. <https://doi.org/10.1073/PNAS.212474399>
- Yule, T. D., Montoya, G. D., Russell, L. D., Williams, T. M., & Tung, K. S. (1988). Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 141(4), 1161–1167.
- Zhang, F. P., Poutanen, M., Wilbertz, J., & Huhtaniemi, I. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 15(1), 172–183. <https://doi.org/10.1210/mend.15.1.0582>
- Zhou, B., Lin, W., Long, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wu, K., & Chu, Q. (2022). Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 95. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00934-y>
- Zirkin, B. R., & Papadopoulos, V. (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*, 99(1), 101–111. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy059>