

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maša CRČEK

**VLOGA GENA *Crem* V RAZVOJU MOŽGANOV PRI MIŠIH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ROLE OF *Crem* GENE ON DEVELOPMENT OF MURINE BRAIN**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Centru za genomiko živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Gregorja Majdiča in za recenzenta diplomskega dela izr. prof. dr. Marka Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Gregor MAJDIČ

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Center za genomiko živali

Član: izr. prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Maša CRČEK

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 606:61:575.16(043.2)  
KG *Crem*/možgani/razvoj/miši/aktivnost/telesna teža/anksioznemu podobno obnašanje/suprakiazmatično hipotalamusno jedro/vazopresin/enhanced at puberty protein/CYP51/test z dvignjenim labirintom/skupno gibanje/aktiven čas  
AV CRČEK, Maša  
SA MAJDIČ, Gregor (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2009  
IN VLOGA GENA *Crem* V RAZVOJU MOŽGANOV PRI MIŠIH  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 42 str., 10 sl., 66 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Dnevno-nočni ritem je vzdrževan preko hormonskih nihanj. Pri sesalcih je za izdelovanje hormona melatonina odgovorna epifiza, signal za izdelavo tega hormona pa izvira v notranji uri, ki je v suprakiazmatičnem hipotalamusnem jedru (SCN). Izražanje gena *Crem* vpliva na profil izdelave melatonina, vendar je natančna vloga gena v možganih še nepojasnjena. V diplomskem delu smo proučili fenotip miši z izbitim genom *Crem* z vidika aktivnosti, obnašanja in izražanja nekaterih proteinov v SCN. Tedensko smo beležili telesno težo v času od odstavitve do žrtvovanja. Z uporabo sistema za merjenje aktivnosti v dvodimenzijskem prostoru smo en teden pri normalnem dnevno-nočnem ciklu (12:12) in en teden v stalni temi spremljali aktiven čas in skupno gibanje miši. S testom dvignjenega labirinta (EPM) smo ugotavljali morebitne spremembe v anksioznemu podobnem obnašanju, beležili smo število vstopov v odprte in zaprte krake in čas postanka v teh krakih. Miši smo žrtvovali v 21. tednu po odstavitvi, fiksirali tkivo s postopkom perfuzije in jim odvzeli možgane. Z imunohistokemičnim barvanjem smo analizirali izražanje beljakovin arginin vazopresin (AVP), lanosterolne demetilaze (CYP51) in enhanced at puberty proteina (EAP). Rezultati aktivnosti in skupnega gibanja, testa anksioznemu podobnega obnašanja in imunohistokemije ne kažejo statistično značilnih razlik glede na spol in genotip. Rezultati meritev telesne teže so pokazali na vpliv spola in genotipa. Miši z izbitim genom *Crem* so imele povišano telesno težo v primerjavi z mišmi divjega tipa od pubertete naprej. Do razlike je lahko prišlo zaradi spremenjenega razvoja SCN, kar posledično pomeni prehranjevalne motnje, ali pa zaradi spremenjene fiziologije (adipogeneze), vendar natančen vzrok za povišanje telesne teže še ni pojasnjen. Zaradi majhnih razlik v težah bi bile smiselne nadaljnje raziskave, kjer bi miši krmili z bolj mastno krmo, s čimer bi se razlike med genotipoma povečale. Prav tako bi bilo smiselno proučiti izražanja še nekaterih drugih genov v SCN, ki so prav tako povezana s dnevno-nočnim ritmom (na primer *per*, *bmal*, *clk*).

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 606:61:575.16(043.2)  
CX *Crem*/brain/development/mice/activity/body weight/anxiety-like behavior/suprachiasmatic hypothalamic nucleus/vasopressin/enhanced at puberty protein/CYP51/elevated plus maze/total movements/active time  
AU CRČEK, Maša  
AA MAJDIČ, Gregor (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology  
PY 2009  
TI ROLE OF *Crem* GENE ON DEVELOPMENT OF MURINE BRAIN  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 42 p., 10 fig., 66 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Circadian rhythms are regulated by hormone oscillations. In mammals, hormone melatonin is synthesized in the pineal gland, while the signal for its synthesis originates in endogenous clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the brain. Expression of *Crem* gene is affecting melatonin production, but exact role of this gene in the regulation of circadian rhythms is yet unclear. In our study, we have examined a phenotype of *Crem* knockout mice with special interests in activity, behavior and expression of several proteins in the SCN. We were measuring body weight weekly from weaning until sacrifice of mice at 24 weeks. Using a system for measuring activity in two-dimensional space, we monitored activity and locomotion one week at normal day and night cycle (12:12) and the second week in constant darkness. Anxiety-like behavior was examined with standard elevated plus maze (EPM) with monitoring number of entrances into open and closed arms of the maze and duration of stay in the arms. Mice were sacrificed with perfusion fixation at 24 weeks. Brains were dissected and postfixed in 4% paraformaldehyde. We have analyzed the expression of arginin vasopressin (AVP), lanosterol demethylase (CYP51) and enhanced at puberty protein (EAP) in SCN using immunohistochemistry method. The results of activity and locomotion, results of EPM and results of expression of AVP, CYP51 and EAP proteins in SCN did not show any differences between genders and genotypes. However, the difference was found in body weight. *Crem* knockout mice were heavier than wildtype mice, with difference being notable from puberty onwards. The difference may be a result of changes in SCN development, which could result in energy balance disorder or due to changes in adipogenesis. The exact cause for higher body weight is not known yet. The small differences in body weight could be confirmed in an experiment using high-fat diet for mice and this should be done in the future studies together with analyses of expression of other genes in SCN, which are involved in the regulation of circadian rhythm (like *per*, *bmal* and *clk*).

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija.....	III
Key words documentation.....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo slik.....	VIII
Okrajšave in simboli.....	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 DNEVNO-NOČNI RITMI	3
<b>2.1.1 Hipotalamus in epifiza</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Suprakiazmatično hipotalamusno jedro (SCN)</b>	<b>4</b>
2.1.2.1 Razdelitev SCN	4
2.1.2.2 Razvoj SCN	4
2.1.2.3 Vloga SCN	5
2.2 MELATONIN	6
2.3 GEN <i>Crem</i>	7
2.4 PROTEIN ICER	8
<b>2.4.1 Delovanje cAMP sporočilne poti in protein ICER</b>	<b>8</b>
2.5 RAZVOJ MOŽGANOV	9
<b>2.5.1 Nevroendokrina organizacija razvoja nevronov</b>	<b>9</b>
<b>2.5.2 Nevrodegeneracija in gen <i>Crem</i></b>	<b>10</b>
2.6 VPLIVI GENA <i>Crem</i> NA SPERMATOGENEZO	10
2.7 AKTIVNOST IN OBNAŠANJE	11
<b>2.7.1 Aktivnost in dnevno-nočni ritem</b>	<b>11</b>
<b>2.7.2 Telesna teža in dnevno-nočni ritem</b>	<b>11</b>
<b>2.7.3 Anksioznemu podobno obnašanje</b>	<b>12</b>
<b>2.7.4 Vpliv gena <i>Crem</i> na aktivnost in anksioznemu podobno obnašanje</b>	<b>13</b>

2.8	ARGININ VAZOPRESIN (AVP)	13
<b>2.8.1</b>	<b>Sproščanje AVP in dnevno-nočni ritem</b>	14
<b>2.8.2</b>	<b>Vpliv AVP na obnašanje</b>	14
2.9	CYP51 IZ DRUŽINE CITOKROMOV P450	15
<b>2.9.1</b>	<b>Citokrom P450</b>	15
<b>2.9.2</b>	<b>CYP51 in sinteza holesterola</b>	16
<b>2.9.3</b>	<b>Dnevno-nočno izražanje CYP51 v jetrih in <i>Crem</i></b>	16
2.10	ENHANCED AT PUBERTY PROTEIN (EAP)	17
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b>	18
3.1	ŽIVALI	18
<b>3.1.1</b>	<b>Razgradnja tkiva in določanje genotipa z metodo PCR</b>	18
<b>3.1.2</b>	<b>Tehtanje miši</b>	19
<b>3.1.3</b>	<b>Spremljanje celotne aktivnosti miši</b>	19
<b>3.1.4</b>	<b>Test anskioznemu podobnega obnašanja z dvignjenim labirintom (EPM)</b>	20
<b>3.1.5</b>	<b>Žrtovanje miši</b>	20
3.1.2.1	Odvzem krvi	21
3.1.2.2	Fiksacija tkiv s postopkom perfuzije	21
3.1.2.3	Izolacija možganov	21
3.2	ANALIZA MOŽGANOV	21
<b>3.2.1</b>	<b>Imunohistokemično barvanje plavajočih rezin možganov miši</b>	21
3.2.1.1	Primarna protitelesa	23
<b>3.2.2</b>	<b>Analiza hipotalamusnega jedra SCN v možganih</b>	23
3.2.2.1	Priprava digitalnih slik in analiza	23
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	23
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	24
4.1	SPREMLJANJE TELESNE TEŽE	24
4.2	SPREMLJANJE CELOTNE AKTIVNOSTI	25
<b>4.2.1</b>	<b>Skupno gibanje</b>	25
<b>4.2.2</b>	<b>Aktiven čas</b>	26
4.3	SPREMLJANJE ANSKIOZNEMU PODOBNEGA OBNAŠANJA	26
4.4	IZRAŽENOST AVP, CYP51 IN EAP V SCN	28
<b>4.4.1</b>	<b>Izraženost AVP v SCN</b>	28

<b>4.4.2</b>	<b>Izraženost CYP51 v SCN</b>	<b>30</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Izraženost EAP v SCN</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>37</b>

**ZAHVALA**

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema delovanja cAMP signalne poti, vse od celične membrane, skozi citoplazmo v jedro (Molina in sod., 1993) .....	9
Slika 2: Rezultati spremljanja telesne teže glede na spol in genotip v času od odstavitve do žrtvovanja s prikazom intervalov standardne napake. <i>Legenda</i> : WT M – samci divjega tipa, WT F – samice divjega tipa, <i>Crem</i> KO M – samci z izbitim genom <i>Crem</i> , <i>Crem</i> KO F – samice z izbitim genom <i>Crem</i> . .....	24
Slika 3: Rezultati spremljanja ritma skupnega gibanja glede na spol in genotip. Merjenje v temi je osenčeno. <i>Legenda</i> : WT F – samice divjega tipa, WT M – samci divjega tipa, <i>Crem</i> KO F – samice z izbitim genom <i>Crem</i> , <i>Crem</i> KO M – samci z izbitim genom <i>Crem</i> . .....	25
Slika 4: Rezultati spremljanja ritma aktivnega časa glede na spol in genotip. Merjenje v temi je osenčeno. <i>Legenda</i> : WT F – samice divjega tipa, WT M – samci divjega tipa, <i>Crem</i> KO F – samice z izbitim genom <i>Crem</i> , <i>Crem</i> KO M – samci z izbitim genom <i>Crem</i> . .....	26
Slika 5: Rezultati testa dvignjenega labirinta - primerjava časa, ki ga je miš preživela v odprtih krakih dvignjenega labirinta, glede na spol in genotip in prikaz intervalov standardne napake. <i>Legenda</i> : WT – miši divjega tipa, <i>Crem</i> KO – miši z izbitim genom <i>Crem</i> , M – samci, F – samice. ....	27
Slika 6: Rezultati testa dvignjenega labirinta – primerjava števila vstopov v odprta kraka EPM glede na spol in genotip in prikaz intervalov standardne napake. <i>Legenda</i> : WT – miši divjega tipa, <i>Crem</i> KO – miši z izbitim genom <i>Crem</i> , M – samci, F – samice. ....	27
Slika 7: Rezultati imunohistokemije - primerjava števila nevronov v SCN z izraženim AVP med spoloma in glede na genotip ter prikaz intervalov standardne napake. n = 5 pri vseh skupinah. <i>Legenda</i> : <i>Crem</i> KO – miši z izbitim genom <i>Crem</i> , WT – miši divjega tipa, F – samice, M – samci .....	28
Slika 8: Rezultati imunohistokemije - izraženost AVP v nevronih v SCN pri samcih WT (a), samcih <i>Crem</i> KO (b), samicah WT (c) in samicah <i>Crem</i> KO (d) pri 100-kratni povečavi. <i>Legenda</i> : SCN – suprakiazmatično jedro, 3V – tretji ventrikel, OT – olfaktorni trakt.....	29
Slika 9: Rezultati imunohistokemije - izraženost CYP51 v nevronih v SCN pri samcih WT (a), samcih <i>Crem</i> KO (b), samicah WT (c) in samicah <i>Crem</i> KO (d) pri 100-kratni povečavi. <i>Legenda</i> : SCN – suprakiazmatično jedro, 3V – tretji ventrikel, OT – olfaktorni trakt.....	30
Slika 10: Rezultati imunohistokemije - izraženost EAP v nevronih v SCN pri samcih WT (a), samcih <i>Crem</i> KO (b), samicah WT (c) in samicah <i>Crem</i> KO (d) pri 100-kratni povečavi. <i>Legenda</i> : SCN – suprakiazmatično jedro, 3V – tretji ventrikel, OT – olfaktorni trakt.....	31



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>Okrajšava</b>	<b>Pomen</b>
<i>Crem</i> KO	miš z izbitim genom <i>Crem</i> (angl. <i>Crem</i> knockout)
WT	divji tip miši (angl. wild type)
EPM	test z dvignjenim labirintom (angl. elevated plus maze)
SCN	suprakiazmatično jedro (angl. suprachiasmatic nucleus)
CYP51	protein iz družine citokromov P450
EAP	enhanced at puberty protein
IEG	takojšnji zgodnji geni (angl. immediate early genes)
LRG	geni poznega odgovora (angl. late response genes)
vl-SCN	ventrolateralni del suprakiazmatičnega jedra
dm-SCN	dorzomedialni del suprakiazmatičnega jedra
NAT	N-acetiltransferaza
CRE	elementi, odzivni na cAMP sporočilno pot (angl. cAMP-responsive elements)
CREB	vezavni protein na CRE elementih (angl. cAMP-responsive element binding protein)
PKA	protein kinaza A
ICER	represorski produkt gena <i>Crem</i> (angl. inducible cAMP early repressor)
ERG	geni zgodnjega odgovora (angl. early response genes)
CREM	modulator elementov CRE (angl. cAMP responsive element modulator)
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
ATP	adenozin trifosfat
PLXNA2	gen za plexin 2A
AVP	arginin vazopresin
T-MAS	aktivacijski sterol za mejozo iz mod
FF-MAS	aktivacijski sterol za mejozo iz folikularne tekočine
SREBP	vezavni proteini, ki se vežejo na urejevalne elemente za sterole (angl. sterol regulatory element binding proteins)

IRF2BP	vezavni proteini, ki se vežejo na urejevalne faktorje interferona (angl. interferon regulatory factor 2-binding protein)
GnRH	gonadotropin-sproščujoči hormon, gonadoliberin (angl. gonadotropin-releasing hormone)
PENK	preproenkefalin
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffer saline)
NGS	normalni kozji serum (angl. normal goat serum)
TBS	pufer Tris (angl. Tris buffered saline)
DAB	diamino benzidin

## 1 UVOD

Zmožnost prilagajanja spremenljivemu okolju je pomembna lastnost fiziološkega urejanja vseh organizmov, saj jim omogoča prednost v boju za obstanek. Nastanek različnih bioritmičnih sprememb je tako posledica dolgotrajnega filogenetskega razvoja v okolju. Ena najbolj znanih konstantnih sprememb v okolju je sprememba dneva in noči. Dnevno-nočni ritem je endogenega izvora, kjer so zunanji dejavniki kot sta sprememba dolžine dneva in intenzivnost osvetlitve le modulatorji procesov, osnovni vzrok sprememb pa so centri za bioritmiko. Dnevno-nočni ritem je vzdrževan preko hormonskih nihanj. Pri sesalcih je za izdelovanje hormona melatonina odgovorna epifiza, signal za izdelavo tega hormona pa izvira v notranji uri, ki je v suprakiazmatskem hipotalamusnem jedru (SCN, angl. suprachiasmatic nucleus) (Melatonin, 2009).

Molekularni mehanizmi, ki sodelujejo pri ritmičnem izdelovanju melatonina, vključujejo gen *Crem*, ki kodira prepisovalne dejavnike, pomembne za aktivacijo cAMP sporočilne poti. Natančna vloga gena *Crem* v možganih in njegovi celotni vplivi na organizem še niso dobro pojasnjeni. V primeru neustreznega izločanja melatonina iz epifize prihaja do motenj v dnevno-nočnem ritmu, kar posledično vodi v motnje spanja in kronično nespečnost. Podrt dnevni ritem pomeni tudi motnje hranjenja, neustrezno aktivnost organizma ter spremembe v obnašanju. Pri ljudeh se lahko pojavi anksioznost oziroma tesnoba, pri živalih pa govorimo o anksioznemu podobnem obnašanju. Anksioznemu podobno obnašanje se razvije kot posledica sproščanja hormonov in nevrottransmitterjev. Eden izmed prenašalcev živčnih dražljajev v centralnem živčnem sistemu je tudi vazopresin. Njegove vloge so številne, v možganih pa predvsem vpliva na dnevno-nočni ritem lokomotornega obnašanja in na socialno obnašanje (De Vries in sod., 1983).

### 1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V diplomskem delu smo podrobneje proučili fenotip miši z izbitim genom *Crem* (*Crem* KO, angl. *Crem* knockout) v primerjavi s fenotipom divjega seva miši (WT, angl. wild type). Ker gen *Crem* povezujejo z izdelovanjem melatonina, ta pa vpliva na dnevno-nočni ritem, smo miši *Crem* KO testirali z vidika dnevno-nočnega ritma in obnašanja.

Tedensko smo beležili telesno težo miši, spremljali pa smo tudi aktiven čas in skupno gibanje miši s pomočjo sistema za merjenje celotne aktivnosti. Za ugotavljanje anksioznemu podobnega obnašanja s posebnim poudarkom na morebitnih razlikah med spoloma smo izvedli test z dvignjenim labirintom (EPM, angl. elevated plus maze). Ker naj bi miši *Crem* KO imele motnje v dnevno-nočnem ritmu, ki ga uravnava SCN, smo z imunohistokemično metodo ugotavljali izraženost proteinov lanosterolna demetilaza

(CYP51), enhanced at puberty proteina (EAP) in vazopresina (AVP), ki so vsi močno izraženi v SCN.

Naše delo smo pričeli z naslednjimi hipotezami:

- Miši *Crem* KO imajo porušen dnevno-nočni ritem, posledice se kažejo v spremenjenem dnevno-nočnem vzorcu aktivnosti miši.
- Miši *Crem* KO imajo povišano telesne težo.
- Miši WT so v primerjavi z mišmi *Crem* KO manj anksiozne.
- Pri miših *Crem* KO se v SCN pojavijo spremembe v izražanju proteinov AVP, CYP51 in EAP.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 DNEVNO-NOČNI RITMI

Dnevno-nočni ritem traja približno en dan in ga ločimo na dnevno in nočno fazo. Pri živalih, ki so aktivne podnevi, je večina fizioloških procesov najintenzivnejša v dnevni fazi. Pri živalih, ki so najbolj aktivne ponoči, pa so fiziološki procesi intenzivnejši v nočni fazi. V času enega dneva pride v telesu do številnih sprememb kot so intenzivnost metabolizma, sestava krvi in izločanje hormonov (Cestnik, 1993). Notranji biološki ritem pa vendarle ni popolnoma natančen, ampak je dodatno uravnan s svetlobo. Ravno nenatančnost ritma omogoča njegovo večjo prilagodljivost, kar je predstavljalo prednost pri preživetju med evolucijo. V osnovi je izvor bioloških ritmov endogeni, vendar pa nanje lahko dodatno vplivajo spremembe iz okolja. Tako se z daljšanjem dneva daljša tudi aktivna faza (pri dnevno aktivnih živalih). Dnevno-nočni ritem je prisoten že pri enoceličnih organizmih. Molekularne komponente ritma so tako ohranjene vse od rastlin do muh in vretenčarjev. Gre za par aktivatorjev (CLOCK in BMAL1), ki spodbudita prepisovanje para represorjev (PER in CRY) in sta urejana s posebnimi molekulami (Kohsaka in Bass, 2006).

Proučevanja nevroendokrinega in presnovnega sistema so pokazala, da na oba sistema močno vpliva dnevno-nočni ritem. Kohsaka in Bass (2006) sta našla številne biokemijske poti, ki povezujejo dnevno-nočni ritem s potjo glukoneogeneze in lipogeneze. Raziskave z mutanti z izbitima gena *Clock* in *Bmal1* so pokazali vlogo dnevno-nočnega ritma v energijski presnovi in adipogenezi sesalcev (Turek in sod., 2005; Rudic in sod., 2004).

#### 2.1.1 Hipotalamus in epifiza

Vmesni možgani ali diencefalon spadajo v celoti k možganskemu deblu in so zato filogenetsko gledano star del možganov. V ta predel štejemo hipotalamus, ki služi predvsem za nadzor in urejanje vegetativnih funkcij (presnova, krvni obtok, endokrina dejavnost žlez) in talamencefalon. Slednji se deli na epitalamus, kjer se nahaja epifiza, in nato še na talamus, metatalamus in tretji prekat. Epifiza ima značaj hormonske žleze, saj izdeluje hormon melatonin. Njegovo izdelavo naj bi zavirali svetlobni dražljaji, ki se prenašajo od mrežnice na epifizo preko simpatičnih vlaken. Epifizni hormon melatonin deluje zaviralno na spolne žleze. Tako se delovanje spolnih žlez v močnejše osvetljenih fazah dneva poveča (Rigler, 1988).

Sistem hipotalamus-hipofiza sestoji iz številnih tesnih povezav. Hipotalamus delimo na različna jedrna področja, ki so siromašna z mielinom. Paraventricularno jedro vsebuje

velike celice, ki podobno kot endokrine žleze izdelujejo hormone. Hormoni, vazopresin in oksitocin dospejo preko debelih vlaken traktusa paraventriculo-hipofizeusa, ki poteka po podolžni osi skozi hipofizni pecelj, v nevrohipofizo, kjer se zbirajo in nato po krvni poti oddajo v telo (Rigler, 1988).

### 2.1.2 Suprakiazmatično hipotalamusno jedro (SCN)

Dnevno-nočni ritem pri sesalcih uravnava hipotalamusno jedro SCN, ki je tesno povezano z drugimi centri tega področja možganov (Ralph in sod., 1990). Sestavljeno je iz približno 8000 do 10 000 nevronov, ki so nameščeni nad križiščem vidnikov in ob tretjem ventriklu v hipotalamusu. Informacija o svetlobi iz okolja, ki jo sprejmejo fotoreceptorji v očeh, se prenese preko glutamatergične poti, imenovane retinohipotalamusni trakt, v SCN, in nato vpliva na izražanje od dnevno-nočnega ritma odvisnih genov v SCN (Nelson, 2005). Bendova in sodelavci (2004) so ugotovili, da se v manjši meri informacije prenesejo tudi po genikulohipotalamusnem traktu. Svetlobnemu dražljaju sledi aktivacija prepisa takojšnjih zgodnjih genov (IEG, angl. immediate early genes) v SCN, še posebno *c-fos* in *junB*. Proizvedeni proteini kot prepisovalni faktorji nadzorujejo prepis genov poznega odgovora (LRG, angl. late response genes).

#### 2.1.2.1 Razdelitev SCN

Morfološko in funkcionalno delimo SCN na ventrolateralni (vl) del in dorzomedialni (dm) del. Vl-SCN sprejema neposredne ali posredne svetlobne signale, v tem predelu se izražata *c-fos* in *Per1* gena. Dm-SCN pa sprejema predvsem nesvetlobne signale iz možganske skorje, prednjih možganov in hipotalamusa, v tem predelu se ritmično izraža gen za vazopresin (Bendova in sod., 2004).

#### 2.1.2.2 Razvoj SCN

SCN se pri sesalcih razvija v več fazah. Razvojne faze pri podganah so proučevali Bendova in sodelavci (2004). V času E14-E17 se iz specializiranega področja ventralnega diencefaličnega germinalnega epitelijskega kot del periventricularne skupine celic oblikuje SCN. Najprej se razvijejo nevroni dm-SCN, sledijo jim nevroni vl-SCN. Ritmičnost v dm-SCN verjetno pomaga oblikovati ritmičnost tudi v vl-SCN. Ko pa je slednja vzpostavljena, se verjetno prej odzove na svetlobni signal kot dm-SCN. Sinaptogeneza v poznem prenatalnem in zgodnjem postnatalnem času napreduje počasi, v času P4-P10 pa se izredno pospeši. Retinohipotalamusni trakt se oblikuje v času rojstva, pojavljati se začnejo številne intrinzične povezave. Oblikujejo se aferentni nevroni in celoten živčni sistem doseže odraslo stopnjo razvoja do P10. Intrinzična ritmika v SCN (ritem privzema 2-

deoksiglukoze, aktivnost nevronov, izražanja *Per1*) je prisotna že v poznem embrionskem obdobju.

### 2.1.2.3 Vloga SCN

SCN, ki natančno uravnava 24-urni dnevno-nočni cikel, prenaša ta ritem na številne strukture centralnega živčnega sistema in izvaja nadzor nad večino dnevno-nočnih bioloških ritmov. Nadzoruje predvsem sintezno aktivnost epifize, neuroendokrinega tkiva, ki prevaja dnevno-nočna živčna sporočila iz SCN v humoralna sporočila – v obliki hormona melatonina (Vanecek in sod., 1987). SCN vsebuje heterologno populacijo nevronov, ki sproščajo različne neuropeptide, vključno z neuropeptidom Y, arginin vazopresinom in somatostatinom (Nelson, 2005).

Tema sproži v SCN izražanje številnih genov IEG. Guido in sodelavci (1999) so proučevali IEG in ugotovili, da je njihovo izražanje sproženo hitro, vendar le prehodno, in se spreminja glede na različne dražljaje, njihovi prepisi pa predstavljajo različne urejevalne faktorje. IEG najverjetneje delujejo kot tretji sporočevalci, ki prenašajo informacije poznih sprememb v genskem izražanju, kar vodi v preoblikovanje kratkotrajnih zunajceličnih signalov v dolgo-trajajoče celične spremembe (Robertson, 1992). Dnevno-nočna ura v SCN uravnava dva neodvisna ritma izražanja IEG. Prvi, ritem občutljivosti na nočno svetlobo, je delujoč najbolj v ventralnem delu SCN, drugi ritem pa je spontano spodbujen v mraku in deluje predvsem v dorzalnem delu SCN (Guido in sod., 1999). Poleg uravnavanja ritma izražanja genov IEG, pa SCN nadzira tudi ritme električne aktivnosti, ritem privzema 2-deoksiglukoze, ki predstavlja označevalec presnovne aktivnosti, in ritem proizvodnje številnih peptidov kot so arginin vazopresin ter prepisi genov *c-Fos* in *Per1* (Bendova in sod., 2004).

Geni, ki se ravnaajo po dnevno-nočnem ritmu, se izražajo v različnih tkivih v organizmu, kar dokazuje, da SCN komunicira s temi tkivi tako, da sinhronizira izraženost genov. Povezava med SCN in tkivi naj bi bil avtonomni živčni sistem, vendar bodo za dokaz te povezave potrebne nadaljnje raziskave (Nelson, 2005). Nevroni SCN so s sinapsami povezani s telesci celic subparaventricularnega področja in lateralnega hipotalamusnega področja (Kohsaka in Bass, 2006), ki predstavljajo eferentno izhodno pot informacij iz SCN. Drugi tip izhoda informacij pa je humoralni signal, na primer arginin vazopresin. SCN prireja dnevno-nočni ritem sproščanja vazopresina in je odgovoren za dnevno-nočni ritem le-tega v cerebrospinalni tekočini.

Bolje znana multisinaptična izhodna informacijska pot iz SCN je pretvorba svetlobne informacije v endokrino sporočilo v epifizi, ki sprošča hormon melatonin. V temi ti nevroni sproščajo norepinefrin, ki stimulira pinealocite, da pospešijo encimsko aktivnost in izdelujejo melatonin (Nelson, 2005).

## 2.2 MELATONIN

Pri višje razvitih živalih, vključno s človekom, se melatonin izdeluje v epifiznih celicah, v mrežnici, očesnih lečah, prebavnem traktu in drugih tkivih. Na izdelavo melatonina v epifizi vpliva SCN, ki od mrežničnih svetlobno občutljivih ganglijskih celic prejme informacijo o svetlobi in temi.

Ritmično izdelovanje hormona melatonina služi kot pomemben dnevno-nočni endokrini signal. Časovno uravnjavani signali se prevajajo v nočno izdelavo melatonina v epifizi, podnevi pa je s svetlobo izdelava zavrtja. Izločanje melatonina je največje sredi noči in strmo popušča v drugi polovici noči. Sproščen melatonin predstavlja dnevno in tudi sezonsko sporočilo vsem celicam, ki imajo izpostavljene receptorje za melatonin. Vanecek in sodelavci (1987) so ugotovili, da se številni receptorji za melatonin nahajajo ravno v SCN. Čeprav njihova natančna fiziološka vloga še ni pojasnjena, njihova gosta izraženost v SCN nakazuje na vpliv melatonina na centralni ritem preko fiziološke povratne zanke (Agez in sod., 2007). Povezanost melatonina z dnevno-nočnim ritmom so dokazale tudi raziskave Redmana in sodelavcev (1983), ki so dnevno-nočni sistem urejali z akutnimi injiciranjem eksogenega melatonina. Njihovi rezultati so pokazali na sinhronizacijo spontane lokomotorne aktivnosti z dnevnimi injiciranjem melatonina. Dubocovich in sodelavci (2005) pa so raziskovali vlogo receptorjev za melatonin. Ugotovili so, da pri miših brez receptorjev za melatonin ni prišlo do sprememb v ritmu spontane aktivnosti po injiciranju eksogenega melatonina, kar potrjuje, da melatonin vpliva na dnevno-nočni ritem preko svojih receptorjev v SCN. V SCN sta prisotna dva tipa receptorjev za melatonin, MT1 (Poirel in sod., 2002) in MT2 (Dubocovich in sod., 2003), vendar njuna natančna vloga v posredovanju melatoninske informacije še ni popolnoma znana.

Izdelava melatonina poteka s pomočjo encima N-acetiltransferaza (NAT), katerega izraženost aktivira cAMP sporočilna pot, nihanja v količini tega encima pa določajo dnevno-nočno izdelovanje melatonina. Tako encim NAT predstavlja ključen korak v urejanju izdelave melatonina. Urejanje prepisovanja preko cAMP poteka s pomočjo prepisovalnih dejavnikov iz družine bZip, ki se vežejo na cAMP-responsive elemente (CRE). Ti elementi delujejo kot aktivatorji ali kot represorji, njihova aktivnost je urejana s fosforilacijo. Korak, ki povezuje cAMP sporočilno pot in izraženost genov, je ravno fosforilacija CRE-vezavnega proteina CREB (angl. CRE-binding protein) s protein kinazo A (PKA). Med urejevalce elementov CRE spada tudi produkt gena *Crem*. Nastajanje proteina ICER (angl. inducible cAMP early repressor) je vodeno z istimi časovno odvisnimi adrenergičnimi signali, ki sodelujejo pri izdelavi melatonina. mRNA proteina ICER doseže vrh v drugi polovici noči, malo pred padcem izdelovanja melatonina in zmanjšanju prepisov mRNA za encim NAT. Dnevno-nočni preklon gena *Crem* je razvojno urejan in se pojavi prvič šele po rojstvu, sočasno s pričetkom ritmične izdelave melatonina. Stopnja nočne indukcije gena *Crem* in spodbuditve s cAMP s prilagajanjem na podaljševanje noči upada. Vsaka sprememba v količini svetlobe, ki vpliva na izraženost gena *Crem*, vpliva tudi na profil izdelave melatonina (Foulkes in sod., 1996).



Glavno vlogo v razvoju in fiziologiji hipotalamus-epifiza-spolne osi ima prepisovalni faktor *Crem* s svojim produktom ICER. Nihanje koncentracij proteina ICER so usklajena z izdelovanjem epifiznega hormona melatonina, katerega izdelava je uravnavana z notranjo uro. Melatonin tako ureja hipotalamusno-epifizno os. Nicholas S. Foulkes je leta 1996 s sodelavci dokazal, da je pri miškah z izbitim genom *Crem* izraženost encima NAT močno povečana, saj sam protein ICER močno zavira nastajanje encima NAT. Okarakterizirali so promotor encima NAT in ugotovili, da vsebuje vezavno mesto za protein ICER.

ICER tako vpliva na ritmično izraženost encima NAT in posledično na izdelovanje melatonina v epifizi. Izraženost encima NAT je nepravilno urejana pri miškah z izbitim genom *Crem*, kar pomeni, da je aktivnost promotorja encima NAT zavrta s proteinom ICER.

### 2.3 GEN *Crem*

Sporočilne poti predstavljajo temeljni mehanizem, ki uravnava celično diferenciacijo in proliferacijo. Ključne komponente teh poti so geni, ki jih uvrščamo v razred genov zgodnjega odgovora (ERG, angl. early response genes), za katere je značilno, da za njihovo sprožitev ni potrebna tvorba proteinov. Faktorji, potrebni za sprožitev prepisovanja genov, so prisotni v celici že pred spodbuditvijo (Molina in sod., 1993).

Večeksoski gen *Crem*, ki se pri miši nahaja na osemnajstem kromosomu (*Crem* cAMP responsive element modulator, 2009), je sestavljen iz osmih eksonov in z alternativnim izrezovanjem le-teh kodira družino aktivatorjev in antagonistov cAMP inducibilne transkripcije. Gen *Crem* vsebuje dve alternativni vezavni domeni za DNA, ki sta pri različnih izoformah različno razrezani (Laoide in sod., 1993). *Crem* antagonisti  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$  so brez dveh z glutaminom bogatih domen in zaustavljajo s cAMP spodbujeno prepisovanje genov. Druga izoforma gena, *Cremt*, pa vsebuje z glutaminom bogate domene, zaradi katerih postane prepisovalni aktivator (Molina in sod., 1993). Izraženost gena *Crem* je v različnih celičnih tipih izjemno raznolika. Med spermatogenezo pride do funkcionalnega preklopa v izraženosti gena *Crem*, ko se izražanje nizkih koncentracij antagonistov prevesi v izražanje visokih koncentracij aktivatorja (Laoide in sod., 1993).

Izraženost gena *Crem* (cAMP-responsive element modulator) je tkivno specifična in uravnavana z razvojem. *Crem* spada v družino vezavnih faktorjev na elemente CRE in aktivira cAMP sporočilno pot. Kinetika izraženosti gena je značilna za gene tipa ERG. Sprožitev izraženosti gena je celično specifična, ne vključuje povečane stabilnosti prepisa in ne zahteva tvorbe proteinov. *De novo* tvorba proteinov je potrebna le pri zaviranju izražanja gena *Crem*. Spodbujen prepis izhaja iz alternativnega intronskega promotorja in kodira zaviralec ICER. Inducibilnost cAMP uravnava skupina štirih CRE faktorjev v tem promotorju. Na te elemente se veže protein ICER in tako zavre aktivnost svojega lastnega promotorja, s čimer se vzpostavi negativna avtoregulatorna zanka (Molina in sod., 1993).

Gen *Crem* postane inducibilen z aktivacijo sporočilne poti adenilat-ciklaze, vendar se pri tem ne pričnejo izražati prepisi *Crem*  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  in  $\tau$ , ki imajo svojo, drugačno prepisovalno kontrolo, ampak se spodbudi nastanek nove izoforme ICER (Molina in sod., 1993).

## 2.4 PROTEIN ICER

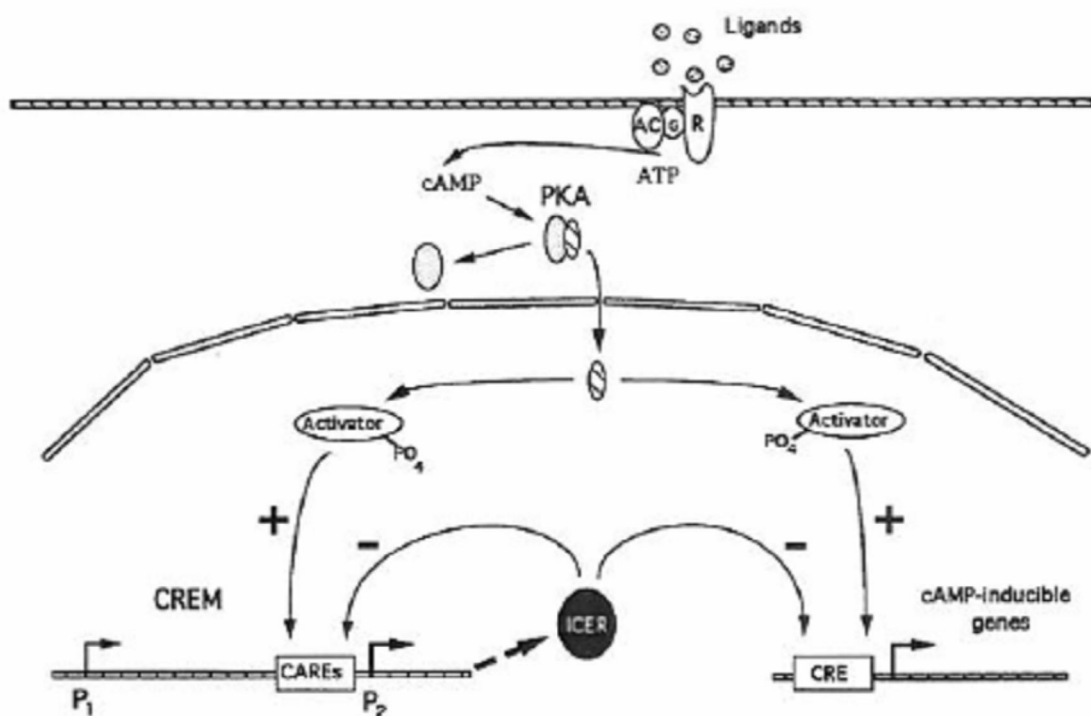
Protein ICER (Inducible cAMP Early Repressor) ima pomembno vlogo pri delovanju dnevno-nočnega sistema v možganih sesalcev. Nahaja se tako v SCN kot v epifizi, dveh delih možganov, ki nadzorujeta dnevno-nočne ritme v telesu sesalcev, poleg tega pa je izražen tudi v nekaterih drugih delih hipotalamusa. ICER spada v družino osnovnih prepisovalnih dejavnikov z levcinsko zadrigo CREM, ki so dominantni negativni urejevalci izražanja genov. Gre za zelo majhen prepisovalni faktor, saj je sestavljen le iz osnovne domene levcinske zadrge, ki je potrebna za dimerizacijo proteina za vezavo na DNK. Odsotnost škatle P ga uvršča v novo kategorijo vezavnih faktorjev CRE, saj je za njegovo aktivnost pomembna njegova znotrajcelična koncentracija in ne fosforilacija, tako kot pri ostalih vezavnih faktorjih iz te skupine. ICER ima v urejanju izražanja nevroendokrinih genov izredno pomembno vlogo. Deluje kot močan zaviralec cAMP spodbujenega prepisovanja. Inducibilnost gena *Crem* je celično specifična, kinetika le-te pa je značilna za gene tipa ERG. Izraženost proteina ICER doseže vrh v dveh urah po spodbuditvi in upade po največ šestih urah od sprožitve (Molina in sod., 1993).

Iz gena *Crem* se prepisujejo štiri različne izoforme proteina ICER in sicer I, Igama, II in IIgama (Chandhoke in sod., 2008). Protein CREM se ritmično izraža in sodeluje pri prepisovalni avtoregulatorni zanki, ki nadzira amplitudo nihanja encima NAT, ki je pomemben pri izdelavi melatonina. Izražanje gena *Crem* niha skozi dnevno-nočni cikel, vrh pa doseže proti koncu noči (Foulkes in sod., 1997). Preklop med dnevno-nočnim izražanjem gena *Crem* nadzorujejo adrenergični signali iz SCN.

### 2.4.1 Delovanje cAMP sporočilne poti in protein ICER

Ciklični adenzin monofosfat (cAMP) je sekundarni sporočevalec s pomembno vlogo v številnih bioloških procesih. Izvira iz adenzin trifosfata (ATP) in prenaša znotrajcelična sporočila. cAMP sporočilna pot (Slika 1) je odvisna od specifične PKA in od elementov CRE, ki predstavljajo tarčo za nadziranje prepisovanja. Ligandi z vezavo na transmembranske receptorje spodbudijo encim adenilat-ciklazo preko povezav s proteinom G. Povišana koncentracija cAMP v celici povzroči razpad regulatorne in katalitične podenote PKA. Aktivna katalitična podenota PKA se prenese v jedro celice, kjer fosforilira in tako stimulira prepisovalne aktivatorje, vezane na elemente CRE, kar povzroči prepisovanje od cAMP odzivnih genov. Ti dejavniki sprožijo prepisovanje gena *Crem* P2 preko elementov CARE, kar vodi do hitrega povečanja koncentracije proteinov ICER.

ICER nato zavre s cAMP sproženo prepisovanje, vključno s prepisovanjem samega gena *Crem*. Posledičen padec koncentracije proteinov ICER vodi v ukinitvev zaviranja in dovoljuje novi cikel aktivacije prepisovanja genov (Molina in sod., 1993).



Slika 1: Shema delovanja cAMP signalne poti, vse od celične membrane, skozi citoplazmo v jedro (Molina in sod., 1993).

## 2.5 RAZVOJ MOŽGANOV

### 2.5.1 Neuroendokrini organizacija razvoja nevronov

Rast in razvoj nevronov sta v času prenatalnega in neonatalnega obdobja pod vplivom aktivnosti genoma in endokrinih tarčnih celic. Hormoni, neuropeptidi in živčni prenašalci z urejanjem prepisovanja genov in izdelave proteinov uravnavajo rast in diferenciacijo živčnih celic, tvorbo hormonskih receptorjev in receptorjev živčnih prenašalcev ter število sinaptičnih povezav, ki jih posamezna celica vzpostavi. Ti nevroregulatorji uravnavajo razvoj nevronskih mrež, ki so nato odgovorne za zaznavanje zunanjih dražljajev, za gibanje in različne pomembne povezovalne funkcije v možganih. Prav delovanje hormonov in živčnih prenašalcev v času razvoja nevronov vzpostavi splošno stanje metabolizma organizma ter funkcije neuroendokrinih, avtonomnega in centralnega živčnega sistema (Lauder, 1983). Dejavniki, ki prekinjejo izločanje hormonov in živčnih

prenašalcev v času zarodka, povzročijo slabši razvoj možganov, kar predstavlja nepopravljive posledice za možgane in vpliva na obnašanje.

### 2.5.2 Nevrodegeneracija in gen *Crem*

Za oblikovanje kompleksne strukture možganov sta pomembna nastajanje in celična smrt (apoptoza) nevronov. V primeru večjih izgub nevronov pa prihaja do nepopravljivih motenj in različnih nevrodegenerativnih bolezni. Razmerje med preživetjem in apoptozo nevronov uravnava aktivacija receptorjev živčnih prenašalcev. Celično preživetje in proliferacijo nadzorujejo izvencelični signali. *Creb*, ki izvira iz iste družine genov kot *Crem*, dopolnjuje delovanje gena *Crem*. Ob zmanjšanem izražanju gena *Creb* se poveča izražanje gena *Crem* in obratno. Odsotnost obeh v razvijajočih se možganih vodi v splošno celično smrt, medtem ko motnja v njunem prepisovanju po rojstvu povzročijo selektivno in napredujočo nevrodegeneracijo (Mantamadiotis in sod., 2002).

Pri miših *Crem* KO so odkrili napredujočo nevrodegeneracijo hipokampusa in dorzolateralnega stratum. Pri pregledu možganov miši *Crem* KO so bile prisotne vse možganske strukture, kar pomeni, da gen *Crem* nima večje vloge pri oblikovanju možganov. Arhitektura celic v predelu hipotalamusa je bila dobro ohranjena in posamezna jedra so bila razpoznavna. Število diferenciranih nevronov v hipotalamusnih jedrih pa je bilo zmanjšano in večina nevronov je bila manjša v primerjavi z možgani kontrolnih miši. Največja izguba nevronov se je pojavila v predelu vohalnega betiča ter v prednjem in limbičnem delu skorje velikih možganov (Mantamadiotis in sod., 2002).

## 2.6 VPLIVI GENA *Crem* NA SPERMATOGENEZO

Spermatogeneza predstavlja kompleksen razvojni proces proizvodnje in zorenja moških spolnih celic in je sestavljena iz treh faz: spermatocitogeneze, mejotske delitve in spermioogeneze. Prične se v začetnih fazah pubertete in zajema celoten razvoj spermatogonijev (primordialne matične celice) v spermije (Spermatogenesis... , 2006).

Leta 1996 je Julie A. Blendy s sodelavci iz mišjega genoma selektivno odstranila gen *Crem*. Ugotovili so, da odsotnost vseh CREM proteinov vodi v sterilnost samčkov, saj se njihove spermatide niso razvile v spermije. Vzrok je v izrednem zmanjšanju izraženosti postmejotskih genov v testisih. Homozigotne mutirane samice pa so plodne. Miši *Crem* KO so v splošnem zdrave in ne kažejo nobenih nepravilnosti pri rasti in razvoju. Analize mod samčkov *Crem* KO so pokazale izredno zmanjšanje velikosti in teže v primerjavi s kontrolo. Zmanjšana velikost mod je posledica motenega procesa spermatogeneze, ker v semenskih cevkah manjkajo celice od okroglih spermatid naprej. Analiza je pokazala, da

hormonske nepravilnosti niso vzrok za neplodnost, saj koncentracija androgenov in folikel stimulirajočega hormona pri samčjih *Crem* KO nista znižani. Normalni moški spolni organi in paritveno obnašanje nakazujeta na normalne koncentracije hormonov v telesu. Histološka preiskava je pokazala prekinitvev spermatogeneze, saj so bile najbolj razvite zgodnje haploidne matične celice, ki pa niso prešle morfološke diferenciacije in se niso razvile v podaljšane spermatide. Odsotnost semenčic je tako vzrok za neplodnost samčkov *Crem* KO. Gen *Crem* je tako izrednega pomena za spermatogenezo in miši brez tega prepisovalnega faktorja služijo nadaljnje kot modelni sistem za raziskave neplodnosti pri moških.

## 2.7 AKTIVNOST IN OBNAŠANJE

### 2.7.1 Aktivnost in dnevno-nočni ritem

Sezonski vzorci aktivnosti so povezani z dolžino dneva, ki vpliva tudi na izdelovanje spolnih hormonov. Na aktivnost pa vplivajo tudi okoljski pogoji kot so temperatura ter kvaliteta, kvantiteta hrane in čas hranjenja (Nelson, 2005). Vpliv steroidnih hormonov na časovni potek aktivnosti sta raziskovala Ellis in Turek (1979). Število obratov kolesa pri hrčkih je zelo upadlo, če sta jim skrajšala dolžino dneva. Zmanjšanje gibanja lahko ponazorimo tudi s poskusom, kjer so kastrirani hrčki izpostavljeni normalni dolžini dneva. Aktivnost se je ob dodajanju testosterona povrnila na normalno raven. Na dolžino izvajanja aktivnosti vplivata epifiza in ščitnica, kot je ugotovil Zucker (1980). Ob odstranitvi epifize se gibalna aktivnost podaljšuje, medtem ko odstranitev ščitnice povzroči skrajšanje aktivnega časa. Ob izvajanju terapije s hormoni ščitnice se aktiven čas podaljša na normalno raven (Wahlstrom, 1965, cit. po Beasley L. J. in Nelson R. J., 1982).

### 2.7.2 Telesna teža in dnevno-nočni ritem

Prehranjevalne navade so pri ljudeh izredno kompleksno urejan proces, ki vključuje endokrini in živčni sistem. Spolni steroidni hormoni vplivajo na hranjenje in posledično na telesno težo (Nelson, 2005). Tudi živali so podvržene sezonskim spremembam v telesni teži (Bartness in sod., 2002). Jeseni pridobivajo na teži, v zimskem času pa se uskladiščena maščoba počasi oksidira, kar živalim daje energijo, ki jo potrebujejo za preživetje zime, ko je na voljo manj hrane. Letni cikel telesne teže nadzoruje notranja biološka ura, ki ga ohranja takšnega več let, tudi v primeru, če žival udomačimo ali jo redimo v laboratoriju pod stalnimi okoljskimi pogoji. Sezonski cikel nihanja telesne teže je večinoma urejan z dolžino dneva oziroma količino svetlobe. Le-ta neposredno vpliva na presnovne poti, saj se v krajših dneh ob enakomernem hranjenju zaloga maščobe poveča. Dolžino dneva organizem zaznava preko iz epifize izločenega melatonina. Nekatere živali preživijo zimo

z izgubo telesne teže, kar poveča razmerje med površino in volumnom njihovega telesa. Večje oddajanje toplote v okolje povzroči zmanjšanje količine maščobe. Preživetje temelji na principu, da potrebuje manjši organizem veliko manj vnesenih kalorij v primerjavi z večjim organizmom (Nelson, 2005). Del izgube telesne teže Bartness in Wade (1985) pripisujeta tudi zmanjšanemu kroženju spolnih steroidnih hormonov.

Na letno nihanje telesne teže pa vplivajo tudi spremenjeni vnosi hrane, ki pa so glede na kopičenje in porabo maščobe sekundarnega pomena. Notranja ura nadzoruje kopičenje in porabo maščob, kar povzroči spremembe v prehranjevalnem obnašanju (Nelson, 2005). Nočne živali se prehranjujejo večinoma v temni fazi dneva. Regulacija vnosa hrane je zelo kompleksna in zahteva koordinacijo različnih predelov možganov in številnih oreksigenih in anoreksigenih hormonov. Pri poškodbah hipotalamusnega jedra SCN v možganih pride do razpršenih vnosov hrane preko celega dneva in noči. SCN tako komunicira neposredno z vsemi hipotalamusni jedri, ki so povezana z vnosom hrane, vključno z arkvatnim jedrom, dorzo-medialnim jedrom, ventromedialnim jedrom in področji stranskega hipotalamusa (Kalra in sod., 1991). Poškodbe arkvatnega jedra in paraventrikularnega jedra povzročajo motnje v dnevno-nočnem izločanju oreksigenih in anoreksigenih hormonov, kar spremeni vzorec prehranjevalnega obnašanja (Kriegsfeld in sod., 2002). Tudi številni živčni prenašalci so povezani z vnosom hrane (Nelson, 2005).

### **2.7.3 Anksioznemu podobno obnašanje**

Dernovšek in sodelavci (2006) anksioznost pri ljudeh opredeljujejo kot neprijetno čustvo, ki ga spremljajo tipične fiziološke spremembe in obnašanje. Te spremembe so ponavadi odziv na stres, ki ga organizem doživlja. Anksiozno obnašanje se odraža v občutenju strahu in ogroženosti, spremljajo ga pospešen srčni utrip in dihanje ter napetost mišic. Pri ljudeh so anksiozne motnje poleg depresije najpogostejše duševne motnje v razvitem svetu.

Rosen in Schulkin (1998) sta ugotovila, da biološka osnova za anksioznemu podobno obnašanje živali temelji na nevronske mreži amigdale in hipokampusu. Posamezni geni imajo majhne učinke na kompleksne lastnosti, kakršna je anksioznost. Pomembnejše je njihovo medsebojno delovanje in vpliv zunanjih dejavnikov. Wray in sodelavci (2007) so našli kandidatni gen s polimorfizmom, ki vpliva na anksioznemu podobno obnašanje, to je gen za plexin 2A (PLXNA2).

Pri antidepresivnem zdravljenju se uporabljajo spremembe v cAMP sporočilni poti. Tako se za zdravljenje depresije in podobnih duševnih motenj uporabljajo urejevalci sistema CREB, medtem ko uporabnost sorodnih prepisovalnih faktorjev še ni popolnoma dokazana. Antidepresijski učinek bi lahko imel tudi ICER, eden od produktov gena *Crem*, kar so proučevali Conti in sodelavci (2004). Adrenergična stimulacija in elektrokonvulzivni dražljaji povečajo izražanje proteina ICER v možganskih predelih, ki so povezani z antidepresivnim učinkom. ICER se v večjih količinah nahaja v

paraventricularnem jedru in omogoča antidepresivom, da urejajo s stresom vzpostavljeno aktivacijo hipotalamus-hipofiza-adrenalne osi.

Kot glavno raziskovalno orodje se v nevrobioloških raziskavah anksioznemu podobnega obnašanja živali uporablja test z dvignjenim labirintom, ki predstavlja model za testiranje anksioznemu podobnega obnašanja pri glodalcih. Labirint sestoji iz štirih krakov, pri čemer sta dva odprta in dva zaprta. Kraki so dvignjeni od tal približno 1 meter. Model temelji na tipičnem strahu glodalcev pred odprtimi prostori. Ta strah vodi do obnašanja, imenovanega tigmotaksa, ki predstavlja izogibanje odprtih območij, gibanje v zaprtih območjih in po robovih med zaprtim in odprtim območjem (Elevated plus ... , 2009). Testirano žival postavimo na križišče vseh štirih krakov in beležimo njeno gibanje 5 minut. Test z EPM se zaradi spomina na vsaki testni živali izvede le enkrat. Zmanjšana stopnja izražanja anksioznemu podobnega obnašanja se kaže v podaljšanem času, ki ga testirana žival preživi v odprtih krakih labirinta, in v večjem številu vstopov v odprte krake (Pellow in sod., 1985). Skupno število vhodov v krake in število vhodov v zaprte krake se navadno uporablja za spremljanje splošne aktivnosti (Elevated plus ... , 2009).

#### **2.7.4 Vpliv gena *Crem* na aktivnost in anksioznemu podobno obnašanje**

*Crem* sodeluje pri nadzoru različnih nevroendokrinih odgovorov. Raziskave Fisherja (1989) so pokazale, da so številni hormoni osi hipotalamus-epifiza ključni za načine obnašanja, vključno s čustvenim stanjem in odzivnostjo na stres. Leta 1999 je Rafael Maldonado s sodelavci raziskoval vplive gena *Crem* na gibalno aktivnost in anksioznemu podobno obnašanje. Miši *Crem* KO so bile v času svetle faze hiperaktivne in pri gibanju niso kazale značilnega dnevno-nočnega ritma. Ugotovili so tudi, da so te miši izražale manjšo stopnjo anksioznemu podobnega obnašanja.

### **2.8 ARGININ VAZOPRESIN (AVP)**

Nevrohipofizni hormon arginin vazopresin (AVP) sta prva opisala Oliver in Schafer leta 1895, ki sta dokazala, da ekstrakt hipofize zmanjšuje krvni pritisk. Njegove antidiuretične funkcije pa so bile odkrite šele leta 1913 (Vongraven, 1913, cit. po Caldwell H. K. in sod., 2008; Farini, 1913, cit. po Zimmermann E. A. in Robinson A. G., 1976). AVP nastaja v magnocelularnih celicah v hipotalamusnem supraoptičnem in paraventricularnem jedru, katerih aksoni vodijo v zadnji režanj hipofize (Caldwell in sod., 2008). Sestavljen je iz devetih aminokislin, nastaja pa iz prohormona, ki med drugim vsebuje tudi prenašalni protein nevrofizina. S hidrolizo iz prohormona proreosofizina nastanejo AVP, nevrofizin II in kratek glikopeptid. Naloga nevrofizina je podaljšati razpolovno dobo AVP v krvi iz treh na približno trideset minut s tem, ko se veže nanj in ga ščiti pred peptidazami (Nelson, 2005). Po sintezi se AVP ob primerni stimulaciji (dehidracija) sprošča v krvni obtok.

AVP je znan tudi kot antidiuretični hormon. Njegovi funkciji sta krčenje krvnih žil, kar upočasni tok krvi in poveča možnost preživetja pri večjih krvavenjih, ter zadrževanje vode v ledvičnih cevkah. V primeru motenj v izločanju ali delovanju AVP govorimo o centralnem diabetes insipidusu. Zaradi zmanjšane sposobnosti koncentriranja seča v ledvicah se iz telesa izločajo velike količine urina, kar vodi v kompleks poliurije (Cestnik, 1996).

Planas in sodelavci (1995) so ugotovili, da se AVP sprošča tudi v delih možganov kot so paraventricularno jedro hipotalamusa, medialna amigdala in SCN, vendar v precej manjših koncentracijah. Učinki, ki jih ima AVP iz SCN na možgane, so popolnoma drugačni od učinkov vazopresina, nastalega v epifizi. V centralnem živčnem sistemu AVP deluje kot neurotransmitter. Le-ti nastajajo v živčnih celicah, od koder se v aksonih sproščajo v sinaptično špranjo ter vežejo na receptorje dendritov postinaptične celice (Brown, 1994). Leta 1984 je DeWied s poskusom na podganah brattleboro dokazal, da AVP deluje tudi kot antiamnestic, saj zavira pozabljanje in podaljšuje spomin. Nevroni v SCN s sproščanjem AVP med drugim vplivajo tudi na budnost organizma (The neuronal switches ..., 2008).

### **2.8.1 Sproščanje AVP in dnevno-nočni ritem**

Sproščanje AVP v cerebrospinalno tekočino se ravna po dnevno-nočnem ritmu in doseže vrh v dnevnem času (približno opoldne). Izraža se predvsem v dorzalnem delu SCN (Majzoub in sod., 1991). V SCN AVP pomaga v dnevno-nočnem nadzoru sproščanja hormonov, saj nadzoruje sproščanje kortikotropin sproščujočega hormona in adrenokortikotropičnega hormona, izrednega pomena pa je tudi za dnevno-nočni ritem lokomotornega obnašanja (De Vries in sod., 1983).

Poskus Groblewskega in sodelavcev leta 1981 na podganah brattleboro pa je pokazal drugače. Podgane z izbitim genom za AVP so kazale le manjše spremembe v dnevno-nočnem ritmu. Rezultati lahko nakazujejo na razvojno prilagoditev, da je AVP relativno gledano nepomemben člen v urejanju dnevno-nočnega ritma, ali pa na to, da se je živalim brez ritma zmanjšalo sproščanje AVP zaradi nepravilnega delovanja SCN in ne obratno, kot so sprva mislili (De Vries in sod., 1983). Natančna funkcija dnevno-nočnega ritma sproščanja AVP ostaja torej nerazjasnjena.

### **2.8.2 Vpliv AVP na obnašanje**

Hormoni ne povzročajo neposrednih sprememb v obnašanju, ampak vplivajo na centralni živčni sistem, senzorični sistem in efektorski mišični sistem s specifičnimi signali, ki izzovejo specifične odgovore v primernem kontekstu obnašanja (Nelson, 2005). Obnašanje se med spoloma velikokrat razlikuje, zato so bile izrednega pomena študije mapiranja s



spolom povezanih razlik v sistemu izražanja AVP. Že prve takšne študije so pokazale, da je gostota vlaken z AVP v stranskem septumu pri samcih povečana v primerjavi s samicami (De Vries in sod., 1983).

AVP je pomemben pri urejanju agresije in pripadnosti, pri socialnem prepoznavanju, spominu, depresiji in anksioznemu podobnem obnašanju (De Vries in sod., 1983). Landgraf in sodelavci (1995) so ugotovili, da se z zaviranjem izražanja mRNA za AVP receptor stopnja anksioznemu podobnega obnašanja izredno zmanjša.

## 2.9 CYP51 IZ DRUŽINE CITOKROMOV P450

### 2.9.1 Citokrom P450

Ta velika družina hemproteinov je prisotna vse od arhej, bakterij, gliv in rastlin do insektov, rib, ptic in sesalcev. Citokromi združeno tvorijo del večkomponentne verige za prenos elektronov. Gre za hem-vsebujoče monooksigenaze, ki sodelujejo v ksenobiotični presnovi, biosintezi holesterola in steroidogenezi. Pri sesalcih se številni citokromi P450 v različnih tkivih izražajo sočasno. Mesto izražanja je povezano z njihovo fiziološko vlogo v tistem tkivu. Tako se citokromi P450 nahajajo ne samo v različnih celičnih tipih in tkivih, ampak tudi v različnih znotrajceličnih predelkih. Na splošno velja, da so ti encimi membransko vezani (Seliškar in Rozman, 2007). V evkariontih se večinoma nahajajo v endoplazmatskem retikulumu (mikrosomalni citokromi P450) in v notranjih membranah mitohondrijev (mitohondrijski citokromi P450) (Nordberg in sod., 2004). Našli pa so jih tudi v zunanji membrani jedra, v različnih predelkih Golgijevega aparata, peroksisomih in v plazmalemii (Seliškar in Rozman, 2007).

Pri ljudeh so našli 57 genov in več kot 59 psevdogenov, ki so jih razdelili v 18 družin in 43 poddružin genov citokroma P450 (Nelson, 2003). Število citokromov P450 pa se med vrstami zelo razlikuje, saj imajo kvasovke (*S. cerevisiae*) le 3, gliva *Neurospora crassa* 38, *C. elegans* 74, miš kar 120 in različne rastlinske vrste po več sto (Seliškar in Rozman, 2007). Vloga vseh citokromov P450 še ni znana. V splošnem sodelujejo v izdelovanju in presnovi številnih molekul s pomembno fiziološko funkcijo.

Raziskave Liu in sodelavcev (2004) kažejo na pomembno vlogo citokromov P450 v možganih, saj katalizirajo izoblikovanje številnih možganskih sporočilnih molekul (nevrosteroidi in eikosanoidi) in presnavljajo substrate kot so vitamin A in D, holesterol, žolčne kisline, nekatera zdravila, anestetike in okoljske nevrotoksine. Vse te aktivnosti ohranjajo možganske funkcije vitalne. Izrednega pomena so tudi funkcije citokromov P450 v fiziologiji možganov in njihovem razvoju, saj sodelujejo pri zaščiti možganov, nadzoru možganskega krvotoka in temperature, sproščanju neuropeptidov, vzdrževanju homeostaze

holesterola v možganih, odpravljanju retinoidov iz centralnega živčnega sistema in urejanju količine živčnih prenašalcev. Geni citokromov P450 predstavljajo potencialne kandidate za zdravljenje nepravilnosti v centralnem živčnem sistemu kot so Alzheimerjeva bolezen, kronična nevrodegenerativna bolezen, poškodbe možganov (kap), Parkinsonova bolezen, epilepsija in multipla skleroza (Seliškar in Rozman, 2007). Raziskave Schosserja in Kasperja (2009) potekajo tudi na tem, da bi citokrome P450 uporabljali za zdravljenje psihiatričnih nepravilnosti, vključno z depresijo in anksioznostjo.

## 2.9.2 CYP51 in sinteza holesterola

CYP51 je eden izmed encimov, odgovorih za biosintezo holesterola, in spada v 51. družino citokromov P450, v poddružino A (angl. animals), ki pripada živalim, zato je njegova popolna oznaka CYP51A1, imenujejo pa ga tudi polipeptid 1. Njegovo kemijsko ime je lanosterol 14-alfa-demetilaza (Cytochrome P450, 1997). Največ se izraža v modih, jajčnikih, nadledvični žlezi, prostati, jetrih, ledvicah in v pljučih. Biokemijska pot sinteze holesterola je sestavljena iz dvajsetih korakov in CYP51 katalizira prvi korak, kjer katalizira preoblikovanje lanosterola v FF-MAS (aktivacijski sterol za mejozo iz folikularne tekočine). Slednji se nato izoblikuje v aktivacijski sterol za mejozo v modih (T-MAS). FF-MAS in T-MAS, oba s kratko življenjsko dobo, sta produkta demetilacije v somatskih celicah, akumulirata pa se v tkivih spolnih žlez. Na splošno se CYP51 nahaja v endoplazmatskem retikulumu, vendar je v času razvoja moških spolnih celic encim tudi v Golgijevem aparatu in akrosomu. Sočasno se ob izražanju CYP51 se na akrosomalnih membranah pojavlja tudi NADPH citokrom P450 reduktaza, ki pomaga CYP51 pri encimatski aktivnosti (Seliškar in Rozman, 2007).

## 2.9.3 Dnevno-nočno izražanje CYP51 v jetrih in *Crem*

Periferna tkiva, vključno z jetri, imajo svojo biološko uro, ki deluje samostojno, brez vpliva SCN v možganih (Kornmann in sod., 2007). Večina endogene presnove in ksenobiotske detoksifikacije je podvržena dnevno-nočni regulaciji (Claudel in sod., 2007). Le-ta vpliva tudi na vsebnost holesterola v krvi. Meritve holesterola v človeškem serumu so pokazale na ritmično sproščanje, njegova vsebnost je bila največja proti koncu noči (Jones in Schoeller, 1990).

CYP51 je urejan z negativno povratno zanko preko vezavnih proteinov SREBP (angl. sterol regulatory element binding proteins), ki se vežejo na urejevalne elemente za sterole in preko prepisovalnih faktorjev, odvisnih od cAMP poti (Rozman in sod., 1999). Raziskave z mišmi *Crem* KO so pokazale, da je izražanje CYP51 v jetrih izgubilo dnevno-nočni ritem. Gen *Crem* in njegov protein ICER tako vplivata na dnevno-nočno izražanje

CYP51 in drugih encimov, povezanih s sintezo holesterola v jetrih (Ačimovič in sod., 2008).

## 2.10 ENHANCED AT PUBERTY PROTEIN (EAP)

Protein EAP1 spada v družino vezavnih proteinov na interferon regulatorne faktorje (IRF2BP, angl. interferon regulatory factor 2-binding protein) in se nahaja v jedru. Njegova celovita vloga v organizmu še ni dobro znana, vendar rezultati raziskav kažejo na njegovo vlogo v puberteti in pomembnost v nadzoru delovanja spolnih organov pri samicah (Enhanced at puberty ... , 2009).

Pri sesalcih je začetek pubertete kot tudi vzdrževanje spolnih ciklov pri samicah vzdrževano s strani nevronov hipotalamusa, ki izločajo gonadotropni-sproščujoči hormon (GnRH, angl. gonadotropin-releasing hormone). Gen *Eap1* deluje kot prepisovalni urejevalec nevronske povezave, saj nadzoruje delovanje spolnega sistema pri samicah. *Eap1* se v času pubertete izraža v hipotalamusu in kodira jedrni protein, ki nastaja v nevronih, povezanih z nadzorom delovanja spolnih žlez. Protein EAP1 aktivira gene, potrebne za urejanje delovanja spolnih organov, in zavira zaviralne gene, kot je preproenkefalin (PENK, angl. preproenkephalin) (Heger in sod., 2007). Vpliva na gensko prepisovanje z zaustavitvijo delovanja promotorja GnRH in zaviranjem delovanja promotorja PENK (Enhanced at puberty ... , 2009). Zaustavljeno izražanje EAP1 vodi v zakasnjeno puberteto, moten spolni cikel in nepravilnosti v jajčnikih. Tako *Eap1* predstavlja prepisovalni dejavnik, ki deluje v neuroendokrinem delu možganov in nadzoruje delovanje spolnih organov pri samicah (Heger in sod., 2007).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 ŽIVALI

Dovoljenje za poskus je izdala Veterinarska uprava RS, št. 34401-2/2009/6 in je bil narejen v skladu z etičnimi standardi.

Vsi poskusi so bili narejeni na miših (*Mus musculus*) mešanega seva C57/Bl6 in 129J, ki smo jih gojili v Centru za genomiko živali na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani pod standardnimi pogoji (temperatura: 20-25 °C, vlažnost: 40-60%, svetlo-temni cikel 12:12). Voda in hrana sta bili na razpolago *ad libitum*. Krmili smo jih s krmo brez fitoestrogenov (Harlan Teklad, Milano, Italija), kletke pa smo nastiljali z Lignocelom (hygienic animal bedding).

Pri raziskovanju vpliva transkripcijskega faktorja ICER smo uporabljali model gensko spremenjene miši, ki je imel izbit gen *Crem*.

Za pridobitev homozigotnih miši *Crem* KO, smo parili med seboj heterozigotne miši za izbit gen *Crem*. Določitev genotipa ni bila mogoča le po fenotipskih znakih, zato smo mladičem odvzeli biološki material (opisano v nadaljevanju v metodah) 21. dan po rojstvu, ko smo jih odstavljali od matere ter jih ločevali po spolu. Miši WT iz istih gnezd ali časovno primerljivih gnezd so predstavljale kontrolne živali in so bile izpostavljene enakim protokolom raziskave. Miši so bile v kletkah velikosti 38 x 22 x 16 cm nastanjene skupinsko (3 miši/kletko). V poskusu smo mišim merili telesno težo, spontano celotno aktivnost in anksioznemu podobno obnašanje. Miši so žrtvovali pri starosti 24 tednov in jim odvzeli kri ter možgane za nadaljnje raziskave.

##### 3.1.1 Razgradnja tkiva in določanje genotipa z metodo PCR

Za določitev genotipa miši z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) smo uporabili tkivo uhljev 4-6 dni starih mladičev, ki smo ga razgradili v 200 µl pufra za razgradnjo (Taq DNA lysis buffer, Promega, WI, ZDA), kateremu smo dodali 15 µl proteinaze K (15 mg/ml, Sigma). Tkivo se je razgrajevalo čez noč na stresalniku (Thermomixer Compact, Eppendorf) pri 400 obratih in 55 °C.

Razgrajeno tkivo smo uporabili za določitev genotipa *Crem* z metodo PCR po naslednjem protokolu: 1 µl vzorca genomske DNK smo dodali v reakcijsko mešanico, ki smo jo pripravili iz 0,24 µl oligonukleotidnih začetnikov, 10 µl mastermiksa in destilirane vode do končnega volumna 20 µl.

Uporabili smo naslednje oligonukleotidne začetnike:

*Crem*-genotip-fw AATCGTGTGGCTGTGCTTGAA in  
*Crem*-genotip-rw TGTACATGCTGTAATCAGTTC

za določitev alela *Crem* WT,

*Crem*-genotip-neo GGCCAGCTCATTCCCTCCCCTCATGAT

za določitev alela *Crem* KO.

Reakcija PCR je potekala v aparaturi PCR (Primus 96 plus, MWG AG BIOTECH, Ebersberg, Nemčija) pri naslednjih pogojih:

1. 95 °C, 5 minut
2. 95 °C, 1 minuta
3. 60 °C, 1 minuta
4. 72 °C, 30 sekund
5. 72 °C, 7 minut
6. 4 °C, ∞.

Koraki 2-4 so se ponovili 45-krat. Nastajanje nespecifičnih produktov PCR pa smo zmanjšali z dodajanjem polimeraze DNK pri temperaturi 95 °C.

Nastale produkte PCR smo ločili z gelsko elektroforezo (2% agarozni gel, Sigma; U = 130 V, 20 min). Na gel smo dodali 1 µl markerja. Odsek DNK, pomnožen iz celotne DNK miši *Crem* WT je dolg 524 bp, medtem ko je fragment DNK, pomnožen iz celotne DNK miši *Crem* KO, krajši in je dolg 406 bp.

### 3.1.2 Tehtanje miši

Telesno težo miši smo spremljali tedensko ob enakih časovnih obdobjih (7-9 ur od začetka svetle faze) vse od odstavitve (21. dan po rojstvu) do žrtvovanja (24. tednov po rojstvu).

### 3.1.3 Spremljanje celotne aktivnosti miši

Aktivnost miši smo spremljali pri starosti 7 tednov z uporabo sistema za merjenje aktivnosti v dvodimenzijem okolju (Motor monitor, Kinder scientific, CA, ZDA), s katerim smo dobili vpogled v spontano celotno aktivnost miši. V času merjenja so bile miši izolirane, zato smo jih privajali na novo okolje 1-2 dneva pred samim merjenjem. Prvi del

meritev je bil opravljen pri normalnem svetlo-temnem ciklu (12:12), drugi del (ki je sledil neposredno prvemu delu) pa v stalni temi. Oba dela sta posamično trajala 7 dni. Miš smo s kletko, hrano in vodo postavili na sredino merilnega polja znotraj okvirja s številnimi laserskimi senzorji, katerih žarki so se prepletali v gosto mrežo preko merilnega polja. Vsak premik miši je prekinil laserski žarek na določeni koordinati merilnega polja in signal se je zabeležil v računalniškem programu. Beležili smo si podatke o skupnem gibanju ter o času aktivnosti miši. Skupno gibanje zajema vsak premik miši v kletki, pri čemer je pogoj, da se en svetlobni žarek prekine, drug pa ponovno vzpostavi, s čimer se prepreči, da bi v gibanje bili šteti premiki glave ali kakšnega drugega dela telesa pri dejansko mirujoči miši. Čas aktivnosti pa predstavlja dejanski čas, ko so se prekinjali svetlobni žarki in se je torej miš premikala po kletki. Po končanem testu aktivnosti smo miši vrnili v prvotno okolje do testiranja anksioznemu podobnega obnašanja ter nato do žrtvovanja.

### **3.1.4 Test anksioznemu podobnega obnašanja z dvignjenim labirintom (EPM)**

Test anksioznemu podobnega obnašanja miši smo izvedli pri desetih tednih starosti v temi pri rdeči luči. V času poskusa je bila miš izolirana. Test z EMP temelji na naravnem konfliktu posamezne miši med željo po raziskovanju novega okolja in strahom pred odprtim prostorom. Crawley (2000) je ugotovil, da anksiolitična zdravila vplivajo na miš tako, da se poveča število vstopov v odprte krake labirinta in da tam preživijo več časa, se pravi se stopnja anksioznemu podobnega obnašanja zmanjša.

Štirikraki labirint je dvignjen en meter od tal in je sestavljen iz dveh odprtih ter dveh zaprtih krakov. Miš smo postavili na sredino labirinta in v času petih minut s pomočjo programa Stop-watch beležili vstop v odprta ali zaprta kraka, trajanje njihovega postanka in čas, ki so ga preživele na prehodu med zaprtima in odprtima krakom (angl. risk assesment).

### **3.1.5 Žrtovanje miši**

Pri 24 tednih starosti smo vse miši žrtvovali. Čas žrtvovanja je bil vedno enak in sicer od 7 do 10 ur od začetka svetle faze. Miši smo anestezirali (splošna anestezija) z mešanico Ketamina (Veyx-Pharma, Nemčija; 1,25 mg/žival), Acepromazina (Fort Dodge, ZDA; 0,025 mg/žival) in Xilazina (Chanelle, Irska; 0,125 mg/žival), ki smo jo aplicirali podkožno (s/c).

### 3.1.2.1 Odvzem krvi

Mišim smo v globoki anesteziji iz desnega prekata srca odvzeli kri z iglo 0,8 x 40 mm 21Gx1 9/16" in 1 ml brizgo, ki smo ju prej sprali s heparinom (1 U/ $\mu$ l, Sigma). Kri smo shranili v 1,5 ml epruveti in jo takoj po odvzemu centrifugirali (Centrifuge 5415 R. Eppendorf, Hamburg, Nemčija) pri 3000 obratih 5 minut na 4 °C. Dobljeno plazmo smo odpipetirali v 1,5 ml epruvete in jo shranili v zamrzovalniku na -20 °C. Preostalo kri smo nato sprali s hladnim 0,05 M pufrom PBS.

### 3.1.2.2 Fiksacija tkiv s postopkom perfuzije

Tkivo smo učvrstili z raztopino 4% formaldehida v 0,05 M pufru PBS s pomočjo peristaltične črpalke (Ecoline ISM1076, Ismatec SA, Zürich, Švica) pri pretoku mešanice 5 ml/min.

### 3.1.2.3 Izolacija možganov

Po fiksaciji smo izolirali možgane in jih inkubirali v raztopini 4% paraformaldehida v 0,05 M pufru PBS na stresalniku pri 50 obratih čez noč pri 4 °C za dodatno učvrstitev. Naslednji dan smo možgane prenesli v 0,1 M fosfatni pufer (PB) in jih hranili do nadaljnjih raziskav pri 4 °C.

## 3.2 ANALIZA MOŽGANOV

### 3.2.1 Imunohistokemično barvanje plavajočih rezin možganov miši

Imunohistokemične tehnike izkoriščajo protitelesa za določitev mesta nahajanja nekega proteina v določenem tkivu ali organu. Protitelesa so nanešena na rezine tkiva, kjer se vežejo s hormonom ali živčnim prenašalcem, ki ga proučujemo, kar povzroči določeno obarvanje. Za pregled tkiv pod svetlobnim mikroskopom se kot markerska molekula največkrat uporablja hrenova peroksidaza.

Z imunohistokemičnim barvanjem smo ugotavljali izraženost AVP in genov *Cyp51* in *Eap* v možganih miši. Možgane smo zalili v agarozne bloke (5% agarozna, Sigma) in jih z vibrotomom narezali na 50  $\mu$ m debele prečne rezine ter prenesli v hladen 0,05 M pufer PBS. Za odstranitev ostankov fiksativa v tkivu rezin in prekinitvev povezav med beljakovinami v celicah, ki so nastale ob fiksaciji, smo možgane inkubirali na hladnem v raztopini 0,1 M glicina (Sigma) v 0,05 M pufru PBS 30 minut in nato še v raztopini 0,5%

natrijevega borohidrida (Sigma) v 0,05 M pufru PBS 15 minut na stresalniku (Tehtnica) na 4 °C. Raztopino glicina smo spirali z 0,05 M pufrom PBS trikrat po 5 minut, raztopino natrijevega borohidrida pa štirikrat po 5 minut na stresalniku na 4 °C.

Rezine možganov, pri katerih smo ugotavljali izražanje CYP51, smo posebej inkubirali na sobni temperaturi na stresalniku 1 uro v raztopini 0,05 M natrijevega citrata s pH 8,6. Nato smo jih potopili v natrijev citrat, segret na 80 °C za 30 minut, potem pa pustili rezine, da so se ohladile na sobno temperaturo na mešalniku 30 minut. Temu je sledilo spiranje trikrat po 5 minut s hladnim 0,05 M pufrom PBS.

Nato smo vse rezine možganov (za analizo izražanja AVP, CYP51 in EAP) blokirali v raztopini 5% normalnega kozjega seruma (NGS, Chemicon, CA, ZDA) in 1% peroksida (Merck) v 0,05 M pufru PBS z dodanim 0,5% detergentom TritonX-100 (Sigma) od 30 minut do 120 minut na stresalniku na 4 °C. Potem smo rezine prenesli v ustrezne redčitve primarnih protiteles v pufru 1% goveji serumski albumin (BSA, Sigma) v 0,05 M pufru PBS z dodanim 0,5% detergentom TritonX-100 (Sigma) in inkubirali 2-3 dni na stresalniku pri 4 °C. Odvečna primarna protitelesa smo spirali z raztopino 1% NGS v 0,02% detergentu TritonX-100 v 0,05 M pufru PBS štirikrat po 15 minut na stresalniku pri sobni temperaturi.

Po spiranju primarnih protiteles smo na rezine možganov vezali sekundarna protitelesa, vezana z biotinom. Sekundarna proti-kunčja protitelesa, narejena v oslu (H + L ostanki IgG, Jackson Immunoresearch, PA, ZDA), smo v redčitvi 1:500 pripravili v 1% NGS in 0,5% TritonX-100 v 0,05 M pufru PBS. Rezine smo v raztopini sekundarnih protiteles inkubirali dve uri na stresalniku na sobni temperaturi. Temu je sledilo spiranje štirikrat po 15 minut z 0,02% detergentom TritonX-100 v 0,05 M pufru PBS. Za označitev vezanih sekundarnih protiteles smo rezine inkubirali na mešalniku 1 uro v raztopini peroksidaze (redčitev 1:2000), konjugirane s streptavidinom (Jackson Immunoresearch, PA, ZDA), in 0,5% detergenta TritonX-100 v 0,05 M pufru PBS. Rezine možganov smo nato sprali v pufru TBS nizke ionske jakosti s pH 7,5, pripravljenim z 0,5 M Tris in 0,15 M NaCl, spirali smo štirikrat po 15 minut na stresalniku na sobni temperaturi.

Za označitev kompleksov protiteles, vezanih na ustrezne beljakovine, smo rezine inkubirali v raztopini kromogena 0,02% diamino benzidina (DAB, Sigma), 0,5 g niklja (Sigma) in 0,02% peroksida v pufru TBS nizke ionske jakosti 5 minut na stresalniku na sobni temperaturi. Reakcijo peroksidaze smo prekinili s spiranjem v pufru TBS trikrat po 10 minut na stresalniku na sobni temperaturi, nato pa smo shranili rezine možganov na 4 °C do nadaljnjega dela.

Po končanem imunohistokemičnem barvanju smo rezine možganov nanesli na predmetnice, prevlečene s silanom (APES, Sigma) in jih pustili sušiti čez noč. Naslednji dan smo predmetnice z rezinami sprali z destilirano vodo, posušili in pokrili s hidrofobnim medijem za pripravo trajnih mikroskopskih preparatov (Pertex Medite, Burgdorf, Nemčija).



### 3.2.1.1 Primarna protitelesa

Uporabili smo kunčja protitelesa proti arginin vazopresinu (AVP, ImmunoStar, Inc. WI, ZDA) v redčitvi 1:15000, kunčja protitelesa proti CYP51 (darilo Waterman M., Nashville, TN, ZDA) v redčitvi 1:5000 in kunčja protitelesa proti enhanced at puberty proteinu (EAP, darilo Ojeda S. R., OR, ZDA) v redčitvi 1:8000.

## 3.2.2 Analiza hipotalamusnega jedra SCN v možganih

Pri analiziranju izražanja biokemijsko označenih elementov v možganih in mesta njihovega nahajanja je za medsebojno primerljivost rezin potrebno paziti, da so bile rezine rezane pod enakim kotom. Določiti si moramo tudi meje področja v možganih, ki ga analiziramo. V naši raziskavi smo se osredotočili na SCN, ker se v tem predelu možganov sproščajo proteini, katerih izraženost želimo ovrednotiti. V SCN smo želeli ovrednotiti število oziroma gostoto izraženih proteinov. Ker je to področje zaradi simetrije na vsaki rezini zastopano dvakrat, smo analizirali področje na tisti strani, kjer je bila izraženost večja. S tem smo zmanjšali možnost za nastanek razlik z naključno izbiro.

### 3.2.2.1 Priprava digitalnih slik in analiza

SCN smo slikali s pomočjo mikroskopa (Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonska)) z vgrajeno digitalno kamero (Nikon DS-Fi1 (Nikon, Japonska)). Digitalne slike smo uredili s pomočjo programa Photoshop CS 8.0, s katerim smo uredili osvetlitev in kontrast slik ter jih spremenili v črno-beli format, pri tem pa nismo vplivali na kakovost imunohistokemičnega barvanja na sliki. S pomočjo programa Image J v.1.34 (NIH, MD, ZDA) smo slike pokrili z mrežo. S tem smo jih razdelili na ustrezne kvadrate, znotraj katerih smo nato šteli črno obarvana območja, kjer se izraža določen protein.

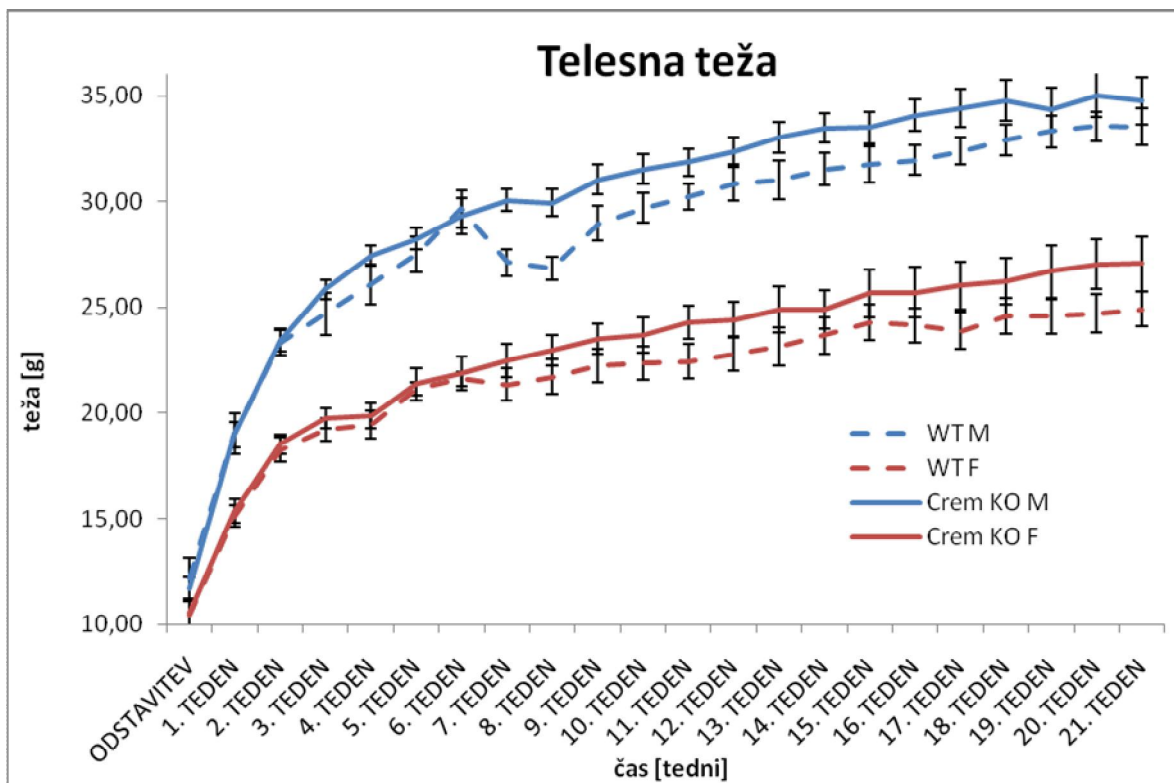
## 3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Rezultate vseh testov smo statistično obdelali z dvosmerno analizo variance, pri čemer smo za spremenljivki uporabili spol in genotip (WT ali *Crem* KO). Pri vseh analizah smo kot statistično zanesljivo upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .

## 4 REZULTATI

### 4.1 SPREMLJANJE TELESNE TEŽE

Telesno težo smo merili tedensko v času od odstavitve do žrtvovanja. V poskusni skupini smo spremljali težo 11 samcev *Crem* KO in 9 samic *Crem* KO, v kontrolni skupini pa 10 samcev WT in 11 samic WT. Rezultate meritev smo statistično obdelali z dvosmerno analizo variance, kjer sta bili spremenljivki spol in genotip (WT/ *Crem* KO). Pri vseh tednih starosti se je pričakovano pokazala močna statistično značilna razlika v telesni teži med spoloma ( $p = 0,000000$ ), kjer so bili samci vselej težji od samic (Slika 2). Med 7. in 12. tednom po odstavitvi se je pokazala statistično značilna razlika v telesni teži glede na genotip. Samci in samice *Crem* KO so bili v tem času težji od miši WT. Razlika v teži med genotipi je bila statistično značilna tudi 16. in 17. teden starosti, pri vseh ostalih časovnih točkah od 13. tedna naprej pa se je pokazal močan statističen trend za razliko med genotipi.

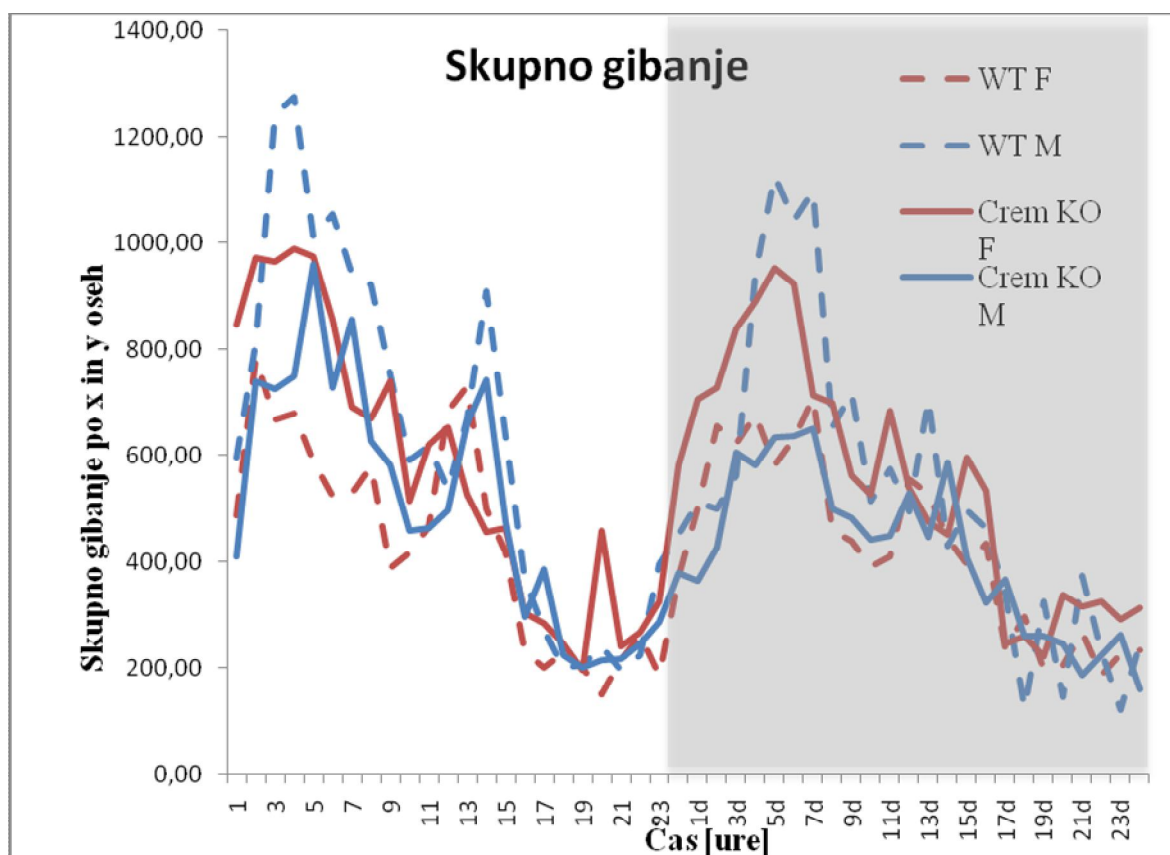


Slika 2: Rezultati spremljanja telesne teže glede na spol in genotip v času od odstavitve do žrtvovanja s prikazom intervalov standardne napake. *Legenda*: WT M – samci divjega tipa, WT F – samice divjega tipa, *Crem* KO M – samci z izbitim genom *Crem*, *Crem* KO F – samice z izbitim genom *Crem*.

## 4.2 SPREMLJANJE CELOTNE AKTIVNOSTI

### 4.2.1 Skupno gibanje

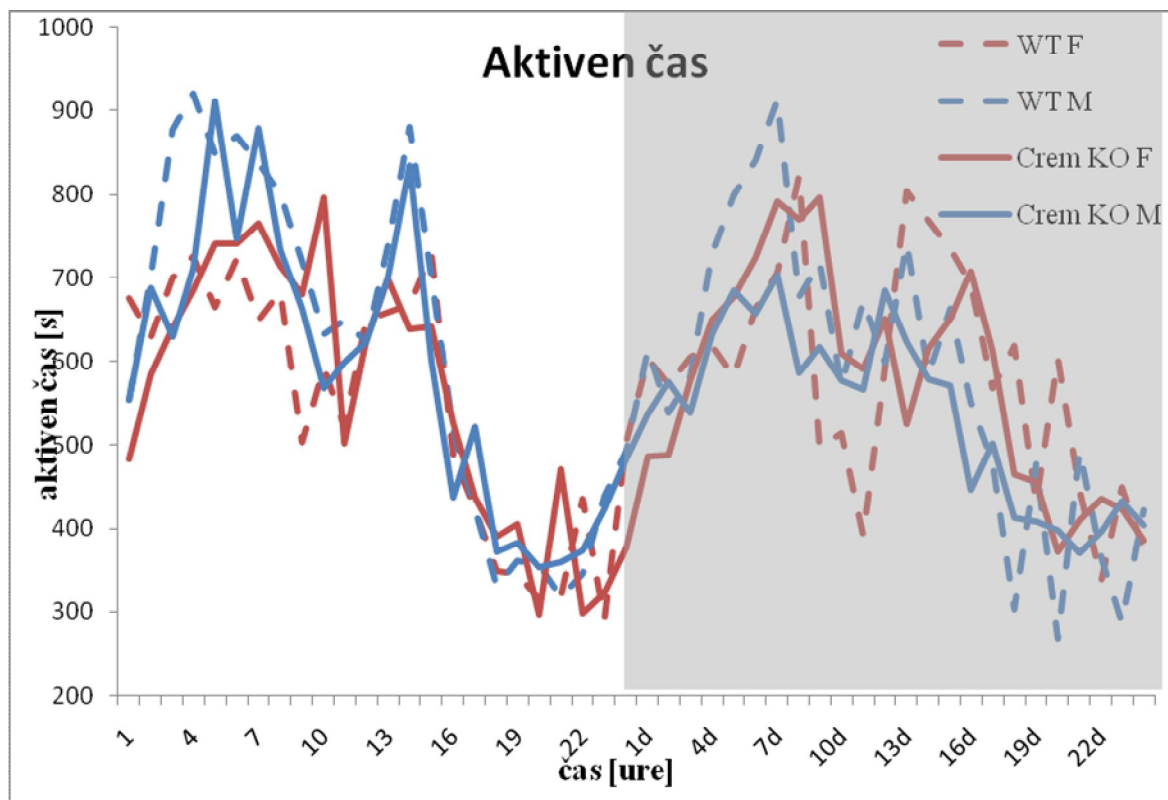
V poskusni skupini je bilo 9 samcev *Crem* KO, 6 samic *Crem* KO, v kontrolni skupini pa 9 samcev WT in 6 samic WT. Rezultate merjenja skupnega gibanja, ki je trajalo en teden pri normalnem dnevno-nočnem ciklu 12:12 in nato še en teden v popolni temi, smo analizirali tako, da smo izračunali povprečja skupnega gibanja za vsako uro (Slika 3). Dvosmerna analiza variance s statističnima spremenljivkama spol in genotip ni pokazala statistično značilnih razlik v skupnem gibanju.



Slika 3: Rezultati spremljanja ritma skupnega gibanja glede na spol in genotip. Merjenje v temi je osenčeno. *Legenda*: WT F – samice divjega tipa, WT M – samci divjega tipa, *Crem* KO F – samice z izbitim genom *Crem*, *Crem* KO M – samci z izbitim genom *Crem*.

#### 4.2.2 Aktiven čas

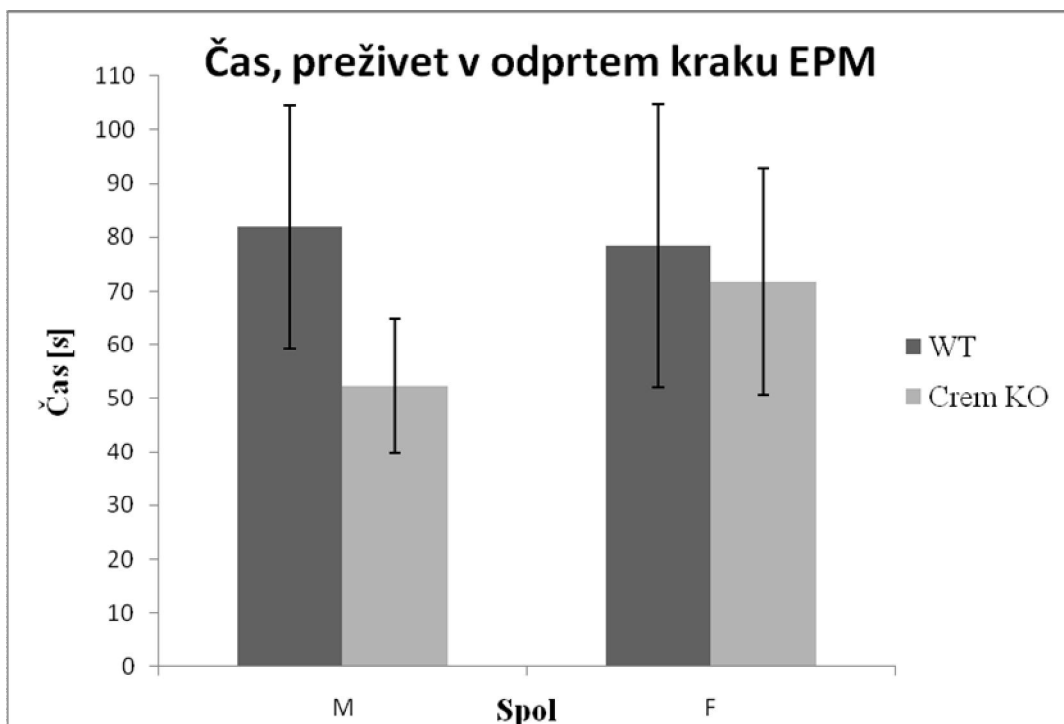
Aktiven čas smo merili z uporabo istega sistema kot za merjenje skupnega gibanja. Število živali v poskusni in kontrolni skupini je bilo enako. Tudi te rezultate smo analizirali tako, da smo izračunali povprečja za vsako uro (Slika 4). Dvosmerna analiza variance s spremenljivkama spol in genotip ni pokazala statistično značilnih razlik v aktivnem času.



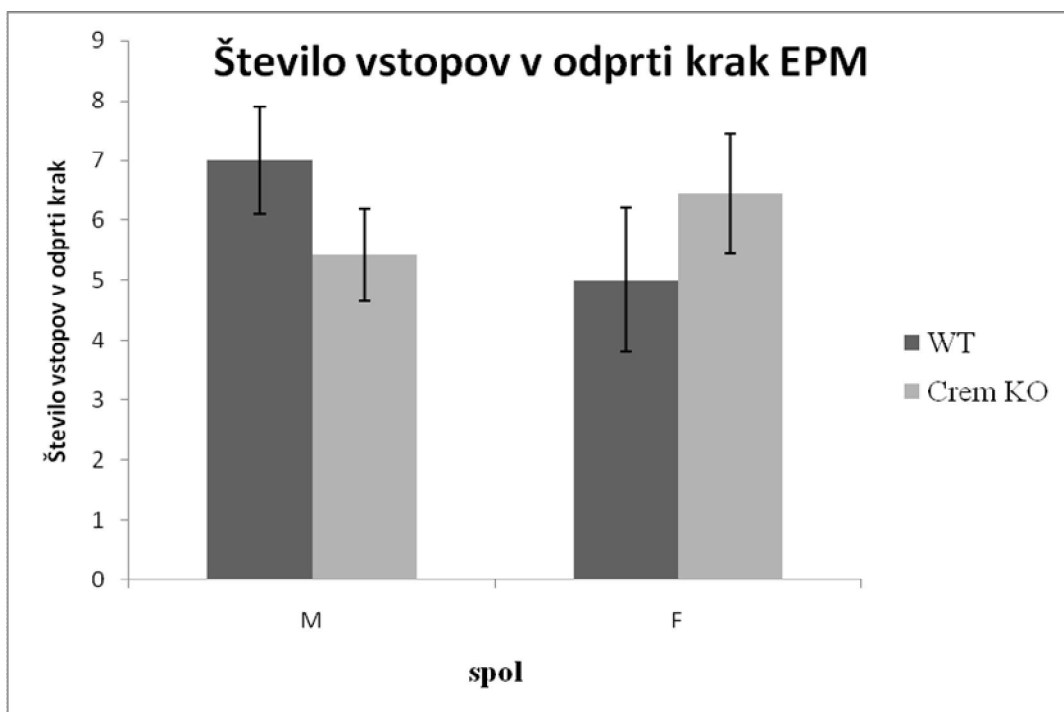
Slika 4: Rezultati spremljanja ritma aktivnega časa glede na spol in genotip. Merjenje v temi je osenčeno. *Legenda:* WT F – samice divjega tipa, WT M – samci divjega tipa, *Crem KO F* – samice z izbitim genom *Crem*, *Crem KO M* – samci z izbitim genom *Crem*.

#### 4.3 SPREMLJANJE ANSKIOZNEMU PODOBNEGA OBNAŠANJA

Anksioznemu podobno obnašanje smo testirali z uporabo dvignjenega labirinta (EPM). V poskusni skupini je bilo 12 samcev *Crem KO*, 9 samic *Crem KO*, v kontrolni skupini pa 8 samcev WT in 10 samic WT. Spremljali smo čas, preživet v odprtih in v zaprtih krakih labirinta, število vstopov v krake ter čas, preživet na meji med odprtimi in zaprtimi kraki. Dvosmerna analiza variance, kjer sta bili spremenljivki spol in genotip, ni pokazala nobenih statistično značilnih razlik ne v času zadrževanja v odprtem kraku EPM (Slika 5), niti pri rezultatih števila vstopov v odprta kraka labirinta (Slika 6).



Slika 5: Rezultati testa dvignjenega labirinta - primerjava časa, ki ga je miš preživela v odprtih krakih dvignjenega labirinta, glede na spol in genotip in prikaz intervalov standardne napake. *Legenda*: WT – miši divjega tipa, *Crem* KO – miši z izbitim genom *Crem*, M – samci, F - samice.



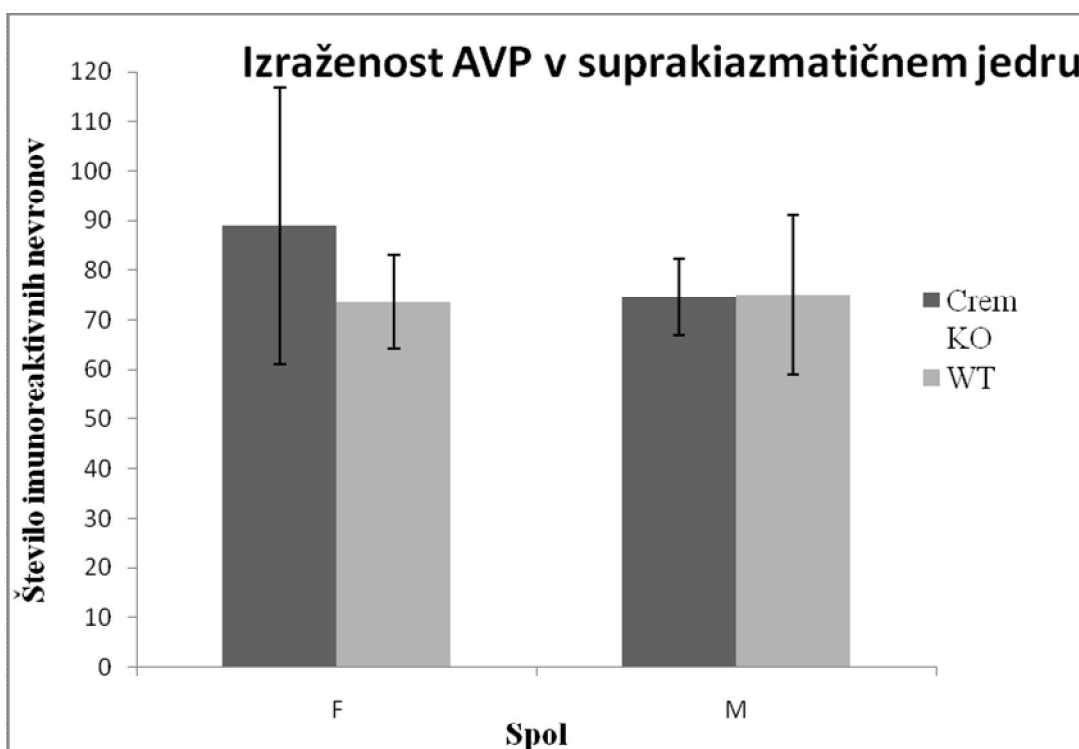
Slika 6: Rezultati testa dvignjenega labirinta – primerjava števila vstopov v odprta kraka EPM glede na spol in genotip ter prikaz intervalov standardne napake. *Legenda*: WT – miši divjega tipa, *Crem* KO – miši z izbitim genom *Crem*, M – samci, F - samice.

#### 4.4 IZRAŽENOST AVP, CYP51 IN EAP V SCN

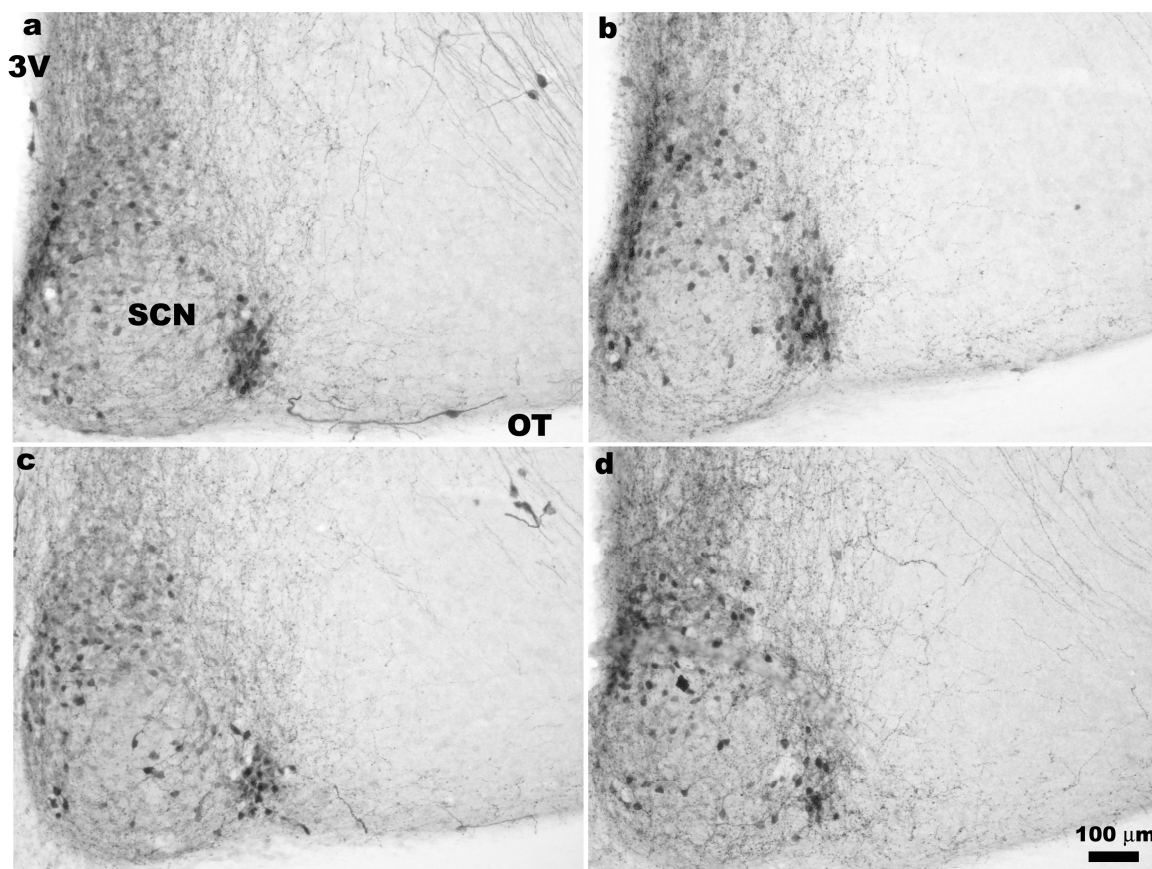
Z imunohistokemično metodo smo ugotavljali izraženost AVP, CYP51 in EAP v SCN v možganih.

##### 4.4.1 Izraženost AVP v SCN

Dvosmerna analiza variance je pokazala, da spol in genotip ne vplivata na razliko v številu nevronov z izraženim AVP, saj med skupinami ni bilo nobenih razlik (Slika 7).



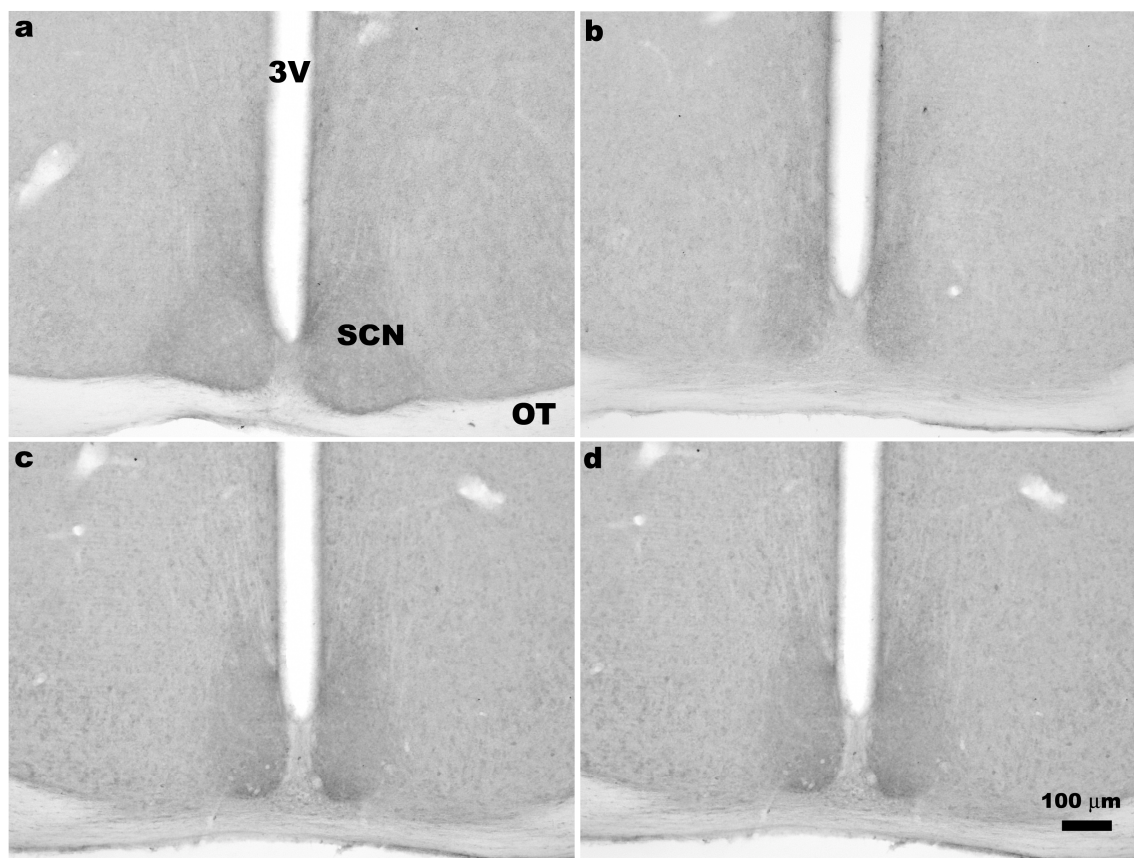
Slika 7: Rezultati imunohistokemije - primerjava števila nevronov v SCN z izraženim AVP med spoloma in glede na genotip ter prikaz intervalov standardne napake.  $n = 5$  pri vseh skupinah. *Legenda*: *Crem* KO – miši z izbitim genom *Crem*, WT – miši divjega tipa, F – samice, M - samci.



Slika 8: Rezultati imunohistokemije - izraženost AVP v nevronih v SCN pri samcih WT (a), samcih *Crem* KO (b), samicah WT (c) in samicah *Crem* KO (d) pri 100-kratni povečavi. *Legenda*: SCN – suprakiazmatično jedro, 3V – tretji ventrikel, OT – olfaktorni trakt.

#### 4.4.2 Izraženost CYP51 v SCN

Ob natančnem pregledu rezin možganov nismo opazili očitnih razlik v izraženosti CYP51 v SCN med živalmi iz poskusne in kontrolne skupine (Slika 9), zato števila celic nismo dodatno ovrednotili.

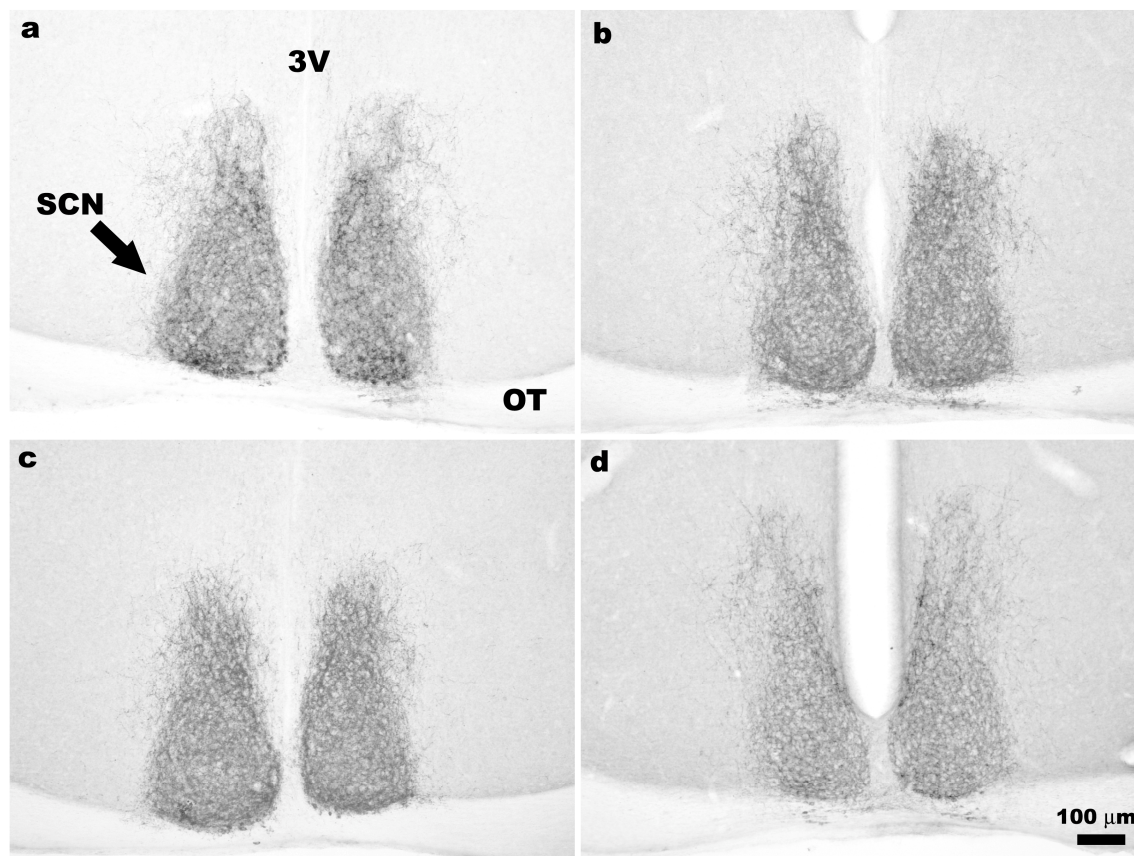


Slika 9: Rezultati imunohistokemije - izraženost CYP51 v nevronih v SCN pri samcih WT (a), samcih *Crem* KO (b), samicah WT (c) in samicah *Crem* KO (d) pri 100-kratni povečavi. *Legenda*: SCN – suprakiazmatično jedro, 3V – tretji ventrikel, OT – oflaktorni trakt.



#### 4.4.3 Izraženost EAP v SCN

Ob natančnem pregledu rezin možganov nismo opazili očitnih razlik v izraženosti EAP v SCN med živalmi iz poskusne in kontrolne skupine (Slika 10), zato števila celic nismo dodatno ovrednotili.



Slika 10: Rezultati imunohistokemije - izraženost EAP v nevronih v SCN pri samcih WT (a), samcih *Crem* KO (b), samicah WT (c) in samicah *Crem* KO (d) pri 100-kratni povečavi. *Legenda*: SCN – suprakiazmatično jedro, 3V – tretji ventrikel, OT – olfaktorni trakt.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Čeprav je veliko znanega o povezanosti gena *Crem* z dnevno-nočnim ritmom in izdelavo melatonina, vloga tega gena v možganih še ni dobro pojasnjena. Zato smo se odločili proučiti morebitne razlike, ki bi jih miši *Crem* KO lahko imele v hipotalamusnem jedru SCN. Na ta predel možganov smo se osredotočili ravno zaradi njegove povezanosti z dnevno-nočnim ritmom. Razlike smo iskali predvsem v času aktivnosti in skupnega gibanja, redno smo spremljali telesno težo miši, testirali smo tudi morebitno anksioznemu podobno obnašanje.

Rezultati spremljanja skupnega gibanja miši niso pokazali statistično značilne razlike med mišmi *Crem* KO in WT. Tudi rezultati aktivnega časa kažejo na ohranitev dnevno-nočnega ritma, nihanje je podobno med vsemi skupinami in tudi tukaj statistična analiza ni pokazala pomembnejših razlik. Rezultati aktivnega časa tako sovpadajo z rezultati skupnega gibanja. Ritem aktivnosti je pri vseh skupinah podoben, ohranja se tudi v fazi stalne teme, kar potrjuje dejstvo, da je dnevno-nočni ritem endogenega izvora. Odsotnost gena *Crem* tako ne vpliva na dnevno-nočni ritem gibanja miši, kar se ne sklada z dosedanjimi ugotovitvami Rafaela Maldonada in sodelavcev (1999). Njihovi rezultati pravijo, da so se miši *Crem* KO v dnevno-nočnem ciklu gibale homogeno, brez padca aktivnosti v dnevnem času. V primerjavi z mišmi WT so bile miši *Crem* KO ves čas hiperaktivne. Naši rezultati pa kažejo, da so miši *Crem* KO ohranile naravni ritem, primerljiv z ritmom miši WT, kar pomeni hiperaktivnost v temnih fazah in zmanjšano aktivnost v svetlih fazah. Vzrok za neujemanje rezultatov bi lahko bil v premajhnem časovnem obsegu, v katerem so Maldonado in sodelavci merili aktivnost miši. Njihov eksperiment je trajal le tri dni, kar pomeni toliko manjši obseg raziskave in slabši vpogled v resnično stanje. Naše spremljanje aktivnosti in skupnega gibanja miši je trajal skupaj dva tedna, s čimer smo dobili natančnejši vpogled v ritem gibanja in aktivnosti. Prav tako so Maldonado in sodelavci merili aktivnost vsaki dan le ob 14. uri, medtem ko smo v naši raziskavi merili aktivnost miši v času celega dne. Glede na to, da je bila naša raziskava veliko širše postavljena in je zaobjela več časovnih točk, so naši rezultati natančnejši prikaz učinka odsotnosti gena *Crem* na dnevno-nočni ritem aktivnosti miši. Tako moramo našo hipotezo o spremenjenem ritmu aktivnosti miši *Crem* KO ovreči, saj so razlike v amplitudi ritma premajhne in statistično neznačilne.

V času 21 tednov po odstavitvi so miši ustrezno pridobivale na teži. Kot je bilo pričakovano, so bili samci težji od samic. Tudi analiza rezultatov je potrdila statistično značilno razliko v telesni teži glede na spol ( $p = 0,000000$ ). Če primerjamo med seboj genotipe, pa lahko iz grafa telesne teže (Slika 2) razberemo, da genotip *Crem* KO povzroči manjšo spremembo v telesni teži. Gre za povečanje telesne teže pri miših *Crem* KO obeh spolov. S statistično obdelavo rezultatov smo potrdili značilne razlike v telesni teži v obdobju med 7. in 12. tednom ter v 16. in 17. tednu po odstavitvi. Vmes pa razlike niso bile statistično značilne, so pa kazale močan trend, saj je bila vrednost  $p$  tudi v vseh ostalih

časovnih točkah po 12. tednu po odstavitvi blizu 0,05. Razlika v telesni teži se je torej pojavila šele nekje od pubertete naprej in se nato ohranjala pri odraslih miših. Ker aktivnost miši *Crem* KO ni bila spremenjena, za povečanje telesne teže miši *Crem* KO le-ta verjetno ni bila vzrok, zato moramo našo hipotezo o povišanju telesne teže miši zaradi znižane aktivnosti ovreči. Povečanje telesne teže je zato lahko posledica spremenjenih fizioloških procesov v presnovi ali pri vnosu hrane. Možen vzrok je lahko v spremembah v adipogenezi. Odsotnost gena *Crem* je lahko spremenila razvoj in delovanje možganov, poškodbe hipotalamusnega jedra SCN na primer lahko vodijo v spremenjene prehranjevalne navade in posledično v povišano telesno težo. V diplomskem delu nismo spremljali porabe hrane, zato lahko o povezanosti povišane telesne teže miši *Crem* KO z motnjami prehranjevanja le predvidevamo, bi pa bilo smiselno proučiti porabo hrane pri teh miših v nadaljnjih raziskavah. Glede na majhno razliko v telesni teži med genotipoma bi bil smislen tudi poskus, v katerem bi miši hranili z bolj mastno hrano, saj se ob takem prehranjevanju majhne razlike v telesni teži običajno povečajo in bi razlike med mišmi WT in *Crem* KO tako lahko postale bolj očitne.

Spremljanje anksioznemu podobnega obnašanja s testom EPM ni pokazalo razlik med skupinami. Rezultati merjenja časa, preživetega v odprtih krakih labirinta, in števila vstopov v odprta kraka ne izražajo statistično značilnih razlik med spoloma in genotipoma. Rezultati spremljanja obnašanja tako nakazujejo, da odsotnost gena *Crem* ne vpliva na spremembo stopnje anksioznemu podobnega obnašanja pri miših. Ti rezultati se zopet ne ujemajo z rezultati raziskovalne skupine Rafaela Maldonada (1999), ki trdi, da so imele miši *Crem* KO znižano stopnjo anksioznemu podobnega obnašanja. Ker so obnašanje spremljali z enako metodo, to je test EPM, lahko sklepamo, da je vzrok za neujemanje ugotovitev v tehniki izvajanja tega testa. Njihov eksperiment je trajal tri dni, se pravi so njihovi rezultati odraz trikratnega merjenja obnašanja po 5 minut. V naši raziskavi pa smo test EPM izvajali le enkrat, kot je sicer v številnih metodologijah tega testa priporočeno, saj vsakokratno ponavljanje testa zmanjša pravilnost rezultatov zaradi spomina miši. Rezultati Maldonada in sodelavcev se v prvem poskusu testiranja z dvignjenim labirintom sicer ujemajo z našimi, saj ni statistično značilnih razlik med genotipoma. V naslednjih dneh testiranja pa so miši *Crem* KO v njihovi raziskavi preživele več časa v odprtih krakih labirinta verjetno ravno zaradi pozitivnih izkušenj iz prejšnjih testiranj. Vzrok za razliko med genotipoma pa je lahko v boljšem spominu, ki bi ga miši *Crem* KO lahko imele. Znano je, da na spomin med drugim vpliva tudi vazopresin. Njegova povezanost z genom *Crem* pa še ni natančno določena. Vzrok za izboljššan spomin bi lahko bil tudi v spremenjenih pogojih v možganih. Odsotnost gena *Crem* vpliva na spremenjen razvoj možganov in potrebne bi bile nadaljnje raziskave glede povezanosti gena *Crem* s spominom. Naša hipoteza o povišani stopnji anksioznemu podobnega obnašanja zaradi spremenjenega bioritma je tako ovržena, saj sta tako test spremljanja aktivnosti kot test spremljanja anksioznemu podobnega obnašanja dala negativne rezultate.

Razlika v izražanju AVP v hipotalamusnem jedru SCN v možganih glede na spol in genotip se ni izkazala za statistično značilno. Nespremenjen vzorec izražanja AVP v SCN

lahko povežemo z ohranitvijo dnevno-nočnega ritma aktivnosti miši *Crem* KO, saj tako njegovi vplivi na dnevno-nočni ritem in lokomotorno obnašanje niso bili spremenjeni. Prav tako nismo našli razlik v izražanju CYP51 v omenjenem področju možganov. V možganih je CYP51 najverjetneje pomemben za proizvodnjo holesterola za izgradnjo celičnih membran. Proizveden holesterol lahko služi tudi kot predhodnik nevrosteroidnih hormonov. Možno pa je tudi, da neposredni produkti encima CYP51 delujejo kot sporočilne molekule. Čeprav je znano, da miši *Crem* KO nimajo dnevno-nočnega ritma izražanja CYP51 v jetrih, kar vodi v moteno tvorbo holesterola, naši rezultati kažejo na normalno izražanje CYP51 v SCN, kar verjetno pomeni nemoten potek izdelovanja holesterola v tem predelu možganov. Tudi rezultati imunohistokemičnega barvanja rezin za EAP v SCN niso pokazali statistično značilnih razlik med spoloma in genotipoma. Zaradi nespremenjenosti v izražanju EAP v SCN tudi ni nobenih sprememb pri plodnosti samic, čeprav dejansko še ne vemo, kaj je vloga EAP v hipotalamusnem jedru SCN. Protein EAP je bil odkrit šele pred kratkim in je zaenkrat zelo malo znanega o njegovem delovanju. Znano je le, da je izraženost proteina EAP povezana z nastopom pubertete vsaj pri samicah. Izraženost EAP v SCN bi lahko bila povezana z delovanjem spolnega sistema, saj je ta močno uravnavan s cirkadianimi oziroma cirkanualnimi ritmi. Iz imunohistokemičnih rezultatov tako lahko sklepamo, da odsotnost gena *Crem* ne vpliva na izražanje AVP, CYP51 in EAP v SCN, s čimer se ovrže naša hipoteza o spremenjenem izražanju proteinov v SCN zaradi motenega dnevno-nočnega ritma miši *Crem* KO. Rezultati imunohistokemije nakazujejo, da razvoj SCN z vidika izraženosti teh treh proteinov in morfoloških značilnosti samega jedra ni moten. Niso pa izključene druge možne spremembe v razvoju tega predela možganov, ki bi se lahko pokazale v spremenjenem izražanju katerih drugih genov kot so morda geni za uravnavanje dnevno-nočnih ritmov (na primer *per*, *bmal*, *clk* in drugi).

Rezultati spremljanja aktivnosti in gibanja miši, testiranja anksioznemu podobnega obnašanja in analize izražanja proteinov AVP, CYP51 in EAP v SCN ne kažejo statistično značilnih razlik glede na spol in genotip. Meritve telesne teže miši pa so pokazale močan vpliv spola in tudi statistično značilno razliko v telesni teži med genotipoma od pubertete naprej. Na podlagi naših rezultatov lahko trdimo, da gen *Crem* nima vpliva na dnevno-nočni ritem aktivnosti in gibanja miši, prav tako ne vpliva niti na anksioznemu podobno obnašanje niti na izražanje omenjenih treh proteinov v hipotalamusnem jedru SCN. Očitna pa je povezanost gena *Crem* s telesno težo miši, vendar natančen vzrok za povišanje teže miši *Crem* KO še ni pojasnjen in lahko služi kot predmet nadaljnjih raziskav.

## 6 POVZETEK

Izražanje večeksonskega gena *Crem* (cAMP responsive element modulator) je tkivno specifično in uravnava z razvojem. *Crem* spada v družino vezavnih faktorjev na elemente CRE in aktivira cAMP sporočilno pot. Gen *Crem* postane inducibilen z aktivacijo sporočilne poti adenilat-ciklaze, vendar se pri tem ne inducirajo prepisi *Crem*  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  in  $\tau$ , ki imajo svoj, drugačen prepisovalni nadzor, ampak se inducira nova izoforma ICER (Molina in sod., 1993). Protein ICER (inducible cAMP early repressor) ima pomembno vlogo pri delovanju dnevno-nočnega sistema v možganih sesalcev. Med drugim se nahaja tudi v suprakiazmatičnem jedru hipotalamusa, ki je odgovoren za nadzor dnevno-nočnega ritma. Natančna vloga gena *Crem* in njegovega prepisa ICER v možganih pa še ni dobro proučena.

V naši raziskavi smo uporabljali model gensko spremenjene miši, ki je imel izbit gen *Crem*. Želeli smo proučiti vplive gena *Crem* na dnevno-nočni ritem aktivnosti in gibanja miši, na telesno težo in anksioznemu podobno obnašanje. Zanimale so nas tudi morebitne spremembe v strukturi in delovanju SCN, zato smo analizirali izražanje proteinov arginin vazopresin (AVP), lanosterolne demetilaze (CYP51) in enhanced at puberty proteina (EAP).

AVP v možganih deluje kot nevrottransmitter (Brown, 1994) in antiamnestik (De Wied, 1984). Izraža se predvsem v SCN, njegovo sproščanje je podvrženo dnevno-nočnemu ritmu. AVP pomaga tudi v dnevno-nočnem nadzoru sproščanja nekaterih hormonov (kortikotropin sproščujoči hormon, adrenokortikotropični hormon), pomemben pa je tudi za dnevno-nočni ritem lokomotornega obnašanja. Povezujejo ga tudi z urejanjem agresije, socialnega prepoznavanja, depresije in anksioznemu podobnega obnašanja (De Vries in sod., 1983).

CYP51 spada v družino citokromov P450 in je povezan s tvorbo holesterola v jetrih (Cytochrome P450, 1997), v možganih pa katalizira izoblikovanje številnih možganskih signalnih molekul (Liu in sod., 2004). Tvorba holesterola je podvržena dnevno-nočnemu ritmu. Ugotovili so, da gen *Crem* in njegov protein ICER vplivata na dnevno-nočno izražanje CYP51 v jetrih (Ačimovič in sod., 2008). V možganih natančna vloga CYP51 še ni razjasnjena, predvideva pa se, da ureja tvorbo holesterola za celične membrane, holesterol lahko služi tudi kot predhodnik nevrosteroidnih hormonov, produkti encima CYP51 pa v možganih lahko delujejo tudi kot signalne molekule.

Vloga proteina EAP je še precej neznana, vemo le, da je njegovo sproščanje povezano s puberteto in da prispeva k nadzoru reproduktivnosti samic.

Aktivnost in gibanje miši smo spremljali z uporabo sistema za merjenje aktivnosti v dvodimenzijemskem prostoru. Gibanje miši se je zaznavalo s prekinitvijo žarkov in posledično ponovno vzpostavitev drugih žarkov. Prvi del meritev je bil opravljen pri

normalnem svetlo-temnem ciklu (12:12), drugi del pa v stalni temi. Oba dela sta posamično trajala 7 dni, brez prekinitve med obema deloma.

Anksioznemu podobno obnašanje smo spremljali z uporabo dvignjenega labirinta (EPM). Beležili smo si število vstopov v odprte in zaprte krake ter trajanje njihovega postanka. Beležili smo si tudi postanke na mejnih mestih med kraki.

Telesno težo smo merili tedensko, vedno ob enakem času, vse od odstavitve do žrtvovanja. Miši smo žrtvovali 21. teden po odstavitvi, fiksirali tkivo s postopkom perfuzije in jim odvzeli možgane.

Izražanje proteinov AVP, CYP51 in EAP smo analizirali z metodo imunohistokemičnega barvanja plavajočih rezin možganov miši. Uporabili smo primarna kunčja protitelesa proti arginin vazopresinu v redčitvi 1:15000, primarna kunčja protitelesa proti CYP51 v redčitvi 1:5000 in primarna kunčja protitelesa proti enhanced at puberty proteinu v redčitvi 1:8000. Na njih smo vezali sekundarna proti-kunčja protitelesa, narejena v oslu v redčitvi 1:500. Pod mikroskopom smo slikali hipotalamusno jedro SCN in uredili digitalne slike.

Vse rezultate smo statistično obdelali z dvosmerno analizo variance, kjer smo za spremenljivki uporabili spol in genotip (WT ali *Crem* KO). Pri vseh analizah smo kot statistično značilno upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .

Rezultati aktivnega časa in skupnega gibanja ne kažejo statistično značilnih razlik glede na spol in genotip. Dnevno-nočni ritem je bil pri vseh skupinah ohranjen. Prav tako ni bilo razlik pri testiranju anksioznemu podobnega obnašanja z EPM. Statistično značilne razlike pa so se pojavile pri rezultatih meritev telesne teže miši. Kot pričakovano se kaže velik vpliv spola na telesno težo. Tudi glede na genotip se je pojavila razlika, saj kažejo miši *Crem* KO povišano telesno težo v primerjavi z mišmi WT vse od pubertete naprej. Rezultati imunohistokemičnega barvanja rezin možganov ne kažejo razlik v izražanju proteinov AVP, CYP51 in EAP v SCN.

Naši rezultati tako kažejo, da gen *Crem* ne vpliva na dnevno-nočni ritem aktivnosti miši in prav tako ne na anksioznemu podobno obnašanje. Gen *Crem* tudi ne vpliva na izražanje proteinov AVP, CYP51 in EAP v hipotalamusnem jedru SCN v možganih. Dokazan pa je vpliv gena *Crem* na telesno težo miši, ki se kaže od pubertete naprej. Vzrok je lahko v spremenjenem delovanju SCN, kar bi pomenilo motnje v prehranjevanju, ali pa v spremembi drugih fizioloških procesih v telesu, na primer adipogenezi, vendar točen vzrok za povišanje teže še ni pojasnjen.

## 7 VIRI

- Ačimovič J., Fink M., Pompon D., Bjorkhem I., Hirayama J., Sassone-Corsi P., Goličnik M., Rozman D. 2008. CREM modulates the circadian expression of CYP51, HMGCR and cholesterologenesis in the liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376: 206-210
- Agez L., Laurent V., Pevet P., Masson-Pevet M., Gauer F. 2007. Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*, 144: 522-530
- Bartness T. J., Demas G. E., Song C. K. 2002. Seasonal changes in adiposity: The roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system. *Experimental Biology and Medicine*, 227: 363-376
- Bartness T.J., Wade G.N. 1985. Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters. *Neuroscience & Behavioral Reviews*, 9: 599-612
- Beasley L. J., Nelson R. J. 1982. Thyroid gland influences the period of hamster circadian oscillations. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 38, 7: 870-871
- Bendova Z., Sumova A., Illnerova H. 2004. Development of circadian rhythmicity and photo periodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research*, 148: 105-112
- Blendy J. A., Kaestner K. H., Weinbauer G. F., Nieschlag E., Schutz G. 1996. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature*, 380: 162-165
- Brown R. E. 1994. An introduction to neuroendocrinology. Cambridge University Press: 408 str.
- Caldwell H. K., Lee H. J., Macbeth A. H., Young W. S. 2008. Vasopressin: Behavioral Roles of an "Original" Neuropeptide. *Progress in Neurobiology*, 84, 1: 1-24
- Cestnik V. 1993. Fiziologija domačih živali (Uvod, Splošna fiziologija, Fiziologija krvi). Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani: 45-50
- Cestnik V. 1996. Fiziologija endokrinega sistema pri domačih živalih. Ljubljana, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani: 186 str.
- Chandhoke T. K., Huang Y. F., Liu F., Gronowicz G. A., Adams D. J., Harrison J. R., Kream B. E. 2008. Osteopenia in transgenic mice with osteoblast-targeted expression of the inducible cAMP early repressor. *Bone*, 43, 1: 101-9

Claudel T., Cretenet G., Saumet A., Gachon F. 2007 Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock. *FEBS Letters*, 581: 3626–3633

Conti A. C., Kuo Y. C., Valentino R. J., Blendy J. A. 2004. Inducible cAMP early repressor regulates corticosterone suppression after tricyclic antidepressant treatment. *The Journal of Neuroscience*, 24, 8: 1967-1975

Crawley J. N. 2000. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. Wiley-Liss: 329 str.

Crem cAMP responsive element modulator [ *Mus musculus* ]. 2009. Entrez Gene, National Center for Biotechnology Information.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12916?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12916?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum) (17. september 2009)

Cytochrome P450. 1997. Online Mendelian Inheritance In Man (OMIM).  
<http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Entrez/Dispomim.Cgi?Id=601637> (18. september 2009)

De Vries G. J., Best W., Sluiter A. A. 1983. The influence of androgens on the development of a sex difference in the vasopressinergic innervation of the rat lateral septum. *Brain Research*, 284: 377–380

Dernovšek M., Tavčar R., Orel D., Gorše Muhič M., Pečenič S. 2006. Prepoznavanje in premagovanje anksioznosti. Slovensko društvo za nevroznanost.  
[http://www.sinapsa.org/tm/file.php?id=58&db=tm\\_priponke](http://www.sinapsa.org/tm/file.php?id=58&db=tm_priponke) (25. september 2009)

DeWied D. 1984. Neurohypophyseal hormone influences on learning and memory processes. V: *Neurobiology of learning and memory*. Lynch G, McGaugh J. L. in Weinberger N. M. (ur.). New York, Guilford: 289-312

Dubocovich M.L., Hudson R.L., Sumaya I.C., Masana M.I., Manna E. 2005. Effect of MT melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *Journal of Pineal Research*, 39: 113-120

Dubocovich M.L., Rivera-Bermudez M.A. Gerdin M.J., Masana M.I. 2003. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Frontiers in Bioscience*, 8: d1093-d1108

Elevated plus maze. 2009. Wikipedia, The Free Encyclopedia.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Elevated\\_plus\\_maze](http://en.wikipedia.org/wiki/Elevated_plus_maze) (25. september 2009)



Ellis G.B., Turek F.W. 1979. Changes in locomotor activity associated with the photoperiodic response of testes in male golden hamsters. *Journal of Comparative Physiology*, 132: 277-284

Enhanced At Puberty Protein 1. 2009. Uniprotkb Protein Knowledgebase. <http://Www.Uniprot.Org/Uniprot/Q8k3x4> (18. september 2009)

Fisher L. A. 1989. *Trends in Pharmacology science*, 10: 189-193

Foulkes N. S., Borjigin J., Snyder S. H., Sassone-corsi P. 1996. Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Neurobiology*, 93: 14140-14145

Foulkes N. S., Whitmore D., Sassone-Corsi P. 1997. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Biology of the Cell*, 89, 8: 487-94

Guido M.E., de Guido L.B., Goguen D., Robertson H.A., Rusak B. 1999. Daily rhythm of spontaneous immediate-early gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 14, 4: 275-280

Heger S., Mastronardi C., Dissen G. A., Lomniczi A., Cabrera R., Roth C. L., Jung H., Galimi F., Sippell W., Ojeda S. R. 2007. Enhanced at puberty 1 (EAP1) is a new transcriptional regulator of the female neuroendocrine reproductive axis. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 8: 2145-2154

Jones P.J., Schoeller D.A.. 1990. Evidence for diurnal periodicity in human cholesterol synthesis. *Journal of Lipid Research*, 31: 667-673

Kalra S.P., Dube M.G., Sahu A., Phelps C.P., Kalra P.S. 1991. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the United States of America*, 88: 10931-10935

Kohsaka A., Bass J. 2006. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 18, 1: 4-11

Kornmann B., Schaad O., Bujard H., Takahashi J.S., Schibler U.. 2007. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biology*, 5: e34

Kriegsfeld L.J., LeSauter J., Hamada T., Pitts S.M., Silver R. 2002. Circadian rhythms in the endocrine system. V: Hormones, Brain and Behavior. Pfaff D.W., Arnold A.P., Etgen A.M., Fahrbach S.E., Rubin R.T. (ur.). New York, Academic Press, 2: 33-91

- Landgraf R., Gerstberger R., Montkowski A., Probst J. C., Wotjak C. T., Holsboer F., Engelmann M. 1995. V1 vasopressin receptor antisense oligodeoxynucleotide into septum reduces vasopressin binding, social discrimination abilities, and anxiety-related behavior in rats. *Journal of Neuroscience*, 15: 4250-4258
- Laoide Brid M., Foulkes N. S., Schlotter F., Sassone-Corsi P. 1993. The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *The EMBO Journal*, 12, 3: 1179-1191
- Lauder J.M. 1983. Hormonal and humoral influences on brain development. *Psychoneuroendocrinology*, 8: 121-155
- Liu M., Hurn P.D., Alkayed N.J. 2004. Cytochrome P450 in neurological disease. *Current Drug Metabolism*, 5, 3: 225–234
- Majzoub J.A., Robinson B.C., Emanuel R.L. 1991. Suprachiasmatic nuclear rhythms of vasopressin mRNA in vivo. V: Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock, DC Klein, RY Moore, Sm Reppert (ur.), Oxford University Press, NY: 177-190
- Maldonado R., Smadja C., Mazucchelli C., Sassone-Corsi P. 1999. Altered emotional and locomotor responses in mice deficient in the transcription factor CREM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 24: 14094-14099
- Mantamadiotis T., Lemberger T., Bleckmann S. C., Kern H., Kretz O., Villalba A. M., Tronche F., Kellendonk C., Gau D., Kapfhammer J., Otto C., Schmid W., Schütz G. 2002. Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nature Genetics*, 31: 47-54
- Molina C. A., Foulkes N. S., Lalli E., Sassone-Corsi P. 1993. Inducibility and Negative Autoregulation of CREM: An Alternative Promoter Directs the Expression of ICER, An Early Response Repressor. *Cell*, 75: 875-886
- Melatonin. 2009. Wikipedia, The Free Encyclopedia.  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Melatonin> (7. oktober 2009)
- Nelson D. 2003. Cytochromes P450 in humans.  
<http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html> (19. september 2009)
- Nelson R. L. 2005. An introduction to behavioral endocrinology. Third edition. Sinauer Associates: 822 str.

- Nordberg M., Duffus J., Templeton D. M.. 2004. Cytochrome P450. Glossary Of Terms Used In Toxicokinetics, (Iupac Recommendations 2003). Pure And Applied Chemistry, 76, 5: 1033-1082
- Pellow S., Chopin P. File S.E., Briley M. 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. Journal of Neuroscience Methods, 14, 3: 149-167
- Planas B., Kolb P. E., Raskind M. A., Miller M. A. 1995. Vasopressin and galanin mRNAs coexist in the nucleus of the horizontal diagonal band: a novel site of vasopressin gene expression. Journal of Comparative Neurology, 361: 48-56
- Poirel V.J., Masson-Pevet M., Pevet P., Gauer F. 2002. MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. Brain Research, 946: 64-71
- Ralph M.R., Foster R. G., Davis F. C., Menaker M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. Science, 247: 975-978
- Redman J., Armstrong S., Ng K.T. 1983. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. Science, 219: 1089-1091
- Rigler L. 1988. Anatomija domačih živali. Neurologia in aesthesiologia. Skripta za študente veterinarstva. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTOZD za veterinarstvo: 314 str.
- Robertson H.A. 1992. Immediate-early genes, neuronal plasticity, and memory. Biochemistry and Cell Biology, 70: 729-737
- Rosen J. B., Schulkin J. 1998. From normal fear to pathological anxiety. Psychological Review, 105, 2: 325-50
- Rozman D., Fink M., Fimia G.M., Sassone-Corsi P., Waterman M.R. 1999. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate(cAMP)/cAMP-responsive element modulator (CREM) dependent regulation of cholesterologenic lanosterol 14 $\alpha$ -methylase (CYP51) in spermatids. Molecular Endocrinology, 13: 1951-1962
- Rudic R.D., McNamara P., Curtis A. M., Boston R. C., Panda S., Hogenesch J. B., Fitzgerald G. A. 2004. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. Public Library of Science Biology, 2: e377

- Schosser A., Kasper S. 2009. The role of pharmacogenetics in the treatment of depression and anxiety disorders. *International Clinical Psychopharmacology*. Pub Med.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738481?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed\\_ResultsPanel.Pubmed\\_DefaultReportPanel.Pubmed\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738481?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum)  
(5. september 2009)
- Seliškar M., Rozman D. 2007. Mammalian cytochromes P450 - Importance of tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770: 458-466
- Spermatogenesis. Gametogenesis. 2006. Human embryology. Embryogenesis. Universities of Fribourg, Lausanne and Bern.  
<http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato01.html> (25. avgust 2009)
- The neuronal switches for waking and sleeping. 2008. The brain from top to bottom.  
[http://thebrain.mcgill.ca/flash/a/a\\_11/a\\_11\\_cl/a\\_11\\_cl\\_cyc/a\\_11\\_cl\\_cyc.html](http://thebrain.mcgill.ca/flash/a/a_11/a_11_cl/a_11_cl_cyc/a_11_cl_cyc.html)  
(23. september 2009)
- Turek F.W., Joshu C., Kohsaka A., Lin E., Ivanova G., McDearmon E., Laposky A., Losee-Olson S., Easton A., Jensen D. R., Eckel R. H., Takahashi J. S., Bass J. 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, 308: 1043-1045
- Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H. 1987. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Research*, 435: 359-362
- Wray N. R., James M. R., Mah S. P., Nelson M., Andrews G., Sullivan P. F., Montgomery G. W., Birley A. J., Braun A., Martin N. G. 2007. Anxiety and comorbid measures associated with PLXNA2. *Archives of General Psychiatry*, 64, 3: 318–26
- Zimmermann E. A., Robertson A. G. 1976. Hypothalamic neurons secreting vasopressin and neurophysin. *Kidney International*, 10: 12-24
- Zucker I. 1980. Light, behavior, and biologic rhythms. V: Neuroendocrinology. Krieger D.T., Hughes J.C. (ur.). Sunderland, MA, Sinauer Associates: 93-101

## ZAHVALA

Posebej se zahvaljujem mentorju prof. dr. Gregorju Majdiču za omogočeno raziskavo, ki mi je prinesla ogromno novih izkušenj. Zahvalila bi se tudi za usmerjanje pri delu, potrpežljivost in spodbudo, za literaturo in pomoč pri statistični analizi rezultatov.

Ogromna zahvala gre tudi dr. Tomažu Büdefeldu, univ. dipl. mikrobiologu, za uvajanje v delo z miškami, prijazno pomoč v laboratoriju in pri težavah, s katerimi sem se soočila, za motivacijo ter za veliko mero prilagodljivosti, strpnosti in dobre volje.

Hvala Katerini Čeh, dr. vet. med, za uvajanje v test z dvignjenim labirintom in pomoč pri težavah, ki so mi prečkale raziskovalno pot.

Hvala Jasmini Kerčmar, dr. vet. med., za pomoč pri razvrščanju plavajočih rezin možganov, predvsem pa za dobro voljo, motivacijo in zabavno vzdušje v laboratoriju.

Zahvalila bi se tudi staršem za podporo v času študija, Saši in drugim sošolcem za družbo med celotnim študijem, spodbudne besede in motivacijo za raziskovalno delo in Mateju za potrpežljivost v času pisanja diplomskega dela.

Hvala tudi vsem, ki niso posebej omenjeni, pa so mi kakorkoli pomagali pri raziskovalnem delu.

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maša CRČEK

**VLOGA GENA *Crem* V RAZVOJU MOŽGANOV  
PRI MIŠIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009