

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Teja FABJAN

**ČASOVNE SPREMEMBE V IZRAŽENOSTI  
NEKATERIH STEROIDOGENIH ENCIMOV V  
MOŽGANIH MIŠJIH ZARODKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Teja FABJAN

**ČASOVNE SPREMEMBE V IZRAŽENOSTI NEKATERIH  
STEROIDOGENIH ENCIMOV V MOŽGANIH MIŠJIH ZARODKOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**TEMPORAL CHANGES IN EXPRESSION OF SOME  
STEROIDOGENIC ENZYMES IN THE MURINE FETAL BRAIN**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na Centru za genomiko živali na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 04.06.2009 za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Majdiča in za recenzenta prof. dr. Simona Horvata..

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor MAJDIČ  
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Center za genomiko živali

Član: prof. dr. Simon HORVAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Izjavljam, da je naloga 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.

Teja FABJAN

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 606:575(043.2)
KG	steroidi/hormoni/encimi/miši/zarodki/možgani/izražanje/SF-1/CYP19A1/HSD17B1/AKR1C6/ SRD5A1/qRT-PCR
AV	FABJAN, Teja
SA	MAJDIČ Gregor (mentor)
KZ	SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2011
IN	ČASOVNE SPREMEMBE V IZRAŽENOSTI NEKATERIH STERODOGENIH ENCIMOV V MOŽGANIH MIŠJIH ZARODKOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 61 str., 2 pregl., 15 sl., 63 vir.
IJ	SI
JJ	sl/en
AI	Ženske in moški se razlikujemo v velikosti in obliki teles, fiziološko in tudi v vedenju. Obstaja teorija, ki predvideva, da na razvoj določenih oblik vedenja tipičnega za spol vpliva izpostavljenost zarodka spolnim hormonom v obdobju pred rojstvom. Dolgo časa je veljalo, da so endokrine žleze, kot so skorja nadledvične žleze, spolne žleze in placenta, edini vir steroidov, ki vplivajo na možgane. Več raziskav pa je pokazalo, da so tudi možgani sami sposobni tvorbe različnih steroidov. Miši brez gena <i>Sf-1</i> se rodijo brez spolnih in nadledvičnih žlez, z nedelujočimi gonadotropnimi celicami v hipofizi ter s spremenjenim ventromedialnim jedrom v hipotalamusu. Med embrionalnim razvojem niso izpostavljene lastnim steroidnim hormonom iz spolnih žlez in predstavljajo odličen model za preučevanje razvoja in delovanja centralnega živčnega sistema neodvisno od spolnih žlez. V diplomskem delu smo preučili izraženost naslednjih steroidogenih encimov: <i>Cyp19a1</i> , <i>Hsd17b1</i> , <i>Akr1c6</i> in <i>Srd5a1</i> v možganih zarodkov miši divjega tipa in jih primerjali z izraženostjo pri miših brez gena <i>Sf-1</i> . Ugotoviti smo želeli ali obstajajo razlike v izraženosti teh encimov med spoloma, med različnimi starostmi zarodkov in ali so prisotne razlike med mišmi divjega tipa in mišmi brez gena <i>Sf-1</i> . Izraženost encimov smo merili z metodo RT-PCR v realnem času (qRT-PCR). Naši rezultati kažejo, da s starostjo izražanje <i>Hsd17b1</i> v možganih mišjih zarodkov narašča. V izražanju <i>Akr1c6</i> med različno starimi zarodki ni bilo zaznati razlik, stopnja izražanja pa je bila pri vseh starostih zelo nizka (izražanje zaznali šele v 14,5 dni starih možganih zarodkov in starejših). Predvidevali smo, da je encima v možganih zarodkov malo. <i>Srd5a1</i> se je izražala v možganih mišjih zarodkov pri vseh štirih starostnih skupinah. Pri 18,5 dni starih možganih zarodkov (E18,5) smo zaznali povišanje stopnje izražanja glede na mlajše zarodke. Med ostalimi starostnimi skupinami ni bilo razlik. Izražanje <i>Cyp19a1</i> smo sicer zaznali, vendar je bilo zelo šibko in tudi standardne napake so bile velike. Gen <i>Sf-1</i> ne vpliva na izražanje nobenega izmed encimov. Le znotraj skupine 14,5 dni starih zarodkov smo zaznali statistično značilno razliko med mišmi divjega tipa in mišmi brez gena <i>Sf-1</i> v izražanju <i>Hsd17b1</i> in <i>Srd5a1</i> . Izražanje <i>Hsd17b1</i> in <i>Srd5a1</i> je tudi enako pri obeh spolih. Pri <i>Cyp19a1</i> smo zaznali razliko v izražanju med spoloma le pri 16,5 dni starih zarodkih. Izraženost gena <i>Akr1c6</i> pa se je razlikovala med samci in samicami. V možganih zarodkov moškega spola je bilo izražanje višje kot pri ženskah.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
 DC UDC 606:575(043.2)  
 CX steroids/hormons/enzymes/mice/embrios/brain/expression/SF-1/  
 CYP19A1/HSD17B1/AKR1C6/ SRD5A1/qRT-PCR  
 AU FABJAN, Teja  
 AA MAJDIČ Gregor (mentor)  
 PP SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in  
 Biotechnology  
 PY 2011  
 TI TEMPORAL CHANGES IN EXPRESSION OF SOME STEROIDOGENIC  
 ENZYMES IN THE MURINE FETAL BRAIN  
 DT Graduation Thesis (University studies)  
 NO XIII, 61 p., 2 tab., 15 fig., 63 ref.  
 LA SI  
 AL sl/en  
 AB Women and men differ in size and body shape, physiologically and behaviorally. The theory exists, which assumes that fetal exposure to sex hormones in the prenatal period affects on development of different forms of gender-typical behavior. For a long time it was thought, that the endocrine glands such as adrenal cortex, gonads and placenta are the only source of steroids, which affect the brain. More researching has shown that the brain itself is capable of forming various steroids. Mice without the gene *Sf-1* are born without sex and adrenal glands, with mal-functioning gonadotropic cells in the pituitary and with a modified ventromedial nucleus in the hypothalamus. They are not exposed to steroid hormones from their own gonads during embryonic development, so they represent an excellent model for studying the development and functioning of the central nervous system, independently of the gonads. In this research, we examined the expression of steroidogenic enzymes, following: *Cyp19a1*, *Hsd17b1*, *Akr1c6* *Srd5a1* in the fetal brain of wild-type mice and compared them to mice without the gene *Sf-1* (*Sf-1* knock out). We wanted to determine whether there are differences in the expression of these enzymes between sex and between different ages of embryos and whether there are present differences between wild-type mice and *Sf-1* knock out mice. The expression of enzymes was measured by the method of polymerase chain reaction with reverse transcription in real-time (qRT-PCR). Our results suggest that the expression of *Hsd17b1* in the fetal brain is growing with aging. The expression of *Akr1c6* in different aged embryos showed no differences and the level of expression was at all ages very low (expression was detected only in the 14.5-day-old fetal brains and older). It was assumed that there is a very small amount of enzyme in the embryonic brain. *Srd5a1* was expressed in fetal mouse brains in all four age groups. In 18.5-day-old fetal brains (E18, 5), we detected increased level of expression according to the younger embryos. Among the remaining age groups there were no differences. *Cyp19a1* expression was detected, but it was very weak and standard errors were large. *Sf-1* gene does not affect the expression of any of the enzymes. Only within the group of 14.5-day-old embryos, we detected a statistically significant difference between wild-type mice and mice without the gene *Sf-1* in expression of *Srd5a1* and *Hsd17b1*. Expression of *Srd5a1* and *Hsd17b1* is also the same in both sexes. In *Cyp19a1* we notice the difference in expression between the sexes only in the 16.5-day-old embryos. The expression of the gene *Akr1c6* differed between males and females. In the male fetal brains was higher expression than in female brains.

## KAZALO VSEBINE

<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>2</b>
2.1 ENDOKRINI SISTEM IN HORMONI .....	2
<b>2.1.1 Osnovne definicije</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1.2 Hipotalamus</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.3 Hipofiza</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.4 Nadledvični žlezi</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1.5 Spolne žleze ali gonade</b> .....	<b>6</b>
2.1.5.1 Moda .....	6
2.1.5.2 Jajčniki .....	7
<b>2.1.6 Placenta ali posteljica</b> .....	<b>8</b>
2.2 RAZLIKE MED SPOLOMA IN VEDENJE.....	8
<b>2.2.1 Določitev spola in diferenciacija</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2.2 Diferenciacija spolnih žlez</b> .....	<b>10</b>
2.3 STEROIDOGENEZA .....	12
2.4 NEVROSTEROIDOGENEZA .....	14
2.5 JEDRNI RECEPTOR PODDRUŽINE 5, SKUPINA A, ČLAN 1 (NR5A1) ALI STEROIDOGENI FAKTOR 1 (SF-1) .....	15
2.6 CITOKROMI P450 .....	16
2.7 HIDROKSISTEROID DEHIDROGENAZE (HSD) .....	20
<b>2.7.1 Hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaze (HSD17B)</b> .....	<b>20</b>
<b>2.7.2 Aldo-keto reduktaza družine 1, član C6 (AKR1C6)</b> .....	<b>23</b>
2.8 STEROID 5 ALFA-REDUKTAZA 1 (SRD5A1) .....	24
2.9 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO IN OBRATNIM PREPISOM V REALNEM ČASU (RT-RT-PCR ALI QRT-PCR).....	27
<b>3 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE</b> .....	<b>30</b>
3.1 CILJI.....	30
3.2 HIPOTEZE .....	30
<b>4 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>31</b>
4.1 ŽIVALI IN TRETIRANJE .....	31
4.2 TESTNE ŽIVALI.....	31
4.3 RAVNANJE Z VZORCI.....	31
4.4 GENOTIPIZACIJA.....	32
4.5 IZOLACIJA RIBONUKLEINSKIH KISLIN (RNK).....	33
4.6 KVANTIFIKACIJA Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO IN REVERZNO TRANSKRIPTAZO V REALNEM ČASU (QRT-PCR).....	33
<b>4.6.1 Aparatura Mastercycler® ep realplex (Eppendorf)</b> .....	<b>34</b>
<b>4.6.2 Aparatura StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)</b> .....	<b>35</b>
4.6.2.1 Reakcija PCR z obratnim prepisom (RT-PCR).....	36
4.6.2.2 Reakcija PCR v realnem času.....	37
4.7 STATISTIČNE METODE. ....	38
<b>5 REZULTATI</b> .....	<b>39</b>

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

5.1 VZORCI .....	39
5.2 RAZLIKE MED STAROSTNIMI SKUPINAMI.....	40
<b>5.2.1 Hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaza (HSD17B1).....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.2 Steroid 5<math>\alpha</math> reduktaza 1 (SRD5A1).....</b>	<b>41</b>
<b>5.2.3 Aldo-keto reduktaza družine 1, član C6 (AKR1C6).....</b>	<b>42</b>
<b>5.2.4 Citokrom P450, družina 19, poddružina A, polipeptid 1 (CYP19A1) .....</b>	<b>43</b>
5.3 RAZLIKE MED SPOLOMA .....	44
<b>5.3.1 Aldo-keto reduktaza družine 1, član C6 (AKR1C6).....</b>	<b>44</b>
5.4 RAZLIKE ZNOTRAJ POSAMEZNIH STAROSTNIH SKUPIN.....	45
<b>5.4.1 Hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaza (HSD17B1).....</b>	<b>45</b>
<b>5.4.2 Steroid 5<math>\alpha</math> reduktaza 1 (SRD5A1).....</b>	<b>46</b>
<b>5.4.3 Citokrom P450, družina 19, poddružina A, polipeptid 1 (CYP19A1) .....</b>	<b>48</b>
<b>6 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>49</b>
6.1 VPLIV STAROSTI .....	50
6.2 VPLIV GENOTIPA .....	52
6.3 VPLIV SPOLA .....	52
<b>7 POVZETEK .....</b>	<b>53</b>
<b>8 VIRI.....</b>	<b>56</b>
<b>ZAHVALA</b>	

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Geni za encime, ki smo jih uporabili pri raziskavi (Gene, 2011) .....	34
<b>Preglednica 2:</b> Pregled skupin vzorcev vključenih v raziskavo .....	39



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Celične in molekulske interakcije med razvojem spolnih žlez (Koopman, 1999: 845).....	12
<b>Slika 2:</b> Biosinteza steroidnih hormonov v nadledvičnih in spolnih žlezah (Payne in Hales, 2004: 948).....	14
<b>Slika 3:</b> Encimska reakcija katalizirana z encimom aromatazo (Payne in Hales, 2004: 953). .....	17
<b>Slika 4:</b> Mesta izraženosti gena <i>Cyp19a1</i> v sagitalnem prerezu možganov pri 15,5 dni starih mišjih zarodkih (Cytochrome..., 2011).....	18
<b>Slika 5:</b> Zadnji koraki v presnovi estrogenov in androgenov (Mindnich in sod., 2004: 11). .....	21
<b>Slika 6:</b> Shematska predstavitev izražanja encimov udeleženih v nevrosteroidogenezo v odraslih možganih (Compagnone in Mellon, 2000: 16).....	22
<b>Slika 7:</b> Analiza relativne izraženosti gena <i>Hsd17b1</i> po starostnih skupinah. ....	40
<b>Slika 8:</b> Analiza relativne izraženosti gena <i>Srd5a1</i> po starostnih skupinah. ....	41
<b>Slika 9:</b> Analiza relativne izraženosti gena <i>Akr1c6</i> po starostnih skupinah. ....	42
<b>Slika 10:</b> Analiza relativne izraženosti gena <i>Cyp19a1</i> po starostnih skupinah. ....	43
<b>Slika 11:</b> Analizo relativne izraženosti gena <i>Akr1c6</i> po genotipih. ....	44
<b>Slika 12:</b> Analiza relativne izraženosti gena <i>Hsd17b1</i> pri 14,5 dni starih zarodkih. ....	45
<b>Slika 13:</b> Analiza relativne izraženosti gena <i>Srd5a1</i> pri 14,5 dni starih zarodkih. ....	46
<b>Slika 14:</b> Analiza relativne izraženosti gena <i>Srd5a1</i> pri 14,5 dni starih zarodkih. ....	47
<b>Slika 15:</b> Analiza relativne izraženosti gena <i>Cyp19a1</i> pri 16,5 dni starih zarodkih. ....	48

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>Okrajšava</b>	<b>Pomen</b>
46XX	oznaka normalne človeške garniture kromosomov za žensko
46XY	oznaka normalne človeške garniture kromosomov za moškega
ACTB	aktin, beta
AKR	aldo-keto reduktaze
AKR1C6	aldo-keto reduktaza družine 1, član C6
ArKO	miši z izbitim genom <i>Cyp19</i> (aromataza),
C57BL/6J	uradna oznaka linije miši
CAH	kongenitalna adrenalna hiperplazija (angl. congenital adrenal hyperplasia)
CD	kampomelična displazija (angl. campomelic dysplasia)
cDNK	komplementarna DNK
Ct	pražni cikel (angl. Cycle treshold)
CYP11A1/CYP11A/P450 <sub>sc</sub>	protein iz družine citokromov P450
CYP11B1	protein iz družine citokromov P450
CYP11B2	protein iz družine citokromov P450
CYP17A1/CYP17	protein iz družine citokromov P450
CYP19A1/CYP19	citokrom P450, družina 19, poddružina A, polipeptid 1
CYP21/CYP21A1	protein iz družine citokromov P450
DEPC voda	voda brez RNaz, obdelana z dietil pirokarbonatom (DEPC)
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHP	dihidroprogesteron
DHT	dihidrotestosteron
DNAza	deoksiribonukleaza
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid (dATP, dGTP, dCTP ali dTTP)
EtBr	etidijev bromid
GABA	4-aminomaslena kislina ali $\gamma$ -aminomaslena kislina
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
HMG	skupina visoko mobilnih proteinov (angl. high-mobility group)
HSD	hidroksisteroid dehidrogenaza
HSD17B1	hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaza 1
MHC1	kompleks glavne histološke kompatibilnosti razred 1 (angl. Major histocompatibility complex 1)
mRNK	sporočilna RNK
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
NR5A1	jedrni receptor poddružine 5, skupina A, član 1; sinonim: Sf-1 (angl. nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
qRT-PCR	verižna reakcija s polimerazo in obratnim prepisom v realnem času
RNAza	ribonukleaza

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

RNK	ribonukleinska kislina
rRNK	ribosomalna RNK (16S, 18S, 19S, 23S, 25S, 28S rRNK
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo in obratnim prepisom
SDN-POA	spolno dimorfno jedro preoptične regije
SF-1	steroidogeni faktor 1; sinonim: <i>Nr5a1</i>
SF-1 KO	miš z izbitim genom <i>Sf-1</i> (angl. <i>Sf-1</i> knock out)
SOX	(angl. Sry-box containing gene)
SRD5A1	steroid 5 $\alpha$ -reduktaza 1
SRY	spol-določujoča regija Y kromosoma (angl. sex-determining region Y)
TBE	tris boratni EDTA pufer
UNG	uracil-N-Glikozilaza
WT	divji tip miši (angl. wild type)

## SLOVARČEK

AKR1C6	Aldo-keto reduktaza družine 1, član C6 ali 3 $\alpha$ -hidroksisteroidna dehidrogenaza je multifunkcionalna reduktaza, ki metabolizira steroidne hormone in policiklične aromatske ogljikovodikove karcinogene. Reducira kortizol, progesteron in testosteron za kar potrebuje NADPH kot kofaktor. Sodeluje tudi pri tvorbi in znotraj celičnem transportu žolčnih kislin
ACTB	Aktin, beta je ena izmed oblik aktinov, ki so zelo ohranjeni proteini med vrstami, udeleženi v gibanje, skelet in integriteto celice. Ravno zaradi njegove ohranjenosti in bolj ali manj enakomerne izraženosti med celicami se gen za ACTB (hišni gen) pogosto uporablja kot notranja kontrola oz. kot referenčni gen pri qRT-PCR.
qRT-PCR	Verižna reakcija s polimerazo in obratnim prepisom v realnem času je izjemna relativno hitra metoda, s katero lahko merimo kvantitativne razlike v izražanju mRNK, tudi v primerih, ko je dostopna zelo majhna količina mRNK.
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza je zelo ohranjen encim udeležen v glikolizo. Gen za GAPDH se uporablja kot notranja kontrola pri qRT-PCR.
CYP19A1/CYP19	Citokrom P450, družina 19, poddružina A, polipeptid 1 ali aromataza je ena izmed encimov citokroma P450. Katalizira pretvorbo androgenov v estrogena (androstenedion v estron in testosteron v estradiol).
HSD17B1	Hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaza 1 je ena izmed izoencimov 17-beta hidroksisteroidnih dehidrogenaz, ki nadzorujejo zadnji korak pri tvorbi vseh androgenov in estrogenov in so zato ključni encimi v razvoju, rasti in delovanju reproduktivnih tkiv pri obeh spolih.
SRD5A1	Steroid 5 $\alpha$ -reduktaza 1 je pomemben encim, ki med drugim katalizira pretvorbo testosterona v njegov aktivni metabolit dihidrotestosteron (DHT), pretvorbo progesterona v 5 $\alpha$ -dihidroprogesteron.
SF-1	Steroidogeni faktor 1 je staro ime za NR5A1 in je pomemben prepisovalni dejavnik. Miši brez gena <i>Sf-1</i> se rodijo brez spolnih in nadledvičnih žlez, z nedelujočimi gonadotropnimi celicami v hipofizi ter s spremenjenim ventromedialnim jedrom v hipotalamusu. Med embrionalnim razvojem niso izpostavljene lastnim steroidnim hormonom iz spolnih žlez in predstavljajo odličen model za preučevanje razvoja in delovanja centralnega živčnega sistema neodvisno od spolnih žlez.
Steroidogeneza	Steroidogeneza je biosinteza steroidnih hormonov. Steroidni hormoni so derivati holesterola in se lahko tvorijo v različnih

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

Neurosteroidogeneza	tkivih (najpomembnejše so nadledvična železa, spolne žleze in placenta). Med steroidne hormone spadajo glukokortikoidi, mineralokortikoidi, androgeni, estrogeni in progestageni. Steroidogeneza, ki poteka znotraj centralnega živčnega sistema. Namreč možgani sami so tudi sposobni tvorbe steroidnih hormonov.
Citokromi P450	Citokromi P450 predstavljajo veliko družino hemskih proteinov, ki jih najdemo v vseh vrstah od bakterije do človeka. Opravljajo različne naloge: sodelujejo pri presnovi raznih zdravil in aditivov; steroidogenezi; presnovi maščobnih kislin in tudi pri pretvorbi prokancerogenih, promutagenih in ostalih škodljivih genotoksičnih komponent.

## 1 UVOD

Encimi, ki sodelujejo pri presnovi steroidnih hormonov imajo zelo pomembno vlogo v mišjih možganih v času prenatalnega razvoja. Steroidni hormoni, ki se tvorijo v živčnih tkivih (imenovani tudi nevrosteroidni hormoni), so udeleženi pri razvoju živčnih celic. Sodelujejo pri nadzoru mnogih vedenjskih, nevroendokrinih in metabolnih procesih kot je urejanje prehranjevanja, gibanja, agresivnosti, tesnobe, depresije in nadzor telesne temperature ter krvnega pritiska. Poleg tega so odgovorni tudi za razvoj večine značilnosti moških možganov (Do Rego in sod., 2009; Mensah-Nyagan in sod., 1999; Nelson, 2005).

Miši brez gena *Nr5a1* (jedrni receptor poddružine 5, skupina A, član 1; v nadaljevanju naloga je uporabljen sinonim *Sf-1*), se rodijo brez spolnih in nadledvičnih žlez, poleg tega pa imajo tudi nepravilno razvito ventromedialno jedro v hipotalamusu, ki je eno od mest izražanja steroidnih encimov ((Ikeda in sod., 1995; Luo in sod., 1995; Shinoda in sod., 1995).

V tem diplomskem delu smo preučili izraženost aromataze (uradni simbol in polno ime: CYP19A1, citokrom P450, družina 19, poddružina a, polipeptid 1), 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze (uradni simbol in polno ime: HSD17B1, hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaza 1), 3 $\alpha$ -hidroksisteroid dehidrogenaze (uradni simbol in polno ime: AKR1C6, aldo-keto reduktaza družina 1, član C6) in 5 $\alpha$ -reduktaze (uradni simbol in polno ime: SRD5A1, steroid 5 alfa-reduktaza 1) v možganih zarodkov miši divjega tipa in jih primerjali z izraženostjo pri miših brez gena *Sf-1*. Ugotoviti smo želeli ali obstajajo razlike v izraženosti teh encimov med spoloma, med različnimi starostmi zarodkov in ali so prisotne razlike med mišmi divjega tipa in mišmi brez gena *Sf-1*. Izraženost encimov smo merili preko sporočilne ribonukleinske kisline (mRNK) z metodo verižne reakcije s polimerazo in obratnim prepisom v realnem času (qRT-PCR).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ENDOKRINI SISTEM IN HORMONI

#### 2.1.1 Osnovne definicije

Beseda endokrini je grškega izvora in se razdeli na *endon*, ki pomeni 'v ali znotraj' in *krinein*, ki pomeni 'sprostiti, osvoboditi' (Nelson, 2005). Endokrini sistem je tako sistem žlez z notranjim izločanjem in drugih tkiv ter organov, ki s svojimi izločki povezujejo delovanje organizma v skladno celoto (Cestnik, 1996). Pojem hormon prav tako izhaja iz grške besede in pomeni 'vzburiti'. Hormoni so organske kemične molekule, ki nastajajo v endokrinih žlezah in se sproščajo neposredno v krvni obtok. Po krvi potujejo do tarčnih tkiv ali organov, na katere delujejo. Endokrinologija je znanstvena veda, ki preučuje endokrine žleze in njihove hormone (Nelson, 2005).

Hormone glede na kemično zgradbo lahko razdelimo na peptidne hormone, steroidne hormone, derivate aminokislin (kot so kateholamini in ščitnična hormona tiroksin in trijodtironin) in ostale kemične spojine (npr. prostaglandini, histamin, serotonin, kinini,...) (Cestnik, 1996).

Poleg endokrinih žlez pa tudi številna druga tkiva in celo nekatere novotvorbe izločajo hormone ali snovi, ki delujejo kot hormoni. Zato avtorji govorijo o tkivnih (aglandularnih) hormonih. V številnih notranjih organih se nahajajo posamezne endokrine celice ali skupki teh. Poznamo pa tudi poseben tip hormonov, ki jih imenujemo nevrohormoni, za katere je značilno, da se izločajo iz nevronov in ne iz žlez. Nevroendokrinologija je torej posebna znanstvena veda, ki preučuje povezave med živčnim in endokrinim sistemom (Nelson, 2005).

Med endokrine žleze spadajo: hipotalamus, hipofiza, ščitnica, trebušna slinavka, nadledvični žlezi, češarika, spolne žleze ali gonade (testisi ali moda pri samcih; jajčniki pri samicah), placenta ali posteljica (začasen endokrini organ) (Nelson, 2005).

### **2.1.2 Hipotalamus**

Hipotalamus je del osrednjega živčnega sistema in je s številnimi živčnimi potmi povezan z višjimi centri. Poleg funkcij v zvezi s hranjenjem (center za lakoto in sitost, center za žejo), bioritmiko, obnašanjem (agresivnost, spanje in budnost), uravnavanjem telesne temperature in vodenjem delovanja avtonomnega živčevja predstavlja povezavo med živčnim in hormonalnim sistemom. Morfološko je majhno področje na bazi možganov. Nahaja se nad križiščem vidnih živcev in hipofizo. Njegov zgornji del predstavlja dno tretje možganske kletke, s hipofizo pa je povezan s hipofiznim pecljem. Številne aferentne in eferentne živčne povezave povezujejo hipotalamus s skorjo možganov, talamusom, limbičnim sistemom in hrbtenjačo (Cestnik, 1996).

Sestavljen je iz več zbirk teles živčnih celic ali nevronov, ki se imenujejo jedra. Informacije, ki jih prejema iz ostalih delov možganov se tako združijo po teh posameznih jedrih. Na bazi hipotalamusa in v osrednjem delu strukture se nahajajo nevroni, ki so specializirani za sproščanje kemičnih sporočevalcev. Čeprav je naloga teh nevrosekretornih celic primarno endokrina so morfološko povsem enake običajnim nevronom. Ti kemični sporočevalci, imenovani nevrohormoni, se sproščajo iz aksonov kot odgovor na živčne impulze na način, ki je podoben sproščanju živčnih prenašalcev, vendar se namesto v sinaptično špranjo sproščajo v krvne žile, ki vodijo do hipofize. Ta sistem komunikacije med hipotalamusom in hipofizo je eno od področij kjer so meje med endokrinim in živčnim sistemom zabrisane (Nelson, 2005).

Hipotalamus poleg endokrinega sistema pomembno spreminja aktivnost vegetativnega živčevja. Biološki pomen tega nadzora se pokaže pri različnih vzorcih vedenja. Če je le-to usmerjeno k prehranjevanju, se aktivira prebavni sistem predvsem prek parasimpatičnega živčevja. Obratno se mora pri borbi ali begu povečati prekrvavljenost skeletnih mišic in zmanjšati pretok skozi prebavila (prerazporeditev krvnega obtoka) predvsem prek aktivacije simpatičnega živčevja. Takšne vedenjske vzorce lahko izzovemo z draženjem v različnih predelih hipotalamusa (Štrucl, 1999).



Beseda vedenje označuje celokupno (motorično) dejavnost organizma, tako hoteno dejavnost kot izraz osebkove »volje«, kot tudi nagonsko obnašanje organizma, ki ga lahko nazorno opazujemo predvsem pri živalih. Električno draženje posameznih delov hipotalamusa sproži različne vzorce vedenja, ki zelo spominja na značilno obnašanje poskusne živali (prehranjevalno, spolno, napadalno obnašanje). Takšne stereotipne reakcije na električno draženje torej nakazujejo, da vsebujejo mreže hipotalamičnih nevronov prirojene programe za različne vedenjske vzorce, ki zajamejo somatični, vegetativni in hormonski sistem. Programi se priključijo ob ustreznem spletu notranjega in zunanega okolja ter ob ustreznih pobudah iz nadrejenih središč. Hkrati lahko ob draženju hipotalamusa ugotovljamo različna čustvena stanja poskusne živali v razponu od izrazite razdraženosti in sovražne razpoloženosti ali strahu do dobrodušne krotkosti. Toda hipotalamus pri opisanih vlogah nikakor ni neodvisen, temveč je pod neposrednim vplivom limbičnega sistema ter neokorteksa (Štrucl, 1999).

### 2.1.3 Hipofiza

Hipofiza ali možganski privesek (*hypophysis cerebri, glandula pituitaria*) je majhna žleza, ki leži v koščeni vdolbini lobanjskega dna, imenovani turško sedlo. Razdeljena je na tri področja: prednji (*pars anterior*), srednji (*pars intermedia*) in zadnji (*pars nervosa*) reženj. Srednjega režnja nimajo vsi organizmi. Funkcionalno pa razdelimo hipofizo na adenohipofizo in neurohipofizo. Neurohipofiza je nadaljevanje hipotalamusa, adenohipofiza pa je pravi žlezni del hipofize (Cestnik, 1996).

Hipotalamus komunicira s hipofizo na dva načina. Nevrohormoni iz hipotalamusa se sproščajo v prednji reženj hipofize preko hipotalamusnega-hipofiznega portalnega sistema (poseben krvni obtok, ki skrbi da teče kri primarno v eno smer: iz hipotalamusa v hipofizo). Druga skupina hipotalamusnih nevrosekretornih celic so dejansko del hipofize – jedra teh nevronov se nahajajo v hipotalamusu, njihovi aksonski podaljški, ki sproščajo hormone v krvni obtok, pa se nahajajo v zadnjem režnju hipofize. (Nelson, 2005).

#### **2.1.4 Nadledvični žlezi**

Parni nadledvični žlezi, ki sta elipsoidne oblike, se pri sesalcih in pticah nahajata na obeh straneh hrbtenice ob sprednji ploskvi ledvic. Pri samicah so navadno nekoliko večje kot pri samcih. Pri sesalcih je histološko vsaka žleza razdeljena na skorjo in sredico. Skorja in sredica izločata različne hormone (Cestnik, 1996).

Sredica nadledvične žleze je sestavljena iz kromafinskih celic, ki se tako imenujejo zato, ker imajo visoko afiniteto do barvil. Te celice izvirajo iz primitivnega živčnega tkiva, natančneje iz postganglijskih simpatičnih nevronov v času embrionalnega razvoja, po rojstvu pa delujejo kot del avtonomnega živčnega sistema (Nelson, 2005). Sredica nadledvične žleze izloča kateholamine: adrenalin (epinefrin), noradrenalin (norepinefrin) in dopamin. Kateholamini imajo na organizem večstranski učinek. Sodelujejo v intermediarnem metabolizmu in pri procesih, s katerimi organizem premaga akutni stres (Cestnik, 1996).

Skorja nadledvične žleze je pri sesalcih zgrajena iz treh plasti: zunanja klobčičasta (zona glomerulosa), vmesna snopičasta (zona fasciculata) in notranja mrežasta cona (zona reticularis) (Nelson, 2005). Skorja nadledvične žleze izloča steroidne hormone. Skupno število teh hormonov je okoli 30, vendar številni med njimi nimajo posebnega fiziološkega pomena. Glavne skupine hormonov skorje nadledvične žleze so: mineralokortikoidi, glukokortikoidi in spolni hormoni (Cestnik, 1996).

Človeški zarodek ima zelo velike nadledvične žleze, v katerih so našli tudi četrto plast, ki pri odraslih ljudeh ni prisotna. Tako med razvojem plodu zona glomerulosa, zona fasciculata in zona reticularis predstavljajo le 20% skorje nadledvične žleze, ostalih 80% pa predstavlja zarodna cona (fetal zone). Ta začne takoj po rojstvu izginjati in njena funkcija ostaja nepojasnjena. Pri ostalih živalih se takšna cona sicer ne razvije, vendar pa prav tako ob rojstvu najdemo zelo podobno plast celic, ki so jo poimenovali cona X (Nelson, 2005). Pri mačkah cona X izloča gonadotropine, vendar pa s puberteto izgine (Cestnik, 1996).

## 2.1.5 Spolne žleze ali gonade

Spolne žleze so različne pri moških in ženskih živalih. Pri samicah je spolna žleza jajčnik ali ovarij, pri samcih moda ali testisi. Poleg hormonov izločajo tudi spolne celice. Spolne žleze tvorijo in izločajo moške in ženske spolne hormone. Ti so po strukturi steroidni. Vpliv spolnih hormonov na organizem je dvojen. Po eni strani vplivajo na spolne organe, po drugi pa na rast in razvoj celotnega telesa (presnova, pojav telesnih znakov, značilnih za posamezni spol, sekundarni spolni znaki) (Cestnik, 1996).

### 2.1.5.1 Moda

Moda sta parni žlezi, ki se nahajata pri večini sesalcev v posebni vrečki, zunaj telesa, ki se imenuje mošnja ali skrotum. Pri ostalih vretenčarjih jih najdemo znotraj trebušne votline. Sestavljena so iz različnih tipov celic. Semenski kanalčki so dolge zvite cevke, skozi katere gredo semenčice skozi različne razvojne faze med dozorevanjem (spermatogeneza).. Sertolijeve celice, ki se nahajajo ob membrani semenskih cevčic skrbijo za hranjenje razvijajočih semenčic. Celice, ki proizvajajo hormone v modih se imenujejo Leydigove celice in so razpršene med semenskimi kanalčki. Leydigove celice tvorijo steroidne hormone, primarno androgene, pod vplivom hipofiznih gonadotropinov (Nelson, 2005).

V Leydigovih celicah se izloča predvsem testosteron. V celicah ciljnih organov se testosteron pod vplivom encima  $5\alpha$  reduktaze pretvori v  $5\alpha$ -dihidrotestosteron, ki je pravi hormon, testosteron je le njegova predstopnja (prekurzor). Vpliva na rast semenskih kanalčkov, proces spermatogeneze in razvoj prostate ter drugih akcesornih spolnih žlez. Vpliva tudi na razvoj sekundarnih spolnih znakov, kot so npr.: oblika in velikost telesa (samci so višji, bolj mišičasti), rast grive (lev, bizon), rast rože oz. grebena pri kokoših, rast rogov pri jelenjadi,... Med delovanje moških spolnih hormonov sodijo tudi: vpliv na obnašanje živali v času parjenja (dvorjenje), akt parjenja (erekcija in ejakulacija) in agresivnost samcev. Na metabolizem vpliva tako, da pospešuje oksidacijske procese in pospešuje tvorbo beljakovin predvsem v mišicah (anaboličen učinek) (Cestnik, 1996).

### 2.1.5.2 Jajčniki

Pri sesalcih sta jajčnika parni žlezi, ki ležita na hrbtni strani trebušne votline, pod ledvicami. Kot moda tudi jajčniki izločajo spolne celice in hormone. Delovanje obeh funkcij v jajčnikih je v obliki ciklusa, medtem ko je delovanje mod stalno tako pri tvorbi semenčic in kot tudi pri sekretornih aktivnostih med paritveno sezono (Nelson, 2005).

Pri sesalskih samicah ločimo dve obliki reprodukcijskih ciklusov: menstrualni ciklus in pojatveni (gonitveni) ciklus. Pri živalih, pri katerih je spolna dovzetnost omejena na določena obdobja, govorimo o pojatvenih ciklikih. Pri primatih, ki so spolno dovzetni skoraj ves čas ciklusa, pa se uporablja izraz menstrualni ciklus, po pojavu menstruacije, ki predstavlja začetek ciklusa (Cestnik, 1996). Jajčnik ima tri funkcionalne enote: folikel (vsak vsebuje razvijajoče jajčece), rumeno telo (struktura, ki se razvije iz folikla po sprostitvi jajčeca) in stroma (podporno tkivo) (Nelson, 2005). V jajčniku potekajo procesi, zaradi katerih razdelimo dogajanja v njem na dve fazi, ki ju med seboj loči ovulacija. To sta folikularna faza in lutealna faza. Za prvo fazo je značilen razvoj jajčnih foliklov z istočasnim razvijanjem jajčne celice, za drugo pa nastanek in rast rumenega telesa (Cestnik, 1996).

Ženske spolne hormone razdelimo na tiste z estrogenim in tiste z gestagenim delovanjem. Estrogeni hormoni nastajajo v jajčnem foliklu, ki se razvije v jajčniku. Najpomembnejši hormon te skupine je  $17\beta$ -estradiol, ki nastaja pri nebrehjih, in estron, ki nastaja v telesu brejih živali. Pri primatih se izloča tudi estriol. Estrogeni hormoni vplivajo na razvoj ženskih spolnih organov, predvsem maternice v smislu pospeševanja razvoja maternične sluznice in njene priprave na sprejem zarodka (proliferacijska faza). V mlečni žlezi vplivajo na razvoj mlečnega tkiva in kanalčkov. Ker se tvorijo tudi v placenti ali posteljici, se koncentracija estrogenov povečuje med brejostjo, doseže največjo koncentracijo pred porodom, nato naglo pade. Estrogeni vplivajo tudi na sproščanje prostaglandinov skupine  $F2\alpha$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), zaustavljajo rast kosti pospešujejo proteinski anabolizem in rast epitelijskega tkiva. Vplivajo tudi na obnašanje živali med pojatvenim ciklusom (Cestnik, 1996).

Gestageni nastajajo v celicah granulose jajčnikov oz. v rumenem telesu, ki se razvije na mestu folikla po ovulaciji. Najpomembnejši gestagen je progesteron. Progesteron skupaj z estradiolom vpliva na razvoj ženskih spolnih organov, predvsem maternice (sekretorna faza). Tu se nadaljuje razvoj maternične sluznice, prične njeno izločanje in s tem zaključna priprava na sprejem oplojenega jajčeca. Progesteron vpliva tudi na mlečno žlezo, zlasti na razvoj mlečnega tkiva. Pri brejih živalih pa vpliva tudi na obnašanje (Cestnik, 1996).

### **2.1.6 Placenta ali posteljica**

Poleg vloge pri preskrbi zarodka s hranilnimi snovmi in kisikom ter vloge pri odstranjevanju ogljikovega dioksida in presnovkov ima placenta pomembno vlogo kot organ z notranjim izločanjem (Cestnik, 1996). Placenta je začasen endokrini organ, ki se razvije v maternici v času brejosti pri sesalcih. Izoblikuje se iz tkiv blastociste (zarodka) in materničnega tkiva (Nelson, 2005).

Placenta izloča tri vrste hormonov: gonadotropne hormone (ki so po učinku podobni hormonom prednjega režnja hipofize), relaksin ter spolne steroidne hormone (estrogen in progesteron). Gonadotropni hormoni in relaksin so polipeptidni hormoni (Cestnik, 1996).

## **2.2 RAZLIKE MED SPOLOMA IN VEDENJE**

### **2.2.1 Določitev spola in diferenciacija**

Ženske in moški se razlikujemo. Zato pravimo, da smo ljudje, kot tudi mnoge ostale živali, spolno dimorfni (di, "dva"; morph, "tip") v velikosti in obliki teles, fiziološko in tudi v vedenju. Vedenje fantov in deklet se razlikuje v mnogih smereh. Dekleta na splošno prekašajo fante v svojih verbalnih sposobnostih; za fante je skoraj dvakrat večja verjetnost, da trpijo za disleksijo (problem pri branju) in da jecljajo. Medtem, ko so fantje na splošno boljši od deklet pri nalogah, ki zahtevajo prostorsko predstavo. Dekleta imajo pogosteje prehranske motnje, namreč preko 90% anoreksije zadane mlade ženske. Mladi moški dvakrat pogosteje trpijo za shizofrenijo kot mlade ženske (Nelson, 2005). Fantje so agresivnejši in se že kot otroci na splošno raje igrajo na bolj grobe načine kot dekleta. Obstoja teorija, ki predvideva, da na razvoj vedenja tipičnega za spol vpliva izpostavljenost

zarodka spolnim hormonom v obdobju pred rojstvom. Raziskovalci, ki so primerjali način igranja otrok s kongenitalno adrenalno hiperplazijo (CAH, avtosomalna recesivna motnja, ki povzroči pomanjkanje encimov, ki so potrebni za tvorbo steroidnih hormonov v nadledvični žlezi) z načinom igranja zdravih otrok so ugotovili, da ta povezava ni konstantna. Ena možnost, zakaj pride do variabilnosti je, da obstajajo različna kritična obdobja vpliva hormonov na pojav različnih vedenj tipičnih za spol. Druga možnost pa je ta, da kljub temu da na določene oblike vedenja vplivajo hormoni med razvojem, pa na druge oblike bolj vplivajo drugi dejavniki, kot sta socialno in kulturno okolje (Hines in Kaufman, 1994).

K oblikovanju hipoteze o vplivu hormonov v obdobju pred rojstvom na spolno identiteto so prispevale tudi študije na poskusnih živalih. Hipoteza temelji na opaženju, da na ravnotežje med moškim in ženskim paritvenem in drugimi reprodukcijskimi vedenji pri živalih močno vpliva stopnja in čas zgodnje izpostavljenosti androgenom. Vplivi se kažejo pri fizioloških, morfoloških in vedenjskih lastnostih. Za anatomske razlike med spoloma v posameznih področjih možganov glodavcev vključene v urejanje teh vedenj, pa se je izkazalo, da so odvisne od podobnih hormonov v času razvoja. Največ študij nevroanatomskih razlik med spoloma je bilo narejeno na spolnem dimorfem jedru v predoptičnem področju (SDN-POA) pri podganah, ki je eno od jeder hipotalamusa. Homologno SDN-POA najdemo tudi pri primatih in ljudeh, kjer ga običajno imenujemo tretje intersticijsko jedro sprednjega hipotalamusa in je večje pri moških kot pri ženskah. Poročali so tudi, da se razlikuje glede na spolno usmerjenost, torej da je večje pri ginofilnih kot pri androfilnih posameznikih. Spolna usmerjenost se nanaša na erotično privlačnost. Androfilni ljudje so tisti, ki jih privlačijo moški, ginofilne privlači ženski spol, biseksualne pa privlačita oba spola. Poleg tega so opazili tudi, da se velikost spodnjega jedra končne strije (bed nucleus of the stria terminalis) razlikuje med spoloma pri podganah in ljudeh v povezavi s spolno identiteto, vendar ne glede na spolno orientacijo. Jedra so bila večja pri ljudeh, ki so se identificirali za moške, ne glede na njihov genetski, fizični ali hormonski status oz. spolno orientacijo. Te študije na ljudeh pa zahtevajo dodatne poglobljene raziskave, saj do sedaj še ni empiričnih podatkov, ki bi dokazovali odvisnost domnevnih razlik v hipotalamusu od vpliva predrojstvenih hormonov pri ljudeh (Byne, 2006).

### 2.2.2 Diferenciacija spolnih žlez

Razvoj samih spolnih žlez je edinstven v embriologiji, ker se iz popolnoma enake zasnove, ki jo imenujemo bipotencialna spolna žleza lahko razvijejo moda ali jajčniki. Pri miših se ta bipotencialna spolna žleza izoblikuje malo pred dnevom 10,5 po oploditvi (E10,5), ki se kaže kot zadebelitev celomičnega epitelijskega v bližini mezonefrosa, sestavljena iz somatskih celic in predhodnic spolnih celic. Razvoj moda iz bipotencialne spolne žleze nato usmerja en sam gen na kromosomu Y, imenovan *Sry* ali s polnim imenom spol-določajoče področje kromosoma Y. *Sry* se prepíše v protein, ki se veže z DNK in spada v družino visoko mobilnih proteinov (HMG), ki so potrebni za uspešen razvoj mod. Če gen *Sry* ni prisoten se tako XX kot tudi XY spolne žleze razvijejo v jajčnike. Izražanje *Sry* v mišjem zarodku se začne kmalu po dnevu 10,5 po oploditvi (E10,5), doseže vrh 36 ur pred najzgodnejšo histološko zaznano diferenciacijo testisov in pade do dneva 12,5 po oploditvi (E12,5). Po načelu avtonomnosti celic, *Sry* začne razvoj samca s tem, da povzroči, da se podporna plast celic izoblikuje v Sertolijeve namesto v folikularne celice. Sertolijeve celice nato pričnejo celične in morfološke spremembe kot so: izoblikovanje strukture mod, migracija celic iz mezonefrosa, ožiljevanje in diferenciacija Leydigovih celic (Nef in sod., 2005).

Čeprav je bilo narejenih veliko raziskav v zvezi s spolno diferenciacijo samca, so specifični molekularni mehanizmi po katerih se tvorijo spolne žleze in še posebej narava kaskade transkripcijskih dogodkov, ki jih zažene *Sry*, zelo slabo znani. Ključni urejevalci razvoja bipotencialne spolne žleze v obeh spolih so med drugimi: steroidogeni dejavnik 1 (*Sf-1*), dejavnik Wilmsonevega tumorja 1 homolog (*Wt1*), *Lhx9* in *Emx2* (Nef in sod., 2005). V primeru miši, ki nimajo gena *Sf-1*, se razvoj spolnih žlez začne normalno, vendar zametek odmre (apoptoza) do dneva 12,5 po oploditvi (E12,5), kar kaže na to, da je *Sf-1* potreben za diferenciacijo in vzdrževanje ter rast somatskih celic v razvijajoče se spolne žleze (Luo in sod., 1994). V zadnjih nekaj letih je bilo odkritih še kar nekaj genov, ki urejajo razvojno pot samca, npr. *Sox9*, *Dmrt1*, *Fgf9*, *Dhh*, *Sox8* in *Nr0b1* (sinonim: *Dax1*),... (Nef in sod., 2005) *Sry* je torej le eden od genov družine povezane s HMG proteini. Ti geni so znani pod imenom *Sox* (SRY-box containing gene). Geni *Sox* so bili najdeni v mnogih živalskih vrstah, a so najboljše okarakterizirani pri miših. Študije izražanja, eksperimenti z gensko spremenjenimi mišmi in identifikacije mutacij v številnih

človeških obolenjih kažejo, da so *Sox* geni pomembni za diferenciacijo in za delovanje številnih celičnih tipov med embrionalnim razvojem. *Sox9* je še posebej pomemben pri določitvi spola. Izražanje *Sox9* je bilo najprej opaženo na mestih hondrogeneze (razvoj hrustančnega tkiva) pri mišjih zarodkih. Pri ljudeh so heterozigotni defekti v *SOX9* povezani s porušeno kostno morfologijo pri sindromu imenovanem kampomelična displazija (campomelic dysplasia, CD). Velik del CD pacientov z XY genotipom kaže ženski fenotip, kar je dokaz pomembne vloge *SOX9*, ne le v razvoju skeleta, vendar tudi v določitvi moškega spola (Koopman, 1999).

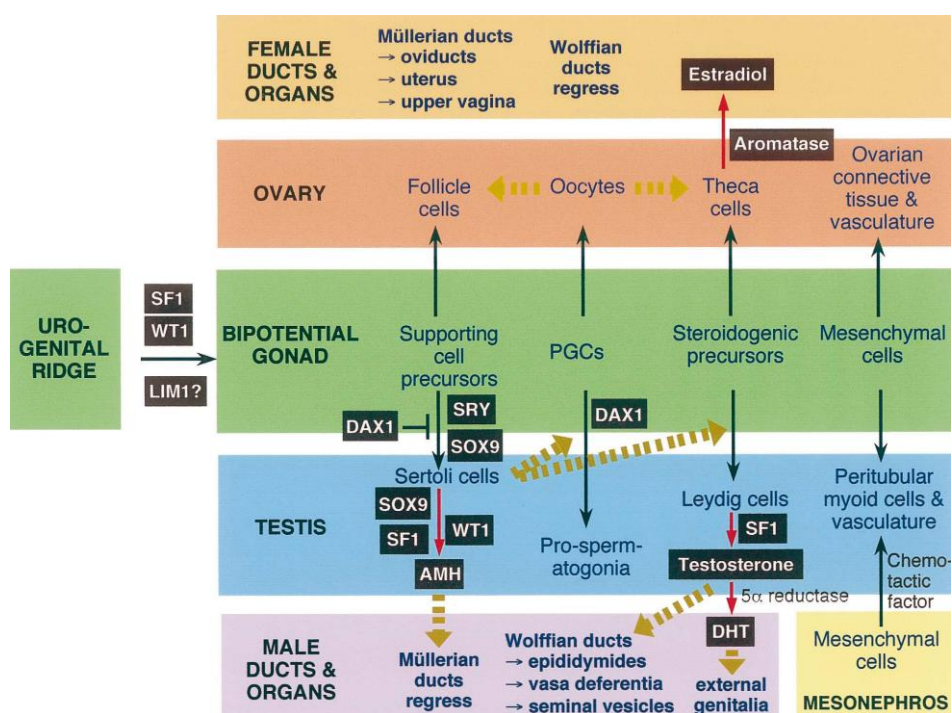
Molekularna patogeneza pacientov z 46 XY genotipom, vendar z nerazvitimi spolnimi žlezami ali obratni spol pri 46 XY moških, ki so fenotipsko ženske ali pa pacienti z 46 XX genotipom, vendar z izraženima obema spoloma (hermafroditi) ostaja precej nerazumljiva pri več kot 75% pacientov, torej mora obstajati še precej genov, ki vplivajo na določitev spola, ki jih še nismo odkrili (Nef in sod., 2005).

Dogodki na molekularnem nivoju pri razvoju jajčnikov pa so še precej manj raziskani. Več kot 50 let je namreč veljalo, da je razvoj v žensko samodejna pot, glede na opaženje, da gen *Sry* sproži razvoj moškega, medtem ko se ženska pot nadaljuje v odsotnosti moških signalov. Trenutno veljaven model determinacije ženskega spola predlaga, da se razvojna pot jajčnikov sproži, ko spolne celice preidejo v mejozo. Avtonomni vstop spolnih celic v mejozo torej sproži razvoj jajčnikov in blokira razvoj testisov. Gen *Sry* zavre to pot s tem, da sproži izoblikovanje jedra testisov in izolira spolne celice znotraj jedra testisov ter s tem blokira mejozo. Čeprav ženski analogni gen gena *Sry*, še ni bil odkrit, je očitno, da se specifični program razvoja jajčnikov tudi nekako sproži. Žal je zelo malo znanega o molekularnem urejanju zgodnjega razvoja jajčnika. Le nekaj genov s specifičnim izražanjem pri ženskah je bilo že povezanih neposredno z zgodnjimi dogodki razvoja in delovanja jajčnikov, npr. *Fst*, *Wnt4*, *Bmp2*, *Nr0b1*,... (Nef in sod., 2005).

Na Sliki 1 je prikazan preprost shematski diagram medsebojnih vplivov med celicami in molekulami med določitvijo spola in razvojem spolnih žlez.



Fabjan T. Časovne spremembe v izražnosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011



Slika 1: Celične in molekulske interakcije med razvojem spolnih žlez (Koopman, 1999: 845).

OPIS SLIKE: Poti celične diferenciacije in migracije so označene s črnimi puščicami, biosintetske poti z rdečimi puščicami, hormone ali neznane signalne poti pa z velikimi prekinjenimi puščicami. Efektorski geni oz. produkti genov so v rjavih okvirjih (DHT je kratica za dihidrotestosteron)

### 2.3 STEROIDOGENEZA

Steroidogeneza je biosinteza (tvorba) steroidnih hormonov (Mosby's Medical Dictionary, 2009). Steroidni hormoni so derivati holesterola. Tvorijo se lahko v različnih tkivih, najpomembnejša med njimi pa so nadledvična in spolne žleze ter placenta. Prekursor holesterola se tvori v celici iz acetata ali iz zalog holesterolnih estrov v intracelularnih lipidnih veziklih ali pa iz privzetih lipoproteinov z nizko gostoto, ki tudi vsebujejo holesterol. Steroidne hormone delimo v 5 skupin:

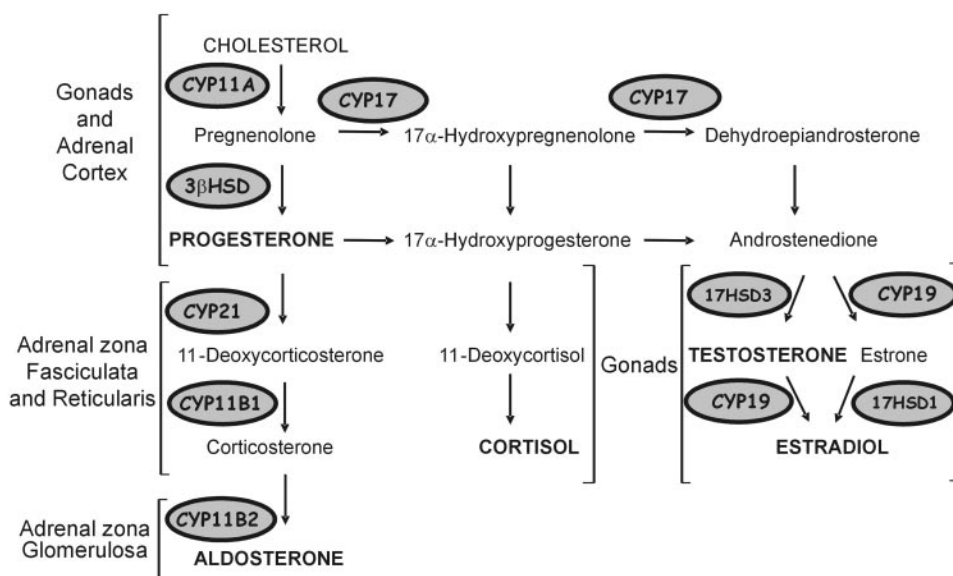
1. Glukokortikoidi: npr. kortizol
2. Mineralokortikoidi: npr. aldosteron
3. Androgeni: npr. testosteron
4. Estrogeni: npr. estradiol in estron
5. Progestageni (tudi znani kot progestini): npr. progesteron

Holesterol se v prvem koraku z encimom CYP11A1 (ali P450<sub>sc</sub>), pretvori v pregnenolon. Pregnenolon sam ni hormon, ampak vmesni prekurzor za tvorbo vseh ostalih steroidnih hormonov (Bowen, 2001). Pregnenolon nato preide v progesteron, ki se izloča kot hormon ali pa spet služi kot prohormon za nadaljnjo tvorbo drugih steroidnih hormonov. V modih in jajčnikih se 17 $\alpha$  hidroksipregnenolon in 17 $\alpha$  hidroksiprogesteron spremenita v dihidroepiandrosteron in androstenedion, ki se nato pretvorita v testosteron. Testosteron je predstopnja za estrogene, ki jih izloča jajčnik (Cestnik, 1996)..

V skorji nadledvične žleze pa se večina pregnenolona pretvori v 17 $\alpha$  hidroksipregnenolon in 17 $\alpha$  hidroksiprogesteron, progesteron pa se predvsem pretvori v 11-deoksikortikosteron. Iz njega nastane v zoni fascikulati kortikosteron, v celicah zone glomeruloze pa aldosteron. 17 $\alpha$  hidroksiprogesteron preide v 11-deoksikortizol, iz katerega nastane kortizol. Iz 17 $\alpha$  hidroksiprogesterona nastanejo v skorji nadledvične žleze tudi androgeni in estrogeni (Cestnik, 1996).

Encimi iz skupine citokromov P450, ki so udeleženi v biosintezi steroidnih hormonov so membransko vezani proteini, bodisi v mitohondrijskih membranah (CYP11A1 ali s starim simbolom CYP11A, CYP11B1 in CYP11B2) ali pa jih najdemo v endoplazmatskem retikulumu (mikrosomi), takšni pa so CYP17A1 ali s starim simbolom CYP17, CYP19A1 ali s starim simbolom CYP19 in CYP21A1 ali s starim simbolom CYP21. Slika 2 prikazuje shematsko potek celotne steroidogeneze v posameznih tkivih (Payne in Hales, 2004).

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011



Slika 2: Biosinteza steroidnih hormonov v nadledvičnih in spolnih žlezah (Payne in Hales, 2004: 948).

Vse te encime lahko razdelimo v dve veliki družini proteinov: že omenjeni citokromi P450 in ostali, med katere spadajo tudi hidroksisteroid dehidrogenaze.

## 2.4 NEVROSTEROIDOGENEZA

Izkazalo se je, da steroidni hormoni vplivajo tudi na živčni sistem. Igrajo pomembno vlogo v razvoju, rasti, dozorevanju in diferenciaciji tako centralnega živčnega sistema kot tudi perifernega. Dolgo časa je veljalo, da so endokrine žleze, kot so skorja nadledvične žleze, spolne žleze in placenta, edini vir steroidov, ki vplivajo na možgane, saj ti zlahka prehajajo krvno-možgansko prepreko. Več raziskav pa je pokazalo, da so tudi podganji možgani sposobni tvorbe različnih steroidov kot sta pregnenolon in dehidroepiandrosteron (DHEA) iz holesterola. Najprej so demonstrirali prisotnost visokih koncentracij pregnenolona in DHEA v možganih podgan, katerim so odstranili nadledvične in spolne žleze. V naslednjem koraku so ugotovili, da na koncentraciji pregnenolona in DHEA v možganih ne vpliva povišanje koncentracije hormonov, ki spodbujajo delovanje nadledvične žleze (adrenokortikotropni hormoni), niti zmanjšanje koncentracije glukokortikoidov v krvi z dexametazonom. Pokazali so tudi, da stopnje pregnenolona in DHEA v možganih nihata preko dneva, vendar ne sinhrono s steroidnimi hormoni v krvi. Z imunohistokemično

metodo so dokazali, da se encim citokrom CYP11A1 (cepilec stranske verige holesterola), nahaja v podganjih možganih in je biološko aktiven, kar je dokončno potrjuje dejstvo, da se steroidni hormoni lahko tvorijo v centralnem živčnem sistemu. Tako je bil postavljen pojem nevrosteroidni hormon. To je steroidni hormon, ki se na novo tvori iz holesterola ali katerega drugega prekursorja, v živčnem sistemu in je v telesu še vedno prisoten po odstranitvi perifernih steroidogenih žlez (Mensah-Nyagan in sod., 1999).

*In vivo* študije so pokazale, da so nevrosteroidni hormoni udeleženi v urejanje različnih nevrofizioloških in vedenjskih procesov, vključno z učenjem, bujenjem, stresom, depresijo, strahom in spanjem (Mensah-Nyagan in sod., 1999).

## 2.5 JEDRNI RECEPTOR PODDRUŽINE 5, SKUPINA A, ČLAN 1 (NR5A1) ALI STEROIDOGENI FAKTOR 1 (SF-1)

Jedrna družina hormonskih receptorjev vsebuje skupino prepisovalnih dejavnikov, ki uravnavajo aktivacijo različnih ligandov: steroidnih hormonov, ščitničnih hormonov, vitamina D in retinoidov (Mangelsdorf in sod., 1995). Ker za nekatere prepisovalne dejavnike še ne poznamo ligandov, ki jih aktivirajo, jim pravimo, da so osiroteli. Eden izmed teh je steroidogeni faktor 1 (SF-1) ali z uradnim imenom jedrni receptor poddružine 5, skupina A, član 1 (NR5A1). Za SF-1 je najprej veljalo, da je odgovoren za tkivno specifično izražanje genov udeleženi v steroidogenezo, od tod tudi njegovo staro ime. Kasneje so s študijami na gensko spremenjenih miših, ki imajo nedelujoč gen *Sf-1* (SF-1 knock out miši ali *Sf-1* KO) dokazali, da ima še več pomembnih vlog. Bistveno je urejanje osi hipotalamus-hipofiza-steroidogeni organi na različnih stopnjah, pa tudi kompleksnih procesov v endokrini diferenciaciji (Parker in Schimmer, 1997). Genotipizacija potomcev heterozigotnih *Sf-1* miši (okvarjen je le en alel gena *Sf-1*) kaže, da so potomci z genotipom *Sf-1* KO v pričakovanem razmerju 1:4 z ostalimi. Torej sam SF-1 ni nujno potreben za preživetje *in utero*. Tudi ob kotitvi so *Sf-1* KO mladiči ne razlikujejo od normalnih (divji tip; wild-type; WT). 12 ur po kotitvi pa začnejo *Sf-1* KO miši kazati znake izčrpanosti in poginejo do najkasneje 8. dne starosti. Mladičke lahko obdržimo pri življenju z injekcijami glukokortikoidov in mineralokortikoidov, kar dokazuje, da je vzrok smrti nedelujoča

nadledvična žleza (Luo in sod., 1995). Izkazalo se je, da *Sf-1* KO miši sploh nimajo nadledvične in spolnih žlez. Živali obeh spolov imajo ženske spolne organe, tako zunanje kot notranje (jajcevodi, maternica in vagina). To dokazuje ključno vlogo faktorja SF-1 v razvoju primarnih steroidogenih tkiv (Luo in sod., 1994; Sadovsky in sod., 1995).

*Sf-1* se torej izraža v spolnih žlezah, nadledvični žlezi, hipofizi in tudi v možganih (Ikeda in sod., 1994). V možganih je izražanje *Sf-1* omejeno na ventromedialno jedro v hipotalamusu. *Sf-1* KO miši nimajo razločnega ventromedialnega jedra (Ikeda in sod., 1995; Shinoda in sod., 1995). Določene študije so pokazale, da ventromedialno jedro ureja telesno težo. *Sf-1* KO miši lahko po rojstvu rešimo s presaditvijo nadledvične žleze, da odrastejo. Te živali so namreč značilno težje od miši divjega tipa. Debelost pa je bolj rezultat manjše aktivnosti kot večje porabe hrane (Majdic in sod., 2002).

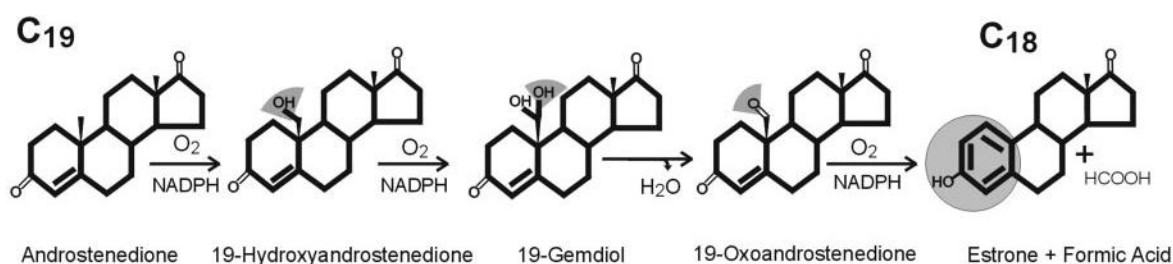
## 2.6 CITOKROMI P450

Ime citokromi P450 predstavlja veliko družino hemskih proteinov. Ob zadnjem štetju, je bilo 2000 identificiranih citokrom P450 genomskih in cDNK sekvenc, ki so bile razdeljene v skupno 265 različnih družin. Od bakterije pa vse do človeka opravljajo proteini citokroma P450 zelo različne, vendar pomembne naloge. Pri sesalcih sodelujejo pri presnovi raznih zdravil in aditivov, steroidogenezi, metabolizmu maščobnih kislin pa tudi pri pretvorbi prokancerogenih, promutagenih in ostalih škodljivih genotoksičnih komponent. Citokromi P450 tako vzdržujejo oksidativen, peroksidativen in reduktiven metabolizem endogenih in tudi ksenobiotičnih substratov (Danielson, 2002).

Citokromi P450 imajo to lastnost, da v prisotnosti reducenta (natrijev ditionit ali NADH) tvorijo kompleks z ogljikovim monoksidom, ki se ga vpiha v raztopino. Ta kompleks ima značilen absorpcijski maksimum pri 450nm. Ta pojav je prvi opazil Martin Klingenberg in ga opisal leta 1958. Od tod je torej prišlo ime: P pomeni pigment, 450 pa je valovna dolžina vrha absorbnosti (Estabrook, 2003).

### 2.6.1 Citokrom P450, družina 19, poddružina A, polipeptid 1 (CYP19A1)

CYP19A1 (sinonim: aromataza) je torej eden od encimov družine citokrom P450, ki sodeluje v procesu steroidogeneze in vpliva na fiziološko ravnotežje med spolnimi steroidnimi hormoni. Katalizira pretvorbo C19 androgenov v C18 estrogene; torej androstenedion v estron in testosteron v estradiol.

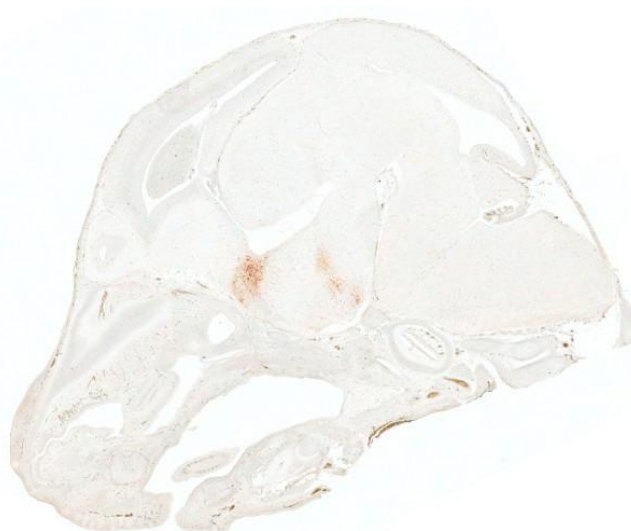


Slika 3: Encimska reakcija katalizirana z encimom aromatazo (Payne in Hales, 2004: 953).

OPIS: Aromataza lahko kot substrat uporablja androstendion ali testosteron in proizvede za produkt estron ali estradiol (odvisno od substrata). Aromatizacija A obroča zahteva tretjo molekulo kisika in NADPH ter poteče preko več vmesnih korakov

Izražanje *Cyp19a1* je omejeno na spolne žleze (jajčniki in testisi) in možgane pri mnogih vretenčarjih. Pri nekaterih vrstah pa najdemo ta encim še v mnogih ostalih tkivih. Pri ljudeh so aromatazo odkrili tudi v placenti, adipoznih stromalnih celicah, v osteoblastih v kosteh, v fibroblastih v koži, ponekod v ožilju, pri zarodkih pa tudi v jetrih in ostalih tkivih (Conley in Hinshelwood, 2001). Aromataza v reprodukcijskih procesih v jajčniku in placenti, kontrolira tvorbo estrogenov, vendar tudi njena prisotnost v možganih igra pomembno fiziološko vlogo. Prisotnost aromataze v možganih je prvi pokazal Naftolin s sod. v 70. letih prejšnjega stoletja z merjenjem njene aktivnosti v podganah in miših (Naftolin in sod., 1975; Naftolin in sod., 1972). Z merjenjem encimske aktivnosti v mikrodisekciranih frakcijah možganov podgane so kasneje natančneje določili mesta izražanja aromataze v možganih (Roselli in sod., 1985; Schumacher in Balthazart, 1987). Aktivnost aromataze v možganih je omejena na posamezne regije kot so predoptična in hipotalamusna jedra ter strukture limbičnega sistema. Najvišja aktivnost je bila zaznana v medialnem in periventrikularnem predoptičnem jedru, v suprakiazmatičnem jedru, v prednjih in ventromedialnih jedrih hipotalamusa, v spodnjem jedru končne strije in tudi v medialnem in kortikalnem jedru mandljaste strukture (amigdala) (Roselli in sod., 1985).

Raziskana je bila podrobna celična in subcelična porazdelitev aromataze v ptičjih, podganjih in mišjih možganih z imunocitokemičnimi študijami s specifičnimi protitelesi. Ugotovili so, da se aromataza ne nahaja le v teh področjih, kjer so zaznali tudi njeno aktivnost, ampak tudi na nekaterih novih mestih, ki so odgovorna tudi za nevroendokrino urejanje reprodukcije in vedenja in v mnogih primerih kažejo razvojne in spolno dimorfne razlike v aktivnosti encimov (ventralni pallidum, vohalni sistem, piriform cortex, jedra v talamusu ter še v nekaterih drugih strukturah) (Sanghera in sod., 1991; Shinoda in sod., 1989).



Slika 4: Mesta izraženosti gena *Cyp19a1v* sagitalnem prerezu možganov pri 15,5 dni starih mišjih zarodkih (Cytochrome..., 2011)

Metoda barvanja: BAC brightfield, DAB, 10X.

V času razvoja živali se stopnja izražanja *Cyp19a1* spreminja. Izražanje sporočilne ribonukleinske kisline (mRNK) za aromatazo v možganih miši se poviša in tvori vrh med 3-4 dnevom po rojstvu in je za 5-50% višje pri samcih kot samicah (Harada in Yamada, 1992). Pri podganah je bila aktivnost aromataze prvič zaznana pri 15 dni starih zarodkih in raste dokler ne pride do vrha 3-4 dni pred rojstvom, nato pa počasi pada do odraslosti (George in Ojeda, 1982). Do razlik bi lahko prišlo zaradi različnega trajanja brejosti. To možnost podpira tudi poročilo, da je kritična razvojna doba za spolno diferenciacijo možgan pri podgani proti koncu brejosti pa do 5 dneva po rojstvu, pri miših pa samo po

rojstvu (Maclusky in Naftolin, 1981). Pri morskih prašičkih so z merjenjem aromatazne aktivnosti ugotovili, da je razporeditev v možganih podobna ostalim vrstam. Aktivnost aromataze je bila v možganih najvišja zgodaj v embrionalnem razvoju in pade v času brejosti. Posebne razlike med spoloma niso zaznali, vendar je tretiranje z dodatnimi androgeni povzročilo povišanje aktivnosti aromataze v določenih regijah možganov zarodkov (Connolly in sod., 1994).

Študije na pacientih, z okvarjenim *Cyp19a1* genom za aromatazo, skupaj z opažanji na sevu gensko spremenjenih miših z manjkajočim genom *Cyp19a1* (Aromataza-knockout miši; ArKO) so nam omogočile boljše razumevanje delovanja aromataze pri obeh spolih živali (Conley in Hinshelwood, 2001).

Povišano izražanje *Cyp19a1* v tkivih, ki v normalnih razmerah vsebujejo le nizke koncentracije tega encima je povezano z mnogimi patološkimi stanji pri ljudeh (ginekomastija, prezgodnja puberteta, makromastija, pojav tumorjev na dojki, testisih, jajčnikih, jetrih, nadledvični žlezi ali maternici in tudi endometrioza) (Bulun in sod., 1997; Sasano in Harada, 1998; Stratakis in sod., 1998; Zeitoun in Bulun, 1999). Kaj točno vpliva na to, da se izražanje *Cyp19a1* tako poveča, da vodi v bolezen zaenkrat še ni znano. Znani so tudi primeri, ko do motenj prihaja zaradi pomanjkanja aromataze. Ženske se rodijo z nejasno razvitim spolom, sledi hipergonadotropni hipogonadizem v puberteti (odsotnost spolnih hormonov zaradi nerazvitih spolnih žlez) kot rezultat nezadostne aromatizacije androgenov in kasneje v življenju cistična degeneracija jajčnikov, ki pa se razvije tudi pri miših brez gena za aromatazo (ArKO). Pri moških z okvarjenim genom *Cyp19a1* pride do degeneracije mod, podobno kot pri samcih ArKO miši. Pride lahko tudi do prekomerne rasti kosti in osteopenije. Pravilno ravnotežje med androgeni in estrogeni je torej zelo pomembno in lahko vpliva na mnogo fizioloških in patoloških procesov na različne načine, ki pa jih še odkrivamo (Conley in Hinshelwood, 2001).

Pri ArKO miših so opazili tudi nevrološke učinke pomanjkanja aromataze v času razvoja. ArKO samci kažejo drugačen profil obnašanja, tako pri paritvi, agresiji in starševstvu v primerjavi z mišmi divjega tipa. Vse te spremembe v obnašanju so zanimive tudi pri preučevanju pomanjkanja aromataze pri ljudeh. Raziskave so pokazale, da se je spolno



vedenje pri moških s pomanjkanjem aromataze izboljšalo po terapiji z estrogenom, vendar pa sama odsotnost tega encima ni imela vpliva na moško spolno orientacijo ali spolno identiteto. Torej obstaja možnost, da imata aromataza in estrogen pomembno vlogo v moški spolni aktivnosti pri ljudeh (Matsumoto in sod., 2003).

## 2.7 HIDROKSISTEROID DEHIDROGENAZE (HSD)

Hidroksisteroid dehidrogenaze (HSD) so udeležene v redukcijo in oksidacijo steroidnih hormonov. Ena od glavnih razlik med citokromi P450 in hidroksisteroid dehidrogenazami je ta, da je vsak od encimov citokroma P450 produkt enega samega gena, medtem ko obstaja več izooblik HSD in vsaka je produkt ločenega gena. Število izooblik oz. izoencimov je različno med različnimi živalskimi vrstami, v porazdelitvi med tkivi, katalitični aktivnosti (ali je njihova funkcija dominantno dehidrogenazna ali reduktazna), po specifičnosti substrata in kofaktorjev in položaju v celici (Payne in Hales, 2004).

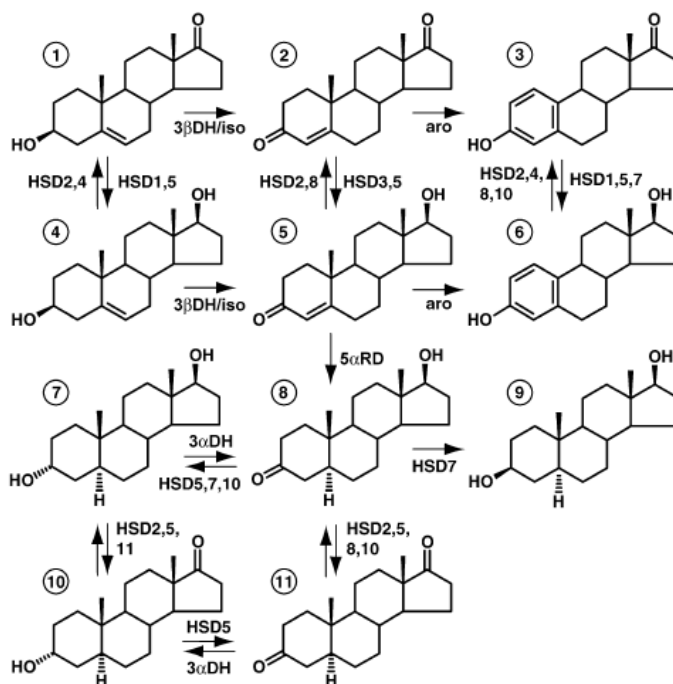
### 2.7.1 Hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaze (HSD17B)

Hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaze (HSD17B) nadzorujejo zadnji korak pri tvorbi vseh androgenov in estrogenov. Ti encimi igrajo ključno vlogo v biologiji spolnih steroidnih hormonov, ker nadzorujejo koncentracijo vseh aktivnih spolnih steroidnih hormonov znotraj celice. Obstaja torej več izoencimov HSD17B, ki se različno izražajo v celici, porabljajo različne substrate in urejevalne mehanizme. Aktivnost HSD17B povzroči pretvorbo 17- ketosteroidov (npr. dehidroepiandrosteron, androstendione in estron) v ustrezne 17 $\beta$ -hidroksisteroide (npr. androst-5-en-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol, testosterone in 17 $\beta$ -estradiol). Redukcijo katalizirajo različni izoencimi HSD17B. Tako so HSD17B ključni encimi udeleženi v razvoju, rasti in delovanju reproduktivnih tkiv pri obeh spolih (Labrie in sod., 1997).

V nadledvični žlezi se dehidroepiandrosteron (DHEA) pretvori v  $\Delta$ 5-androstendiol in  $\Delta$ 4-androstendion se pretvori v testosteron s pomočjo HSD17B. V jajčniku pa se estron pretvori v estradiol na podoben način. HSD17B1 v glavnem katalizira redukcijo estrona v estradiol in tudi pretvorbo DHEA v androstendiol, medtem ko HSD17B4 v glavnem

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

katalizira oksidacijo estradiola v estron, torej povratno reakcijo. HSD17B2 katalizira pretvorbo testosterona v androstendion, androstendiola v DHEA ter estradiola v estron. HSD17B3 in HSD17B5 pa v glavnem katalizirata pretvorbo androstendiona v testosteron. Delovanje je prikazano tudi na sliki 4 (Mindnich in sod., 2004).



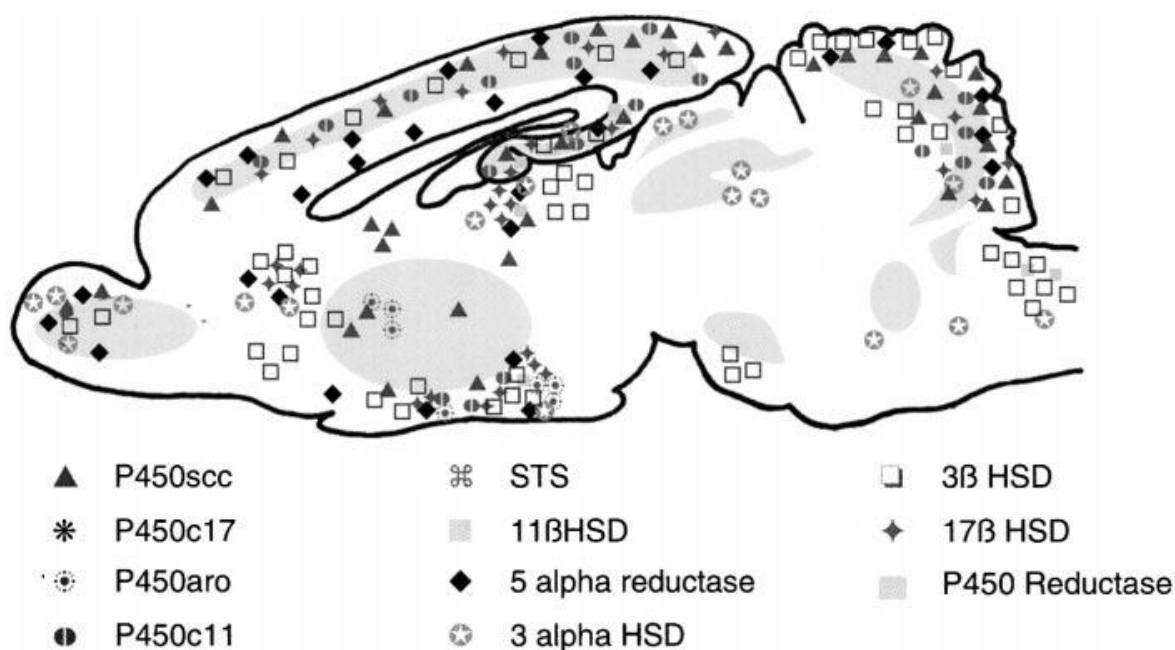
Slika 5: Zadnji koraki v presnovi estrogenov in androgenov (Mindnich in sod., 2004: 11).

Okrajšave: HSD1,2- HSD17B1 in HSD17B2; 3αDH- AKR1C6; 3βDH/iso-3β-dehidrogenaza/Δ5-Δ4-izomeraza; aro- aromataza ali CYP19A1; 5αRD- 5α-reduktaza ali SRD5A1. Steroidni hormoni: 1) dehidroepiandrosteron (DHEA); 2) Δ4-androstendion; 3) estron; 4) Δ5-androsten-3β, 17β-diol (Δ5-adiol); 5) testosteron; 6) estradiol; 7) 3α,17β-androstandiol; 8) dihidrotestosteron (DHT); 9) 3β,17β-androstandiol; 10) androsteron in 11) androstendion

Znanstveniki so že zgodaj opazili, da mnoga tkiva metabolizirajo estron in estradiol (Ryan in Engel, 1953a, 1953b). Kmalu je bila opisana tudi prva izolacija delno očiščene HSD17B iz človeške placente (Langer in Engel, 1958). Od takrat potekajo opazovanja aktivnosti HSD17B v ljudeh in glodavcih. Imunohistokemijske študije so dodale opažanja HSD17B iz različnih sesalcev, ptičev in plazilcev ter prikazale njihovo razporeditev med vretenčarji. Ugotovili so, da so HSD17B značilne za vse vretenčarje. Opravljene so bile analize razporeditve aktivnosti encimov HSD17B po tkivih s pomočjo merjenja izražanja RNK z metodama RT-PCR ali northernovo analizo. Ugotovili so, da se mnogo encimov izraža

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

skoraj povsod v telesu, vendar različna tkiva kažejo različno nagnjenost k aktivaciji ali inaktivaciji steroidnih hormonov. Kljub sistematičnemu oskrbovanju spolnih steroidnih hormonov iz spolnih žlez, obstoja tudi velik potencial lokalne steroidne tvorbe (prostata, koža, možgani) in inaktivacije le-teh (epitelne celice v prsih, maternica ali ledvica) (Mindnich in sod., 2004). Demonstracija aktivnosti HSD17B v možganih podgane in opice je pokazala, da sta tako proteini kot tudi mRNK (sporočilna ribonukleinska kislina) HSD17B prisotni. V podganjih in žabjih možganih se izraža HSD17B1. Razporeditev proteina in mRNK v glodavcih in žabi je skladna in je prikazana na sliki 5 (Compagnone in Mellon, 2000).



Slika 6: Shematska predstavitev izražanja encimov udeleženih v nevrosteroidogenezi v odraslih možganih (Compagnone in Mellon, 2000: 16).

Simboli različnih steroidogenih encimov so prikazani pod sliko. Podatki izhajajo iz raziskav na večih vrstah, vključno z glodavci, primati in dvoživkami. HSD17B so v legendi označena s sinonimom 17β HSD.

HSD17B so vzrok za kar nekaj resnih bolezni pri ljudeh. Nekatere se pojavijo zaradi okvare enega samega gena (monogenske bolezni) ali pa pride odpovedi več faktorjev (multigeneske bolezni). Pri monogenskih okvarah (kjer je prizadet samo en tip HSD17B) so npr. poznan primeri psevdohermafrodizma pri moških, za katerega je značilna nezadostna maskulinizacija že v otroštvu pa tudi v odraslosti se primerni znaki moškosti ne razvijejo. Ženske pri tej motnji nimajo simptomov. Lahko je tudi motena β-oksidacija maščobnih kislin, tvorba žolčnih kislin in metabolizem steroidnih hormonov, kar se kaže v hudih

simptomih in pacienti običajno umrejo v prvem letu starosti. Pri številnih boleznih za katere so odgovorne napake v več genih (multigeneske motnje) kot so rak in živčne bolezni so ugotovili, da igrajo tudi androgeni in estrogeni pomembno vlogo. Karcinogeneza povezana s steroidnimi hormoni nastane zaradi pospešene delitve celic in s tem možnosti za kopičenje raznih genetskih napak. Za mnoge steroidne hormone so tudi ugotovili, da varujejo živčni sistem, vendar sami mehanizmi še niso poznani. Kar nekaj sprememb v metabolizmu steroidnih hormonov pa se prepisuje raznim živčnim boleznim. Vse oblike HSD17B so bile opažene v različnih delih možgan. Torej verjetno igrajo svojo vlogo pri vseh teh obolenjih (Mindnich in sod., 2004).

### **2.7.2 Aldo-keto reduktaza družine 1, član C6 (AKR1C6)**

Eksperimenti s kloniranjem cDNK (komplementarna deoksiribonukleinska kislina) so pokazali, da večina HSD pripada eni od dveh družin: kratkoverižne dehidrogenaze/reduktaze (poznane tudi kot kratkoverižne alkoholne dehidrogenaze) in aldo-keto reduktaze. Aldo-keto reduktaza družine 1, član C6 (AKR1C6) ali  $3\alpha$ -HSD spada torej med aldo-keto reduktaze. V prostati je  $3\alpha$ -HSD udeležena v inaktivaciji dihidrottestosterona s pretvorbo šibkega androgena  $3\alpha$ -androstandiola, medtem ko v živčnem sistemu sodeluje v aktivaciji  $5\alpha$ -reduciranih steroidnih hormonov, kot je  $5\alpha$ -DHP v nevrosteroidni hormon alopregnanolon (Compagnone in Mellon, 2000).

Biokemijske študije so pokazale, da je  $3\alpha$ -HSD aktivna v različnih delih možganov glodavcev in se ureja z estrogeni ter laktacijo. Razporeditev je tudi prikazana na Sliki 5 (zgoraj). Western bloti proteina  $3\alpha$ -HSD izoliranega iz različnih delov možganov, so pokazali, da je koncentracija najvišja v vohalnih betičih (Compagnone in Mellon, 2000).

$3\alpha$ -HSD je multifunkcionalna reduktaza, ki metabolizira steroidne hormone in policiklične aromatske ogljikovodikove karcinogene. Reducira kortizol, progesteron in testostosterone za kar potrebuje NADPH kot kofaktor. Redukciji vseh teh hormonov takoj sledi konjugacija na mestu 3 ali 17 z sulfati ali glukuronidi, kar vodi do njihove eliminacije. Poleg svoje vloge v metabolizmu steroidnih hormonov pa opravlja  $3\alpha$ -HSD še eno nalogo v podganjih jetrih. Sodeluje tudi pri tvorbi in znotraj celičnem transportu žolčnih kislin (Stolz in sod., 1991).

Pri ljudeh so našli 4 izoencime  $3\alpha$ -HSD. Sodelujejo pri biosintezi žolčnih kislin v jetrih. S sodelovanjem  $3\alpha$ -HSD z  $5\beta$ -reduktazo nastaja produkt  $5\beta,3\alpha$ -tetrahidroholestani, ki so ključni intermediati pri produkciji holanične kisline.  $3\alpha$ -HSD prav tako sodelujejo pri očiščevanju jeter s tem, da metabolizirajo steroidne hormone. Pri tem sodelujejo bodisi s  $5\alpha$ - ali  $5\beta$ -reduktazo in proizvajajo primerne tetrahidrosteroidne hormone.  $3\alpha$ -HSD pri ljudeh urejajo tudi zasedenost androgenskih receptorjev v tarčnih tkivih. Izoencima tipa 2 in tipa 3 sodelujeta pri pretvorbi  $5\alpha$ -dihidrottestosteron (močan androgen) v  $3\alpha$ -diol (šibek androgen). Ta reakcija verjetno ugasne androgen receptor. Izoencim  $3\alpha$ -HSD tipa 3, pa katalizira obratno reakcijo in oksidira  $3\alpha$ -diol spet v  $5\alpha$ -dihidrottestosteron (*in vitro*), kar verjetno spet aktivira androgeni receptor. V centralnem živčnem sistemu sodelujejo  $3\alpha$ -HSD pri tvorbi alopregnanolona. Ta nevrosteroidni hormon je alosterični efektor GABA receptorja. V odsotnosti GABA receptorja, alopregnanolon nima nobenega učinka. Kadar pa so GABA receptorji prisotni lahko že v zelo majhnih količinah poveča prevodnost za klorid kar vodi do anestetičnih in anksiolitičnih učinkov. Predvidevajo, da je upadanje alopregnanolona najbrž odgovorno za pojav, ki ga imenujemo predmenstrualni sindrom (PMS) pri ženskah. Najbolj odgovoren je tip 3  $3\alpha$ -HSD. Za  $3\alpha$ -HSD se predvideva, da imajo vlogo tudi pri razvoju hormonsko odvisnih bolezni, kot so npr. rak na prostati, prsni ali endometriji v maternici (Penning in sod., 2004).

## 2.8 STEROID 5 ALFA-REDUKTAZA 1 (SRD5A1)

Spolni razvoj moškega pri sesalcih vključuje tri zaporedne procese. Prvi korak je določitev genetskega spola s prisotnostjo 46XY spolnih kromosomov. Ta proces se zaključi ob oploditvi jajčeca. Drugi korak je diferenciacija gonad v moda. Proces vključuje *Sry* gen, ki se nahaja na Y kromosomu in še nekaj ostalih genov, ki se nahajajo na avtosomnih kromosomih. Tretji korak pa je prevod v fenotipski spol, kar obsega formiranje notranjih in zunanjih spolnih organov. Pri tem procesu pa igrata ključno vlogo testosteron in njegov  $5\alpha$  reducirani metabolit dihidrottestosteron (DHT) (Imperato-Mcginley in Zhu, 2002).

Vsi steroidni hormoni, ki vsebujejo  $\Delta^4$ -3okso skupino (androgeni, progestini in kortikosteroidi) so substrati steroid 5 alfa-reduktaze 1(SRD5A1). Delovanje SRD5A1 je

odvisno od prisotnosti NADPH, ki reducira dvojno vez v C<sub>19</sub> in C<sub>21</sub> steroidnih hormonih. Tako katalizira pretvorbo testosterona v njegov aktivni metabolit dihidrotestosteron (DHT), pretvorbo progesterona v 5 $\alpha$ -DHP in 11-deoksikortikosteron se prav tako reducira na 5 $\alpha$  mestu. Oba, testosteron in DHT se vežeta na enake intracelične receptorje in s tem urejata izražanje tarčnih genov. Obstajata dva izoencima steroid 5  $\alpha$ -reduktaze, tip 1 (SRD5A1) in tip 2 (SRD5A2), do zdaj opisana pri ljudeh, podganah in opicah. Oba tipa lahko reducirata testosteron v DHT, vendar imata različne biokemijske in verjetno tudi funkcionalne lastnosti. Pri podganah je afiniteta steroid SRD5A1 za testosteron 15-20-krat nižja od SRD5A2. Oba izoencima imata tudi različen pH optimum (Negri-Cesi in sod., 1996).

Pri miših so izražanje *Srd5a1* detektirali ob rojstvu v jetrih in ne-genitalni koži, kjer je tudi prisotna v času celotnega življenja. V tkivih zarodkov pa je bilo izražanje precej nizko. Pri odraslih živalih so izražanje zaznali v ne-genitalni koži, jetrih in v nekaterih regijah v možganih, medtem ko je bila izraženost v prostati, genitalni koži, obmodku, semenskih mešičkih, testisih, nadledvični žlezi in ledvici nizka. Samci miši brez gena *Srd5a1* se razvijejo normalno, samice pa imajo probleme s porodom. Napako se da odpraviti, če samice tretiramo z 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol (3 $\alpha$ -Adiol), 5 $\alpha$  reducirani produkt, za katerega so včasih mislili, da je okvarjen produkt. Izražanje encimov, ki tvorijo 3 $\alpha$ -Adiol, vključno z SRD5A1 in AKR1C6, sta bila povišana v maternici divjega tipa miši v času pozne brejosti, ne pa pri miših brez gena za *Srd5a1*. (Mahendroo in sod., 1996). SRD5A1 igra glavno vlogo v zarodkih pri inaktiviranju testosterona in s tem porablja substrat za tvorbo estrogena. Rezultati pri miših brez gena *Srd5a1* kažejo, da je pri inaktivaciji testosterona udeležena SRD5A1 in ne SRD5A2 in je s tem ključna za razvoj in preživetje zarodka. Stopnja sporočilne ribonukleinske kisline (mRNK) za SRD5A1 se torej poviša v možganih z nosečnostjo in s tem verjetno ureja stopnje estrogena v živalih divjega tipa, najbrž preko povratnega mehanizma, ki vključuje tudi hipotalamus-hipofiza-gonadno os sistema (Compagnone in Mellon, 2000).

Centralni živčni sistem podgane je sposoben 5 $\alpha$  redukcije progesterona, kar dokazuje, da je steroid 5  $\alpha$ -reduktaza prisotna. Njeno encimsko aktivnost, sam protein in sporočilno ribonukleinsko kislino (mRNK) so zaznali v nevronih, astrocitih in celicah glia in

prevladujoča oblika je tip 1. Izraženost mRNK steroid 5 $\alpha$ -reduktaze 1 je višja med razvojem kot pri odraslih živalih ampak je relativno konstantna. Izražanje *Srd5a2* v možganih pa je med razvojem nadzorovano. Analize raziskav narejenih z metodo reakcije z verižno polimerazo in obratnim prepisom (RT-PCR) na možganih zarodkov podgane kažejo, da je mRNK izoencima tipa 1 konstantno izražena med poznim gestacijskim obdobjem, ob rojstvu in tudi v odraslosti živali. mRNK izoencima tipa 2 pa se prehodno izrazi samo ob koncu gestacijskega obdobja (18. dan po oploditvi) in dramatično pade do dneva 14 po rojstvu. Ta vzorec izražanja mRNK tipa 2 se ujema z tvorbo testosterona v testisih zarodkov in namiguje, da je steroid 5  $\alpha$ -reduktaza 2 morda vpletena v urejanje spolne diferenciacije možganov v kritičnem obdobju. Pri odraslih podganah imunohistokemijsko barvanje pokaže prisotnost izoencima SRD5A1 v celotnih možganih in nobenih razlik med samci in samicami. Testiranje izražanja *Srd5a1* na podganah med razvojem z hibridizacijo *in situ* in imunohistokemičnim barvanjem je pokazalo, da se encim v zarodkovih možganih prvič pojavi na 12. dan po oploditvi (E12) v hrbtenjači in nevroepitelnem tkivu možganskega ventrikularnega sistema. Na 16 embrionalni dan (E16,5) so zaznali protein v možganski skorji, talamusu, malih možganih, možganskem mostu (medulla), hrbtenjači in perifernih ganglijih. V pozni embriogenezi (E18 do E20) pa je protein podobno razporejen, le da njegovo izražanje pade v vseh strukturah, razen v trigeminalnem gangliju in v ventrikularnem sistemu striatuma, mandlju (amigdala) in talamusu. Pri skotenih mladičkih je bilo izražanje višje v perifernem živčnem sistemu kot v centralnem in do starosti 2 tednov se izražanje popolnoma spremeni in enakomerno razporedi po celotnih možganih. V tem času so strukture možganske beline (optična hiazma, lateralni vohalni trakt, notranja kapsula, corpus callosum) visoko pozitivne za mRNK *Srd5a1*, vendar so tudi ostala področja (hipokampus, nevroepitelij strije) pozitivne. Rezultati so pokazali, da se SRD5A1 izraža na enakih mestih kot njena mRNK. Izražanje je prehodno v proliferativnih conah razvijajočega centralnega živčnega sistema, kar kaže na to, da ima 5  $\alpha$ -reducirani steroidni hormon najbrž vlogo v živčni proliferaciji (Compagnone in Mellon, 2000).

Pri ljudeh so torej našli v prostati oba tipa encima steroid 5  $\alpha$ -reduktaza, vendar kot kaže je v fiziologiji žlez in patofiziologiji najbolj pomemben tip 2. Če pride do genetske okvare tega izoencima se namreč pojavi posebna oblika moškega psevdohermafrodizma,

imenovanega tudi Imperato-McGineyev sindrom, za katerega so fenotipsko značilna nejasna zunanja spolovila in nerazvita prostata. Pri tem sindromu je očitno, da obstoj normalne SRD5A1, ne more nadomestiti posledic odsotnosti izoencima tipa 2 (SRD5A2), čeprav katalizirata enako reakcijo. Do sedaj pa pri ljudeh tudi še ni bil opisan nobeden sindrom za katerega bi bilo značilno pomanjkanje izoencima SRD5A1 (Negri-Cesi in sod., 1996).

## 2.9 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO IN OBRATNIM PREPISOM V REALNEM ČASU (RT-RT-PCR ALI qRT-PCR)

Da bi razumeli reakcijo PCR v realnem času, moramo najprej poznati princip osnovne reakcije PCR. Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, ki omogoča eksponentno pomnoževanje kratke DNK sekvence (običajno od 100 do 600 baznih parov), znotraj daljše dvoverižne DNK molekule in kot nam že ime pove, s pomočjo DNK-polimeraze. Ta encim nove verige DNK ustvarja z uporabo matrice in začetnih oligonukleotidov. V vsakem ciklu dvoverižno DNK razgradimo v enoverižno pri visokih temperature (zato je pomembno, da je DNK-polimeraza odporna na visoke temperature). Po denaturaciji DNK se nanjo vežejo začetni oligonukleotidi, DNK-polimeraza pa potem podaljšuje verigo z dodajanjem posameznih nukleotidov, ki so komplementarni matrici in tako ustvarja novo verigo, ki se spet uporabi v novem ciklu pomnoževanja. Po nekaj ciklih pomnoževanja (običajno okoli 40), lahko PCR produkt analiziramo na agaroznem gelu, z elektroforezo in ga je dovolj, da ga lahko zaznamo obarvanega z etidijevim bromidom. Ta metoda je kvalitativna, za zaznavanje prisotnosti ali odsotnosti določene sekvence DNK, ne moremo pa določiti njene začetne količine. Za merjenje sporočilne RNK (mRNK), lahko metodo razširimo z uporabo reverzne transkriptaze, s katero pretvorimo mRNK v komplementarno DNK (cDNK), ki nato služi kot izhodiščna DNK, ki jo pomnožimo s PCR reakcijo in spet analiziramo na agaroznem gelu z elektroforezo. Metoda obratnega prepisa in verižne reakcije s polimerazo (PCR z obratnim prepisom), pogosto skrajšujejo v RT-PCR, zato moramo paziti da jo ne zamenjujemo z PCR v realnem času (real time-PCR). Reakcijo PCR z reverzno transkriptazo v realnem času so razvili zato, ker je etidijev bromid precej



neobčutljivo barvilo in ker ga zaznamo šele, ko je eksponentna faza pomnoževanja DNK že končana (Hunt, 2010). Za reakcijo qRT-PCR uporabljamo druga barvila (npr. SYBR green), ki fluorescirajo močnejše kot etidijev bromid in so mnogo bolj občutljiva, vendar le če so vezana na dvoverižno DNK (na enoverižno molekulo DNK se ne vežejo). qRT-PCR je metoda s katero bi merili kvantitativne razlike v izražanju mRNA in tudi ker je v nekaterih primerih dostopna le zelo majhna količina mRNK (npr. majhne količine tkiva, dragi reagenti...) (Hunt, 2010). Metoda ima kar nekaj pomembnih prednosti: zmožnost kvantificiranja v zelo širokem dinamičnem razponu (vsaj 5 logaritemskih enot) in izjemna občutljivost (lahko zaznamo manj kot 5 kopij tarčne sekvence). Je tudi relativno hitra metoda, ki se jo da delno avtomatizirati. Reakcije PCR v realnem času tečejo v zaprtih luknjah mikrotitrskih plošč, po končani reakciji pa nadaljno rokovanje z vzorcem ni potrebno. Poznamo pa tudi nekaj slabosti reakcije PCR v realnem času. Lahko jo zaviramo s komponentami, ki so sicer prisotne v bioloških vzorcih kot so razni organski ali fenolni zaviralci (hemoglobin). Temu se lahko tudi izognemo z odporno obliko polimeraze. Velika omejitev pa je lahko tudi človeški faktor, ker smo odgovorni za napačno izbiro barvila, začetnih nukleotidov ali ostalih reagentov, za napačno analizo in interpretacijo podatkov (Valasek in Repa, 2005).

Pri določenih metodah za obdelavo rezultatov reakcije qRT-PCR, potrebujemo med drugim tudi referenčne gene (endogeni gospodinjski gen), s katerimi lahko rezultate ciljnih genov primerjamo. Ti nam služijo kot notranja kontrola. Popolni referenčni gen naj bi imel enako število kopij v vseh celicah, izražati se mora v vseh celicah in povprečno število kopij mora biti ugodno, da je korekcija bolj točna. Popolni standard pa seveda ne obstaja. Običajno se uporabljajo kot standardi mRNK za enega od sledečih proteinov:

- gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH)
- $\beta$ -aktin
- MHC I (major histocompatibility complex I)
- ciklofilin
- nekatere ribosomalni proteini (npr. RPLP0)
- 28S ali 18S rRNK (ribosomalna RNK)

Pri reakciji PCR se DNK teoretično podvoji v vsakem ciklu. Po  $N$  ciklih imamo tako  $2^N$  količino DNK. Seveda pa reakcija ne teče v neskončno, ampak sčasoma doseže fazo platoja. Pri reakciji qRT-PCR z uporabo barvila npr. SYBR green, ki se veže na podvajajočo cDNK preprosto merimo fluorescenco, ki narašča z naraščujočo količino cDNK v reakcijski tubici. Upamo, da ta fluorescenca prihaja iz cDNK, ki jo želimo meriti, čeprav ni vedno tako. Lahko preverimo ali so se nam pomnožili pravi fragmenti s talilno krivuljo. To določi aparaturna za qRT-PCR, tako da izmeri točko taljenja produkta na koncu PCR reakcije. Temperatura taljenja dvojnovijačne DNK je odvisna od njene osnovne sestave in dolžine. Vsi PCR produkti, ki nastanejo s pomočjo enakih oligonukleotidnih začetnikov naj bi imeli enako temperaturo taljenja, razen če je prišlo do kontaminacije, vezave oligonukleotidnih začetnikov na komplementarno ali delno komplementarno sekvenco v netarčnem delu DNK ali nastajanja dimerov oligonukleotidnih začetnikov (povezave med sabo). PCR lahko razdrobimo na štiri glavne faze: linearna faza, zgodnja eksponentna faza, eksponentna faza in plato faza. Med začetno linearno fazo (ponavadi prvih 10-15 ciklov) se PCR komaj začne in fluorescenca sicer raste v vsakem ciklu, vendar je še prenizka, da bi jo zaznali. V zgodnji eksponentni fazi intenzivnost fluorescence doseže določeno mejno vrednost. Zaporedno število cikla pri katerem se to zgodi je definirano kot  $C_t$  vrednost. To število se nato uporablja pri izračunavanju rezultatov. Med eksponentno fazo PCR poteka optimalno in končno plato fazo doseže, ko postanejo količine reakcijskih komponent omejene in intenzivnost fluorescence, ni več uporabna za analizo (Wong in Medrano, 2005).

### 3 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE

#### 3.1 CILJI

Cilj diplomskega dela je bil preučiti izraženost naslednjih encimov:

- citokrom P450, družina 19, poddružina A, polipeptid 1 (CYP19A1),
- hidrosisteroid (17-beta) dehidrogenaz 1 (HSD17B1),
- aldo-keto reduktaza družine 1, član C6 (AKR1C6),
- steroid 5  $\alpha$ -reduktaze 1 (SRD5A1)

v možganih mišjih zarodkov od starosti 12,5 dni (po spočetju) do 18,5 dni in sicer pri miših divjega tipa obeh spolov in pri miših brez gena *Sf-1* (prav tako pri obeh spolih). Skušali smo ugotoviti, kdaj se prične izraženost teh encimov in ali se v času razvoja zarodka izraženost spreminja.

#### 3.2 HIPOTEZE

- Izraženost encimov CYP19A1, HSD17B1, AKR1C6 in SRD5A1 v možganih se prične že v zarodkih.
- Med mišmi divjega tipa in mišmi brez gena *Sf-1* so prisotne razlike v izraženosti encimov CYP19A1, HSD17B1, AKR1C6 in SRD5A1 v možganih zarodkov.
- Med spoloma obstajajo razlike v izraženosti encimov CYP19A1, HSD17B1, AKR1C6 in SRD5A1.

## 4 MATERIALI IN METODE

### 4.1 ŽIVALI IN TRETIRANJE

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

Uporabili smo miši seva C57BL/6J, heterozigone za gen *Nr5a1* (nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1), bolj poznanim pod sinonimom *Sf-1* (stereoidogeni faktor 1). Gojene so bile v Centru za genomiko živali Veterinarske fakultete v Ljubljani, v standardnih pogojih, pri temperaturi 21°C, vlagi 55-65 % ter režimu svetlobe in teme 12:12 ur. Hrana (brez fitoestrogenov, Hasrlan Teklad, Milano, Italija) in voda sta bili na razpolago *ad libitum*. Za nastilj se je uporabljal Lignocel (hygienic animal bedding).

### 4.2 TESTNE ŽIVALI

Miši z manjkajočim *Sf-1* alelom so bile povratno križane z C57BL/6J mišmi v več kot 10 generacijah, da smo pridobili kongenično linijo. Ker so miši brez gena *Sf-1* neplodne, smo med seboj parili heterozigotne samce in samice. Skupno smo uporabili 34 samic. Pri samicah v parjenju smo preverjali prisotnost nožničnih čepkov, da smo določili točno starost zarodkov ob odvzemu. Dan 0,5 (E0,5) brejosti smo definirali kot dan, ko je bil nožnični čepek prisoten, torej dan po kopulaciji, do katere pri miših običajno pride na sredini temnega dela dneva. Mišje samice smo nato žrtvovali v različnih časih brejosti (E12,5; E14,5; E16,5 in E18,5). Tako smo v približno enem letu pridobili vse skupaj 276 zarodkov. Za nadaljnjo analizo smo uporabili 48 primernih, in sicer po 3 zarodke v vsaki posamezni skupini (4 različne starosti, 2 genotipa in za oba spola).

### 4.3 RAVNANJE Z VZORCI

Breje samice smo usmrtili z inhalacijo CO<sub>2</sub>. Nato smo odprli trebušno votlino in odstranili maternico. Vsak posamezen zarodek smo posebej najprej dekapitali, nato pa smo jim odstranili možgane. Pri 12,5 dni starih zarodkih, ki so še zelo majhni in bi bilo zelo težko izluščiti samo možgane, pa smo uporabili kar celo glavo. Odvzete možgane smo takoj zamrznili, najprej v tekočem dušiku, nato pa v zamrzovalniku na temperaturi -70°C. Tako so vzorci bili shranjeni do izolacije ribonukleinskih kislin (RNK). Hkrati ob odvzemu

možganov smo odvzeli tudi košček tkiva zarodka (običajno košček repa), ki pa smo ga uporabili za genotipizacijo.

#### 4.4 GENOTIPIZACIJA

Pridobljeno tkivo iz zarodkov smo razgradili na termostatičnem stresalniku v 200  $\mu$ L PCR DNA pufra (Promega, Madison WI) z dodanimi 15  $\mu$ L proteinaze K (Sigma) čez noč, na 400 obratih na minuto in pri 55°C. 3  $\mu$ L lizata smo nato uporabili za verižno reakcijo s polimerazo (PCR) s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za določitev genotipa (začetniki za gen *Sf-1*) in spola (začetniki za gen *Sry*) po protokolu (Luo in sod., 1994).

Po končani reakciji PCR smo produkt ločili z elektroforezo na agaroznem gelu. Ta metoda nam omogoča ločevanje molekul DNK po velikosti. Opazovanje DNK nam omogoča barvilo EtBR (etidijev bromid), ki interkalira med baze DNK in fluorescira pri svetlobi valovne dolžine okoli 300 nm. Koncentracijo agaroznega gela smo prilagodili namenu uporabe. Naši fragmenti so bili dolgi od 0,3 do 0,7 kb (kilobaznih parov), zato smo uporabili 2% agarozni gel. Za elektroforetski puffer pa smo uporabili 0,5 M TBE puffer (Tris boratni EDTA puffer).

Za pripravo 2% agaroznega gela smo potrebovali:

- 0,5M TBE puffer 50mL
- agaroz (Sigma) 1g
- EtBr 0,7 $\mu$ L

Pripravili smo mešanico agaroze in pufra TBE, jo zavreli v mikrovalovni pečici, da se je agaroz raztopila in jo nekoliko ohladili ter dodali še etidijev bromid. Zmes smo premešali, jo vlili v model za gel ter vstavili glavničke. Ko se je gel strdil, smo ga skupaj z modelčkom vstavili v elektroforezno enoto s 0,5M TBE pufrom.

V vsako luknjico na gelu smo previdno nanесли po 10  $\mu$ L PCR produkta in sprožili elektroforezo pri sobni temperaturi od 15 do 25 min, pri napetosti 130 voltov. Po končani elektroforezi smo rezultate na gelu lahko videli pod UV svetlobo.

#### 4.5 IZOLACIJA RIBONUKLEINSKIH KISLIN (RNK)

Zamrznjene možgane izbranih zarodkov smo odtalili in jih homogenizirali v 1 mL TRIzola (Invitrogen). Na sobni temperaturi so se inkubirali približno 5 min, nato smo dodali 200  $\mu$ L kloroforma in dobro premešali. Vse skupaj smo centrifugirali 15 minut na 10.000 obratih/min pri temperaturi 4°C. Mešanica se je ločila na tri faze: spodnjo roza (DNK z ostanki TRIzola), vmesno bela (proteini) in zgornjo brezbarvno fazo, v kateri je bila raztopljena RNK in smo jo previdno odpipetirali. Tej smo potem dodali približno enako količino (razmerje z brezbarvno fazo 1:1) isopropilnega alkohola, inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi in spet centrifugirali 20 minut na 13.000 obratih/min pri 4°C. S tem smo RNK zbrali v peletu in se znebili nekaj nečistoč. Pelet smo še enkrat sprali s 500  $\mu$ L 75% etanola redčenega z DEPC vodo (brez RNaz) in ga posušili na zraku. Nato smo ga raztopili v 50  $\mu$ L DEPC vode v kolikor je bil pelet večji (možgani zarodkov starih 16,5 in 18,5 dni) ali v 25  $\mu$ L DEPC vode pri manjših peletih (možgani zarodkov starih 12,5 in 14,5 dni). Vzorce smo spet zamrznili na temperaturi -70°C.

#### 4.6 KVANTIFIKACIJA Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO IN REVERZNO TRANSKRIPTAZO V REALNEM ČASU (QRT-PCR)

Absorbanco izolirane RNK pri 260 nm valovne dolžine smo izmerili s spektrofotometrom (SmartSpec 3000™) in izračunali približno koncentracijo RNK v vzorcu (upoštevajoč, da je pri  $A_{260}=1$ , koncentracija v vzorčku 40  $\mu$ g RNK/mL). Vzorce smo nato razredčili z DEPC do enakih koncentracij in sicer do 2 ng RNK/  $\mu$ L. Te smo nadalje uporabili za določanje izraženosti sporočilne RNK (mRNK).

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

Preglednica 1: Geni za encime, ki smo jih uporabili pri raziskavi (Gene, 2011)

Simbol	Akcesijska številka	Polno ime	Funkcija
<i>Hsd17b1</i>	NM_010475.1	hidroksisteroid (17- $\beta$ ) dehidrogenaza 1	estradiol 17- $\beta$ -dehidrogenaza
<i>Srd5a1</i>	NM_175283.3	steroid 5 $\alpha$ -reduktaza 1	3-okso-5- $\alpha$ -steroid 4-dehidrogenaza
<i>Akr1c6</i>	NM_030611.3	aldo-keto reduktaza družine 1, član C6	17- $\alpha$ ,20- $\alpha$ -dihidroksipregn-4-en-3-on dehidrogenaza
<i>Cyp19a1</i>	NM_007810.3	citokrom P450, družina 19, poddružina a, polipeptid 1	aromataza
<i>Actb</i>	NM_007393.3	aktin, beta	komponenta citoskeleta
<i>Gapdh</i>	NM_008084.2	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (NAD <sup>+</sup> ) (fosforilizacija)

#### 4.6.1 Aparatura Mastercycler<sup>®</sup> ep realplex (Eppendorf)

PCR v realnem času smo izvedli na dveh različnih aparaturah. Najprej smo uporabili aparaturo Mastercycler<sup>®</sup> ep realplex (Eppendorf) z reagenti QuantiFast<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR (Qiagen, 204154) na 96-mestnih mikrotiterskih ploščah (Applied Biosystems) in s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za gene *Cyp19a1*, *Akr1c6* ter *Actb* in *Gapdh*, ki smo ju uporabili za notranjo kontrolo. Za barvilo je bil uporabljen SYBR green.

Reakcijo smo izvedli po navodilih proizvajalca, ki so bila priložena k reagentom (QuantiFast<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR Handbook, 2007). In sicer smo reakcijo PCR z obratnim prepisom z encimom reverzna transkriptaza (RT-PCR) smo izvedli naenkrat z reakcijo PCR v realnem času v enem koraku. Potekala je v reakcijski mešanici končnega volumna 20  $\mu$ L. Za vsako reakcijo smo pripravili reagente v obliki skupne reakcijske mešanice PCR volumna 19  $\mu$ L, v katero smo potem dodali 1  $\mu$ L vzorca (približno 2 ng RNK). Pri pripravi reakcijske mešanice smo upoštevali tudi negativno kontrolo reakcije

PCR, pri kateri smo vzorčno RNK nadomestili z DEPC vodo. Vse reagente in mikrotitrsko ploščo smo med pripravo hranili ves čas na ledu.

Reakcijska mešanica qRT-PCR končnega volumna 20 $\mu$ L je vsebovala:

- 10  $\mu$ L QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix (sestavljen iz: HotStarTaq<sup>®</sup> Plus DNK polimeraze, QuantiFast SYBR Green RT-PCR pufra, mešanice nukleotidov (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in pasivnega referenčnega barvila ROX)
- 2  $\mu$ L specifičnega oligonukleotidnega začetnika (za *Cyp19a1*, *Akr1c6*, *Actb* ali *Gapdh*)
- 0,2  $\mu$ L QuantiFast RT Mix (mešanica produktov Omniscript<sup>®</sup> in Sensiscript<sup>®</sup> - reverzna transkriptaza)
- 6,8  $\mu$ L DEPC vode (brez RNaz)
- 1  $\mu$ L RNK

Mikrotitrne plošče smo nato vstavili v aparaturo za PCR v realnem času (Mastercycler<sup>®</sup> ep realplex, Eppendorf) in vzpostavili temperaturno časovni protokol:

- 50°C, 10 minut (optimalna temperatura reverzno transkriptazo, obratni prepis iz RNK v cDNK)
- 95°C, 5minut (aktivacija HotStarTaq<sup>®</sup> Plus DNK polimeraze)
- 40 ciklov:
  - 95°C, 10 sekund (denaturacija DNK)
  - 60°C, 30 sekund (prileganje začetnih oligonukleotidov, zbiranje podatkov o fluorescenci)
- 95°C, 15 sekund (končno podaljševanje)
- 60°C, 15 sekund in postopno naraščanje temperature do 95°C v 20 minutah (določanje talilne temperature produkta).

Sledila je analiza podatkov.

#### 4.6.2 Aparatura StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Ker z rezultati iz aparature Mastercycler<sup>®</sup> ep realplex (Eppendorf) nismo bili popolnoma zadovoljni smo reakcijo RT-PCR ponovili še na aparaturi Applied Biosystems StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR System.



#### 4.6.2.1 Reakcija PCR z obratnim prepisom (RT-PCR)

Tokrat smo reakcijo qRT-PCR izvajali v dveh korakih. Najprej smo izvedli PCR z obratnim prepisom z uporabo encima reverzna transkriptaza, ki je katalizirala prepis RNK v komplementarno DNK (cDNK). Za reagente smo uporabili High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814). Iz osnovnih vzorcev (izolirana RNK) smo pripravili redčitve, tako da smo dobili koncentracijo RNK 2 µg/mL za vsak vzorec. Reakcija RT-PCR je potekala v reakcijski mešanici končnega volumna 20 µL. Za vsako reakcijo smo pripravili reagente v obliki skupne reakcijske mešanice PCR volumna 19 µL, v katero smo potem dodali 1 µL vzorca ( torej približno 2 µg RNK). Vse reagente in mikrotitersko ploščo smo med pripravo hranili ves čas na ledu.

Reakcijska mešanica RT-PCR končnega volumna 20 µL je vsebovala:

- 4 µL PCR pufer (10X RT Buffer )
- 1,6 µL mešanica deoksiribonukleotidov (25X dNTP Mix)
- 4 µL naključni oligonukleotidni začetniki (10X RT Random Primers)
- 2 µL RNazni inhibitor (RNase inhibitor)
- 2 µL reverzna transkriptaza (MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U/µL)
- 5,4 µL DEPC voda (voda brez nukleaz)
- 1 µL vzorčka ( 2 µg RNK)

Reakcijske tubice smo nato vstavili v aparaturo za PCR in vzpostavili temperaturno časovni protokol (določen v protokolu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems):

- 25°C, 10 minut
- 37°C, 120 minut
- 85°C, 5 minut
- 4°C, neomejeno (shranjevanje)

Po končani reakciji smo izmerili absorbanco (pri 260 nm) dobljene cDNK s spektrofotometrom (SmartSpec 3000™). Izračunali približno koncentracijo (upoštevajoč, da če je  $A_{260}=1$ , je koncentracija DNK 37 µg/mL) ter pripravili redčitve posameznih

vzorcev z DEPC vodo, tako da smo dobili približno koncentracijo 5ng cDNK/ $\mu$ L za vsak vzorec.

#### 4.6.2.2 Reakcija PCR v realnem času

V drugem koraku smo izvedli reakcijo PCR v realnem času na aparaturi Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System. Uporabili smo reagente TaqMan® Gene Expression Assay in reakcijo izvajali na 48-mestnih mikrotitrskih ploščah (Applied Biosystems), s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za naslednje gene: *Cyp19a1*, *Hsd17b1*, *Akr1c6*, *Srd5a* ter za *Actb* in *Gapdh*, ki smo ju uporabili za notranjo kontrolo. Za vsako reakcijo smo pripravili reagente v obliki skupne reakcijske mešanice PCR volumna 13 $\mu$ L, v katero smo potem dodali 2 $\mu$ L vzorca ( približno 10 ng cDNK). Pri pripravi reakcijske mešanice smo upoštevali tudi negativno kontrolo reakcije PCR, pri kateri smo vzorčno cDNK nadomestili z DEPC vodo. Vse reagente in mikrotitrsko ploščo smo med pripravo hranili ves čas na ledu.

Posamezna reakcijska mešanica qRT-PCR končnega volumna 15 $\mu$ L je vsebovala:

- 7,5  $\mu$ L izhodiščna zmes (TaqMan® Universal Master Mix II with UNG (Uracil-N-Glikozilaza), 2X)
- 0,5  $\mu$ L specifičnih oligonukleotidnih začetnikov (za gene: *Hsd17b1*; *Akr1c6*; *Srd5a1*; *Actb*; *Gapdh*)
- 5  $\mu$ L DEPC vode
- 2  $\mu$ L cDNK (koncentracija 5ng/  $\mu$ L, torej 10ng v posamezni reakcijski mešanici)

Mikrotitrsko ploščo smo nato vstavili v aparaturo za PCR v realnem času (Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System) in vzpostavili temperaturno časovni protokol:

- 50°C, 2 minuti (inkubacija Uracil-N-Glikozilaze, UNG)
- 95°C, 10 minut (aktivacija polimeraze)
- 40 ciklov:
  - 95°C, 15 sekund (denaturacija DNK)
  - 60°C, 1 minuta (prileganje začetnih oligonukleotidov)

Sledila je analiza podatkov.

#### 4.7 STATISTIČNE METODE.

Za statistično obdelavo smo uporabili ti. metodo po Pfaffl-u , matematični model za relativno kvantifikacijo z RT-PCR v realnem času (Pfaffl, 2001). Ta metoda upošteva različne učinkovitosti pomnoževanja DNK pri PCR reakciji. Upoštevali smo samo tiste vrednosti Ct, ki so bile nižje od 35.

Eksperiment je temeljil na RNK izolirani iz kompleksnih vzorcev tkiva, zato je bilo potrebno rezultate normalizirati, da bi zmanjšali variabilnost v začetni količini in sestavi vzorca. Uporabili smo dva referenčna gena ( *Gapdh*, *Actb* ) kot endogeni kontroli in kot normalizacijski faktor uporabili geometrično sredino njune stopnje izraženosti. Normalizirane stopnje izraženosti ciljnih genov smo izračunali z deljenjem ustrezne relativne količine z normalizacijskim faktorjem (Vandesompele in sod., 2002).

Za primerjavo rezultatov med skupinami smo uporabili programsko opremo NCSS 2007 software package (Waysville, Utah, ZDA). Za primerjavo razlik med posameznimi skupinami vzorcev po starosti, genotipu in spolu smo uporabili dvosmerno analizo variance, pri čemer smo starost, genotip in spol uporabili kot neodvisne spremenljivke. Potem pa smo izvedli še post hoc analizo s Fisherjevim LSD testom. Pri vseh analizah smo kot statistično zanesljivo upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

## 5 REZULTATI

### 5.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili 48 možganov mišjih zarodkov, primerne starosti in genotipa. Vsi vzorci so bili zbrani v razponu enega leta. Razdelili smo jih v naslednje skupine:

Preglednica 2: Pregled skupin vzorcev vključenih v raziskavo.

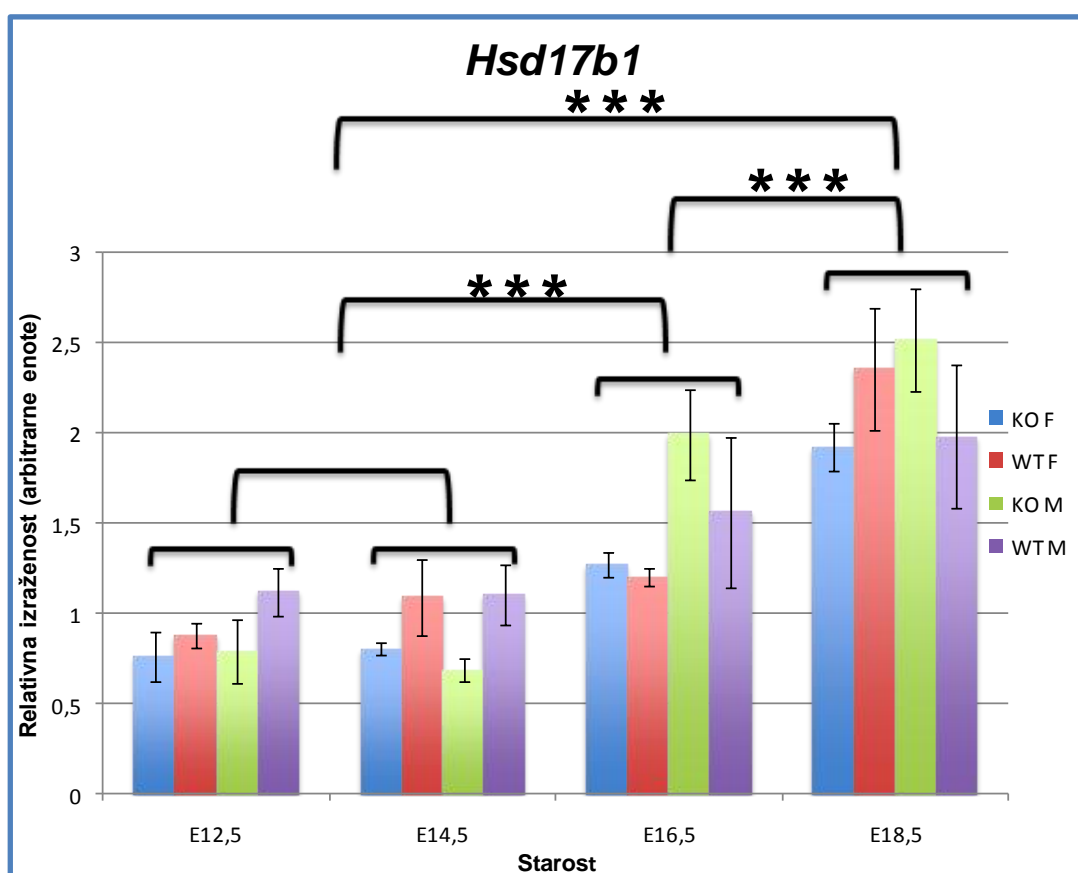
genotipi zarodkov	starost zarodkov			
	E12,5	E14,5	E16,5	E18,5
<b>KOf</b>	3	3	3	3
<b>KOm</b>	3	3	3	3
<b>WTf</b>	3	3	3	3
<b>WTm</b>	3	3	3	3
<b>SKUPAJ</b>	<b>48 vzorcev</b>			

RAZLAGA: V vsako posamezno skupino so bili kot je prikazano vključeni možgani treh zarodkov. Pomen oznak: E12,5, E14,5 E16,5, E18,5- starosti zarodkov (npr. 12,5 dni po oploditvi); KO- zarodek brez gena *Sf-1*; WT- zarodek divjega tipa; f- ženski spol; m- moški spol

## 5.2 RAZLIKE MED STAROSTNIMI SKUPINAMI

### 5.2.1 Hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaza (HSD17B1)

*Hsd17b1* ali hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaza (Slika 7) se začne izražati v možganih pri 12,5 dni (E12,5) starih zarodkih in stopnja izraženosti se do starosti 14,5 dni (E14,5) bistveno ne spremeni. Statistično značilno povišanje smo zaznali pri starosti 16,5 dni in tudi pri starosti 18,5 dni se izražanje še poviša ( $p < 0,001$ ).

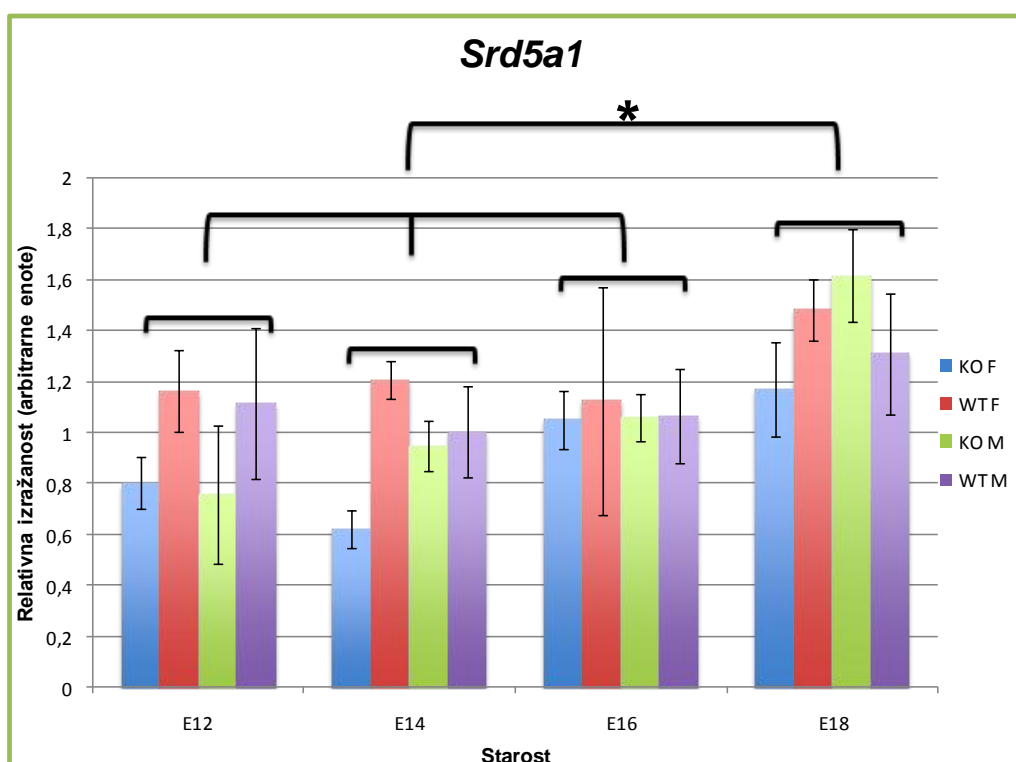


Slika 7: Analiza relativne izraženosti gena *Hsd17b1* po starostnih skupinah.

Stopnje izraženosti so bile določene z uporabo RT-PCR v realnem času, na aparaturi Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System z reagenti TaqMan® Gene Expression Assay, v možganih različno starih mišjih zarodkov (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5= 12, 14, 16,18 dni po spočetju). Uporabili smo miši divjega tipa (WT) in miši brez gena *Sf-1* (KO). F=oznaka samic, M=oznaka samcev. Prikazane so povprečne relativne stopnje izraženosti normalizirane glede na geometrično sredino relativne stopnje izraženosti referenčnih genov (*Actb, Gapdh*). \*\*\*označuje statistično značilne razlike med posameznimi starostnimi skupinami določene z uporabo Fisherjevega LSD testa. Pri analizi smo kot statistično značilno upoštevali razliko pri  $p < 0,001$ .

## 5.2.2 Steroid 5 $\alpha$ reduktaza 1 (SRD5A1)

*Srd5a1* ali steroid 5 $\alpha$  reduktaza 1 (Slika 8) se je izražala v možganih mišjih zarodkov pri vseh štirih starostnih skupinah. Pri 18,5 dni starih možganih zarodkov (E18,5) smo zaznali povišanje stopnje izražanja glede na izražanje v možganih mlajših zarodkov. Med mlajšimi starostnimi skupinami pa nismo zaznali statistično značilnih razlik ( $p < 0,05$ ). Statistika prikazuje tudi zanimiv trend razlike med genotipoma, predvsem pri mlajših zarodkih (E12,5 in E14,5), kjer je stopnja izraženosti *Srd5a1* nekoliko nižja pri KO kot pri WT, vendar te razlike niso statistično značilne ( $p = 0,08$ ). V kolikor ta razlika obstaja, bi se verjetno bolj jasno pokazala, če bi v prihodnje povečali število živali na skupino.

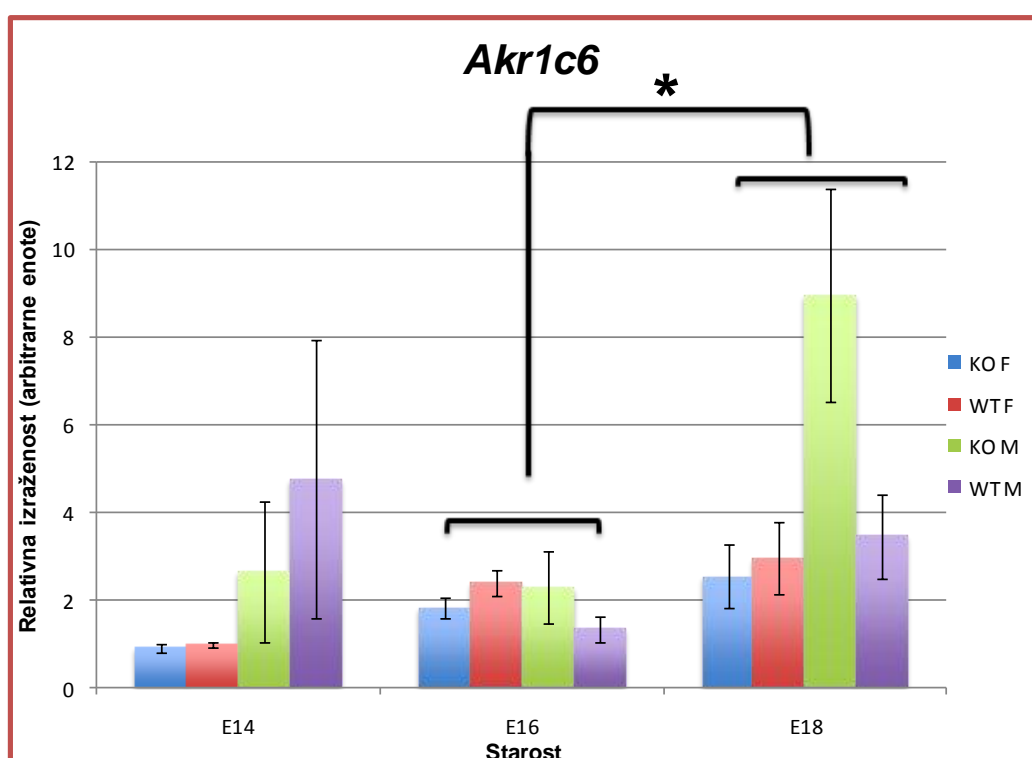


Slika 8: Analiza relativne izraženosti gena *Srd5a1* po starostnih skupinah.

Stopnje izraženosti so bile določene z uporabo RT-PCR v realnem času, na aparaturi Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System z reagenti TaqMan® Gene Expression Assay, v možganih različno starih mišjih zarodkov (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5 = 12, 14, 16, 18 dni po spočetju). Uporabili smo miši divjega tipa (WT) in miši brez gena *Sf-1* (KO). F=oznaka samic, M=oznaka samcev. Prikazane so povprečne relativne stopnje izraženosti normalizirane glede na geometrično sredino relativne stopnje izraženosti referenčnih genov (*Actb*, *Gapdh*). \*označuje statistično značilne razlike med posameznimi starostnimi skupinami določene z uporabo Fisherjevega LSD testa. Pri analizi smo kot statistično značilno upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .

### 5.2.3 Aldo-keto reduktaza družine 1, član C6 (AKR1C6)

Izražanje gena *Akr1c6* (Slika 9) smo zaznali šele pri 14,5 dni starih možganih zarodkov in starejših. Pri 12,5 dni starih zarodkih je bila izraženost gena *Akr1c6* pod mejo detekcije. Stopnja izražanja je bila tudi pri ostalih starostih zelo nizka. Statistično značilno razliko v izraženosti *Akr1c6* smo zaznali med možgani zarodkov starimi 16,5 dni in 18,5 dni in sicer s starostjo stopnja izraženosti naraste ( $p < 0,05$ ), predvsem na račun zelo povišane izraženosti pri samcih brez gena *Sf-1*.

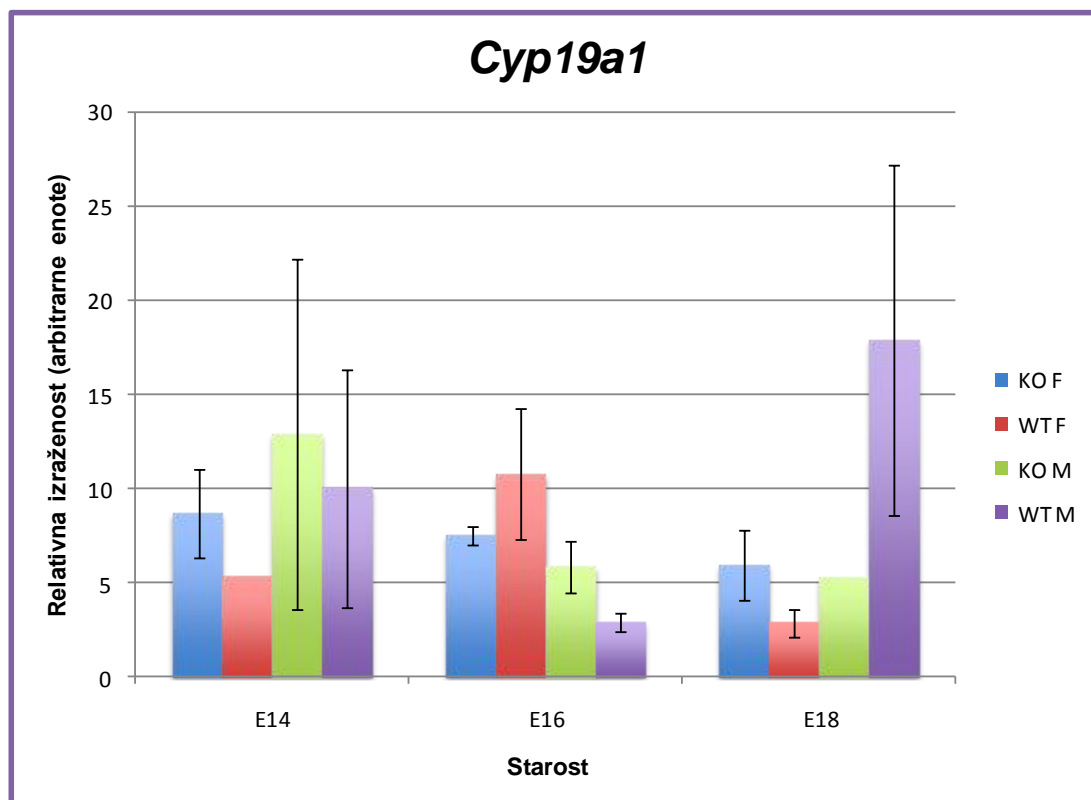


Slika 9: Analiza relativne izraženosti gena *Akr1c6* po starostnih skupinah.

Stopnje izraženosti so bile določene z uporabo RT-PCR v realnem času, na aparaturi Mastercycler® ep realplex (Eppendorf) z reagenti QuantiFast™ SYBR® Green RT-PCR (Qiagen, 204154), v možganih različno starih mišjih zarodkov (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5 = 12, 14, 16, 18 dni po spočetju). Uporabili smo miši divjega tipa (WT) in miši brez gena *Sf-1* (KO). F=oznaka samic, M=oznaka samcev. Prikazane so povprečne relativne stopnje izraženosti normalizirane glede na geometrično sredino relativne stopnje izraženosti referenčnih genov (*Actb*, *Gapdh*). \*označuje statistično značilne razlike med posameznimi starostnimi skupinami določene z uporabo Fisherjevega LSD testa. Pri analizi smo kot statistično značilno upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .

#### 5.2.4 Citokrom P450, družina 19, poddružina A, polipeptid 1 (CYP19A1)

Izražanje gena *Cyp19a1* (Slika 10) smo zaznali v možganih zarodkov starejših od 14,5 dni. Stopnja izražanja je bila šibka, pravzaprav na meji detekcije in tudi standardne napake so bile velike. Statistično značilnih razlik v izraženosti *Cyp19a1* med različnimi starostnimi skupinami zarodkov nismo zaznali ( $p < 0,05$ ).



Slika 10: Analiza relativne izraženosti gena *Cyp19a1* po starostnih skupinah.

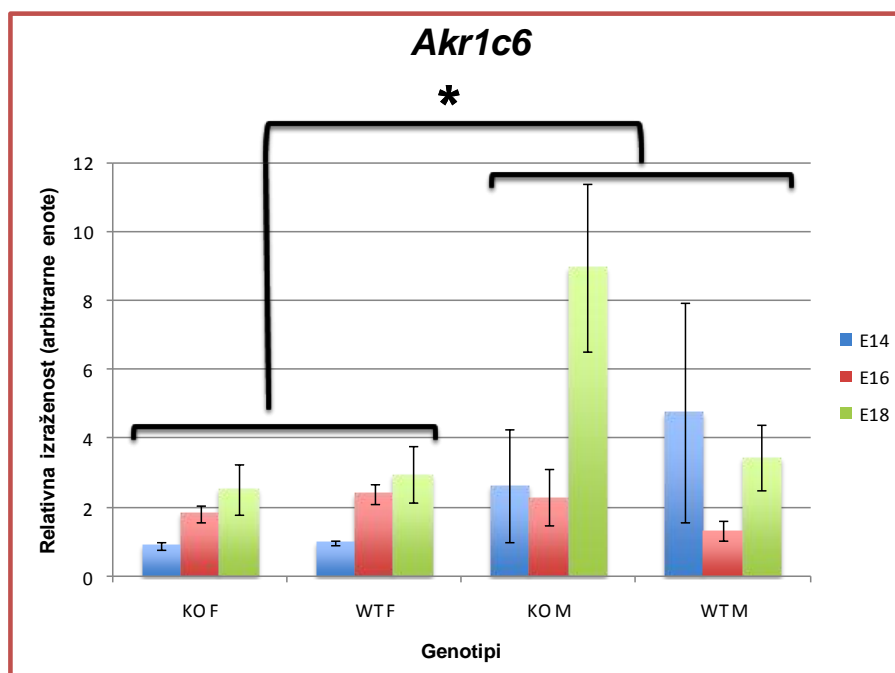
Stopnje izraženosti so bile določene z uporabo RT-PCR v realnem času, na aparaturi Mastercycler® ep realplex (Eppendorf) z reagenti QuantiFast™ SYBR® Green RT-PCR (Qiagen, 204154), v možganih različno starih mišjih zarodkov (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5 = 12, 14, 16, 18 dni po spočetju). Uporabili smo miši divjega tipa (WT) in miši brez gena *Sf-1* (KO). F=oznaka samic, M=oznaka samcev. Prikazane so povprečne relativne stopnje izraženosti normalizirane glede na geometrično sredino relativne stopnje izraženosti referenčnih genov (*Actb*, *Gapdh*). \*označuje statistično značilne razlike med posameznimi starostnimi skupinami določene z uporabo Fisherjevega LSD testa. Pri analizi smo kot statistično značilno upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .



### 5.3 RAZLIKE MED SPOLOMA

#### 5.3.1 Aldo-keto reduktaza družine 1, član C6 (AKR1C6)

Statistično značilna razlika med obema spoloma živali se je pokazala le pri izraženosti gena *Akr1c6* ( $p < 0,05$ ). Stopnja izraženosti *Akr1c6* v možganih ženskih zarodkov je nižja od stopnje izraženosti v možganih moških zarodkov.



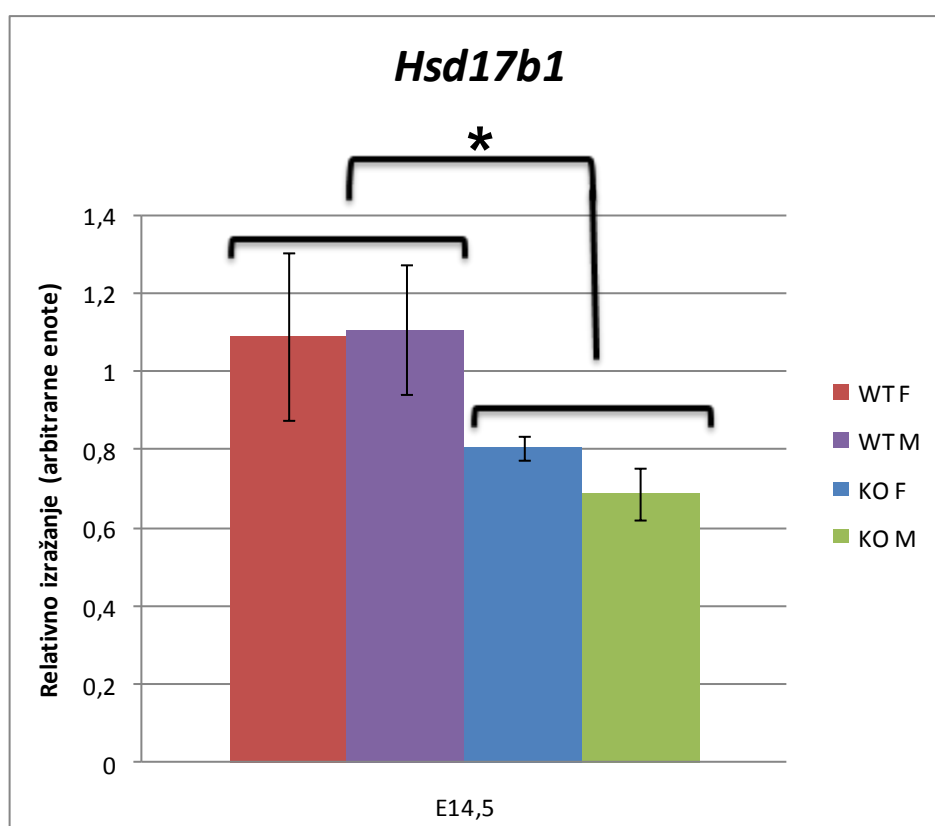
Slika 11: Analizo relativne izraženosti gena *Akr1c6* po genotipih.

Stopnje izraženosti so bile določene z uporabo RT-PCR v realnem času, na aparaturi Mastercycler® ep realplex (Eppendorf) z reagenti QuantiFast™ SYBR® Green RT-PCR (Qiagen, 204154), v možganih različno starih mišjih zarodkov (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5 = 12, 14, 16, 18 dni po spočetju). Uporabili smo miši divjega tipa (WT) in miši brez gena za *Sf-1* (KO). F=oznaka samic, M=oznaka samcev. Prikazane so povprečne relativne stopnje izraženosti normalizirane glede na geometrično sredino relativne stopnje izraženosti referenčnih genov (*Actb*, *Gapdh*). \*označuje statistično značilne razlike med posameznimi starostnimi skupinami določene z uporabo Fisherjevega LSD testa. Pri analizi smo kot statistično značilno upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .

## 5.4 RAZLIKE ZNOTRAJ POSAMEZNIH STAROSTNIH SKUPIN

### 5.4.1 Hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaza (HSD17B1)

V možganih 14,5 dni starih zarodkov je analiza pokazala statistično značilno razliko ( $p < 0,05$ ) v izraženosti gena *Hsd17b1* med mišmi brez gena *Sf-1* in mišmi divjega tipa. Stopnja izraženosti *Hsd17b1*, pri tej starosti, je višja pri miših divjega tipa kot pri miših brez gena *Sf-1* (Slika 12).

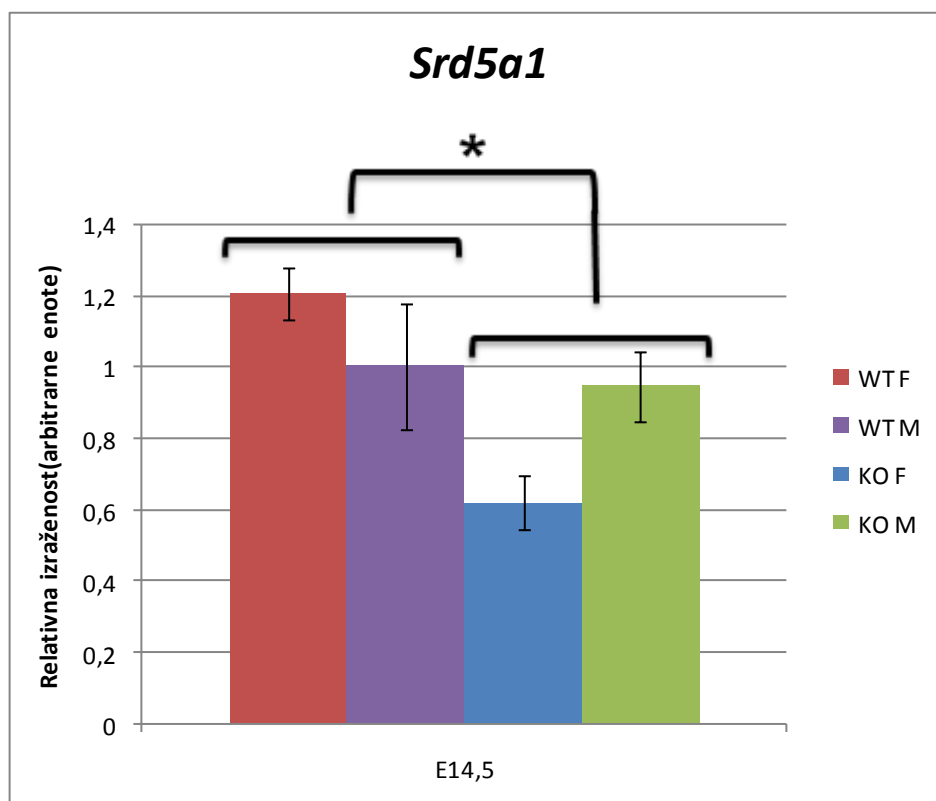


Slika 12: Analiza relativne izraženosti gena *Hsd17b1* pri 14,5 dni starih zarodkih.

Stopnje izraženosti so bile določene z uporabo RT-PCR v realnem času, na aparaturi Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System z reagenti TaqMan® Gene Expression Assay, v možganih različno starih mišjih zarodkov (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5 = 12, 14, 16, 18 dni po spočetju). Uporabili smo miši divjega tipa (WT) in miši brez gena za *Sf-1* (KO). F=oznaka samic, M=oznaka samcev. Prikazane so povprečne relativne stopnje izraženosti normalizirane glede na geometrično sredino relativne stopnje izraženosti referenčnih genov (*Actb*, *Gapdh*). \*označuje statistično značilne razlike med posameznimi starostnimi skupinami določene z uporabo Fisherjevega LSD testa. Pri analizi smo kot statistično značilno upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .

#### 5.4.2 Steroid 5 $\alpha$ reduktaza 1 (SRD5A1)

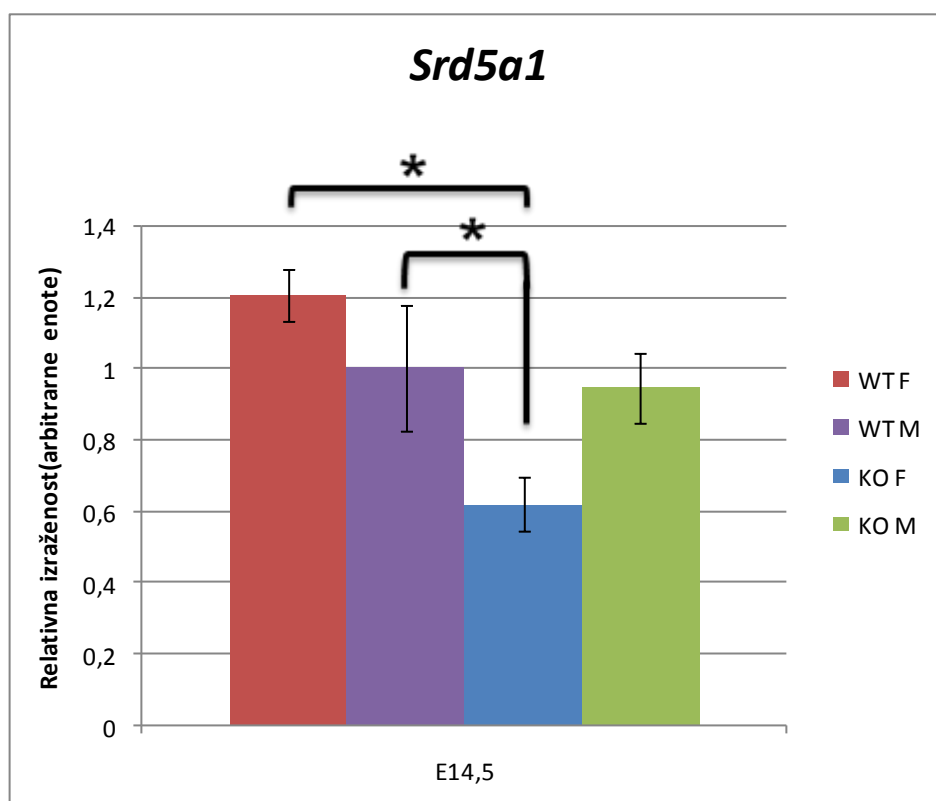
Izraženost gena *Srd5a1* je bila višja v možganih miši divjega tipa kot pri miših brez gena *Sf-1* pri 14,5 dni starih zarodkih ( $p < 0,05$ ) (Slika 13).



Slika 13: Analiza relativne izraženosti gena *Srd5a1* pri 14,5 dni starih zarodkih.

Stopnje izraženosti so bile določene z uporabo RT-PCR v realnem času, na aparaturi Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System z reagenti TaqMan® Gene Expression Assay, v možganih različno starih mišjih zarodkov (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5 = 12, 14, 16, 18 dni po spočetju). Uporabili smo miši divjega tipa (WT) in miši brez gena *Sf-1* (KO). F=oznaka samic, M=oznaka samcev. Prikazane so povprečne relativne stopnje izraženosti normalizirane glede na geometrično sredino relativne stopnje izraženosti referenčnih genov (*Actb, Gapdh*). \*označuje statistično značilne razlike med posameznimi starostnimi skupinami določene z uporabo Fisherjevega LSD testa. Pri analizi smo kot statistično značilno upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .

Analiza variance z uporabo dveh spremenljivk hkrati (genotip in spol) je pokazala razlike ( $p < 0,05$ ) v izraženosti gena *Srd5a1* v možganih 14,5 dni starih zarodkov. Izražanje je statistično značilno višje pri miših divjega tipa obeh spolov kot pri samicah brez gena *Sf-1* (Slika 14).

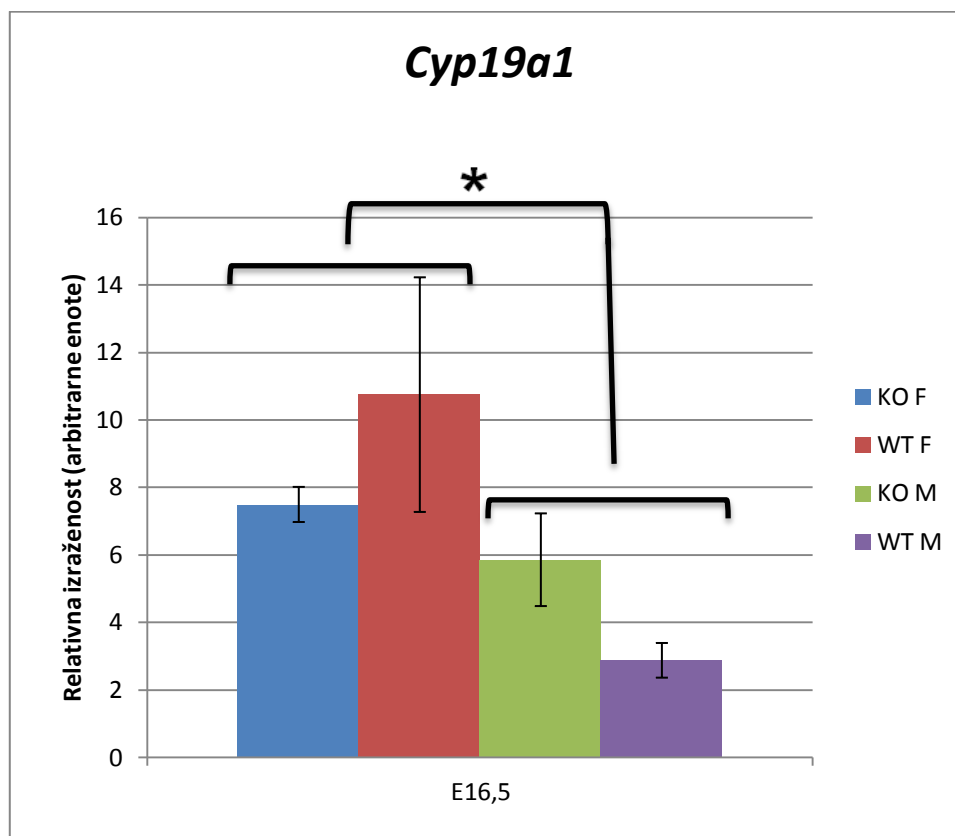


Slika 14: Analiza relativne izraženosti gena *Srd5a1* pri 14,5 dni starih zarodkih.

Stopnje izraženosti so bile določene z uporabo RT-PCR v realnem času, na aparaturi Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System z reagenti TaqMan® Gene Expression Assay, v možganih različno starih mišjih zarodkov (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5 = 12, 14, 16,18 dni po spočetju). Uporabili smo miši divjega tipa (WT) in miši brez gena *Sf-1* (KO). F=oznaka samic, M=oznaka samcev. Prikazane so povprečne relativne stopnje izraženosti normalizirane glede na geometrično sredino relativne stopnje izraženosti referenčnih genov (*Actb, Gapdh*). \*označuje statistično značilne razlike med posameznimi starostnimi skupinami določene z uporabo Fisherjevega LSD testa. Pri analizi smo kot statistično značilno upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .

### 5.4.3 Citokrom P450, družina 19, poddružina A, polipeptid 1 (CYP19A1)

Pri izražanju *Cyp19a1* smo zaznali razliko med spoloma pri 16,5 dni starih zarodkih (Slika 15), pri ostalih starostih ni bilo statistično značilnih razlik ( $p < 0,05$ ). Stopnja izraženosti gena *Cyp19a1* je bila v možganih zarodkov ženskega spola višja kot pri moških.



Slika 15: Analiza relativne izraženosti gena *Cyp19a1* pri 16,5 dni starih zarodkih.

Stopnje izraženosti so bile določene z uporabo RT-PCR v realnem času, na aparaturi Mastercycler® ep realplex (Eppendorf) z reagenti QuantiFast™ SYBR® Green RT-PCR (Qiagen, 204154), v možganih različno starih mišjih zarodkov (E12,5; E14,5; E16,5; E18,5 = 12, 14, 16,18 dni po spočetju). Uporabili smo miši divjega tipa (WT) in miši brez gena *Sf-1* (KO). F=oznaka samic, M=oznaka samcev. Prikazane so povprečne relativne stopnje izraženosti normalizirane glede na geometrično sredino relativne stopnje izraženosti referenčnih genov (*Actb*, *Gapdh*). \*označuje statistično značilne razlike med posameznimi starostnimi skupinami določene z uporabo Fisherjevega LSD testa. Pri analizi smo kot statistično značilno upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ .

## 6 RAZPRAVA IN SKLEPI

Danes je že trdno uveljavljeno prepričanje, da steroidni hormoni igrajo ključno vlogo v razvoju in delovanju centralnega živčnega sistema. Opažanja Baulieu-a in njegove raziskovalne skupine tri desetletja nazaj, da so določeni biološko aktivni steroidni hormoni prisotni v višjih koncentracijah v centralnem živčnem sistemu kot v krvi, so predstavljala velik prodor naprej (Corpechot in sod., 1981; Corpechot in sod., 1983). Od takrat so bila odkrita mesta nahajanja za večino encimov odgovornih za biosintezo steroidnih hormonov v možganih mnogih vretenčarjev in zaznana je bila tudi njihova aktivnosti v posameznih možganskih tkivih. Čeprav je koncept nevrosteroidogeneze torej do danes čvrsto postavljen in uveljavljen pa je ostalo še kar nekaj pomembnih vprašanj, na katera ne znamo odgovoriti (Do Rego in sod., 2009).

Možgani moškega in ženske se strukturno razlikujejo skoraj na vseh anatomskih stopnjah: molekulski, ultrastrukturni, celični in na stopnji živčnega sistema. Steroidni hormoni iz spolnih žlez (še posebej androgeni) igrajo odločilno vlogo pri povzročanju teh razlik z maskulinizacijo živčnega sistema samca, kar pa se zgodi zelo zgodaj v razvoju, običajno že v zarodku. Androgeni so potrebni tako med razvojem kot tudi v odrasli dobi, da je dosežena popolna maskulinizacija možganskih struktur in vedenja. Pri glodavcih je pogosto aromatiziran metabolit androgena (t.j. estrogen) tisti, ki naj bi reagiral z estrogenskim receptorji in povzročil maskulinizacijo možganov, vendar je le malo dokazov, da igra enako vlogo tudi pri primatih, vključno z ljudmi. Obstojajo seveda še drugi živalski modeli, kjer androgeni sami maskulinizirajo živčni sistem z vezavo na androgenske receptorje. Steroidni hormoni imajo v teh procesih vpliv na številne celične mehanizme kot so nevrogeneza, celična smrt, celična migracija, tvorba sinaps, odstranjevanje sinaps in celo celična diferenciacija (Cooke in sod., 1998).

Poleg miši divjega tipa smo pri tem diplomskem delu uporabili še miši brez gena *Sf-1*, ki se rodijo brez spolnih in nadledvičnih žlez, z nedelujočimi gonadotropnimi celicami v hipofizi ter s spremenjenim ventromedialnim jedrom v hipotalamusu. V miših brez gena *Sf-1* se spolni greben izoblikuje normalno pri 10,5 dni staremu zarodku (E10,5), vendar takoj preide v apoptozo in izgine do dneva 12,5 (E12,5). Posledično se pri teh miših

razvijejo ženski notranji in zunanji spolni organi, ne glede na genetski spol. Izražanje steroidogenih encimov v mišjih modih (jajčniki pri zarodkih še niso hormonsko aktivni) se pri zarodkih pojavi okoli 13,5 dneva po oploditvi (E13,5), kar sovpada z začetkom proizvodnje testosterona. Miši brez gena *Sf-1* med embrionalnim razvojem, v prvi fazi izpostavitve plodu spolnim steroidnim hormonom, torej niso izpostavljene lastnim steroidnim hormonom iz spolnih žlez in predstavljajo odličen model za preučevanje razvoja in delovanja centralnega živčnega sistema neodvisno od spolnih žlez. Upoštevati pa moramo tudi, da kljub temu da so spolne žleze odsotne, so lahko zarodki izpostavljeni spolnim steroidnim hormonom iz drugih virov (placenta; sosednji zarodki divjega tipa ali heterozigoti), vendar bi se ti vplivi morali pojavljati naključno (Budefeld in sod., 2008).

Izražanje genov v celicah je proces pri katerem se informacija, zapisana v DNK spremeni v genetski produkt, najprej v RNK in nato v protein. Ocena mRNK (sporočilna RNK) lahko služi kot vmesni pokazatelj stopnje izražanja proteina in je zelo pomembna za prikaz profila genskega izražanja v celici. Izraženost mRNK smo določali z metodo PCR v realnem času. Metoda je zelo občutljiva in ima širok razpon kvantifikacije. Zaznamo in izmerimo lahko minimalne količine nukleinskih kislin v različnih vzorcih (Bustin, 2002).

V naši raziskavi smo želeli preučiti izražanje genov za štiri različne steroidogene encime: *Hsd17b1*, *Akr1c6*, *Srd5a1* in *Cyp19a1*.

## 6.1 VPLIV STAROSTI

Preučili smo izražanje štirih genov (*Hsd17b1*, *Akr1c6*, *Srd5a1* in *Cyp19a1*) v možganih mišjih zarodkov pri štirih različnih starostih. Najmlajši zarodki so bili stari 12,5 dni (E12,5) ob odvzemu, drugo skupino možgan smo pridobili ob starosti 14,5 dni (E14,5), tretjo ob dnevu 16,5, zadnje najstarejše možgane pa smo odvzeli 18,5 dni (E18,5) starim zarodkom. V naši začetni hipotezi smo predvidevali, da bomo zaznali izražanje vseh štirih encimov v možganih zarodkov in jo tudi potrdili. Zaznali smo izražanje vseh štirih encimov že v možganih zarodkov.

*Hsd17b1* (Slika 7) se začne izražati v možganih že pri 12,5 dni starih zarodkih. Naši rezultati kažejo, da se pri starosti 16,5 dni njegovo izražanje statistično značilno poveča in tudi pri starosti 18,5 dni še naraste. Torej s starostjo izražanje *Hsd17b1* v možganih mišjih zarodkov narašča.

Izražanje *Akr1c6* (Slika 9) smo zaznali šele pri 14,5 dni starih možganih zarodkov in starejših. Stopnja izražanja je bila tudi pri teh starostih zelo nizka. Statistično značilnih razlik v izražanju *Akr1c6* med različno starimi zarodki ni bilo zaznati. Z merjenjem encimske aktivnosti AKR1C6 v različnih regijah možganov odrasle podgane, pri čemer so uporabili monoklonska telesa proti jetrni različici encima, so opazili da je najvišja koncentracija encima prisotna v vohalnih betičih in nabreklih, v ostalih delih možgan pa je bilo zaznati nižje koncentracije encima (Celotti in sod., 1997). Glede na to, da s tudi toliko bolj občutljivo metodo kot je PCR v realnem času, dobimo le nizke stopnje izražanja, je verjetno encima v možganih zarodkov res zelo malo.

*Srd5a1* (Slika 8) se je izražala v možganih mišjih zarodkov pri vseh štirih starostnih skupinah. Pri 18,5 dni starih možganih zarodkov (E18,5) smo zaznali povišanje stopnje izražanja glede na izražanje v možganih mlajših zarodkov. Med mlajšimi starostnimi skupinami nismo zaznali statistično značilnih razlik. Naši rezultati se tako nekoliko razlikujejo od podatkov iz literature, kjer so poročali o merjenju izražanja steroid 5 $\alpha$  reduktaze tipa 1 z metodo PCR v realnem času in Northern blot analizo in zaznali pretežno konstantno izražanje *Srd5a1* v možganih skozi embrionalni razvoj, vendar pa so bile te raziskave opravljene v možganih podgan (Celotti in sod., 1997).

Izražanje *Cyp19a1* ali aromataze (Slika 10) smo sicer zaznali, vendar je bilo zelo šibko, pravzaprav na meji detekcije in tudi standardne napake so bile velike. Znano je, da je izražanje *Cyp19a1* v možganih glodavcev omejeno na majhno območje v primerjavi s celotnimi možgani (Slika 4) in sicer je to v glavnem območje hipotalamusa in predoptično področje (Compagnone in Mellon, 2000). Zato smo predvidevali, da je bil naš vzorec najbrž prevelik (uporabili smo celotne možgane). Za boljše rezultate, bi bilo potrebno še posebej analizirati posamezne dele možganov.



## 6.2 VPLIV GENOTIPA

V našem delu smo želeli poiskati razlike v izražanju genov *Hsd17b1*, *Akr1c6*, *Srd5a1* in *Cyp19a1*, med mišmi divjega tipa (WT) in mišmi brez gena *Sf-1*(KO), v možganih zarodkov. Ugotovili smo, da *Sf-1* na nobenega od teh genov ne vpliva.

Kljub temu pa smo znotraj skupine 14,5 dni starih zarodkov ( Slika12, Slika 13) zaznali statistično značilno razliko med WT in KO v izražanju *Hsd17b1* in *Srd5a1*.

## 6.3 VPLIV SPOLA

Naša tretja hipoteza je bila, da obstajajo razlike med spoloma v izražanju vseh štirih genov, *Hsd17b1*, *Akr1c6*, *Srd5a1* in *Cyp19a1* v možganih zarodkov pri miših. Naši rezultati kažejo, da je izražanje *Hsd17b1* in *Srd5a1* enako pri obeh spolih, kar se v primeru *Srd5a1* tudi ujema z rezultati iz literature (Compagnone in Mellon, 2000).

Pri *Cyp19a1* smo zaznali razliko v izražanju med spoloma le pri 16,5 dni starih zarodkih (E16,5) (Slika 15), pri ostalih starostih ni bilo statistično značilnih razlik.

Izraženost gena *Akr1c6* se je razlikovala med samci in samicami, in sicer je bilo izražanje v možganih zarodkov moškega spola višje kot pri ženskah.

## 7 POVZETEK

Ženske in moški se razlikujemo v velikosti in obliki teles, fiziološko in tudi v vedenju. Obstoja teorija, ki predvideva, da na razvoj določenih oblik vedenja tipičnega za spol vpliva izpostavljenost zarodka spolnim hormonom v obdobju pred rojstvom (Nelson, 2005). Spolni hormoni spadajo med steroidne hormone in so derivati holesterola. Dolgo časa je veljalo, da so endokrine žleze, kot so skorja nadledvične žleze, spolne žleze in placenta, edini vir steroidov, ki vplivajo na možgane. Več raziskav pa je pokazalo, da so tudi možgani sami sposobni tvorbe različnih steroidov (Do Rego in sod., 2009).

Miši brez gena *Sf-1* se rodijo brez spolnih in nadledvičnih žlez, z nedelujočimi gonadotropnimi celicami v hipofizi ter s spremenjenim ventromedialnim jedrom v hipotalamusu. Med embrionalnim razvojem niso izpostavljene lastnim steroidnim hormonom iz spolnih žlez in predstavljajo odličen model za preučevanje razvoja in delovanja centralnega živčnega sistema neodvisno od spolnih žlez (Budefeld in sod., 2008).

V diplomskem delu smo preučili izraženost naslednjih steroidogenih encimov: aromataze (*Cyp19a1*, citokrom P450, družina 19, poddružina a, polipeptid 1), 17 $\beta$  hidroksteroidne dehidrogenaze (*Hsd17b1*, hidroksteroid (17-beta) dehidrogenaza 1), 3 $\alpha$  hidroksteroidne dehidrogenaze (*Akr1c6*, aldo-keto reduktaza družina 1, član C6) in 5 $\alpha$  reduktaze (*Srd5a1*, steroid 5 alfa-reduktaza 1) v možganih zarodkov miši divjega tipa in jih primerjali z izraženostjo pri miših brez gena *Sf-1*. Ugotoviti smo želeli ali obstajajo razlike v izraženosti teh encimov med spoloma, med različnimi starostmi zarodkov in ali so prisotne razlike med mišmi divjega tipa in mišmi brez gena *Sf-1*.

Miši brez gena *Sf-1* so neplodne, zato smo med seboj parili heterozigotne samce in samice in vsako jutro preverjali prisotnost nožničnih čepkov, ki se pri miših tvorijo po kopulaciji, da smo določili točno starost zarodkov ob odvzemu možganov. Breje samice smo na določene dneve žrtvovali in odvzeli zarodke. Vsakemu zarodku smo nato določili genotip in spol, iz njihovih možganov pa izolirali RNK, preko katere smo merili izraženost encimov z metodo verižne reakcije s polimerazo in obratnim prepisom v realnem času (qRT-PCR).

qRT-PCR je uporabna metoda s katero lahko spremljamo izražanje specifičnih genov v zelo kratkem času in majhnih količinah vzorcev. S qRT-PCR v vzorcu podvojujemo specifično tarčno sekvenco DNK, kopičenje DNK pa spremljamo z merjenjem fluorescence. Ko signal doseže prag to lahko povežemo s količino tarčne sekvence (Wong in Medrano, 2005).

Za statistično obdelavo smo uporabili Pfaffl-ov matematični model za relativno kvantifikacijo z qRT-PCR (Pfaffl, 2001). Uporabili smo tudi dva referenčna gena (*Gapdh*, *Actb*) kot endogeni kontroli in kot normalizacijski faktor uporabili geometrično sredino njune stopnje izraženosti (Vandesompele in sod., 2002). Za primerjavo razlik med posameznimi skupinami vzorcev po starosti, genotipu in spolu smo uporabili dvosmerno analizo variance, pri čemer smo starost, genotip in spol uporabili kot neodvisne spremenljivke (kot statistično zanesljivo smo upoštevali razliko pri  $p < 0,05$ ).

Kot smo predvidevali smo zaznali izražanje vseh štirih encimov v možganih zarodkov. S starostjo izražanje *Hsd17b1* v možganih mišjih zarodkov narašča. V izražanju *Akr1c6* med različno starimi zarodki ni bilo zaznati razlik, stopnja izražanja pa je bila pri vseh starostih zelo nizka (izražanje zaznali šele v 14,5 dni starih možganih zarodkov in starejših). Predvidevali smo, da je encima v možganih zarodkov malo. *Srd5a1* se je izražala v možganih mišjih zarodkov pri vseh štirih starostnih skupinah. Pri 18,5 dni starih možganih zarodkov (E18,5) smo zaznali povišanje stopnje izražanja glede na izražanje v možganih mlajših zarodkov. Med ostalimi starostnimi skupinami ni bilo razlik. Naši rezultati se tako nekoliko razlikujejo od podatkov iz literature, kjer so zaznali pretežno kostantno izražanje *Srd5a1* v možganih skozi embrionalni razvoj, vendar pa so bile raziskave opravljene v možganih podgan (Celotti in sod., 1997). Izražanje *Cyp19a1* smo sicer zaznali, vendar je bilo zelo šibko in tudi standardne napake so bile velike. *Cyp19a1* se v možganih glodavcev izraža omejeno, na majhnem območju v primerjavi s celotnimi možgani (v glavnem območje hipotalamusa in predoptično področje) (Compagnone in Mellon, 2000). Zato je verjetno bil naš vzorec prevelik (celotni možgani). Za boljše rezultate, bi bilo potrebno še posebej analizirati posamezne dele možganov.

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

Naši rezultati kažejo, da se *Sf-1* ne vpliva na izražanje *Hsd17b1*, *Srd5a1*, *Akr1c6* in *Cyp19a1*. Le znotraj skupine 14,5 dni starih zarodkov smo zaznali statistično značilno razliko med mišmi divjega tipa in mišmi brez gena *Sf-1* v izražanju *Hsd17b1* in *Srd5a1*.

Izražanje *Hsd17b1* in *Srd5a1* je tudi enako pri obeh spolih. Pri *Cyp19a1* smo zaznali razliko v izražanju med spoloma le pri 16,5 dni starih zarodkih. Izraženost gena *Akr1c6* pa se je razlikovala med samci in samicami. V možganih zarodkov moškega spola je bilo izražanje višje kot pri ženskah.

## 8 VIRI

- Bowen R.A. 2001. Steroidogenesis. Fort Collins. Colorado State University (online)  
<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/basics/steroidogenesis.html>  
(5. 3. 2010)
- Budefeld T., Grgurevic N., Tobet S.A., Majdic G. 2008. Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. *Developmental Neurobiology*, 68, 7: 981-995
- Bulun S.E., Noble L.S., Takayama K., Michael M.D., Agarwal V., Fisher C., Zhao Y., Hinshelwood M.M., Ito Y., Simpson E.R. 1997. Endocrine disorders associated with inappropriately high aromatase expression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61, 3-6: 133-139
- Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 1: 23-39
- Byne W. 2006. Developmental endocrine influences on gender identity: Implications for management of disorders of sex development. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 73, 7: 950-959
- Celotti F., Negri-Cesi P., Poletti A. 1997. Steroid metabolism in the mammalian brain: 5alpha-reduction and aromatization. *Brain Research Bulletin*, 44, 4: 365-375
- Cestnik V. 1996. Fiziologija endokrinega sistema pri domačih živalih. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 186 str.
- Compagnone N.A., Mellon S.H. 2000. Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21, 1: 1-56
- Conley A., Hinshelwood M. 2001. Mammalian aromatases. *Reproduction*, 121, 5: 685-695
- Connolly P.B., Roselli C.E., Resko J.A. 1994. Aromatase activity in developing guinea pig brain: Ontogeny and effects of exogenous androgens. *Biology of Reproduction*, 50, 2: 436-441
- Cooke B., Hegstrom C.D., Villeneuve L.S., Breedlove S.M. 1998. Sexual differentiation of the vertebrate brain: Principles and mechanisms. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 19, 4: 323-362
- Corpechot C., Robel P., Axelson M., Sjoval J., Baulieu E.E. 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 8: 4704-4707

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

Corpechot C., Synguelakis M., Talha S., Axelson M., Sjoval J., Vihko R., Baulieu E.E., Robel P. 1983. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Research*, 270, 1: 119-125

Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1 (GENSAT Image 41482). 2011. Bethesda, National Center for Biotechnology Information.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gensat/41015> ((05.04.2011))

Danielson P.B. 2002. The cytochrome p450 superfamily: Biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism*, 3, 6: 561-597

Do Rego J.L., Seong J.Y., Burel D., Leprince J., Luu-The V., Tsutsui K., Tonon M.C., Pelletier G., Vaudry H. 2009. Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30, 3: 259-301

Estabrook R.W. 2003. A passion for P450s (rememberances of the early history of research on cytochrome p450). *Drug Metabolism and Disposition*, 31, 12: 1461-1473

Gene. 2011. Bethesda, National Center for Biotechnology Information.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (5.5.2011)

George F.W., Ojeda S.R. 1982. Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. *Endocrinology*, 111, 2: 522-529

Harada N., Yamada K. 1992. Ontogeny of aromatase messenger ribonucleic acid in mouse brain: Fluorometrical quantitation by polymerase chain reaction. *Endocrinology*, 131, 5: 2306-2312

Hines M., Kaufman F.R. 1994. Androgen and the development of human sex-typical behavior: Rough-and-tumble play and sex of preferred playmates in children with congenital adrenal hyperplasia (CAH). *Child Development*, 65, 4: 1042-1053

Hunt M. 2010. Real time PCR. Columbia. University of South Carolina School of Medicine, Department of Pathology, Microbiology and Immunology (online)  
<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm> (14.10.2010)

Ikeda Y., Luo X., Abbud R., Nilson J.H., Parker K.L. 1995. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Molecular Endocrinology*, 9, 4: 478-486

Ikeda Y., Shen W.H., Ingraham H.A., Parker K.L. 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology*, 8, 5: 654-662

Imperato-McGinley J., Zhu Y.S. 2002. Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198, 1-2: 51-59

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

- Koopman P. 1999. SRY and SOX9: Mammalian testis-determining genes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 6-7: 839-856
- Labrie F., Luu-The V., Lin S.X., Labrie C., Simard J., Breton R., Belanger A. 1997. The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids*, 62, 1: 148-158
- Langer L.J., Engel L.L. 1958. Human placental estradiol-17 beta dehydrogenase. I. Concentration, characterization and assay. *The Journal of Biological Chemistry*, 233, 3: 583-588
- Luo X., Ikeda Y., Parker K.L. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77, 4: 481-490
- Luo X., Ikeda Y., Schlosser D.A., Parker K.L. 1995. Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse FTZ-F1 gene. *Molecular Endocrinology*, 9, 9: 1233-1239
- MacLusky N.J., Naftolin F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, 211, 4488: 1294-1302
- Mahendroo M.S., Cala K.M., Russell D.W. 1996. 5 alpha-reduced androgens play a key role in murine parturition. *Molecular Endocrinology*, 10, 4: 380-392
- Majdic G., Young M., Gomez-Sanchez E., Anderson P., Szczepaniak L.S., Dobbins R.L., McGarry J.D., Parker K.L. 2002. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*, 143, 2: 607-614
- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M. 1995. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 83, 6: 835-839
- Matsumoto T., Honda S., Harada N. 2003. Neurological effects of aromatase deficiency in the mouse. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86, 3-5: 357-365
- Mensah-Nyagan A.G., Do-Rego J.L., Beaujean D., Luu-The V., Pelletier G., Vaudry H. 1999. Neurosteroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacological Reviews*, 51, 1: 63-81
- Mindnich R., Moller G., Adamski J. 2004. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 218, 1-2: 7-20
- Mosby's medical dictionary. 2009. St. Louis, Elsevier Health Sciences: 2056 str.  
<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com> (10.3.2010)

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

- Naftolin F., Ryan K.J., Davies I.J., Reddy V.V., Flores F., Petro Z., Kuhn M., White R.J., Takaoka Y., Wolin L. 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Progress in Hormone Research*, 31: 295-319
- Naftolin F., Ryan K.J., Petro Z. 1972. Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. *Endocrinology*, 90, 1: 295-298
- Nef S., Schaad O., Stallings N.R., Cederroth C.R., Pitetti J.L., Schaer G., Malki S., Dubois-Dauphin M., Boizet-Bonhoure B., Descombes P., Parker K.L., Vassalli J.D. 2005. Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Developmental Biology*, 287, 2: 361-377
- Negri-Cesi P., Poletti A., Celotti F. 1996. Metabolism of steroids in the brain: A new insight into the role of 5 $\alpha$ -reductase and aromatase in brain differentiation and functions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 58, 5-6: 455-466
- Nelson R.J. 2005. *An introduction to behavioral endocrinology*. 3<sup>rd</sup> ed. Sunderland, Sinauer Associates, Inc.: 822 str.
- Parker K.L., Schimmer B.P. 1997. Steroidogenic factor 1: A key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews*, 18, 3: 361-377
- Payne A.H., Hales D.B. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, 25, 6: 947-970
- Penning T.M., Jin Y., Steckelbroeck S., Lanisnik Rizner T., Lewis M. 2004. Structure-function of human 3  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases: Genes and proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215, 1-2: 63-72
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: 2002-2007
- Roselli C.E., Horton L.E., Resko J.A. 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology*, 117, 6: 2471-2477
- Ryan K.J., Engel L.L. 1953a. The interconversion of estrone and estradiol-17 $\beta$  by rat liver slices. *Endocrinology*, 52, 3: 277-286
- Ryan K.J., Engel L.L. 1953b. The interconversion of estrone and estradiol by human tissue slices. *Endocrinology*, 52, 3: 287-291
- Sadovsky Y., Crawford P.A., Woodson K.G., Polish J.A., Clements M.A., Tourtellotte L.M., Simburger K., Milbrandt J. 1995. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of



Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

corticosteroids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92, 24: 10939-10943

Sanghera M.K., Simpson E.R., McPhaul M.J., Kozlowski G., Conley A.J., Lephart E.D. 1991. Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. Endocrinology, 129, 6: 2834-2844

Sasano H., Harada N. 1998. Intratumoral aromatase in human breast, endometrial, and ovarian malignancies. Endocrine Reviews, 19, 5: 593-607

Schumacher M., Balthazart J. 1987. Neuroanatomical distribution of testosterone-metabolizing enzymes in the Japanese quail. Brain Research, 422, 1: 137-148

Shinoda K., Lei H., Yoshii H., Nomura M., Nagano M., Shiba H., Sasaki H., Osawa Y., Ninomiya Y., Niwa O., et al. 1995. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the FTZ-F1 disrupted mice. Developmental Dynamics, 204, 1: 22-29

Shinoda K., Yagi H., Fujita H., Osawa Y., Shiotani Y. 1989. Screening of aromatase-containing neurons in rat forebrain: An immunohistochemical study with antibody against human placental antigen X-P2 (HPAX-P2). The Journal of Comparative Neurology, 290, 4: 502-515

Stolz A., Rahimi-Kiani M., Ameis D., Chan E., Ronk M., Shively J.E. 1991. Molecular structure of rat hepatic 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. A member of the oxidoreductase gene family. The Journal of Biological Chemistry, 266, 23: 15253-15257

Stratakis C.A., Vottero A., Brodie A., Kirschner L.S., DeAtkine D., Lu Q., Yue W., Mitsiades C.S., Flor A.W., Chrousos G.P. 1998. The aromatase excess syndrome is associated with feminization of both sexes and autosomal dominant transmission of aberrant P450 aromatase gene transcription. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 83, 4: 1348-1357

Štrucl M. 1999. Fiziologija živčevja. Ljubljana, Littera picta d.o.o.: 130 str.

Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, 29, 3: 151-159

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, 3, 7: Research 0034.1-0034.11

Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques, 39, 1: 75-85

Fabjan T. Časovne spremembe v izraženosti nekaterih steroidogenih encimov v možganih mišjih zarodkov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2011

---

Zeitoun K.M., Bulun S.E. 1999. Aromatase: A key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertility and Sterility*, 72, 6: 961-969

## ZAHVALA

Ko se želiš vsem zahvaliti, se zdi besedica 'hvala' veliko preskromna, da bi lahko vanjo zlila vse svoje misli in občutke.

Vendar res ogromna zahvala mentorju, prof. dr. Gregorju Majdiču, za ves trud pri vodenju in pomoč, odzivnost, ter spodbudo, predvsem pa neizmerno razumevanje in potrpežljivost v času nastajanja tega dela.

Velika zahvala Tanji Španić, dr. vet. med, za nesebično pomoč in strpnost pri analizi rezultatov. Tvoja pozitivna energija mi je dala motivacijo, brez katere mi ne bi uspelo.

Iskrena hvala dr. Tomažu Büdefeldu, univ. dipl. mikrobiol. in Katerini Čeh, dr. vet. med., za pomoč pri delu z miškami in v laboratoriju, ker sta mi bila vedno pripravljena priskočiti na pomoč, če sem karkoli potrebovala. .

Hvala tudi prof.dr. Simonu Horvatu za strokoven pregled naloge.

Hvala mojima staršema in vsem trem sestram pa tudi starima staršema, ki so mi v vseh teh letih študija stali ob strani, me spodbujali, mi pomagali, me podpirali in nikoli obupali nad mano.

Posebna zahvala pa gre mojemu stricu Alešu, na katerega se res vedno in povsod lahko zaneseš.

Nenazadnje pa hvala tudi mojima najdražjima, možu Andreju za podporo in potrpljenje v tem času in sinku Gabrielu, katerega rojstvo je dalo mojemu življenju nov pomen. Veliko je bilo trenutkov, ki jih nismo mogli preživeti skupaj.

Rada bi se zahvalila še vsem, ki ste mi kakor koli pomagali in me spodbujali na poti do diplome pa niste posebej omenjeni. HVALA LEPA!

**Če imaš prijatelja ob sebi, ni nobena pot predolga." *Japonski pregovor***