

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Nina ŠTERMAN

**VLOGA GENA *Cyp51* V TESTISIH MIŠI
MED SPERMATOGENEZO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Nina ŠTERMAN

**VLOGA GENA *Cyp51* V TESTISIH MIŠI
MED SPERMATOGENEZO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE ROLE OF GENE *Cyp51* IN MOUSE TESTES
DURING SPERMATOGENESIS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstvo - zootehnika. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. Stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Simona Horvata in za somentorja asist. dr. Roka Kebra.

Recenzentka: izr. prof. dr. Tanja Kunej

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Janez SALOBIR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Simon HORVAT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: izr. prof. dr. Tanja KUNEJ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: asist. dr. Rok KEBER

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nina Šterman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK UDK 575(043.2)=163.6
 KG molekularna genetika/gen *Cyp51*/holesterol/citokrom P450/transgeni mišji modeli/spermatogeneza
 KK AGRIS/
 AV ŠTERMAN, Nina
 SA HORVAT, Simon (mentor)/KEBER, Rok (somentor)
 KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
 LI 2016
 IN VLOGA GENA *Cyp51* V TESTISIH MIŠI MED SPERMATOGENEZO
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP XIV, 78 str., 10 pregl., 21 sl., 4 pril., 91 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Gen *Cyp51* je član naddružine citokromov P450 in kodira protein lanosterol 14 α -demetylazo, ki sodeluje v biosintezi holesterola. Holesterol igra pomembno vlogo pri regulaciji lastnosti celičnih membran v sesalskih celicah. Sodeluje pri tvorbi sterolnih intermediatov, ki sodelujejo pri spermatogenezi. Holesterol v sami celični predstavlja osnovni gradnik celičnih membran, pri katerih regulira njihovo trdnost in prepustnost lipidnega dvosloja. Za preučevanje vloge gena *Cyp51* med spermatogenezo smo razvili transgeni mišji model s pogojnim izničenjem v spolnih celicah. Mišji model smo pridobili s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* z uporabo sistema Cre/loxP. Preučevali smo vpliv izničenja gena *Cyp51* med spermatogenezo, tako da smo ocenjevali dnevno produkcijo spermijev pri križancih genotipa *Cyp51* za spolne celice, Sertoliève in Leydigove celice. Z metodo PCR smo analizirali učinkovitost izničenja gena, pri kateri smo uporabili tri različne začetne oligonukleotide, ki smo jih preverili z gelsko elektroforezo. Ugotovili smo 89-odstotni delež izreza lokusa *Cyp51* in 94-odstotni delež prisotnosti zapisa za rekombinazo Cre in s tem dokazali učinkovitost izreza lokusa *Cyp51* in prisotnosti zapisa za rekombinazo Cre. S spremeljanjem dnevne produkcije spermijev smo hoteli pojasniti ali pogojno izničenje gena *Cyp51* v spolnih celicah vpliva na spermatogenezo preko mehanizma odstotnosti *de novo* sinteze holesterola. S pomočjo statistične analize smo podatke o telesni masi, masi testisov in dnevni proizvodnji spermijev spremljali pri vseh treh linijah križancev. Ugotovljeno je bilo, da pogojno izničenje gena *Cyp51* nima vpliva na dnevno produkcijo spermijev med homozigotama za divji tip in za izničen alel *Cyp51*. Sklepali smo, da kljub temu, da je bil gen *Cyp51* pogojno izničen v različnih tipih celic testisa in je bila s tem onemogočena sinteza holesterola, je organizem živali verjetno nadomestil potrebo po sterolnih intermediatih in holesterolu iz intersticija testisov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 575(043.2)=163.6
CX molecular genetics/gene *Cyp51*/cholesterol/Cytochrome P450/transgenic mouse models/spermatogenesis
CC AGRIS/
AU ŠTERMAN, Nina
AA HORVAT, Simon (supervisor)/KEBER, Rok (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal science
PY 2016
TI THE ROLE OF GENE *Cyp51* IN MOUSE TESTIS DURING SPERMATOGENESIS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIV, 78 p., 10 tab., 21 fig., 4 ann., 91 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Cyp51* gene is a member of cytochrome P450 superfamily and it codes for the lanosterol-14 α -demethylase, which participates in biosynthesis of cholesterol. Cholesterol plays an important role in regulation of properties of cell membranes in mammalian cells. It participates in the generation of sterol intermediates, which have been suggested to play a role in spermatogenesis. Cholesterol represents a building block of cell membranes in which it regulates their hardness and permeability of the lipid bilayer. For the study of the role of gene *Cyp51* in spermatogenesis we developed a transgenic mouse model with a conditional elimination in reproductive cells. Mouse model was developed using conditional deletion of *Cyp51* with the Cre/loxP system. We studied the role of *Cyp51* loss of function in spermatogenesis by evaluating the daily production of sperm cells in conditional knockout mouse models for the germ, Sertoli and Leydig cells. We demonstrated a successful excision of the *Cyp51* gene (89 %) as well as a presence of the CRE recombinase insert (94 %) using a PCR method with three different primers analysed by a gel electrophoresis. We wanted to clarify if the conditional deletion of *Cyp51* in reproductive cells has an effect on spermogenesis at which *de novo* synthesis of cholesterol participates. With analysed data on the bodyweight, weight of testicles and daily sperm production in all three lines of crossbreeds. We determined that the conditional elimination of gene *Cyp51* has no effect on daily sperm production in all three conditional *Cyp51* models. We conclude that conditional deletion of *Cyp51* in germ, Sertoli and Leydig cells is not essential for spermatogenesis and that it is likely that the organism compensates the presumptive need for steroid intermediates or cholesterol from the interstitium.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NADRUŽINA CITOKROMOV P450	3
2.1.1 CYP51 – sterol 14α-demetilaza	4
2.1.2 Zgradba in izražanje gena CYP51	4
2.1.3 Regulacija izražanja gena CYP51	6
2.1.4 Protein CYP51	7
2.1.5 Motnje v aktivnosti encima CYP51	8
2.1.6 CYP51 kot tarča zdravil	9
2.2 HOLESTEROL	9
2.2.1 Vir holesterola v telesu	10
2.2.1.1 Pridobivanje iz hrane	11
2.2.1.2 Sinteza <i>de novo</i>	12
2.2.2 Intermediati sinteze holesterola	14
2.2.3 MAS – mejozo aktivirajoči steroli	14
2.2.3.1 MAS v testisih	15
2.2.4 Uravnavanje izražanja genov znotraj sinteze holesterola	17
2.3 TESTISI	18
2.3.1 Zgradba testisov (Organa genitalia masculina)	18
2.3.2 Sertolijeve celice	19

2.3.3 Leydigove celice	20
2.3.4 Spolne celice	22
2.4 VLOGA GENA <i>Cyp51</i> IN HOLESTEROLA PRI REPRODUKCIJI SESALCEV	23
2.4.1 Spermatogeneza – razvoj moških spolnih celic	23
2.4.2 Vloga holesterola med spermatogenezo	25
2.4.3 Tehnologija ciljnega izničenja genov	26
2.4.4 Cre/loxP sistem	27
2.4.4.1 Postopek pridobivanja mišjega modela s pogojnim izničenjem preiskovanega gena	27
3 MATERIAL IN METODE	30
3.1 MATERIALI	30
3.1.1 Terminologija	30
3.1.2 Laboratorijski pribor	31
3.2 POSKUSNE ŽIVALI	32
3.2.1 Križanja linij laboratorijskih miši	32
3.2.2 Pridobitev mišjega modela z verjetnostjo pogojnega izničenja gena <i>Cyp51</i>	33
3.2.3 Pridobitev modela miši s pogojnim izničenjem gena <i>Cyp51</i> v spolnih celicah	35
3.2.3.1 <i>Cyp51^{lox/+}; Sycp1-Cre⁻</i> x <i>Cyp51^{lox/lox}; Sycp1-Cre⁺</i>	35
3.2.3.2 <i>Cyp51^{+/lox}; Prp-Cre⁺</i> x <i>Cyp51^{+/lox}; Prp-Cre⁻</i>	36
3.2.3.3 <i>Cyp51^{lox/+}; Stra8-Cre⁻</i> x <i>Cyp51^{lox/lox}; Stra8-Cre⁺</i>	36
3.2.4 Pridobitev modela miši s pogojnim izničenjem gena <i>Cyp51</i> v Sertolijevih celicah	37
3.2.5 Pridobitev modela miši s pogojnim izničenjem gena <i>Cyp51</i> v Leydigovih celicah	37
3.3 OSKRBA MIŠI	37
3.3.1 Čiščenje mišje kolonije	38
3.3.2 Krma in voda	38
3.3.3 Klima ter svetlobni režim v koloniji	39
3.3.4 Vodenje evidenc in analiza podatkov iz reje	39

3.4	MOLEKULARNO-BIOLOŠKE IN BIOKEMIJSKE METODE	41
3.4.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. <i>Polymerase chain reaction</i>)	41
3.4.2	Agarozna gelska elektroforeza	44
3.4.2.1	Priprava agaroznega gela	45
3.4.3	Ocenjevanje dnevne produkcije spermijev	46
3.4.4	Štetje spermijev pod mikroskopom	46
3.5	STATISTIČNA ANALIZA	48
4	REZULTATI	50
4.1	GENOTIPIZACIJA MIŠI B6;129SV - <i>Cyp51</i> ^{+/lox}	50
4.2	PREVERJANJE UČINKOVITOSTI IZREZA Z METODO PCR	51
4.2.1	Preverjanje učinkovitosti izreza lokusa <i>Cyp51</i> v spolnih celicah z metodo PCR	51
4.2.2	Preverjanje učinkovitosti izreza lokusa <i>Cyp51</i> v Sertolijevih celicah pri križancih genotipa <i>Cyp51</i>^{lox/lox}; AMH-Cre^{+/-} z metodo PCR	53
4.2.3	Preverjanje učinkovitosti izreza lokusa <i>Cyp51</i> v Leydigovih celicah križancih genotipa <i>Cyp51</i>^{lox/lox}; <i>Amhr2-Cre</i>^{+/-} z metodo PCR	54
4.2.4	Telesna masa, masa testisov in dnevna proizvodnja spermijev križancev genotipa <i>Cyp51</i>^{lox/-}; <i>Stra8-Cre</i>⁺ (Spolne celice, KO-1)	54
4.2.5	Telesna masa, masa testisov in dnevna proizvodnja spermijev križancev genotipa <i>Cyp51</i>^{lox/lox}; <i>AMH-Cre</i>⁺ (Sertolijeve celice, KO-2)	56
4.2.6	Telesna masa, masa testisov in dnevna proizvodnja spermijev križancev genotipa <i>Cyp51</i>^{lox/lox}; <i>Amhr2-Cre</i>⁺ (Leydigove celice, KO-3)	58
5	RAZPRAVA	60
6	SKLEPI	65
7	POVZETEK	67
8	VIRI	69
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Oprema, ki smo jo potrebovali za izvedbo poskusa	31
Preglednica 2: Reagenti, ki so bili uporabljeni med izvedbo poskusa	32
Preglednica 3: Transgene linije miši, ki so bile uporabljene v poskusu	33
Preglednica 4: Možne različne variante številk pri označevanju mišjih ušes (Prevoršek, 2005)	40
Preglednica 5: Reakcijska mešanica za analizo PCR	42
Preglednica 6: Zaporedja začetnih oligonukleotidov uporabljenih pri genotipizaciji lokusa <i>Cyp51</i> in transgenega vključka Cre	43
Preglednica 7: Pogoji za PCR reakcijo pri preverjanju genotipov	43
Preglednica 8: Pogoji za PCR reakcijo pri preverjanju genotipov	43
Preglednica 9: Pričakovane dolžine pomnoženih oligonukleotidov pri PCR ob preverjanju genotipov	44
Preglednica 10: Reagenti, ki jih potrebujemo za pripravo 0,5 x TBE pufra	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba holesterola in holesterolni derivati, oksisteroli (prirejeno po Accad in Farese, 1998)	10
Slika 2: Shema biosinteze poti holesterola (Debeljak in sod., 2003: 168; Horvat in sod., 2011: 72)	13
Slika 3: Potek razvoja stopenj znotraj spermatogeneze (prirejeno po O'Day, 2016)	25
Slika 4: Shematični prikaz pristopa za izničenje alela <i>Cyp51</i> (povzeto po Keber in sod., 2011)	35
Slika 5: Način označevanja miši s ščipanjem ušes	41
Slika 6: Molekularna lestvica 100 bp in 1000 bp (Fermentas, 2009)	45
Slika 7: Predstavlja manjši kvadrat v celotni mreži, kot je razvidno na spodnji sliki (npr. kvadrat 1)	47
Slika 8: Polja znotraj števne komore, kjer so mreže, kot so prikazane pod sliko 7	48
Slika 9: Štetja spermatid (14-16 dan) pod mikroskopom	48
Slika 10: Prikaz pomnoženega odseka gena <i>Cyp51</i> med oligonukloetidnima začetnikoma 3loxF in 3loxR	50
Slika 11: Prikaz pomnoženega odseka gena <i>Cyp51</i> med oligonukloetidnima začetnikoma 5loxF in 3loxR	52
Slika 12: Ugotavljanje prisotnosti vključka Cre v bioloških vzorcih z metodo PCR	53
Slika 13: Telesna masa križancev genotipa <i>Cyp51</i> ^{lox/-} ; <i>Stra8-Cre</i> ⁺	54
Slika 14: Masa testisov križancev genotipa <i>Cyp51</i> ^{lox/-} ; <i>Stra8-Cre</i> ⁺	55
Slika 15: Dnevna proizvodnja spermijev pri križancih genotipa <i>Cyp51</i> ^{lox/-} ; <i>Stra8-Cre</i> ⁺	55
Slika 16: Telesna masa pri križancih genotipa <i>Cyp51</i> ^{lox/lox} ; <i>AMH-Cre</i> ⁺	56
Slika 17: Teža testisov križancev genotipa <i>Cyp51</i> ^{lox/lox} ; <i>AMH-Cre</i> ⁺	57
Slika 18: Dnevna proizvodnja spermijev pri križancih genotipa <i>Cyp51</i> ^{lox/lox} ; <i>AMH-Cre</i> ⁺	57
Slika 19: Telesna masa križancev genotipa <i>Cyp51</i> ^{lox/lox} ; <i>Amhr2-Cre</i> ⁺	58
Slika 20: Masa testisov križancev genotipa <i>Cyp51</i> ^{lox/lox} ; <i>Amhr2-Cre</i> ⁺	59
Slika 21: Dnevna proizvodnja spermijev pri križancih genotipa <i>Cyp51</i> ^{lox/lox} ; <i>Amhr2-Cre</i> ⁺	59

KAZALO PRILOG

Priloga A: List s paritvami

Priloga B: List za novo gnezdo

Priloga C: Seznam genotipov potomcev križanj z linijo *Prp-Cre-ER^T*

Priloga D: Nadaljevanje seznama genotipov potomcev križanj z linijo *Prp-Cre-ER^T*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°C	stopinja Celzija
ABS	sindrom Antley-Bixer
APOE	apolipoprotein E
Bp	bazni par
cAMP	ciklični adenozin monofosfat (angl.: <i>Response Element Binding Protein</i>)
CoA	koencim A
cDNA	komplementarna DNA
CRE	cAMP odzivni element (angl.: <i>causes recombination</i>)
Cre	rekombinaza sistema Cre/lox
CREB	dejavnik prepisovanja, ki se veže na cAMP odzivni element
CREM	modulator cAMP odzivnega elementa (angl.: cAMP – <i>Response Element Modulator</i>)
CYP	citokrom P450
<i>Cyp51/CYP51</i>	gen <i>Cyp51</i> iz družine citokrom P450, družina 51
CYP51/CYP51A1	encim lanosterol-14α-demetylaza
CYP51P1	citokrom P450, družina 51, psevdogen 1
CYP7A1	citokrom P450, družina 7, poddružina A, polipeptid 1
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotif trifosfat
E	oznaka za starost zarodka v dnevih
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ER	endoplazemski retikulum
ES	matične celice
FF-MAS	mejoza aktivirajoči sterol izoliran iz folikularne tekočine (angl.: <i>follicular fluid</i> MAS)
Flp	rekombinaza sistema Flp/FRT
FRT	prepoznavna in vezavna mesta rekombinaze Flp
FSH	folikel stimulizirajoči hormon

GnRH	gonadotropni hormoni (GnRH – angl.: <i>Gonadotropin releasing hormone</i>)
HDL	lipoprotein visoke gostote (angl.: <i>high density lipoproteins</i>)
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA
HMGCR	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA-reduktaza
<i>Hprt1</i>	hipoksantin fosforibozil transferaza 1
IDL	lipoprotein srednje gostote (angl.: <i>intermediate density lipoproteins</i>)
INSIG	(angl.: <i>Insulin induced gene 1 protein</i>)
KO	miši z izničenim genom <i>Cyp51</i> (angl.: <i>knockout mice</i>)
LDL	lipoprotein nizke gostote (angl.: <i>low density lipoproteins</i>)
LH	luteinizirajoči hormon
Lox	prepoznavno in vezavno zaporedje rekombinaze Cre
LPL	lipoprotein lipaza
LXR	jetrni receptor X
LXRE	DNA odzivni element jetrnega receptorja X
M	molekulska masa (mol/l)
MAS	mejozo aktivirajoči sterol (angl.: <i>meiosis activating sterol</i>)
µl	mikroliter
mES	mišje matične celice
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
n	število ponovitev
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
Neo	neomicin
Nm	nanometer
NPC1L1 protein	(angl.: <i>Niemann Pick C1 like 1 protein</i>)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (angl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PGK	fosfoglicerat kinaza
PrP	prionski protein (angl.: <i>Prion protein</i>)

SCAP	protein za spodbujanje razcepa proteina SREBP (angl.: <i>SREBP cleavage activating protein</i>)
SF1	steroidogeni dejavnik 1
SRE	sterolni element uravnavanja
SREBP	protein, ki se veže na sterolni element uravnavanja (angl.: SRE binding proteins)
TBE	elektroforezni pufer tris/borat/EDTA
T-MAS	mejozo aktivirajoči sterol, izoliran iz testisov (angl.: <i>meiosis activating sterol</i>)
V	volt
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote (angl. <i>very-low-density lipoprotein</i>)
WT	divji tip (angl.: <i>wild type</i>)

SLOVARČEK

Gen *CYP51*

Gospodinjski tip gena *CYP51*, ki kodira lanosterol-14 α -demetilazo, encim biosintezne poti holesterola (Rozman in sod., 1996).

Cyp51^{lox/lox}; Cre⁺

Homozigoten genotip gensko spremenjene miši, ki ima na lokusu gena *Cyp51* vstavljeni zaporedji mest lox (alel *Cyp51*^{lox}) in vsebuje transgeni zapis, ki pod nadzorom albuminskega promotorja specifično izraža rekombinazo Cre v spolnih celicah.

Cyp51^{lox/-}; Cre⁺

Heterozigoten genotip gensko spremenjene miši, ki vsebuje po en alel *Cyp51*^{lox} in en podedovan izbit alel *Cyp51* ter transgeni zapis, ki pod nadzorom albuminskega promotorja specifično izraža rekombinazo Cre v spolnih celicah.

Holesterol

Holesterol je velika, v vodi netopna molekula. Holesterol, kot biološka molekula, igra pomembno vlogo pri regulaciji lastnosti celičnih membran v celicah sesalcev.

Sistem Cre/lox

Izvira iz bakteriofaga P1 in omogoča pogojno izničenje genov v vsakem genomu, ki vsebuje prepoznavna mesta lox, kamor se veže rekombinaza Cre in izzove izrez vmesnega zaporedja med dvema mestoma lox (Sauer in Henderson, 1988).

Spermatogonij

Najzgodnejša oblika spolne celice na bazi semenskega kanalčka. Nahaja se ob bazalni lamini semenskih kanalčkov.

1 UVOD

Gen citokrom P450, družina 51 (*Cyp51* ali *CYP51* angl.: - citochrome P450, family 51) je prisoten v vseh bioloških kraljestvih. Kodira protein lanosterol 14 α -demetilazo, to je encim, ki sodeluje v biosintezi poti holesterola (Rozman in sod., 1996a). Gen *Cyp51* pri sesalcih, z oksidacijo odstranjuje 14 α -metilno skupino iz lanosterola ter tvori iz folikularne tekočine izoliran mejozo-aktivirajoči sterol (FF-MAS angl.: *follicular fluid meiosis-activating sterols*), ki ga najdemo v somatskih celicah kot intermediat biosinteze holesterolne poti. V spolnih celicah po nekaterih domnevah sodeluje pri zorenju semenčic (Debeljak in sod., 2003). *Cyp51* je predstavnik gospodinjskega gena, zato pri njegovem popolnem izničenju pride do smrti zarodkov v zelo zgodnjih stopnjah embrionalnega razvoja (Keber in sod., 2011).

Podatki v literaturi kažejo, da ima biosinteza holesterola in še posebej nekaterih intermediatov potencialno vlogo pri uravnovanju mejoze in posledično plodnosti. Da bi testirali to v pogojih *in vivo*, smo preverili to s poskusom in uporabo določenih mišjih modelov, ki imajo okrnjeno biosintezo holesterola specifično v testisih. Holesterol v sami celici predstavlja osnovni gradnik celičnih membran, pri katerih regulira njihovo trdnost in prepustnost lipidnega dvosloja ter sodeluje pri tvorbi sterolnih intermediatov, ki sodelujejo pri spermatogenezi.

S sistemom Cre/lox, s pomočjo rekombinaze Cre (angl.: *causes recombination*), z vezavo na lox mesta, kataliziramo mestno specifično rekombinacijo med dvema lox mestoma. Cre/lox tehnologija nam omogoča tkivno in časovno specifično izničenje genov. Pri preučevanju namena holesterola v odraslih tkivih, smo se zato poslužili te metoda, da smo pridobili mišje modele s pogojno izničenimi geni za tvorbo holesterola v spolnih celicah. Za pogojno izničenje gena, smo uporabili tudi linijo miši, ki izraža rekombinazo Cre pod kontrolo mišjega prionskega proteina (Prp – angl. *Prion protein*). Uporabljeni liniji miši je v genomu, zaradi mesta vključka, izražala rekombinazo Cre le v spermatogonijih in primarnih spermatocitih, ki omogočajo izrez lokusa *Cyp51* samo v zgodnjih stopnjah razvoja spolnih celic. Osredotočili smo se na preverjanje vpliva izničenja gena *Cyp51*, ki

sodeluje v procesu spermatogeneze, tako da smo spremljali težo testisov in dnevno producijo spermijev, pri miših s pogojno izničenim genom *Cyp51* za spolne celice (*Cyp51^{lox/-}*; *Stra8-Cre⁺⁻*), za Sertolijeve (*Cyp51^{lox/lox}*; *AMH-Cre⁺*) in Leydigove celice (*Cyp51^{lox/lox}*; *Amhr2-Cre⁺*). Z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR), smo določili izničenje genotipa pri mišjih modelih s pogojno izničenim genom *Cyp51*.

S pomočjo statistične analize, smo podatke o telesni teži, teži testisov in dnevni proizvodnji spermijev spremljali pri vseh treh linijah križancev. S spremljanjem dnevne produkcije spermijev, smo hoteli pojasniti ali pogojno izničenje gena *Cyp51* v spolnih celicah vpliva na spermatogenezo, pri kateri sodeluje *de novo* sinteza holesterola.

1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE

Glavni cilj naloge je preučiti, kako delno izničenje gena *Cyp51* iz biokemijske poti biosinteze holesterola vpliva na proizvodnjo spermijev v testisih miši med spermatogenezo. Da bi preučili vlogo gena *Cyp51* med spermatogenezo, smo uporabili mišji model s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* v spolnih celicah.

V okviru diplomske naloge smo preverjali dve delovni hipotezi:

- Izničenje funkcije gena *Cyp51* v spolnih celicah vpliva na proizvodnjo spermijev.
- S prilagojeno metodo PCR (angl.: *polymerase chain reaction*) bo mogoče preveriti učinkovitost izreza lokusa *Cyp51* v spolnih celicah križancev genotipa *Cyp51^{+/lox}*; *Prp-Cre-ER^{T/+}*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NADRUŽINA CITOKROMOV P450

Naddružina citokromov P450 (angl.: Cytochrome P450 - CYP), obsega encime z značilno prostetično hem skupino (tetrapirolov obroč z železovim ionom), ki s pomočjo NADPH katalizirajo pretvorbo različnih molekul, ki so topne v maščobi. Ime naddružine P450, izhaja iz določitve značilnega absorpcijskega vrha 450 nm, kjer se nahaja ogljikovo-monoksidna vez (Omura in Sato., 1962). Celično izražanje nekaterih CYP je regulirano z dejavniki za prepisovanje, katere regulirajo najrazličnejše spojine. Pri sesalcih je značilno, da so encimi CYP vezani na membrano, ki se nahajajo v različnih predelih celice. Najpogosteje so to mikrosomalni encimi endoplazmatskega retikuluma ali pa se nahajajo v notranji membrani mitohondrija. Najdeni pa so bili tudi na zunanji steni jedrne membrane, v Golgijevem aparatu, peroksisomih in celični membrani (Seliskar in Rozman, 2007; Hasler in sod., 1999).

Dandanes je poznanih preko 11000 variant gena CYP, ki so razvrščene glede na ohranjenost aminokislinskega zaporedja v 977 družin in 2519 poddružin (Nelson, 2009). Ujemanje aminokislinskih zaporedij znotraj posamezne družine je najmanj 40 %, znotraj poddružine pa minimalno 55% (Lapesheva in Waterman, 2011). Med različnimi vrstami se število genov CYP razlikuje. Človek jih vsebuje 57, miš 102, kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* 3, gliva *Neurospora crassa* 38, mnoge rastlinske vrste lahko tudi nekaj 100 (Seliskar in Rozman, 2007).

Nomenklatura posameznih genov, ki kodirajo proteine CYP označujemo s splošno oznako CYP, številko posamezne družine, črko poddružine in številko proteina. Na primer s simbolom označen humani gen *CYP51A1*, torej poimenujemo »citokrom P450, iz družine 51, poddružine A, polipeptid 1«, njegov produkt pa lanosterol 14 α-demetilaza (Hugo Gene, 2016).

Pri sesalcih se citokromi P450 izražajo hkrati v različnih tkivih, vključno z jetri, ledvicami, pljuči, nadledvičnimi žlezami, v možganih, v spolnih žlezah in še nekaterih drugih organih.

Citokrome skupine P450, ki so izraženi v teh tkivno/celičnih skupinah, lahko povežemo glede na podlagi njihove fiziološke vloge (Seliskar in Rozman, 2007). Kot ena izmed glavnih lastnosti naddružine *CYP* je njihova funkcionalna raznolikost. Geni skupine *CYP* sodelujejo v metabolizmu endogenih molekul (holesterol, maščobne kisline, žolčne kisline, prostaglandini, levkoteini, vitamin D, steroidni hormoni, retinoidi in biogeni amini). V organizmu sodelujejo tudi pri odstranjevanju tujih molekul, kot so produkti okoljskega kemijskega onesnaževanja (herbicidi, policiklični ogljikovodiki, arilamini) ter zdravil. Njihova pomembna vloga pri presnovi in delovanju zdravilnih učinkovin, pa spodbuja preučevanje s strani farmacevtske industrije (Waterman, 1996).

2.1.1 CYP51 – sterol 14 α -demetilaza

Gen *Cyp51* je edini gen iz naddružine citokromov P450, ki ga je mogoče zaslediti tako pri prokariontih kot evkariontih. Pri živalih gen kodira zapisa za encim lanosterol 14 α -demetilazo, ki sodeluje v biosintezi poti holesterola. (Rozman in sod., 1996a).

2.1.2 Zgradba in izražanje gena *CYP51*

Prvič je bil opisan gen *Cyp51* v kvasovki *Sacharomyces cerevisiae*, od koder izvira njegovo ime (Debeljak in sod., 2003). Za družino *CYP51* je značilno, da zgradba njenih genov ni enotna tako kot pri ostalih družinah iz skupine P450. Razlikuje se v osnovni razporeditvi eksonov in intronov. Geni *CYP51* so dobro opisani pri petih različnih vrstah sesalcev, in sicer pri človeku, miši, podgani, prašiču in govedu (Seliskar in Rozman, 2007). Vsi geni *CYP51* pri sesalcih imajo enotno zgradbo, in sicer iz 10 eksonov in 9 intronov (Noshiro in sod., 1997; Debeljak in sod., 2000b). Pri bakterijah in kvasovkah geni *Cyp51* ne vsebujejo intronov, medtem ko nitaste glice vsebujejo do tri (Rozman in sod., 1996a). Pri *Arobidopsis thaliana*, oba gena *Cyp51* vsebujeta le po en intron, ki pa se povsem razlikuje od intronov pri vretenčarjih in glivah (Paquette in sod., 2000).

Pri človeku gen *CYP51* leži na 7. kromosomu, obsega 22 kbp, njegov bralni okvir pa ima dolžino 1527 bp in kodira protein, ki je sestavljen iz 509 aminokiselin. Izraženost *CYP51*

mRNA najdemo v vseh tkivih, vendar je njegova izrazitost povišana v testisih, saj se poleg somatskega prepisa (3,8 kbp) pojavi še krajši prepis (2,0 kbp) (Rozman in sod., 1996). Na 3. in 13. kromosomu, pri človeku najdemo še dva nekodirajoča brezintronska psevdogena, *CYP51P1* (citokrom P450, družina 51, psevdogen1) in *CYP51P2* (citokrom P450, družina 51, psevdogen 2), ki se pojavita, če sta močno izražena v zarodnih celicah. Pri miših se gen *Cyp51* nahaja na 5. kromosomu, blizu centromere v A2 regiji in obsega približno 17 kbp (Debeljak in sod., 2000b). V somatskih celicah sta prisotna dva prepisa gena *Cyp51* (mRNA), v testisih pa se poleg njiju pojavi še en krajši. (Debeljak in sod., 2003). Gleda na prisotnost krajših prepisov v spolnih celicah testisov se predvideva, da imajo ti potencialno vlogo med razvojem moških spolnih celic, saj naj bi bili le ti bolj stabilni (Strömstedt in sod., 1996; Noshiro in sod., 1997).

Gen *CYP51* v promotorski regiji vsebuje povišan delež baznih parov GC, ki so zgoščeni v CpG otoke. Promotor ne vsebuje elementa TATA, kot večina gospodinjskih genov pri sesalcih, zato se prepisovanje vrši na različnih mestih znotraj CpG otoka (Rozman in sod., 1996b; Debeljak in sod., 2000a; Noshiro in sod., 1997).

V mestih, kjer se začne transkripcija v različnih tkivih, ni razlik, tako da kontrola izražanja verjetno poteka iz istega promotorja preko različnih kontrolnih elementov. Pri sesalcih se na 5' – koncu gena *CYP51* nahaja več ohranjenih mest za vezavo transkripcijskih faktorjev: škatla GC (angl. GC *box*), SRE ali sterolni element uravnavanja (SRE – angl. *Sterol regulatory element*), zaporedje CRE (angl. cAMP – *responsive element*) ter zaporedje LXRE ali DNA odzivni element jetrnega receptorja X (LXRE – angl. *Liver X responsive element*) (Wang in sod., 2008; Debeljak in sod., 2003).

2.1.3 Regulacija izražanja gena *CYP51*

Uravnavanje aktivnosti encima CYP51 je zaradi različnih vlog v somatskih in spolnih celicah tkivno specifično (Seliskar in Rozman, 2007). V somatskih celicah regulacija gena *CYP51* poteka po večini s holesterolno negativno povratno zanko, v kateri sodelujejo proteini SREBP (angl.: *Sterol Regulatory Element Binding Protein*). Ker je *Cyp51* eden izmed odločilnih genov regulacije biosinteze holesterola pri sesalcih, je tako pod vplivom številnih dejavnikov regulacije, ki so lahko od holesterola odvisni ali neodvisni. Holesterolno odvisna regulacija z negativno povratno zvezo, ki je najbolje opisana, vključuje proteine iz družine SREBP, ki se vežejo na elemente SRE in ob znižani koncentraciji holesterola v celici spodbudijo izražanje vseh genov, ki so zadolženi za sintezo holesterola. Ohranjenost zaporedja *CYP51-SRE1* v promotorju gena je pri ljudeh, podganah in miših 100-odstotna, ter veže dejavnik SREBP-1 in s tem omogoča aktivacijo pri pomanjkanju holesterola v celici (Rozman in sod., 1999). Oksisteroli, ki nastajajo ob povišani koncentraciji holesterola, se vežejo na jetrni receptor X (angl.:Liver X Receptor α), ki spada v naddružino jedrnih hormonskih receptorjev. LXRx se v promotorju gena *Cyp51* veže na zaporedje LXRE, ter s tem prepreči izražanje (Wang in sod., 2008). Pri celičnih kulturah je bilo dokazano, da se gen *Cyp51* odziva tudi na nesterolne signale. Ob dodajanju forskolina je le ta sprožil signalno pot v cAMP, kar je pripeljalo do hitrega odziva gena *Cyp51*. S tem se je koncentracija (mRNA) *Cyp51* v dveh urah zvišala za 4-krat. Opazili so padec koncentracije lanosterola, substrata encima CYP51 (Fink in sod., 2005). Pri izražanju *Cyp51* v holesterolno neodvisni regulaciji sodeluje še od cAMP odvisna zanka, ki vsebuje dejavnike za aktivacijo prepisovanja iz družine CREB (angl.: cAMP – Response Element Binding Protein)/CREM (cAMP-Response Element Modulator) in protein kinazo A. V promotorski regiji gena *Cyp51* leži dobro ohranjeno zaporedje *CYP51-CRE2*, ki omogoča vezavo dejavnikov prepisovanja CREB/CRE (Rozman in sod., 1999). Procesi uravnavanja izražanja gena *Cyp51* se v posameznih tkivih razlikujejo in so najbolje raziskani v jetrih in testisih.

2.1.4 Protein CYP51

Identičnost primarnega aminokislinskega zaporedja je bila ugotovljena med več kot 180 poznanimi sterol 14α -demetilazami, in predstavlja 22 do 30 %. Znotraj posameznih kraljestev je identičnost višja, vendar do razlik prihaja glede na raznolikost skupine in njeno oddaljenost med primerjalnimi skupinami (Lepesheva in Waterman, 2011). Med mišjo in podgano identičnost aminokislinskega zaporedja predstavlja 96%, med mišjo in človekom pa 91% (Debeljak in sod., 2000). Pri primarni strukturi aminokislinskega zaporedja, znotraj članov družine Cyp51, opazimo nizko stopnjo enakosti, ki je višja na sekundarnih in terciarnih strukturnih stopnjah proteinov (Lepesheva in Waterman, 2011).

Cyp51 z oksidacijo katalizira odstranitev 14α -metilne skupine (C32) iz lanosterola in 24-metilen-24, 25-dihidrolanosterola pri kvasovkah in glivah, pri rastlinah iz obtusifoliola in sesalcih iz lanosterola in 24,25-dihidrolanosterola, kar mu omogoči nadaljnjo biosintezo sterolov. Sterole, ki so nastali po odstranitvi 14α -metilne skupina, imenujemo ergosteroli pri glivah, fitosteroli pri rastlinah in holesterol pri živalih (Debeljak in sod., 2003). Te tri komponente so potrebne za tvorbo celičnih membran. Pri sesalcih pa holesterol sodeluje pri sintezi spolnih hormonov, žolčnih kislin, glukokortikoidov, mineralkortikoidov in tvorbi oksisterolov (Lepesheva in Waterman, 2011).

Encim Cyp51 se pri sesalcih z najvišjo stopnjo izraža v testisih, jajčnikih, nadledvični želesi, prostat, jetrih, ledvicah in pljučih (Seliskar in Rozman, 2007; Hasler in sod., 1999). Fiziološki vlogi encima Cyp51 sta, da sodeluje v postskvalenskem delu *de novo* biosinteze holesterola, kjer pretvarja lanosterol in 24,25-dihidrolanosterol v 4,4-dimetil- 5α -holesta-8,14,24-trien- 3β -ol, poimenovan tudi FF-MAS, ki se naprej pretvorji do holesterola. Pri prenosu elektronov Cyp51 potrebuje redoks partnerja, in sicer encim POR. Pri monooksigenaciji vsak korak zahteva molekulo kisika in molekulo reduciranega nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH), od koder izhajajo elektroni. V treh zaporednih monooksidacijskih korakih poteka demetilacija substrata brez sprostitve vmesnih intermediatov. Pri prvem koraku se C32-metilna skupina pretvorí v alkoholno

skupino, v drugem koraku v aldehidno in v tretjem se odcepi kot metanojska kislina (Debeljak in sod., 2003).

Pri sesalcih je druga vloga encima Cyp51 povezana z zorenjem spolnih celic. Encim Cyp51 v moških spolnih celicah ni pripet na ER, ampak do akrosomov potuje preko GA, kjer se zadrži več tednov. Prav tako se na membranah akrosomov izraža POR. Vloga sintetiziranih FF-MAS in T-MAS (angl.: *testis meiosis-activating sterol*) v spolnih celicah ni povezana z biosintezo holesterola. FF-MAS in T-MAS sta v somatskih celicah kratkotrajna intermediata, ki se pretvorita do holesterola, za razliko od spolnih celic, kjer se nalagata in domnevno sodelujeta v spermatogenezi in pri zorenju oocit (Debeljak in sod., 2003; Seliškar in Rozman, 2007).

2.1.5 Motnje v aktivnosti encima CYP51

Pri sesalcih ovirana aktivnost encima Cyp51 s specifičnimi zaviralci izzove upad *de novo* biosinteze holesterola. Pri različnih vrstah gliv se uporablajo za oviranje aktivnosti encima Cyp51 različni azoli, ki so ena glavnih antimikotnih skupin na trgu (Horvat in sod., 2011). Pri zdravljenju glivnih infekcij pri rastlinah, živalih in ljudeh se uporablajo azolna zdravila, ki so učinkovita tudi pri oviranju biosinteze sterolov nekaterih patogenih protozoj (Strushkevich in sod., 2010). Azoli se vežejo na železov atom v hemu s heterocikličnim dušikom in s tem ovirajo aktivnost encima Cyp51, ki se zato posledično slabše veže in metabolizira substrat (Lepesheva in Waterman, 2011). Pri dolgotrajni uporabi azolov lahko pride do rezistence patogena na samo zdravilo ali celo do zaviranja delovanja humanega encima CYP51A1 in ostalih encimov naddružine CYP (Strushkevich in sod., 2010). Glede na aminokislinsko zaporedje encima Cyp51 znaša delež enakosti med sesalcem in glivo 38-42 % (Rozman in sod., 1996). Zaradi visoke podobnosti azolov po vezavi na glivni encim Cyp51, so stranski učinki na metabolizem in biosintezo holesterola pri pacientih s sistemsko kandidazo redki.

2.1.6 CYP51 kot tarča zdravil

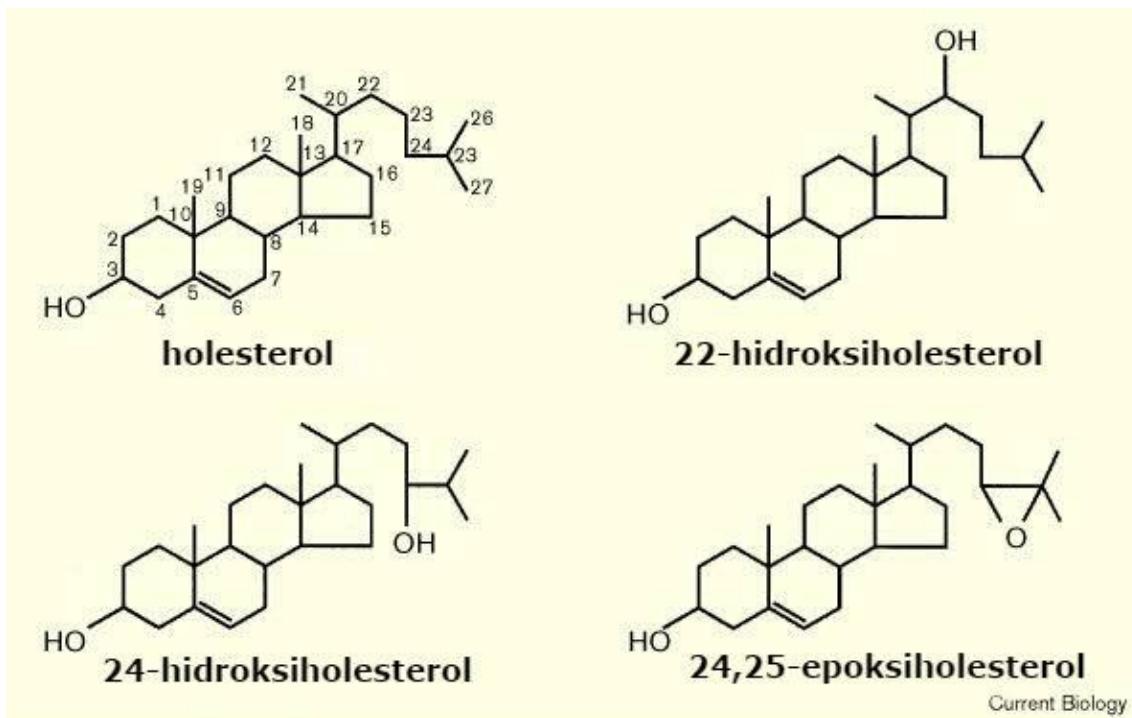
S specifičnimi zaviralci pri sesalcih zavremo aktivnosti *Cyp51*, kar vodi v zaviranje *de novo* sinteze holesterola, pri glivah pa zaviranje *de novo* sinteze ergosterola (Lamb in sod., 1998). *Cyp51* je iz tega razloga zanimiv pri razvoju novih zdravil za znižanje holesterola, še posebej to velja za humani encim CYP51A1, ki je tarča razvoja novih hipolipodemičnih zdravil (Horvat in sod., 2011).

Do neželenega zaviranja človeške CYP51 in drugih CYP, pride pri terapiji z azoli, zato je potreben neprestan razvoj novih bolj specifičnih derivatov le tega. Kot tarča zdravil je CYP51 v zadnjem času bolj zanimiv za znižanje ravni holesterola pri ljudeh. Najpogosteje se za zdravljenje zniževanja ravni holesterola uporablja statine, ki zavirajo delovanje encima 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A reduktazo (HMGCR). Motena je lahko tudi sinteza izoprenoidov, ki nastajajo v mevalonatni poti iz fernezil-PP, ki so del biosintezne poti holesterola (Korošec in sod., 2008). Pri oviranju CYP51A1 se pri nalaganju tvorita dva sterolna prekurzorja, lanosterol in 24,25-dihidrolanosterol, ki na mestu C4 sterolnega obroča vsebujeta metilni skupini. Ali se oba sterolna prekurzorja pretvorita do žolčnih kislin in izločita iz telesa, še ni znano (Horvat in sod., 2011). Pri humanem CYP51A1 so zaviralci: azalanstat; derivati lanosterola; dvojni zaviralci, ki ovirajo glikogen fosforilazo in CYP51A1 (Strushkevich in sod., 2010); in derivat piridiletanol-(feniletil)-aminov, ki s tem, ko se na hem veže piridin, zavrejo biosintezo holesterola v post-lanosterolnem delu poti (Korošec in sod., 2008).

2.2 HOLESTEROL

Holesterol, kot biološka molekula, igra pomembno vlogo pri regulaciji lastnosti celičnih membran v celicah sesalcev. Ima pomembno vlogo pri tvorbi vitamina D, žolčnih kislin in steroidnih hormonov (androgenov, estrogenov, glukokortikoidov in mineralkortikoidov). V sami celici holesterol (slika 1) predstavlja osnovni gradnik celičnih membran, pri katerih regulira njihovo trdnost in prepustnost lipidnega dvosloja. Poleg tega je glavna

komponenta lipidnih raftov, ki omogočajo prenos signalov in komunikacijo z ostalimi celicami v telesu. (Simons Kin sod., 2000).



Slika 1: Zgradba holesterola in holesterolnih derivatov, oksisteroli (prirejeno po Accad in Farese, 1998)

2.2.1 Vir holesterola v telesu

Holesterol (slika 1) je molekula, ki v vodi ni topna, zato ga najdemo v krvi v obliki estrov maščobnih kislin, ki v kombinaciji z apolipoproteini in triglyceridi tvorijo lipoproteinske delce. Znanih je pet tipov lipoproteinskih delcev: hilomikrone, lipoproteine zelo nizke gostote (VLDL – angl.: *very low density lipoprotein*), lipoproteine srednje gostote (IDL – angl.: *intermediate density lipoproteins*), lipoproteine nizke gostote (LDL – angl.: *low density lipoproteins*), ter lipoproteine visoke gostote (HDL – angl.: *high density lipoproteins*). Med seboj se razlikujejo po velikosti, tipu apolipoproteinov ter razmerju proteinov in lipidov. Največji so hilomikroni, ki služijo prenosu v črevesju absorbiranih lipidov in holesterola po telesu. V jetrih se tvorijo VLDL, ki so sestavljeni iz apolipoproteinov APOB100, APOE, APOC1, ter APOCII, ti vežejo fosfolipide, triglyceride, holesterol in estre holesterola. V krvi in na steni kapilar pride do prenosa

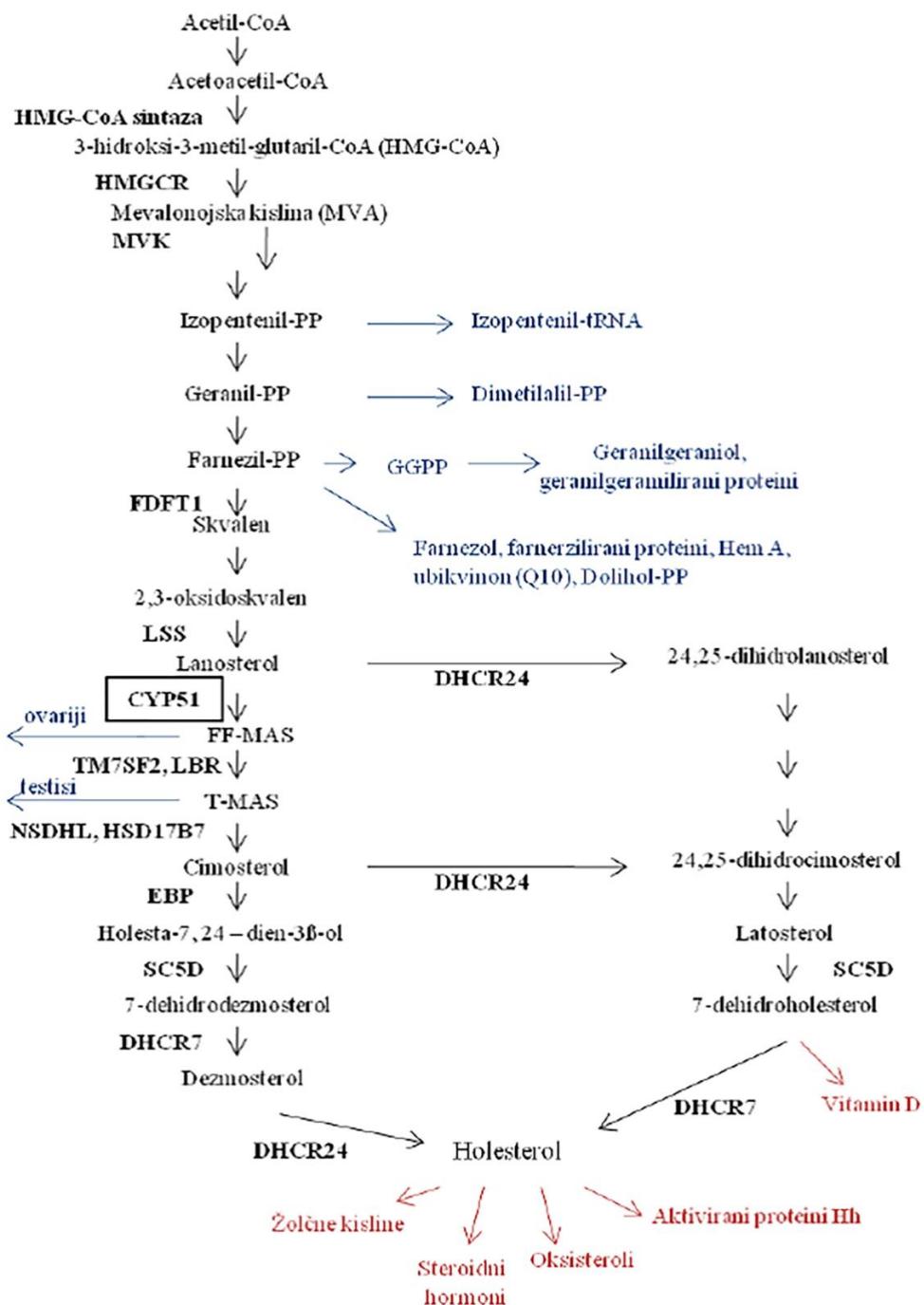
apolipoproteina APOCII iz delcev VLDL na delce HDL in s tem odstranjevanja trigliceridov z encimom lipoprotein lipazo (LPL – angl.: *lipoprotein lipase*). V tem procesu se VLDL pretvori v IDL. Približno polovica delcev IDL se iz krvnega obtoka odstrani z jetri. Preostala polovica IDL se pretvori v LDL delce, ki premore največjo količino estrov holesterola. Sodelujejo pri prenosu lipidov in holesterola v telesne celice preko receptorsko posredovane endocitoze z receptorjem za LDL (LDLR). »Slabi holesterol« kot imenujemo LDL, se ob morebitni oksidaciji s prostimi radikali vežejo na steno žil in povzročajo njihovo poapnenje (aterosklerozo). Ateroskleriza, imenujemo tudi bolezen venčnih žil, in kap sodita med najpogosteje zdravstvene težave razvitega sveta. Delci HDL se smatrajo, kot »dobri holesterol«, ti imajo najvišje razmerje med proteini in lipidi. HDL delci vežejo prosti holesterol in ga prenašajo v jetra, kjer se pretvori v žolčne kisline nato pa se preko prebavnega trakta izloči iz telesa. V prebavnem sistemu žolčne kisline pripomorejo pri razgradnji lipidov in pri prevzemu v maščobi topnih vitaminov. Holesterol telo pridobiva po dveh poteh: s prehrano in tvorbo *de novo*. Koncentracija holesterola v telesu se uravnava preko kompleksnih mehanizmov, ki preprečujejo njegovo škodljivo kopiranje (Kellner – Weibel in de la Llera-Moya, 2011).

2.2.1.1 Pridobivanje iz hrane

Okoli 30 % holesterola v telesu sesalcev izhaja iz prehrane živalskega izvora. Ta delež je manjši od količine holesterola, ki se v telesu tvori *de novo* in predstavlja okoli 40 %. Možgani so edini organ, ki zaradi krvno-možganske pregrade ne morejo izkorističati holesterola pridobljenega iz hrane. V tankem črevesju se iz netopnega holesterola in soli žolčnih kislin tvorijo lipidne kapljice imenovane miceliji, ki omogočajo transport holesterola iz lumna v črevesne resice. Pri samem transportu holesterola v črevesne celice sodeluje membranski protein NPC1L1 (NPC1L1 – angl.: *Niemann Pick C1 like 1 protein*). V celici se holesterol lahko izloča aktivno nazaj v lumen črevesa ali pa se transformira v holesterolne estre in se v obliki hilomikronskih delcev transportira v jetra. Steroli rastlinskega izvora zmanjšujejo prenos holesterola v črevesje. Ti se z visoko afiniteto vežejo v micele in tako izpodrinejo holesterol (Dietschy in Turley, 2002).

2.2.1.2 Sinteza *de novo*

Sinteza holesterola lahko poteka v endoplazmatskem retikulumu v prav vseh celicah telesa, največja količina za potrebe celotnega organizma pa se sintetizira v jetrih. Sintezo tvori več kot 30 encimskih korakov. Kot vir elektronov v reakcijah redukcije substratov v sintezi holesterola se uporablja reducirani NADPH. Posamezne stopnje biosinteze holesterola so vidni na sliki 2. Sinteza se začne s pretvorbo acetil-CoA v 3-hidroksi-3metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), ki se kasneje z encimom HMGR reducira v mevalonat. Sinteza mevalonata je ena izmed pomembnejših delov biosinteze holesterola, ki pa je voden na številnih nivojih. Sledijo procesi fosforilacij in dekarboksilacij, v katerih se mevalonat transformira v izoprenoid-izopentenil-pirofosfat (IPP) in nadaljnje kondenzacijske reakcije, ki peljejo proces v sintezo skvalena. Izoprenoidni intermediati zgodnje poti sinteze služijo kot predhodniki za nastanek dolihola in koencima Q. Skvalen nastane z združevanjem izoprenoidnih enot, ki je prvi intermediat holesterolne poti in je namenjen v celoti biosintezi holesterola. Skvaleska molekula skozi ciklizacijo vodi v tvorbo lanosterola z značilnim sterolnim obročem. V nadalnjih devetnajstih encimski korakih se lanosterol pretvori do holesterola. Eden izmed ključnih korakov poznih stopenj sinteze holesterola je demetilacija lanosterola v FF-MAS (angl.: *follicular fluid* MAS) z encimom Cyp51, ki je zato odvisen od mnogih mehanizmov regulacije. Od tvorbe lanosterola dalje potekata dve vzporedni poti biosinteze holesterola. Poleg klasične poti, ki jo je opisal leta 1965 Konrad Bloch (Bloch K, 1965), poznamo še Kandutsch-Russell-ova pot sinteze holesterola. Pri njegovi poti se holesterol tvori preko reduciranih oblik sterolnih intermediarov, ki se tvorijo z delovanjem encima 24-dehidroholesterol reduktaze (*Shcr24*) (Kandutsch in Russell, 1960).



Slika 2: Shema biosintezne poti holesterola (Debeljak in sod., 2003: 168; Horvat in sod., 2011: 72)

2.2.2 Intermediati sinteze holesterola

Med biosintezo holesterola nastajajo poleg končnega produkta številni drugi intermediati z dodatnimi biološkimi funkcijami. Že dolgo so znane pomembne biološke vloge derivatov zgodnjih stopenj sinteze. Izoprenoidni intermediati služijo prenilaciji proteinov, izoprenilaciji tRNA ter sintezi dolihola in koencima Q. Pred samim odkritjem MAS (Byskov in sod., 1995) je veljalo, da so kasnejši koraki sinteze holesterola (po skvalenu) namenjeni le sintezi holesterola in njegovih derivatov (žolčnih kislin, steroidnih hormonov, retinoidov in oksisterolov) (Edwards in Ericsson, 1999). Veliko pozornosti se v zadnjem času posveča procesom v sami sintezi holesterola, ki potekajo preko oksigeniranih intermediatov. Manjši delež skvalena obide klasično pot in se pretvori v epoksi obliko, ki vodi v sintezo (24S-25)-epoksisterola (Nelson in sod., 1981). Druga stranska pot poteka preko hidroksilacije holesterola in ostalih C27 sterolnih intermediatov v 27-hidroksi oksisterole z encimom CYP27A1. Na podlagi eksperimentov so že dolgo znane različne biološke vloge oksisterolov na podlagi *in vivo* eksperimentov (Sinensky in sod., 1987; Kha in sod., 2004). V novejših študijah, ki so opravljene *in vivo*, zasledimo, da za pojav patoloških sprememb pri okvari genov za sintezo holesterola ni krivo pomanjkanje holesterola, ampak kopiranje intermediatov in njihovih oksosterolnih oblik (Fakheri in Javitt, 2011).

2.2.3 MAS – mejozo aktivirajoči steroli

Mejoza je predpogoj za spolno razmnoževanje pri živalih in je edini proces v spolnih celicah, ki proizvaja haploidne celice, torej genetsko uravnava gamete. Med spoloma se časovni potek mejoze bistveno razlikuje. Številne raziskave se ukvarjajo s preučevanjem razumevanja mejoze in njenih dejavnikov, ki so glavna tema raziskovanja. Že dolgo je znano, da je za začetno stopnjo procesa mejoze potrebna topna substanca za indukcijo mejoze, ki nastaja v spolnih žlezah pri obeh spolih (MIS-angl.: *meiosis inducing substance*). Pri testisih zarodkov, so odkrili snov, ki preprečuje začetek procesa mejoze (MPS-angl.: *meiosis preventing substance*) (Byskov in Saxen, 1976).

Mehanizmi, ki začenjajo mejozo v procesu oogeneze in spermatogeneze, so dokaj neraziskani, medtem ko so kasnejše faze poznane le do določene stopnje. V splošnem so gonadotropini potrebni za proizvodnjo znotrajceličnih in zunajceličnih signalov, ki regulirajo nadaljnjo mejozo v oocitah pri ženskah in v spermatocitah pri moških (Byskov in sod., 1999).

V okviru raziskovanja molekularnih dejavnikov, ki sodelujejo pri uravnavanju mejoze, so Byskov in sod. odkrili sterolne intermediate in jih poimenovali mejoze aktivirajoči steroli (MAS). Prepoznali in določili so dva mejoze aktivirajoča sterola, ki sta v *in vitro* poskusih aktivirala ponovni začetek mejoze pri mišji jajčni celici (Byskov in sod., 1995). Izolirali so dva intermediata iz različnih tkiv, in sicer iz človeške preovulatorne tekočine sta 4,4-dimetil-5 α -holesta-8,14,24-trien-3 β -ol ali FF-MAS (angl.: *follicular fluid* MAS), ter iz bikovih testisov 4,4-dimetil-5 α -holesta-8,24-diene-3 β -ol ali T-MAS (angl.: *testis* MAS). Sinteza intermediatov FF-MAS in T-MAS poteka pod vplivom encima CYP51, ki pretvarja lanosterol v FF-MAS, zraven pa sodeluje še encim TM7SF2, ki FF-MAS pretvori v T-MAS (Aoyama in Yoshida, 1986).

MAS je bil prvi opisan primer pomena intermediata v poznih stopnjah sinteze holesterola, ki naj bi imel pomembno biološko funkcijo. Pri sesalcih se MAS nalaga v večjih količinah v gonadah in deluje neodvisno od spola in vrste, zato so ocenili, da igra pomembno vlogo pri reprodukciji.

2.2.3.1 MAS v testisih

Velika večina intermediata MAS je v testisih sesalcev zastopana z T-MAS intermediatom. Medtem ko se FF-MAS nahaja v nizkih koncentracijah, je T-MAS zastopan v koncentraciji okoli 30 $\mu\text{g/g}$ tkiva testisov pri odraslem biku, konju in prav tako pri miših. Pri podgani so bile koncentracije v izoliranih semenskih kanalčkih, intermediata T-MAS za polovico nižje (15 $\mu\text{g/g}$). Ta koncentracija glede na spolno zrelost krepko niha, saj imajo spolno zreli samci za 8-krat višjo količino T-MAS kot mladi samci. Ob tem se količina holesterola zmanjša za 43-odstotkov (iz 2,4 na 1,5 $\mu\text{g/g}$). Pri človeku so v semenskem izlivu namerili

manj kot 0,5 µg/g MAS, v frakciji spermijev pa je bila ta koncentracija štirikrat povečana (2 µg/g). S tega so sklepali, da je večina MAS verjetno prisotna v celicah spermijev (Byskov in sod., 1999).

Analize izražanja gena *Cyp51* in preostalih genov v sintezi holesterola kažejo na potencialno vlogo MAS v testisu. Izražanje gena *CYP51* v mnogih človeških tkivih je s pomočjo analize northern razkrila, da se v testisu kopiči velika količina krajšega *CYP51* mRNA prepisa, ki močno prevladuje v primerjavi s količino somatskih prepisov v ostalih tkivih (Rozman in sod., 1996a; Strömstedt in sod., 1996).

Raziskave pri podghanah so pokazale, da se *Cyp51* mRNA prepis kopiči samo v testisu pri spolno zrelih podghanah, ne pa v mlajših živalih. Analiza northern in natančnejše analize z *in situ* hibridizacijo (ISH) so prvič pokazale stopenjsko specifično izražanje *Cyp51*. Ugotovili so, da se *Cyp51* mRNA izraža omejeno le v spolnih celicah v semenskih kanalčkih. Najvišje izražanje je od IV do XIV stadija spermatogenze. Sertolijove in Leydigove celice so imele izražene le bazalne količine *Cyp51* mRNA. Količina *Cyp51* prepisa je bila prvič rahlo povišana pri primarnih spermatocitah šele med razvojem spolnih celic. Močno povišano izražanje *Cyp51* mRNA se pojavi v okroglih spermatidah in doseže svoj maksimum v podaljšanih spermatidah. Upadanje izražanja *Cyp51* mRNA pa je pri najbolj zrelih stopnjah spermatid, tik preden se te sprostijo v kanalček. Encimske analize so pokazale, da je aktivnost *Cyp51* za okoli 20-odstotkov aktivnejši pri testisu spolno zrelih samcev v primerjavi z mladimi samci (Stromstedt in sod., 1998).

Z analizo imunohistokemije proteina *Cyp51* so dokazali, da se pri spolno zrelih samcih podgan v Leydigovih celicah in haploidnih spolnih celicah, nahaja največ proteina *Cyp51*. V spolnih celicah protein *Cyp51* ni bil lociran le v citoplazmi, kjer se nahaja ER, ampak tudi na akrosomalnih regijah pri okroglih in podaljšanih spermatidah in v rezidualnih telescih. Iz teh podatkov je mogoče sklepati, da nalaganje *Cyp51* mRNA, ki je zastopan tudi v najzrelejših celicah, služi sintezi proteina v zadnjih stadijih razvoja spolnih celic (Majdič in sod., 2000). Točno določena vloga visokomolekularnih glikoziliranih oblik do danes ostaja nepoznana, saj do danes pretvorba lanosterola v FF-MAS še ni bila prikazana na intaktnih celih spermijih.

2.2.4 Uravnavanje izražanja genov znotraj sinteze holesterola

Sintezo holesterola v telesu uravnavajo kompleksni mehanizmi, ki sodelujejo pri povišanju sinteze holesterola v jetrih pri manjšem vnosu s hrano, ali pa sintezi zmanjšajo, kadar pride do povišanega vnosa. Pri biosintezi holesterola vključuje osnovni načina uravnavanja genov, negativno povratno zanko s holesterolom ter proteine SREBP (angl.: *SRE binding proteins*), ki se vežejo na SRE elemente v promotorjih genov za nastanek in vnos holesterola. Sodelujejo različne oblike proteina SREBP (SREBP1a, SREBP1c in SREBP2) (Horton in sod., 2002). Oblika SREBP, ki je neaktivna se veže na protein za aktivacijo razcepa SREBP (SCAP – angl.: *SREBP cleavage activating protein*), ta pa vsebuje domeno za regulacijo vezave oksisterolov. Kadar je koncentracija oksisterolov nizka, pride do prenosa SREBP/SCAP kompleksa iz ER v GA in odcepitve aktivnega proteina SREBP, ki sproži izražanje genov za sintezo holesterola, ko potuje v jedro. Kadar je koncentracija oksisterolov visoka, protein SREBP ostane v neaktivno obliki v ER vezan na SCAP. Da kompleks SCAP/SREBP ostane neaktiv v ER, sodeluje protein INSIG (angl.: *Insulin-induced gene 1 protein*). SREBP protein najdemo pri regulaciji izražanja dvanajstih genov znotraj sinteze holesterola, vključno z encimom HMGCR, ki je pomemben za uravnavanje hitrosti sinteze holesterola in zato predstavlja pomemben del regulacije sinteze (Brown in Goldstein, 1997). Poleg znane regulacije sinteze holesterola, se pojavljajo še dodatni fini mehanizmi regulacije (angl.: *fine tuning*), ki sodelujejo pri preprečevanju nalaganja intermediatov sinteze holesterola in s tem omogočajo zelo natančno kontrolo količine holesterola. V teh mehanizmih je vključena stimulacija razgradnje HMCR v proteasomih ob povišani koncentraciji lanosterola, (24S, 25) – epoksiholeterola ter 27-hodroksilanosterola. Novejše raziskave so pokazale, da igrajo ključno vlogo v tej regulaciji oksisteroli in encim Cyp27A1 (Lange in sod., 2008). Ti mehanizmi regulacije so značilni v večini za somatske celice v normalnih fizioloških pogojih. V spolnih celicah testisa najdemo posebne načine regulacije sinteze holesterola, ki vodijo v nalaganje intermediatov MAS v določenih stopnjah razvoja spolnih celic in jih opišemo kasneje.

2.3 TESTISI

2.3.1 Zgradba testisov (*Organa genitalia masculina*)

Testisi so parni organ z reprodukcijsko in hormonalno vlogo. V njih se začasno shranjujejo semenčice (spermiji) ter spolni hormoni, ki sodelujejo pri reprodukciji. Testisa ležita zunaj telesne votline v ohlapni kožni vreči – mošnji (*scrotum*), zato so izpostavljena tretjino nižji temperaturi od telesne. Ta temperatura je pomembna za normalno nastajanje semenčic. Pri zarodku se testisi razvijejo v obdobju od 5.-6. tedna prenatalnega razvoja ob dorzalni trebušni steni, retroperitonealno ob predelu ledvic. Med razvojem se vsako od testisov spušča po dimeljskem kanalu v mošnjo. Če je proces spuščanja (*descentus testis*) oviran, in ostanejo testisi v trebušni votlini, ne morejo tvoriti semenčic. Skozi semenska izvodila se izloča semenska tekočina s semenčicami v sečnico spolnega uda. Pomožne spolne žleze tvorijo semensko tekočino, ki prehranjuje in prenaša semenčice v moških semenskih izvodilih. Testisa sta v mošnji prekrita z vrečasto izboklino trebušnega peritoneja (*processus vaginalis peritonei*), ki sega iz trebuha v mošnje, v kateri se slepo končuje. Ta duplikatura peritoneja tvori kasneje serozno ovojnicu testisa (*tunica vaginali testis*). Ta je zgrajena iz dveh slojev: zunanji perietalni list (*periorhij*) in notranjega visceralnega lista (*epiorhij*). Visceralni list se zaviha v peritali na dorzalni steni testisov, kjer je testis pokrito z nadmodkom. To je edino mesto na testisu, ki ni pokrito z dvojnim listom peritoneja. Gladki površini duplikature peritoneja oklepata prostor, zapoljen s serozno tekočino, ki testisu omogoča, da drsi in se premika v mošnji. V nadalnjem razvoju se tisti del vaginalni del procesusa, ki je v nadimeljskem kanalu, zaraste. Pri spuščanju iz trebušne votline navzdol vleče testis tudi žile in živce, ki skupaj s semenovodom tvorijo semensko povesmo. Neposredno pod visceralnim listom peritoneja tj. epiorhijem je vezivna ovojnica testisa (*tunica albuginea*), ki ščiti površino testisa. Le-ta je na dorzalni strani organa, v t.i. mediastinumu, zadebeljena. Iz tega dela testisa se širijo v notranjost žleze vezivni pretini in ga razdelijo v 250-350 piramidastih prostorov testisnih reženjčkov (lobulusov). Pretini so nepopolni, tako da so reženjčki med seboj povezani. V mediastinumu so krvne žile, mezgovnice, živčna vlakna in mrežje cevk testisa. V rahlem vezivu znotraj režnjičkov

(intersticij) so zvite semenske cevke, bogat kapilarji, žilni in živčni pletež ter posamezne endokrine intersticijske celice – Leydigove celice (Zorc in sod., 2010).

2.3.2 Sertolijeve celice

Sertolijeve celice so podolgovate celice, ki obdajajo semenske celice. Segajo skozi vso višino semenskega epitelija od bazalne lame do svetline semenske cevke. Bazo imajo pritrjeno na bazalno larnino, vrh celice je obrnjen v svetlico semenske cevke. Citoplazma je eozifilna, drobna zrnasta. V elektronskem mikroskopu je vidna obilica gladkega endoplazmatskega retikuluma, mitohondriji, Golgijev aparat, lizosomi, lipidne vakuole in jedro z jedrcem. Včasih so v plazmi vidne kristaloidne strukture (Charcot-Bottcherjevi kristali). Jedro celice je ovalno, z vzdolžno osjo usmerjeno pravokotno na bazalno membrano. Nad spermatogoniji v bližini lame semenske cevke so na meji med sosednjimi Sertolijevimi celicami tesni stik, ki razdelijo semenski epitelij v bazalni del in adluminalni del. Spermatogoniji ležijo v bazalnem delu, kar jim omogoča lažji dotok hrane iz kapilarja v okolici cevk (Zorc in sod., 2010).

Med spermatogenezo potomci spermatogonijev preidejo iz bazalnega oddelka v adluminalni. Semenske celice so v napredovelnih stadijih spermatogeneze zaščitene pred morebitnimi škodljivimi snovmi iz krvi s krvno-testisno pregrado. To tvorijo Sertolijeve celice s tesnimi stiki stene kapilarja in peritubulna bazalna lamina. Spermatociti in glave spermatid so ob lateralnem in apikalnem robu Sertolijevih celic vloženi v globoke žepke plazmaleme. Repi spermatid molijo v svetlico zvitih cevk. Sertolijeve celice so povezane med seboj tudi s presledkovimi stiki, ki so pomembni za izmenjavo snovi med celicami. Mogoče se na teh mestih prenašajo informacije, potrebne za koordinacijo spermatogeneze (Zorc in sod., 2010).

Potreba po holesterolu je zaradi produkcije velikega števila novih celic med spermatogenezo zelo velika. Podatki nakazujejo, da biosintetska pot sinteze holesterola v spolnih celicah ni zelo aktivna. Spolne celice večino holesterola pridobijo iz podpornih Sertolijevih celic, ki so sposobne lastne sinteze holesterola *in vitro* (Wiebe in Tilbe, 1979),

ampak večina holesterola izhaja iz krvnega obtoka zaradi velikih potreb. Pomemben vir holesterola je tudi fagocitoza z lipidi bogatih rezidualnih telesc ter ostankov apoptotskih spolnih celic. Kot glavni vir holesterola s Sertolijevih celicah služi HDL, saj bazalna membrana, ki ločuje semenski kanalček od kapilare onemogoča prehod velikih LDL delcev. Tako da predstavlja glavno pot za vnos HDL holesterola v Sertolijeve celice, od APOE proteina odvisna pot (Fofana in sod., 1996). Pomembno vlogo pri ravnovesju holesterola v Sertolijevih celicah igrajo mobilne in dinamične lipidne kapljice (Cermelli in sod., 2006). Obstaja pa tudi nevarnost kopičenja prevelike količine lipidov, zaradi obsežne fagocitotske aktivnosti Sertolijevih celic, kar pa negativno vpliva na plodnost (Robertson in sod., 2005).

Pomen *de novo* sinteze holesterola za nemoten potek spermatogeneze je bil prikazan v živalskih toksikoloških študijah. Inhibicija skvalen sintaze v testisu s specifičnimi inhibitorji, je vodila v propad spolnih celic (Pelletier, 2011).

2.3.3 Leydigove celice

Leydigove celice, imenovane tudi intersticijske celice, se pojavijo in začnejo izločati hormone (testosteron) že v obdobju med 9.-10. tednom prenatalnega razvoja. Testosteron vpliva na razvoj moških spolovil zarodka in pozneje v puberteti na spermatogenezo. Po četrtem mesecu prenatalnega razvoja se število Leydigovih celic zmanjša. Obenem se zmanjša sinteza testosterona. To zatišje v histofiziologiji Leydigovih celic traja do pubertete, ko se spet pojavijo in začnejo ponovno sintetizirati testosteron. Leydigove celice imajo morfološke značilnosti celic, ki secernirajo steroide. So poligonalne oblike z eozofilno zrničasto citoplazmo, v kateri so številni mitohondriji tobularnega tipa, Golgijev kompleks ter lipidne kapljice. V zrelem obdobju so v citoplazmi posamezne kristaloidne strukture (Reinkejevi kristali) in rjavkasta zrnca lipofuscina. Jedro imajo okroglo z malo kromatina in enim do dvema jedrcema. S histokemijskimi in biokemijskimi membranami so v Leydigovih celicah prikazali številne encime: kot napr. lipaze, esteraze, oksidativne encime in steroidne dehidrogenaze. Skoraj vsi encimi, ki sodelujejo pri nastajanju testosterona, so v gladkem endoplazmatskem retikulumu. Samo encim, ki cepi stranske verige holesterola, je v mitohondrijih. Holesterol se sintetizira iz acetata ali iz

citoplazemskih lipidnih kapljic. Encim iz mitohondrijev ga spremeni v pregnenolon. Ta je izpostavljen seriji reakcij, ki so končajo s sintezo testosterona (Zorc in sod., 2010).

Leydigove celice, ki se nahajajo med semenskimi kanalčki, predstavljajo 3 % celic v testisu. V njih poteka sinteza androgenega hormona testosterona (T). Del testosterona se v različnih tkivih pretvori v 5α -dihidro-testosteron (DHT), ki je aktivnejša oblika testosterona. Oba hormona igrata pomembno vlogo pri nastanku moških fenotipskih značilnosti, odzivu na stres in proizvodnjo moških spolnih celic. V krvi sesalcev prevladuje hormon testosteron, ki pa je mnogo manj aktiven kot metabolit dihidro-testosteron. Sinteza testosterona se regulira preko osi hipotalamu-hipofiza-testis. Ob pričetku pubertete hipotalamus začne izločati gonadotropin sproščajoči hormon, ki povzroči izločanje LH iz hipofize. LH se veže na specifičen receptor na Leydigovih celicah in sproži sintezo pretvorbe holesterola v testosteron, ki se odvija v mitohondriju. Prva stopnja vključuje prenos holesterola iz zunanje na notranjo membrano mitohondrija s pomočjo proteina StAR (angl.: *steroidogenic acute regulatory protein*) ter sinteza pregnelona z odcepom stranske verige holesterola. Sinteza pregnelona, ki ga katalizira encim za odcep stranske verige holesterola (P450SCC – angl.: *cholesterol side chain cleavage enzyme*), je ključen korak v sintezi testosterona. Testosteron zmanjša sintezo LH v hipofizi preko negativne povratne zanke (Dufau in sod., 1997). V Leydigovih celicah so geni za sintezo testosterona pod kontrolo cAMP odvisnega mehanizma in kratke negativne povratne zveze s testosteronom (Hales in sod., 1987; Burgos-Trinidad in sod., 1997). Glavni vir holesterola za sintezo testosterona v testisu ob normalnih fizioloških pogojih je sinteza *de novo*. Pri povišani porabi holesterola se aktivirajo mehanizmi za vnos zunanjega holesterola iz lipoproteinskih delcev. Vnos zunanjega holesterola poteka preko LDL receptorja in preko selektivnega transporta iz HDL delcev, ki ga posreduje SR-B1 receptor. Kontrola izražanja genov za sintezo in vnos holesterola v Leydigovih celicah ni dobro poznana. Obstajajo dokazi, ki podpirajo vlogo SREBP2 odvisnega mehanizma v Leydigovih celicah (Charreauf in sod., 1981; Eacker in sod., 2008).

Glavni regulator holesterolno neodvisne kontrole izražanja genov za sintezo holesterola in testosterona v Leydigovih celicah je steroidni faktor 1 (SF-1 – angl.: *steroidogenic factor 1*) (Morohashi in sod., 1993; Mascaró in sod., 2000). V testisu torej obstaja specifična

kontrola genov za sintezo in vnos holesterola, ki je prilagojen steroidogeni vlogi Leydigovih celic. V Leydigovih celicah se je *Cyp51* začnel izražati pri trinajstem dnevu razvoja zarodka, kar nam pove, da je sinteza testosterona v zgodnjem fetalnem obdobju pri miših verjetno odvisna od holesterola zunanjega izvora (Büdefeld T in sod., 2009). *Cyp51* je močno izražen v Leydigovih celicah pri odrasli podgani (Majdic in sod., 2000).

2.3.4 Spolne celice

Najmlajše celice ob bazalni lamini semenskih cevk so spermatogoniji. To so okrogle celice z okroglim ali ovalnim jedrom. V citoplazmi imajo majhen Golgijev aparat, proste ribosome in okroglaste mitohondrije. Po puberteti se po morfologiji jeder v zvitih semenskih cevkah ločijo trije tipi spermatogonijev: tip A – temni spermatogoniji z ovalnim temnim jedrom, gostim kromatinom in z jederci v bližini jadrne membrane; tip A – svetli spermatogoniji so podobni temnim, le da imajo svetlejšo obarvano jedra zaradi razpršenega kromatina; tip B spermatogoniji, ki se ločijo od celic tipa A po okroglih jedrih, grobem kromatinu lokaliziranem ob jadrni membrani in po centralni lokalizaciji jedrc. Tip A – temni spermatogoniji so matične celice. Z njihovo mitotično delitvijo nastajajo bodisi matični temni spermatogoniji A bodisi svetli spermatogoniji tipa A. Z mitotično delitvijo svetlih spermatogonijev tipa A nastajajo spermatogoniji tipa B, ki ostanejo med seboj povezani s citoplazemskimi mostički. Z mitozo nastanejo iz celic večje celice – spermatociti I. reda, ali primarni spermatociti. To so največje celice v semenskih cevkah. Svojo delitev nadaljujejo s procesom prve redukcijske delitve ali mejoze I. Kromatin v velikem jedru ima v različnih fazah mejoze zelo različni videz. V citoplazmi imajo spermatociti I. reda malo mitohondrijev, toda številne proste ribosome. Med nastajanjem se spermatociti I. reda oddaljijo od basalne lamine in matičnih spermatogonijev in premaknejo v notranjost cevk. Razvoj spermatocitov I. reda traja nekaj dni, zato so v histoloških rezinah testisa najbolj številčne celice. Z nastankom spermatocitov I. reda se konča spermatocitogeneza (Zorc in sod., 2010).

2.4 VLOGA GENA *CYP51* IN HOLESTEROLA PRI REPRODUKCIJI SESALCEV

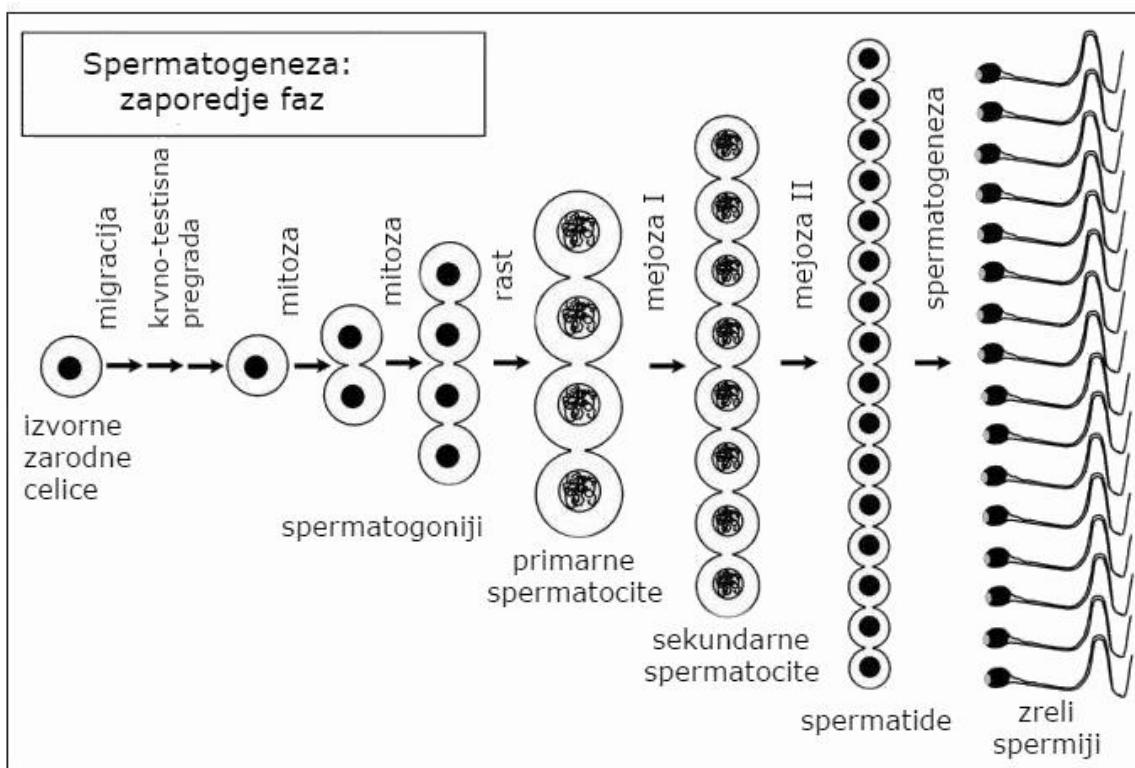
Reprodukcia pri sesalcih poteka v procesu mejoze. Pri spolni reprodukciji je osnova tvorba haploidnih celic, ki se preko oploditve združijo v diploidno zigoto. V procesu mejoze z redukcijsko delitvijo nastanejo haploidne spolne celice, kjer se v procesu homologne rekombinacije geni obeh staršev premešajo v nove kombinacije. Mejzo poznamo kot osnovni in dobro preučen proces, saj ga srečamo ohranjenega pri vseh evkariontih, od kvasovk do sesalcev, kot osnovni molekularni mehanizem (Marston in Amon, 2004). Zelo malo pa nam je znanega o določenih specifičnih mehanizmih same regulacije mejoze, ki se znotraj posamezne vrste in med spolom razlikuje v samem poteku. Preučevanje molekularnih mehanizmov med samim zorenjem spolnih celic je pri samcih toliko težja zaradi kompleksne zgradbe gonad. Kljub številnim raziskavam je vloga holesterola ter intermediatov, ki sodelujejo pri razvoju spolnih celic slabo poznana.

2.4.1 Spermatogeneza – razvoj moških spolnih celic

Pri samcih poteka razvoj moških spolnih celic v notranjosti semenskih kanalčkov, tam so spolne celice v tesnem stiku s somatskimi Sertolijevimi celicami. Sertolijeve celice predstavljajo mehansko oporo, dajejo hranila ter signale, ki so potrebni za zorenje spolnih celic. Med seboj so na bazi povezane s tesnimi celičnimi stiki imenovanimi Sertolijeva ali krvno-testisna pregrada. Ta pregrada ločuje lumen kanalčka od krvne plazme. Semenski kanalček obdajajo mioidne celice, ki ohranjajo samo zgradbo semenskega kanalčka. V intersticijskem prostori se nahajajo Leydigove celice, ki služijo pri proizvodnji sinteze testosterona. Leydigove celice v povezavi z makrofagi izražajo LPL in s tem sodelujejo pri regulaciji koncentracije holesterola v intersticiju testisov (Kabbaj in sod., 2003). V puberteti se iz hipotalamusa s pomočjo specializiranih nevronov začnejo sproščati gonadotropni hormoni (GnRH – angl. *Gonadotropin releasing hormone*), ki sprožijo nastanek luteinizirajočega hormona (LH) in folikel stimulirajočega hormona (FSH) v hipofizi. Ta dva hormona sta nujno potrebna za sintezo spermatogeneze. LH z vezavo na receptorje Leydigovih celic sproži povisano sintezo testosterona. V semenskih kanalčkih je koncentracija testosterona do 50-krat višja kot v krvnem obtoku. V Sertolijevih celicah

najdemo receptorje za FSH in testosteron, ki sta glavna hormona regulacije spermatogeneze. Izločajo tudi hormona inhibin in aktivin, ki sodelujeta pri povratni regulaciji izločanja FSH. Poleg njiju izločajo še protein na katerega se veže androgen, kateri lokalno poviša testosteron v semenskem kanalčku (Walker in Chang, 2005). Ob puberteti ti hormonalni signali sprožijo začetek mejoze.

Iz mitotskih delitev spermatogonijev nastanejo primarne spermatocite, ki se mejotsko delijo in prečkajo krvno-testisno pregrado. V prvi mejozi iz ene primarne spermatocite nastaneta dve diploidni sekundarni spermatociti. Sledi druga mejoza pri kateri nastanejo štiri haploidne spermatide. V procesu spermogeneze se spermatide razvijejo v podaljšane spermatide, ki se izoblikujejo v značilne strukture (akrosom, biček). Med vsemi celičnimi delitvami, od spermatogonija do spermatide, so razvijajoči spermiji povezani med seboj s citoplazemskimi mostički, ki so potrebni za izmenjavo hranilnih snovi in s tem za sinhroni razvoj samih spermijev. Preden se spermij sprosti v semenski kanalček, se odcepi od preostanka citoplazme v obliki rezidualnega telesca. Pri miših in podganah spermatogeneza ne poteka sočasno preko celotnega semenskega kanalčka, ampak v valovih. Zato najdemo na različnih odsekih semenskega kanalčka različne razvojne stopnje spermijev. Pri miših poznamo deset različnih razvojnih stopenj. Procesi vključeni v zorenje spolnih celic se med vrstami razlikujejo. Pri miših traja cikel zorenja 35 dni, pri podgani 52 in pri človeku 64 dni (Russell in sod., 1990).



Slika 3: Potek razvoja stopenj znotraj spermatogeneze (prirejeno po O'Day, 2016)

2.4.2 Vloga holesterola med spermatogenezo

Glavna vloga holesterola med spermatogenezo je gradnja novih membran. Med spermatogenezo pride do povečane sinteze holesterola iz C14 acetata, to se dogaja med samo rastjo spolnih celic, ko se povečuje površina in premer. V fazah, ki sledijo, se zmožnost za sintezo holesterola v spolnih celicah zniža, preostala količina acetata C14 pa se pretvori v dolihol. Tudi v zrelih spermijih zmožnost za sintezo holesterola ostaja nizka. Dolihol predstavlja esencialno snov za glikalizacijo proteinov v membrani spermijev. Membrane spermijev so bogate z glikoproteini, ki se nahajajo na specifičnih mestih znotraj membrane ter igrajo pomembno vlogo pri zorenju spermija. Spolne celice imajo specifične mehanizme regulacije, ki stopenjsko povečajo sintezo dolihola in zmanjšajo sintezo holesterola (Potter in sod., 1981).

Holesterol predstavlja poleg dezmosterola enega izmed glavnih sterolov v semenski tekočini in membrani spermijev pri večini sesalcev (Cross, 1998). Oploditveno sposobnost spermiji pridobijo po kapacitacijski v reproduktivnem traktu samice. Med tem procesom kapacitacije pri sesalcih se iz akrosomalne membrane spermija izloči do 40 % holesterola (Cross, 1998; Travis in Kopf, 2001). Iz membrane se holesterol izloči s pomočjo posebnih akceptorjev in proteina albumina (Neild in sod., 2005). V tem procesu pride do vstopa fosfolipidov v membrano spermija in s tem zmanjša razmerja holesteroli/lipidi. Ti procesi zvečajo fluidnost membrane in s tem vstop Ca^{2+} med akrosomalno reakcijo (Neild in sod., 2005). Pomen koncentracije holesterola in drugih sterolov na oploditveno sposobnost spermijev še ni natančno pojasnjena in je verjetno odvisna od vrste.

2.4.3 Tehnologija ciljnega izničenja genov

Postopek, ki ga imenujemo tehnologija ciljanja genov, nam omogoča ciljno izničenje genov v genomu. Za ta postopek, ki je bil odkrit v poznih osemdesetih letih, so Martin Evans, Mario R. Capecchi in J. Evans prejeli leta 2007 Nobelovo nagrado za medicino. K samem odkritju je bistveno pripomoglo poznavanje procesa homologne rekombinacije in izolacija pluripotentnih matičnih embrionalnih celic (Evans in Kaufman, 1981). Vlogo genskega produkta, ki nastane z izničenjem poljubnega gena v genomu, je mogoče raziskovati pri normalnem razvoju organizma ali bolezni. Odkritje je pomenilo veliko revolucijo na področju sesalske genetike. Od prve objave miši s ciljnim izničenjem gena *Hprt1* (*hipoksantin fosforibozil transferaza 1*) in vse do danes je bilo generiranih več kot 1000 mišjih modelov s ciljnim izničenjem v genih. S pomočjo takšnih živalskih modelov je možno opraviti veliko raziskav, ki pomembno vplivajo na študije človeških bolezni. Nekateri geni predstavljajo esencialno vlogo pri osnovnih razvojnih procesih, zato njihovo izničenje vodi v smrt živali že v embrionalnem razvoju. Zato se pri raziskovanju določene vloge takšnih genov pri odrasli živali poslužujem procesa pogojnega izničenja genov, ki nam omogoča časovni in tkivni nadzor izničenja genov. Tako zagotovimo nemoten razvoj živali in s tem omogočimo preučevanje vloge gena v posameznem tipu celic, tkivu ali razvojni fazji. Osnovo teh procesov predstavlja sistema Cre/lox in Flp/FRT (Garcia in Mills, 2002).

2.4.4 Cre/loxP sistem

Cre/lox sistem izhaja iz bakteriofaga, kjer sodeluje pri izrezu in vgraditvi genoma bakteriofaga iz gostiteljske bakterijske celice. Cre rekombinaza (angl.: *causec recombination*) je mestno specifična in izvira iz družine alfa integras. Z vezavo na *lox* mesta katalizira mestno specifično rekombinacijo med dvema *lox* mestoma. Lox je 34 bp dolgo zaporedje DNA, z dvema 13 bp dolgima obrnjenima ponovitvama in osrednjim 8 bp dolgim jedrom, ki določa orientacijo *loxP* mesta. Cre rekombinaza omogoča inverzijo med dvema loxP mestoma, če sta mestni obrnjeni v nasprotni smeri in izrez odseka med loxP mestoma, kadar sta le ti obrnjeni v isto smer (Sauer in Henderson, 1988). Po enakem principu deluje tudi Flp/FRT sistem, ki izhaja iz *Saccharomyces Cerevisiae*. Ta sistem vsebuje encim flipazo (Flp), ki sodeluje pri rekombinaciji med dvema mestoma FRT. Oba sistem delujeta tudi v sesalskih celicah, zato sta idealno orodje za pogojno izničenje genov. Tehnologija pogojnega ciljanja genov, v gen, ki ga pri miši preučujemo, vnese mesta lox. Miš, ki smo jo pridobili na tak način, križamo s transgeno mišjo, katera ima izraženo Cre rekombinazo pod kontrolo poljubnega promotorja. Transgeno miš s Cre vključkom, pripravijo s tehnologijo mikroinjeciranja v pronukleus. Danes je na trgu dostopnih mnogo miši z vključki lox v različnih genih, in prav tako transgenih miši, ki v svojem genomu nosijo Cre rekombinazo pod različnimi promotorji (Nagy, 2000).

2.4.4.1 Postopek pridobivanja mišjega modela s pogojnim izničenjem preiskovanega gena

Za pripravo mišjega modela s pogojnim izničenjem genov se uporablja postopek, ki je sestavljen iz šestih glavnih stopenj:

- Priprava konstrukta
- Vnos konstrukta v pluripotentne matične zarodne celice
- Dvojna selekcija
- Vnos transgenih celic v blastocisto ter prenos blastociste v nadomestno mater
- Križanje s transgeno mišjo s Cre transgenom
- Fenotipska analiza

Pomemben korak pri razvoju modela s pogojnim izničenjem gena je priprava primernega tarčnega konstrukta za vnos v matične zarodne celice. Konstrukt je zgrajen iz zaporedja tarčnega gena (homologni ročici), selekcijskih kaset ter prepoznavnih mest za rekombinaze (*loxP* in *Fr*). Zaporedja, ki so tuja našemu konstraktu, vnesemo v nekodirajoče regije tarčnega gena z rekombinantnimi tehnikami. Regiji, kjer sta homologni ročici, se popolnoma ujemata s tarčnim genom in s tem omogočita homologno rekombinacijo tarčnega konstrukta v celični genom. Največkrat uporabljenna pozitivna selekcijska kasa je najpogosteje gen za bakterijsko aminoglikozid fosfotransferazo (neo) pod kontrolo sesalskega promotorja PGK. Gen s tem prenese odpornost proti neomicinu pri bakterijah in G418 pri sesalcih ter s tem dopusti preživetje celic s stabilno vgrajenim konstruktom. Pozitivna selekcijska kasa znotraj introna ima možnost vplivanja na izražanje tarčnega gena in izražanje fenotipa. Mesta za rekombinazo, ki so prepoznana in obdajajo pozitivno selekcijsko kaseto, omogočajo njen izrez po končani selekciji. Negativno selekcijsko kaseto predstavlja gen za timidin kinazo (TK), ki leži izven homolognih ročic in se ob rekombinaciji konstrukta na samo tarčno mesto ne vgraditi v genom. Ganciklovir v gojišču selektivno vpliva na celice, v katere se je vgradila TK kasa, saj negativno vpliva na njihovo rast. Celice pri katerih je prišlo do naključne vgradnje konstrukta v genom, le ta selektivno vpliva na njihov razvoj. S postopkom elektroporacije vnesemo linealiziran konstrukt v pluripotentne matične celice. V nadaljevanju so celice izpostavljene dvojni selekciji z G418 in ganciklovirom, ki omogoča selekcijo rekombinantnih klonov, pri katerih je prišlo do stabilne vgraditve tarčnega konstrukta na pravilno mesto v genomu. S predhodnim izražanjem določene rekombinaze iz celic izrežemo pozitivni selekcijski marker. Dodatno potrditev o vgradnji konstrukta pri določenih klonih preverimo še z molekularnimi tehnikami (PCR, sekvenciranje, prenos po Southernu). Celici pred vnosom v blastocisto preverimo kariotip. S postopkom mikromanipulacije prenesemo v blastocisto in nato prenesemo v maternico psevdo-breje nadomestne matere. Za ta postopek se najpogosteje uporabi celice mišje linije 129/Sv, katere imajo svetlo rjav kožuh, nato te celice prenesemo v blastocisto mišje linije C57, katera ima črn kožuh. Za nadaljnja parjenja uporabljamo himere miši, pri katerih je prišlo do vgradnje *lox* mesta v zarodno linijo. Pogojno izničen preiskovani gen bomo dobili šele po križanju miši, z *lox* mesti v preiskovanem genu z linijo, ki vsebuje vključek za Cre rekombinazo. Linija s Cre vključkom, pod poljubnim promotorjem nosi Cre rekombinazo. Šele v dvojno transgenih

miših uporaba inducibilnih promotorjev dovoljuje tkivno in časovno kontrolo izničenja preiskovanega gena (Smith, 2011).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Terminologija

V diplomskem delu so vsa imena genov poenotena v skladu z veljavno nomenklaturo, ki je predpisana s strani Hugo Gene Nomenclature Commite (Hugo Gene..., 2016), imena genov miši pa so poimenovana v skladu z nomenklaturo, ki jo predpisuje Mouse Genome Informatics (Mouse Genome..., 2016). Poenotenje smo uporabili z namenom lažjega razumevanja, saj se v nekaterih starejših objavah pogosto pojavljajo starejše različice imen.

3.1.2 Laboratorijski pribor

Preglednica 1: Oprema, ki smo jo potrebovali za izvedbo poskusa

Aparture	Proizvajalec
Avtomatske pipete	Gilson, Francija
Večkanalna pipeta	Eppendorf, Nemčija
Reagenčne posodice	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga 5417C	Eppendorf, Nemčija
Kadičke za elektroforezo	Pharmacia, Švedska
Pipetni nastavki brez filtra	Brand, Nemčija
Mikrovalovna pečica	Orion, Madžarska
Elektroforeza	Pharmacia, Švedska
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, ZDA
Tehtnica	Sartorius, Nemčija
Sealin folija 480	Roche Applied Science, Nemčija
Light Cycler 480 II	Roche Applied Science, Nemčija
Nano Vue™	GE Healthcare Life science, ZDA
Naprava za slikanje gelov (U:GENIUS)	Syngene, ZDA
Homogenizator - T10 basic ultraturax	IKA, Stamfen, Nemčija
Mikroskop TE2000-U	Nikon
Bürker-Türkova števna komora	Brand

Preglednica 2: Reagenti, ki so bili uporabljeni med izvedbo poskusa

Reagenti	Proizvajalec
Priteinaza K iz <i>Tritirachium album</i>	Sigma - Aldrich
Agaroza	Sigma - Aldrich
Mastermiks	Promega
NaCl - Sodium chloride solution	Sigma - Aldrich
Etidijev bromid	Promega
Triton™ X-100	Sigma – Aldrich
Trizma® base	Sigma - Aldrich
Edta pufer	Sigma - Aldrich
Borova kislina	Sigma - Aldrich
Tripan modro	Fluka

3.2 POSKUSNE ŽIVALI

3.2.1 Križanja linij laboratorijskih miši

Znotraj poskusa so bili vsi postopki ravnanja s poskusnimi živalmi v skladu s pravilnikom o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (Uradni list RS, št. 81/2009) in v skladu z zakonom o zaščiti živali (Uradni list RS, št. 43/2007). Uporabljali smo tudi gensko spremenjene miši, zato smo upoštevali tudi zakon o ravnanji z gensko spremenjenimi organizmi (Uradni list RS, 67/2002 ter 21/2010). Dovoljenje za izvajanje poskusov na gensko spremenjenih živalih varnostnega razreda 1 je odobrilo Ministrstvo za okolje in prostor. Veterinarska uprava republike Slovenije je izdala dovoljenje (št: 34401-57/2009/3) za izvajanje opisanih poskusov, ki so del obsežnejše raziskave pri prof. dr. Simonu Horvatu. Vsi člani osebja za delo s poskusnimi živalmi so bili usposobljeni za delo s poskusnimi živalmi so imeli izdano potrdilo o opravljenem izpitu.

Pri poskusu smo bila uporabljen standardna imbridirana linija miši C57BL/6 (Harlan, Italija) ter preostale transgene linije miši, ki so bile pridobljene z lastno vzrejo na Oddelku

za zootehniko, Biotehniške fakultete, prinešene iz sodelujočih laboratorijev (Minoo Rassoulzadegan, Francija) ali kupljene iz Jackson laboratorija (ZDA) (Preglednica). Te transgene linije smo med rejo, zato da smo ohranjali linijo, povratno križali z linijo C57BL/6.

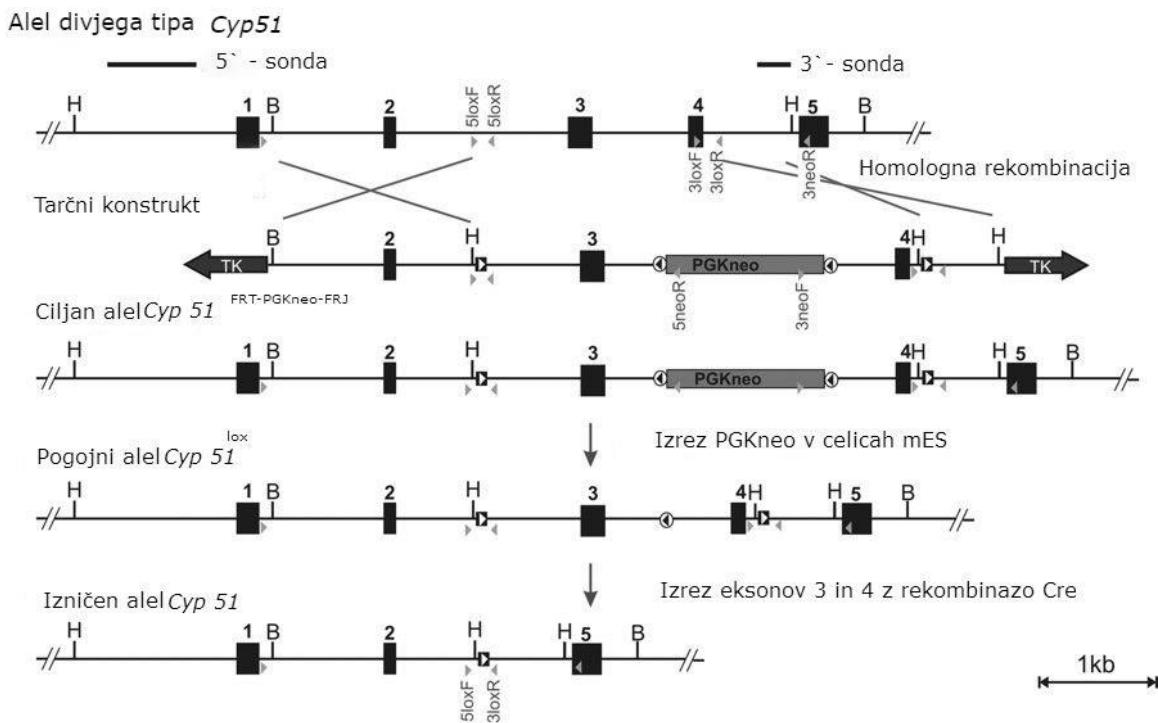
Preglednica 3: Transgene linije miši, ki so bile uporabljene v našem poskusu

Uradno ime linije	Alel <i>Cyp51</i> (genotip)	Transgen Cre	Genetsko ozadje	Vir
B6;129SV ^{Cyp51tm1Bfro}	<i>Cyp51</i> ^{lox}	/	>96,9 % C57, 129/Sv	Oddelek za zootehniko
B6;129SV ^{Cyp51tm1.1Bfro}	<i>Cyp51</i> ⁻	/	>96,9 % C57, 129Sv, FVB/N	Oddelek za zootehniko
B6.FVB-Tg(Ella-cre) C5379Lmgd/J	<i>Cyp51</i> ⁺	<i>Ella-Cre</i>	>96,9 % C57, FVB/N	Laboratorij Jackson (ZDA)
B6.Cg-Tg(<i>Prp-Cre-ER</i> ^T)	<i>Cyp51</i> ⁺	<i>Prp-Cre-ER</i> ^T	>96,9 % C57, SJL	Laboratorij Jackson (ZDA)
B6.D2-Tg(<i>SyCP1-Cre</i>)4Min/J	<i>Cyp51</i> ⁺	<i>SyCP1-Cre</i>	<96,9 % C57,	Prof.dr.Minoo Rassoulzadegan (Francija)
B6;FVB-Tg(<i>Stra8-Cre</i>)1Reb/J	<i>Cyp51</i> ⁺	<i>Stra8-Cre</i>	<96,9 % C57, FVB/N	Laboratorij Jackson (ZDA)
129S.FVB-Tg(Amh- cre)8815Reb/J	<i>Cyp51</i> ⁺	Amh-Cre	<96,9 % C57,	Laboratorij Jackson (ZDA)
B6.129/Sv.Amhr2 ^{tm3(cre)Bhr}	<i>Cyp51</i> ⁺	Amhr2-Cre	<96,9 % C57,	Laboratorij Jackson (ZDA)

3.2.2 Pridobitev mišjega modela z verjetnostjo pogojnega izničenja gena *Cyp51*

Zaporedje gena *Cyp51*, ki smo ga potrebovali za pripravo ciljnega vključka, je bil izolirano iz umetnega bakterijskega kromosoma (klon 519E21), pridobljenega iz knjižnice umetnih bakterijskih in mišjih kromosomov 129/Sv (Research Genetic, ZDA) (Debeljak in sod., 2000a).

Za pogojno izničenje gena *Cyp51* (v nadaljevanju $Cyp51^{lox}$) je bil razvit mišji model, ki je nastal na Oddelku za zootehniko, v okviru raziskav podoktorskega projekta dr. Helene Motaln. Z metodo rekombinantne DNA, so bile v ciljni vključek dodane kasete TK za negativno selekcijo. Z mesti FRT obdana neomicinska kaseto PGK neo za pozitivno selekcijo ter dve mesti *lox* z novim mestom za razcep. Z metodo elektroporacije je bil transgeni vključek vnesen v celice mES, ki so bile izolirane iz miši 129/Sv. Sledila je dvojna selekcija celic z geneticinom in ganciklovirjem, pri kateri so pridobili rekombinantne klone, v katerih so bili vključki vstavljeni s homologno rekombinacijo. Ko je bila vnesena rekombinaza Flp, se je posledično izrezalo zaporedje neomicinske kasete, kar je pripeljalo do tvorbe pogojnega alela $Cyp51^{lox}$. Dva neodvisna klena celic, ki smo jih dobili preko elektroporacij, sta bila naknadno injecirana v mišje blastociste linije C57BL/6JOIaHsd (C57BL/6; Harlan, Italy). Genotipizacijo himer smo naredili s parom začetnih oligonukleotidov 5loxF/5loxR ali 3loxF/3loxR. Potomci heterozigotov $Cyp51^{+/lox}$ so bili medsebojno križani vsaj štiri generacije z mišmi C57BL/6 in s tem ustvarili transgeno linijo B6.129SV-*Cyp51tm1Bfro*. V nadaljevanju je bilo z uporabo Cre/*lox* tehnologije omogočeno nadaljno izničenje gena *Cyp51*. To je potekalo tako, da smo z medsebojnim križanjem živali genotipa $Cyp51^{+/lox}$ pridobili homozigotne živali $Cyp51^{lox/lox}$, ki so bile nato uporabljene v nadaljnjih križanjih (Keber in sod., 2011).



Slika 4: Shematični prikaz pristopa za izničenje alela *Cyp51* (povzeto po Keber in sod., 2011)

3.2.3 Pridobitev modela miši s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* v spolnih celicah

3.2.3.1 *Cyp51*^{lox/-}; *Sycp1*-Cre- x *Cyp51*^{lox/lox}; *Sycp1*-Cre+

Metoda pogojnega izničenja gena *Cyp51* v spolnih celicah, je bila uporabljena za preučevanje vloge gena *Cyp51* med spermatogenezo. Da bi preverili našo hipotezo, smo za začetek izbrali model miši, ki je vseboval rekombinazo Cre pod kontrolo promotorja gena za protein sinaptonemnega kompleksa 1 (*Sycp1* – angl.: *Synaptonemal complex protein 1*). Gen *Sycp1* je izražen v kratkem časovnem okvirju, in sicer med nastankom sinaptonemnega kompleksa v leptotenski in zigotenski fazi prve mejotične delitve. S pomočjo rekombinaze Cre, ki je pod vplivom promotorja *Sycp1*, je mogoče preiskovanje vpliva gena v primarnih spermatocitih ob začetku prve mejotične delitve (Vidal in sod., 1998). V drugih raziskavah je bilo dokazano, da pride do metilacije DNA v zarodni liniji, in s tem do zmanjšanja učinkovitosti izreza z nadaljnji generacijah (Rassoulzadegan in sod., 2002). V spolnih celicah je bil z uporabo te linije izrez gena *Cyp51* neučinkovit.

3.2.3.2 $Cyp51^{+/lox}$; $Prp\text{-}Cre}^+$ x $Cyp51^{+/lox}$; $Prp\text{-}Cre}^-$

Za pogojno izničenje gena, smo uporabili tudi linijo miši, ki izraža Cre rekombinazo pod kontrolo mišjega prionskega proteina (*Prp* – angl. *Prion protein*). Izražanje gena *Prp* najdemo v različnih delih možganov ter v organih, ki so oživčeni s simpatičnim živčevjem, kamor sodijo tudi testisi. Uporabljeni liniji miši je v genomu, zaradi mesta vključka, izražala Cre rekombinazo le v spermatogonijih in primarnih spermatocitih, ki omogočajo izrez lokusa *Cyp51* samo v zgodnjih stopnjah razvoja spolnih celic (Weber in sod., 2001). Zaporedje, ki določa Cre rekombinazo, je dodano spremenjeno zaporedje zapisa s človeškim estrogenskim receptorjem (ER^T), ki ne more vezati naravnega liganda estrogena zaradi mutacije Gly521Arg. Na to mesto se namesto naravnega veže umetni ligand tamoxifen. Tamoxifen z vezavo na protein Cre-ER^T dovoljuje prenos proteina v jedro in omogoči delovanje Cre rekombinaze. S tem sistemom je omogočen dodatni časovni nadzor izničenja gena *Cyp51* v spolnih celicah (Metzger in Chambon, 2001). S tem modelom miši je bil izrez gena *Cyp51* učinkovit, vendar, ker je bilo mesto vezave vključka *Prp-Cre-ER*^T naključno, ni bilo mogoče dobiti dvojnih homozigotov po križanju z linijo *Cyp51*^{lox/lox}. Razlog zato je najverjetneje v vezanem dedovanju lokusov *Cyp51*^{lox} in *Prp-Cre-ER*^T v *trans* konfiguraciji.

3.2.3.3 $Cyp51^{lox/-}$; $Stra8\text{-}Cre}^-$ x $Cyp51^{lox/lox}$; $Stra8\text{-}Cre}^+$

V poskusu smo uporabili še eno linijo s pogojnim izničenjem gena *Cyp51*, pri kateri se Cre rekombinaza izraža pod kontrolo promotorja gena *Stra8*. Gen *Stra8* je značilen za vretenčarje, pri katerem je s spodbujanjem z retinojsko kislino (RA) omogočen začetek mejoze v spolnih celicah pri obeh spolih (Anderson E.L, 2008). Ker je bilo uporabljeno nepopolno promotorsko zaporedje, se *Stra8-Cre* izrazi samo v spermatogonijih in s tem omogoči značilno izničenje gena *Cyp51* v spermatogonijih. Učinkovitost tega izreza je minimalno 95 % (Sadate-Ngatchou in sod., 2008).

3.2.4 Pridobitev modela miši s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* v Sertolijevih celicah

Za pogojno izničenje gena *Cyp51* v Sertolijevih celicah smo uporabili linijo transgenih miši z vstavljeni rekombinazo Cre pod uravnavo promoterja za Anti-Müllerjev hormon (*Amh*). Pri samcih, pri katerih je bila rekombinaza Cre pod uravnavo promotorja gena *Amh*, so ugotovili izraženost mRNA prepisov Cre in rekombinacijo poročevalske beljakovine specifično samo v Sertolijevih celicah (Lécureuil in sod., 2002). Za pridobitev miši s pogojno izničenim genom *Cyp51* v Sertolijevih celicah, smo v prvem koraku križali miši genotipa *Cyp51*^{lox/lox} s transgeno linijo 129S.FVB-Tg(*Amh-cre*)8815Reb/J (*Amh-Cre*⁺). Temu so sledila križanja potomcev genotipa *Cyp51*^{+/lox}; *Amh-Cre*⁺ in genotipa *Cyp51*^{+/lox}; *Amh-Cre*⁻, s čimer smo pridobili miši genotipa *Cyp51*^{lox/lox}; *Amh-Cre*⁺.

3.2.5 Pridobitev modela miši s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* v Leydigovih celicah

Za proučevanje pomena holesterologeneze v Leydigovih celicah pri spermatogenezi smo uporabili linijo transgenih miši B6.129/Sv.*Amhr2*^{tm3(cre)Bhr} (rekombinaza Cre pod uravnavo promoterja gena za receptor za Anti-Müllerjev hormon 2; *Amhr2-Cre*⁺), ki smo jih križali z mišmi genotipa *Cyp51*^{lox/lox}, da smo pridobili heterozigotne miši za pogojni alel *Cyp51*^{lox}, ki so imele tudi zapis za rekombinazo Cre. V nadaljevanju pa smo s križanjem miši genotipov *Cyp51*^{+/lox}; *Amh-Cre*⁺ in *Cyp51*^{+/lox}; *Amh-Cre*⁻ pridobili miši s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* v Leydigovih celicah (*Cyp51*^{lox/lox}; *Amhr2-Cre*⁺).

3.3 OSKRBA MIŠI

V prostorih, kjer je mišja kolonija, veljajo posebne zahteve, ki se jih je potrebno dosledno držati, saj so miši dovetne za marsikatere bolezni iz zunanjega okolja. S temi ukrepi zagotovimo minimalen vnos okužb. Pred vstopom v kolonijo se vsak obiskovalec sezuje in obuje gumijaste škornje. Preobleče se v čisto obleko, na glavo si nataknje mrežasto kapo, usta ima zaščitena z masko, na rokah pa je potrebno nositi rokavice za enkratno uporabo.

Vse predmete, ki jih na novo vnašamo v kolonijo (krma, stelja, različne posode in orodja) je potrebno predhodno razkužiti z Virkonom S (KRKA, Slovenija). Prostor kolonije je zasnovan tako, da se čista in umazana pot ne križata. Na ta način poteka tudi čiščenje kolonije in menjava kletk ter vnos živali. Vsi ti ukrepi so nujno potrebni zaradi zaščite živali ter zaščite samega obiskovalca (preprečevanje alergij,...).

3.3.1 Čiščenje mišje kolonije

Čiščenje se izvaja enkrat tedensko. Oprane kletke (Techniplast, Italija) napolnimo s svežo steljo (Lignocel, Nemčija – J.Rattenmaier & Söhne), vanje prestavimo živali in jih nato pokrijemo s svežimi mrežami, po potrebi imajo nekatere kletke pokrov. Umazane kletke se pere v zunanjem prostoru v pralnem stroju na temperaturi 95°C ob uporabi detergenta. Kletke se nato prenesejo na poseben pult, kjer se posušijo, nato pa jih prenesemo v kolonijo. Prostori za čiščenje kletk so čez noč izpostavljeni UV svetlobi.

Stelja je iz lesenih opilkov, ki je posebej obdelana, da je primerna za laboratorijske živali. Potrebno je zamenjati tudi stekleničko s svežo vodo, ter pretresti in po potrebi dodati krmo. Brejim samicam je potrebno v kletko dodati, kot obogatitev, bombažno krpico (angl.: Nestlets, Plexx) iz katere si naredijo gnezdo.

Miši ob menjavi prestavljamo med kletkami tako, da jih primemo za koren repa in jih prenesemo. Ob menjavi z živalmi rokujemo počasi in previdno, da jim ne povzročamo stresa. Sproti na kartončkih, ki visi pred kletko, preverimo število in ustreznost živali. Pozorni smo tudi na zdravstveno stanje živali, če opazimo da so miši bolne, shujšane ali poškodovane, ustrezno ukrepamo – ločimo jih od ostalih živali ali pa jih izločimo iz kolonije.

3.3.2 Krma in voda

Oskrba z vodo in krmo mora biti mišim stalno na voljo, preverjamo jo vsakodnevno. Vodo nalijemo v stekleničke, ki jih nato namestimo v napajalnike v mreži. Stekleničke so

plastične z volumnom 200 ml, ter imajo kovinski nastavek s cucljem. Voda, ki jo dajemo živalim, je vodovodna voda z dodano HCl, ampak jo moramo predhodno pripraviti - zakisati, da je le ta ustrezna za živali in da v preprečimo morebitne okužbe. Voda mora imeti pH 3-4, to dosežemo z dodajanjem 37 % kisline HCl (Merck). Tako pripravljeno vodo natočimo v stekleničke za miši.

Živali smo krmili s peletirano krmo Altromin 1324, po volji (*ad libitum*). Krma je vsebovala SB 19,00 %, SM 4,00 %, SVI 6,00 %, SP 7,00 %, Ca 0,90 %, P 0,70 %, vit A 15.000 IE, vit D3 600 IE, vit E 75 mg, Cu 5 mg.

3.3.3 Klima ter svetlobni režim v koloniji

Temperatura v koloniji mora biti dokaj konstantna, saj so miši zelo občutljive na njeni nihanje. Povprečna temperatura zraka je $21^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Relativna vlaga pa je med 50-70 %. Ventilacija je konstantna in meri 10 menjav zraka na 1 uro (klimatska naprava Rosenberg). Svetlobni režim je nastavljen na 12 ur svetlobe (podnevi) in 12 ur teme (ponoči).

3.3.4 Vodenje evidenc in analiza podatkov iz reje

V koloniji je potrebno voditi poseben register živali, kjer so zapisani vsi podatki o živalih in kaj se z njimi dogaja znotraj kolonije. Zbrane imamo podatke o paritvah, gnezdih, koliko je bilo odstavljenih mladičev, poginih in izločitvah. Ob prihodu v kolonijo vsak dan preverimo, kaj je potrebno s posameznimi živalmi narediti.

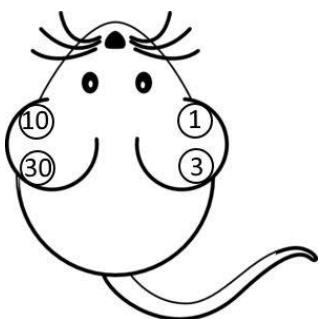
Za **paritev** so živali primerne, ko dosežejo starost med šestim in sedmim tednom starosti. Ko preverimo podatke o genotipih, se na njihovi podlagi odločimo katere živali in koliko jih bomo dali v paritev, ter katere izločili. Povečini parimo samca in samico 1:1, 1:2, včasih celo 1:3 (ti. haremska paritev). Ko so izbrane živali v isti kletki za paritev, jih zabeležimo v rodovniško knjigo pod paritve (priloga A). V koledarsi zabeležimo, kdaj točno gledamo za brejost (18-20 dni).

Brejost traja med 18 in 21 dni. Če opazimo da je samica breja, na kletko označimo kartonček breja in jo nato preverjamo do kotitve. Če je bilo v kletki več samic, brejo ločimo in ji damo posebej kletko, v kateri ji ponudimo bombažno krpico ("nestlets") za izgradnjo gnezda. Ko se gnezdo skoti, si zapišemo datum rojstva in število mladičev v gnezdu, v koledar pa si damo zaznamek, kdaj jih moramo odstaviti (21. dan). Pod kategorijo paritve, dodamo nov list s podatki o gnezdu (linija, generacija), zaporedno gnezdo, datum paritve, podatke o starših, rojstni datum mladičev ter število rojenih in mrtvorojenih (priloga B).

Odstavitev mladičev sledi 21. dan od dneva kotitve. Živali nato označimo in jih ločimo v ločeni kletki po spolih. Glede na genotip se odločimo, kaj se bo z živalmi dogajalo naprej. Ali gredo za vzdrževanje linije ali pa so to testne živali, ki jih bomo po protokolu žrtvovali. V primeru, da so živali bolne, slabotne ali neprimernega genotipa, jih izločimo iz reje oz. primerno zdravimo. Včasih preložimo odstavljanje za teden kasneje, da živali še malo zrastejo in se okrepijo. Po spolu živali ločimo glede na razdaljo med anusom in spolnim organom. Samice imajo krajšo razdaljo, medtem ko je pri samcih ta daljša. Živali označujemo s ščipanjem ušes, kar nam kasneje služi za njihovo identifikacijo, prav tako pa košček uhlja uporabimo za genotipizacijo živali. Pri ščipanju ušes se uporablja določen sistem, ki nam zagotavlja zadostno število kombinacij ušesnih števil (slika 5). Za ščipanje smo uporabili poseben ščipalec, pinceto, s katero smo odvzeli košček tkiva za genotipizacijo, označene 0,5 ml reagenčne posodice (Eppendorf) in 70 % etanol za razkuževanje ščipalca.

Preglednica 4: Možne različne variante številk pri označevanju mišjih ušes (Prevoršek, 2005)

1 luknjica				2 luknjici, isto uho		2 luknjici, različno uho			
1	3	10	30	4	40	11	13	31	33
3 luknjice						4 luknjice		drugo	
14	41	34		43		44		brez	



Slika 5: Način označevanja miši s ščipanjem ušes

Del tkiva uhlja, ki smo ga shranili s pinceto v reagenčne posodice(»epice«) in označili, potem do uporabe shranimo na -80 °C. Zaporedno številko vsake označene živali zavedemo na evidenčni list z gnezdom, hkrati pa vodimo še evidenco z ušesnimi vzorci, ki nam pove, kateri vzorec pripada kateri živali.

3.4 MOLEKULARNO-BIOLOŠKE IN BIOKEMIJSKE METODE

3.4.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. *Polymerase chain reaction*)

Verižna reakcija s polimerazo ali PCR je metoda, ki nam omogoča hitro pomnoževanje DNA *in vitro*. En cikel verižne reakcije poteka v treh glavnih fazah:

1. Denaturacija je faza, v kateri se pri visoki temperaturi 92-95 °C, denaturira matrična DNA, kar pomeni da se razkleneta komplementarni verigi.
2. Faza prileganja začetnih oligonukleotidov, v kateri temperaturo znižamo pod temperaturo tališča (Tm) vezave obeh začetnih oligonukleotidov.
3. V zadnji fazi sledi sinteza komplementarne verige. Temperaturo prilagodimo optimalnemu območju delovanja encima DNA polimeraze (za TaqGold polimerazo predstavlja to 72 °C).

Metoda PCR je bila uporabljena za genotipizacijo lokusa *Cyp51* in preverjanje prisotnosti vključka Cre. Tkivo, ki nam je služilo za genotipizacijo, smo odvzeli iz uhlja, ko smo označevali živali. Ponovno smo preverili genotip ob žrtvovanju živali, ko smo jim odvzeli testise, za določitev dnevne produkcije spermijev.

Del tkiva (aho oz. tkivo testisov) smo po dodatku 60 µl lizatnega pufra in 0,5 µl proteinze K (5 µl proteinaze K/1 ml pufra) inkubirali čez noč na 55 °C. Inkubacija je potekala tako, da smo lizate v epicah postavili v vodno kopel (55 °C), ki se je enakovremeno mešala in pustili čez noč, da je proteinaza K razgradila tkivo in smo dobili DNA.

Po inkubaciji čez noč moramo proteinazo K deaktivirati, in sicer z 10-minutno inkubacijo na 95 °C, to storimo na PCR napravi. Epice pokrijemo s pokrovom, da jih med segrevanjem ne odnese zaradi pritiska. Nato vsako epico posebej dobro premešamo, da smo spravili kapljice s sten in jih še dodatno centrifugirali. Lizate moramo pred PCR reakcijo redčiti 25x, na končno koncentracijo 5 ng/µl (3 µl lizata v 71 µl vode). V PCR reakciji smo uporabil reakcijsko mešanico proizvajalca Fermentas (Nemčija), ki je prikazana v preglednici 5. Za genotipizacijo smo uporabili zaporedja začetnih nukleotidov za določitev lokusa *Cyp51* in preverjanje prisotnosti transgena Cre, ki so prikazani v preglednici 6.

Preglednica 5: Reakcijska mešanica za analizo PCR

Reagent	Končna koncentracija	Volumen za 1 reakcijo (µl)
Voda		1,42
10 x pufer za polimerazo	1 x	1
25 mM MgCl ₂	1,5 mM	1
2 mM dNTP	200 µl	1
10 pm/ µl začetni oligonukleotid 1	0,25 µl	0,25
10 pm/ µl začetni oligonukleotid 2	0,25 µl	0,25
5 U/ µl ampli Tag Gold	0,4 U	0,08

Preglednica 6: Zaporedja začetnih oligonukleotidov uporabljenih pri genotipizaciji lokusa *Cyp51* in transgenega vključka Cre

Oznake začetnih oligonukleotidov	Bazno zaporedje 5'-3'
3LoxF	5'- AA CAT AGC CCA CTT TAA GCA -3'
3LoxR	5'- TTC CGC ACC TAC TGT ATT TT -3'
5LoxF	5'- CAG ACT TGA TGG CAA GAG AT -3'
TK139	5'- ATT TGC CTG CATTAC CGG TC -3'
TK141	5'- ATC AAC GTT TTG TTT TCG GA -3'

Preglednica 7: Pogoji za PCR reakcijo pri preverjanju genotipov

Pogoji za pare začetnih oligonukleotidov 3LoxF/3LoxR in 5LoxF/3LoxR.

T (°C)	Čas (min:sek)	
94	5:00	
94	1:00	
58	1:00	35 x
72	0:30	
72	5:00	
4	Konec	

Preglednica 8: Pogoji za PCR reakcijo pri preverjanju genotipov

Pogoji za pare začetnih oligonukleotidov TK139/TK141.

T (°C)	Čas (min:sek)	
94	5:00	
94	0:30	
55	0:30	35 x
72	1:00	
72	5:00	
4	Konec	

Preglednica 9: Pričakovane dolžine pomnoženih oligonukleotidov pri PCR ob preverjanju genotipov

Par	Alel	Alel	Alel	Pozitiven	Negativen
Zač.oligo.	<i>Cyp51</i>⁺	<i>Cyp51</i>^{lox}	<i>Cyp51</i>⁻	Za Cre	za Cre
3LoxF/3LoxR	159 bp	210 bp	/	/	/
5LoxF/3LoxR	1707 bp	1881 bp	187 bp	/	/
TK139/TK141	/	/	/	349 bp	/

Legenda: / par začetnih oligonukleotidov pri alelu ni tvoril pomnožkov

3.4.2 Agarozna gelska elektroforeza

Fragmente DNA smo določili s pomočjo gelske elektroforeze. Agarozna gelska elektroforeza je standardna metoda, pri kateri s pomočjo električnega toka ločimo negativno nabite molekule DNA. Negativno nabite molekule, ki so izpostavljene električnemu polju, se premikajo v smeri pozitivno nabite elektrode - anode. Po večini se za ločevanje proteinov, kot so nukleinske kisline, uporablja gelska elektroforeza (agarozna oz. poliakrilamidna), odločimo se glede na velikost fragmentov, ki jih želimo ločiti. S pomočjo poliakrilamidne gelske elektroforeze ločujemo predvsem manjše fragmente DNA (od 5 do 500 baznih parov), natančnost ločevanja na takšnem gelu je zelo visoka, saj lahko ločimo delce DNA, ki se razlikujejo samo v enem baznem paru (Zabavnik Piano, 2007). Pri agarozni gelski elektroforezi so te molekule tudi večje (od 100 do 50.000 baznih parov), vendar ima agarozna gelska elektroforeza večji razpon ločevanja. Nižja kot je koncentracija agaroze v gelu, večje so pore v njem, in s tem prehajajo lahko skozi večje molekule DNA. Gel, po katerem potujejo molekule, deluje na principu sita, ki majhnim molekulam omogoča hitrejši, večjim pa počasnejši prehod skozi pore.

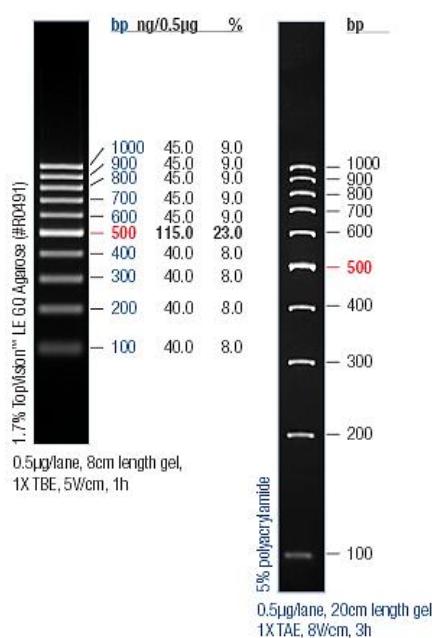
Agaroza je linearni polimer, ki je zgrajen iz D- in L-galaktoze, med seboj pa sta povezani z α -1,3- in β -1,4- glikozidnimi vezmi, ki se oblikujejo v večje vijačne strukture, kiso vezane v še večje aggregate s premerom 20 do 30 nm. Nukleinske kisline najpogosteje barvamo s fluorescentnim barvilom (etidijevim bromidom), da jih kasneje lahko zaznamo pod UV svetlobo. Etidijev bromid se nespecifično veže med bazne pare dvostranske DNA. Vezani etidijevi ioni so vidni pri svetlobi z valovno dolžino 310 nm in oddajajo intenzivno rdeče-oranžno barvo pri 590 nm (Kočevar in sod., 2007).

3.4.2.1 Priprava agaroznega gela

Produkte PCR smo analizirali s pomočjo agaroznega gela, ki je vseboval 3 % agaroze. Za pripravo 3 % agaroznega gela smo potrebovali 100 ml TBE 0,5 % pufer in 3 grame agaroze (Sigma). Za pripravo 0,5 % TBE pufra so potrebovali, 1,9 L H₂O, 100 ml 10 x TBE in 40 µl EtBr (etidijevega bromida). Za razbiranje dolžine PCR produktov na gelu, smo uporabljali 5 µl molekularne lestvice 100 bp (Fermentas, #SM0241) s koncentracijo 0,1 µg/µl. V procesu elektroforeze se fragmenti lestvice ločijo po dolžinah, kot je prikazano na sliki 6.

Preglednica 10: Reagenti, ki jih potrebujemo za pripravo 0,5 x TBE pufra

Reagent	Volumen
10X TBE (Maniatis)	100 ml
Etidijev bromid 10 mg/ml	40 µl
Deionizirana voda	1,9 l



Slika 6: Molekularna lestvica 100 bp in 1000 bp (Fermentas, 2009)

3.4.3 Ocenjevanje dnevne produkcije spermijev

Spremljanje dnevne produkcije spermijev nam je dodatno pojasnilo, kakšne so razmnoževalne sposobnosti samcev s popolno okvaro gena *Cyp51* v spolnih celicah. Z določitvijo skupnega števila spermijev, ki se dnevno proizvaja v testisih, smo ocenjevali razlike v vrednosti med knockout samci v primerjavi s samci divjega tipa. V pomoč pri štetju nam je bil prirejen protokol (Thayer in sod., 2001). Testise smo odvzeli 12 tednov starim živalim, jih očistili okoljskega maščobnega tkiva ter jih natančno stehtali. Tako očiščene testise smo potem prenesli v falkonke s 5 ml fiziološke raztopine z dodatkom 0,05 % tritona X-100, kjer smo jih s pomočjo politronskega homogenizatorja homogenizirali točno 15 sekund na največji hitrosti. Nato je bilo na vrsti priprava suspenzije, ki je vsebovala 100 µl homogenata in 100 µl raztopine tripan modrega (Fluka). V postopku homogenizacije ostanejo spermatide na razvojni stopnji 14-16 nepoškodovane, zato je mogoče njihova jedra prešteti pod mikroskopom v Bürker-Türkovi števni komori. Zrele semenčice in spermatide smo šteli pod mikroskopom TE2000-U (Nikon) ,pri 400-kratni povečavi s fazno-kontrastno mikroskopijo. Dnevno produkcijo spermijev smo preračunali s pomočjo povprečja dveh vrednosti števila celic v volumnu $0,04 \text{ mm}^3$, to smo preračunali na maso testisov, nato pa dobljeno vrednost delili s količnikom 4,84, kar nam pojasni čas zadrževanja (v dnevih) razvijajočih se spolnih celic v stopnji razvoja 14-16. Vrednosti proizvodnje semenčic v gramu svežega tkiva testisov smo primerjali s samci divjega tipa.

3.4.4 Štetje spermijev pod mikroskopom

Štetje spermijev z Bürker-Türk komoro

Potem, ko smo na 84. dan starosti žrtvovali živali (12 tednov), smo jim odvzeli testise in s pomočjo postopka homogenizacije (opisana v prejšnjem poglavju) pripravili suspenzijo, v kateri smo šteli spermatide. Spermatide na razvojni stopnji 14-16 nepoškodovane, zato je mogoče njihova jedra prešteti pod mikroskopom v Bürker-Türkovi števni komori. Zrele semenčice in spermatide smo šteli pod mikroskopom TE2000-U (Nikon) ,pri 400-kratni povečavi s fazno-kontrastno mikroskopijo.

Šteli smo vse celice, ki so bile srpaste oblike, razen tistih največjih, ter spermije (manjši, gostejši). Bürker-Türkova števna komora, ima vgravirano mrežo, ki nam služi v pomoč pri štetju. Pri naši metodi, smo šteli 5 kvadratov (A,B,C,D in E), kot so označeni na sliki A. Da smo dobili neko povprečje, smo nato šteli siva polja pod številko 1 in 6 skupaj (10x mali kvadrat) in polja 4 in 7 skupaj (10xmali kvadrat).

10 kvadratkov (2x (A+B+C+D+E)) :1+6

10 kvadratkov (2x (A+B+C+D+E)) :4+7

Formula za izračun dnevne proizvodnje spermijev:

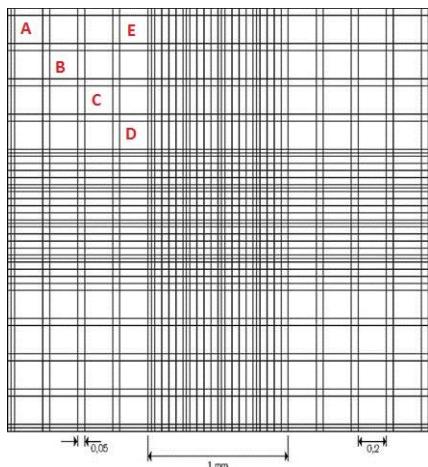
$$\text{DSP} = [((N \cdot 125\,000) \cdot 2 / \text{masa testisa})] / 4.84$$

Število 125 000 dobimo, ko pomnožimo velikosti stranice enega malega števnega kvadratka, se pravi volumna in pomnožimo z 10 (število preštetih polj).

$$125\,000 \rightarrow 0,2 \text{ mm} \cdot 0,2 \text{ mm} \cdot 0,1 \text{ mm} = 0,004 \text{ mm}^3 \cdot 10 = \underline{\underline{0,04 \text{ mm}^3}}$$

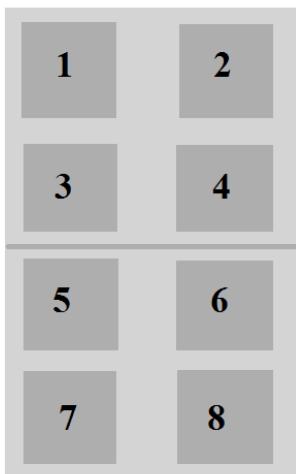
$$\text{Število spermijev v obeh testisih: } 5 \text{ ml} \rightarrow 5000 \text{ mm}^3 / 0,04 \text{ mm}^3 = \underline{\underline{125\,000}}$$

Količnik 4,84 - nam pojasni čas zadrževanja (v dnevih) razvijajočih se spolnih celic v stopnji razvoja 14-16.

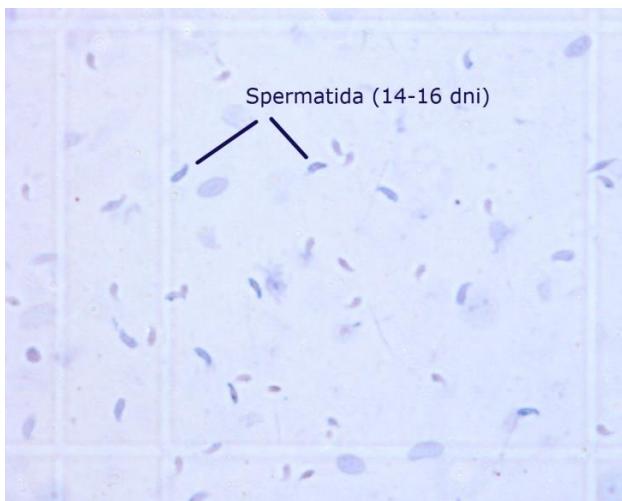


Slika 7: Predstavlja manjši kvadratek v celotni mreži, kot je razvidno na spodnji sliki (npr. kvadratek 1)

Mi smo šteli spermije znotraj kvadrata v označenih poljih (A,B,C,D,E). (Sigma-Aldrich)



Slika 8: Polja znotraj števne komore, kjer so mreže, kot so prikazane pod sliko 7



Slika 9: Štetja spermatid (14-16 dan) pod mikroskopom

Šteli smo samo spermatide v notranjem obsegu kvadrata, vidnega na mreži.

3.5 STATISTIČNA ANALIZA

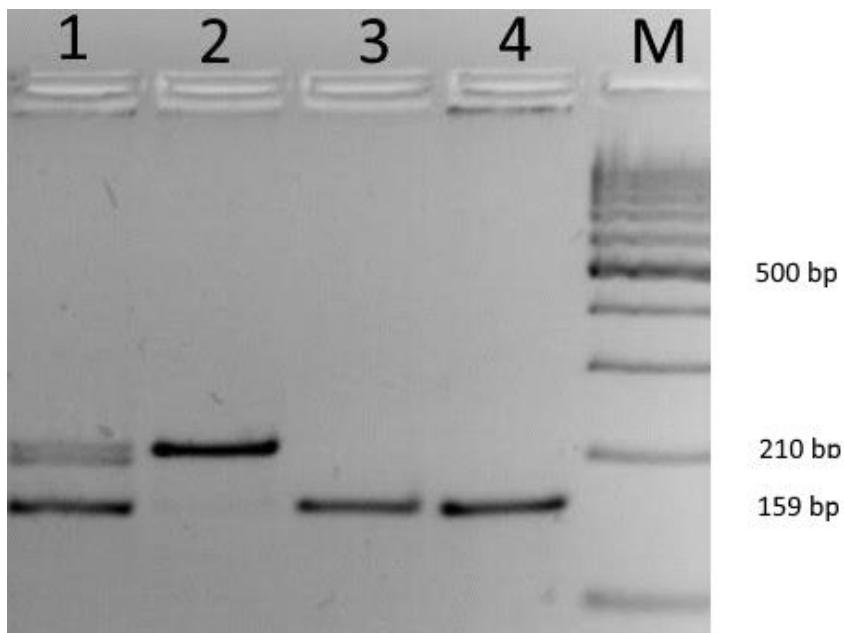
Podatke o telesni teži, teži testisov in dnevni proizvodnji spermijev smo obdelali s statističnim programom SPSS 14.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, ZDA). Razlike v telesni teži in dnevni proizvodnji spermijev med WT in KO mišmi za posamezne vrste križancev s pogojno izbitim genom *Cyp51* smo ugotavljali z eno-faktorsko analizo variance (ANOVA), pri čemer je genotip predstavljal neodvisno spremenljivko. Vpliv genotipa

(WT, KO) na težo testisov pri posameznih vrstah križancev smo ugotavljali z dvo-faktorsko analizo variance (ANOVA), pri čemer sta genotip in stran odvzema testisa predstavljalna neodvisni spremenljivki. Homogenost variance vzorcev smo ugotavljali z Levene-ovim testom. Normalno porazdelitev vzorcev smo ugotavljali s Shapiro-Wilk testom. Razliko smo sprejeli za statistično značilno, če je bila dobljena vrednost p nižja od 0,05.

4 REZULTATI

4.1 GENOTIPIZACIJA MIŠI B6;129SV - *CYP51^{+/LOX}*

Miši linije B6;129SV^{*Cyp51tm1Bfro*}, pri katerih je prišlo do vgraditve transgenega vključka z zapisoma za lox mesti v zarodno linijo in prenosa lokusa *Cyp51^{lox}* na potomce, smo povratno križali z linijo C57BL/6. Prisotnost lox mest z metodo PCR smo ugotavljali s parom začetnih oligonukleotidov 3loxF/3loxR. Pri alelu WT (*Cyp51⁺*) se je podvojeval odsek dolžine 159 bp, pri pogojnem alelu z vstavljenim 3lox mestom (*Cyp51^{lox}*) pa 210 bp (slika 10).



Slika 10: Prikaz pomnoženega odseka gena *Cyp51* med oligonukleoetdnima začetnikoma 3loxF in 3loxR. Določanje genotipa lox je temeljilo na podlagi PCR produktov velikosti 159 bp (*Cyp51⁺*) in 210 bp (*Cyp51^{lox}*). 1- *Cyp51^{+/lox}*, 2- *Cyp51^{lox/lox}*, 3- *Cyp51^{+/+}*, 4- *Cyp51⁺⁺*, M- molekulska lestvica 100 bp.

4.2 PREVERJANJE UČINKOVITOSTI IZREZA Z METODO PCR

4.2.1 Preverjanje učinkovitosti izreza lokusa *Cyp51* v spolnih celicah z metodo PCR

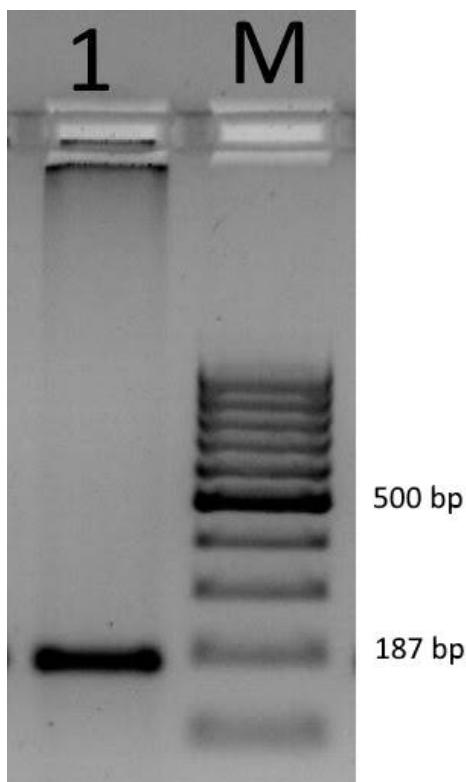
Za preverjanje vloge gena *Cyp51* med razvojem spolnih celic, smo parili linijo transgenih miši s zapisom za rekominazo Cre pod kontrolo promotorja gena *Sycp1*, ki se aktivira tik pred prvo mejotično delitvijo. Križane so bile homozigotne miši *Cyp51^{lox/lox}* s transgeno linijo *Sycp1-Cre*, ki smo jih preverili z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi. Preverjali smo izrez lokusa *Cyp51* v testisih samcev genotipa *Cyp51^{lox/lox}; Sycp1-Cre⁺* (ni prikazano). Pri mnogih samcih do izreza ni prišlo, ker samci *Sycp1-Cre* niso izražali rekombinaze Cre v testisih (Keber in sod., 2011). To potrjuje predhodna opažanja o vplivu metilacije transgena skozi generacije na represijo izražanja vključka Cre pri liniji *Sycp1-Cre*. (Rassoulzadegan in sod., 2002).

Zaradi tega smo pogojno izničenje gena *Cyp51* v spolnih celicah poskušali doseči z uporabo transgene linije *Prp-Cre-ER^T*, pri kateri je bila rekombinaza Cre pod uravnavo promotorja gena za prionski protein (Prp). Z reakcijo PCR smo potrdili izničenje lokusa *Cyp51* v testisih pri heterozigotnih živalih genotipa *Cyp51^{+/lox}; Prp-Cre-ER^T* (ni prikazano). Medsebojno smo križali heterozigote, da bi pridobili miši genotipa *Cyp51^{lox/lox}; Prp-Cre-ER^{T+}*. Pri vseh 262 genotipiziranih potomcih (priloga C in priloga D) nismo našli genotipa, ki smo ga iskali, zato ker se pojavlja vključek Cre samo pri potomcih z aleлом *Cyp51⁺* (ni prikazano), pri živalih *Cyp51^{lox/lox}* pa vključka ni bilo niti v enem samem primeru. Sklepali smo da je vključek *Prp-Cre-ER^{T+}* po vsej verjetnosti preblizu lokusa *Cyp51* in do rekombinacije ne pride, oziroma je ta zelo redka in s tem tudi verjetnost za nastanek potomca genotipa *Cyp51^{lox/lox}; Prp-Cre-ER^{T+}*.

Za poskus izničenja gena *Cyp51* v spolnih celicah mišjih samcev smo uporabili še linijo *Stra8-Cre*, ker je bolj odporna na metilacijo transgenega vključka Cre v spolnih celicah zaradi kodonov, ki so prilagojeni evkariontom. S križanjem miši genotipa *Cyp51^{lox/-}* in transgenih miši *Stra8-Cre* smo uspešno utišali gen *Cyp51* v spermatidah (Keber in sod., 2013, J Lipid Res). Genotip potomcev *Cyp51^{lox/-}; Stra8-Cre⁺* (KO-1) in *Cyp51^{lox/lox}; Stra8-*

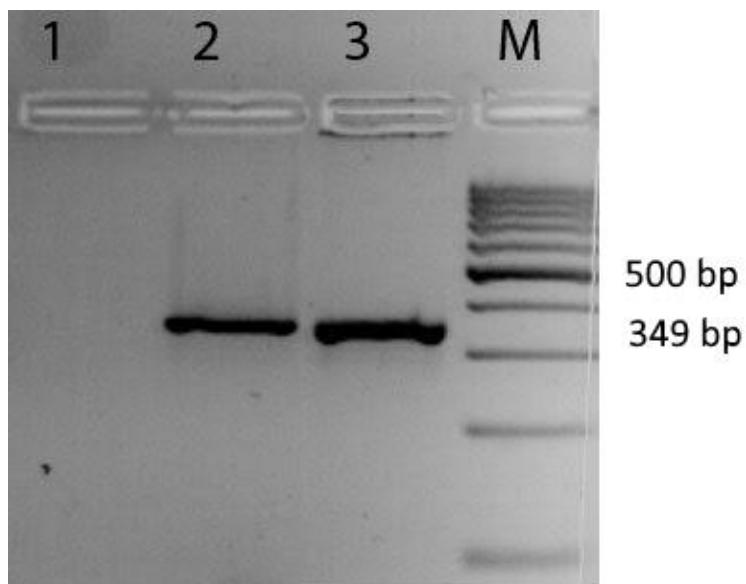
Cre⁻ (WT-1), ki smo jih v nadaljevanju natančneje proučili (telesna masa in masa testisov, dnevna proizvodnja spermijev), smo določili z uporabo parov oligonukleotidnih začetnikov 5loxF/3loxR (slika 11) in TK139/TK141 (slika 12).

Diferenciacija različnih alelov gena *Cyp51* (*Cyp51⁺*, *Cyp51^{lox}* in *Cyp51⁻*) za potrebe genotipizacije je temeljila na pomnoževanju odseka med parom začetnih oligonukleotidov 5loxF in 3loxR. PCR produkt velikosti 1701 bp je ustrezal alelu WT (*Cyp51⁺*), produkt velikosti 1881 bp pogojnemu alelu (*Cyp51^{lox}*) in produkt velikosti 187 bp nefunkcionalnemu alelu *Cyp51* (*Cyp51⁻*, slika 11), ki je nastal po izrezu dela zaporedja DNA med lox mestoma z rekombinazo Cre.



Slika 11: Prikaz pomnoženega odseka gena *Cyp51* med oligonukleotidnima začetnikoma 5loxF in 3loxR PCR produkt velikosti 187 bp predstavlja nefunkcionalno različico alela *Cyp51*, ki nastane zaradi izreza dela gena med lox mestoma. 1- *Cyp51^{-/-}*, M- molekulska lestvica 100 bp.

Prisotnost transgenega zapisa za rekombinazo Cre v bioloških vzorcih smo ugotavljali s parom začetnih oligonukleotidov TK139/TK141. Dolžina PCR produkta je znašala 349 bp. Če DNA vzorec ni vseboval zapisa za rekombinazo Cre, se produkt PCR ni tvoril (Cre^-) (slika 12).



Slika 12: Ugotavljanje prisotnosti vključka Cre v bioloških vzorcih z metodo PCR
Prisotnost konstrukta Cre smo potrdili s PCR produkтом velikosti 349 bp. Odsotnost PCR produkta pomeni, da zapis za rekombinazo Cre v biološkem vzorcu ni bil prisoten. 1- Cre^- , 2- Cre^+ , 3- Cre^+ , M- molekulska lestvica 100 bp.

4.2.2 Preverjanje učinkovitosti izreza lokusa *Cyp51* v Sertolijevih celicah pri križancih genotipa *Cyp51*^{lox/lox}; AMH-Cre^{+/−} z metodo PCR

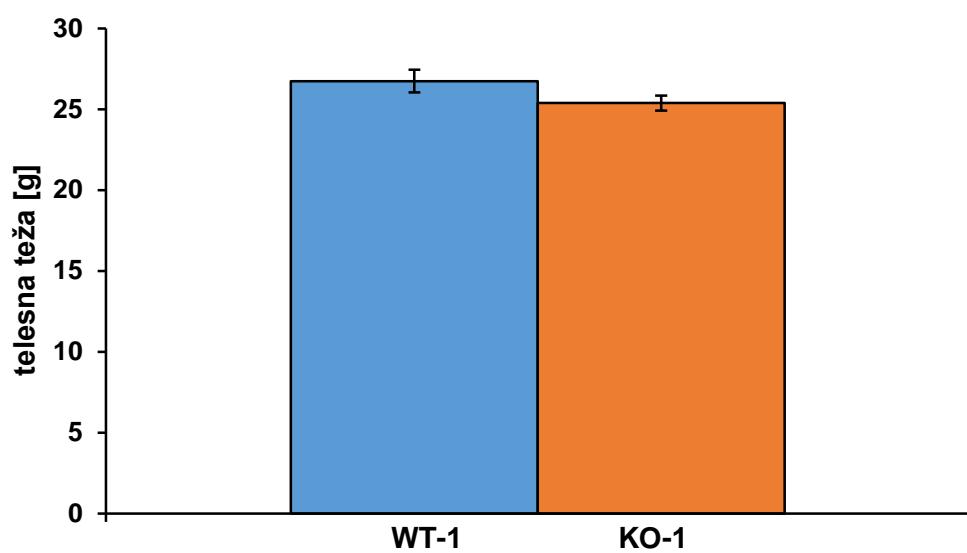
Z namenom pridobiti miši s pogojno izničenim genom *Cyp51* v Sertolijevih celicah, smo miši genotipa *Cyp51*^{lox/lox} križali s transgenimi mišmi pri katerih je bila rekombinaza Cre pod uravnavo promoterja gena za Anti-Mülerjev hormon (Amh). Genotip miši *Cyp51*^{lox/lox}; *Amh-Cre*⁺ (KO-2) in *Cyp51*^{lox/lox}; *Amh-Cre*[−](WT-2) smo določili z uporabo parov oligonukleotidnih začetnikov 5loxF/3loxR in TK139/TK141 (slika 11, slika 12).

4.2.3 Preverjanje učinkovitosti izreza lokusa *Cyp51* v Leydigovih celicah križancih genotipa *Cyp51*^{lox/lox}; *Amhr2-Cre*^{+/−} z metodo PCR

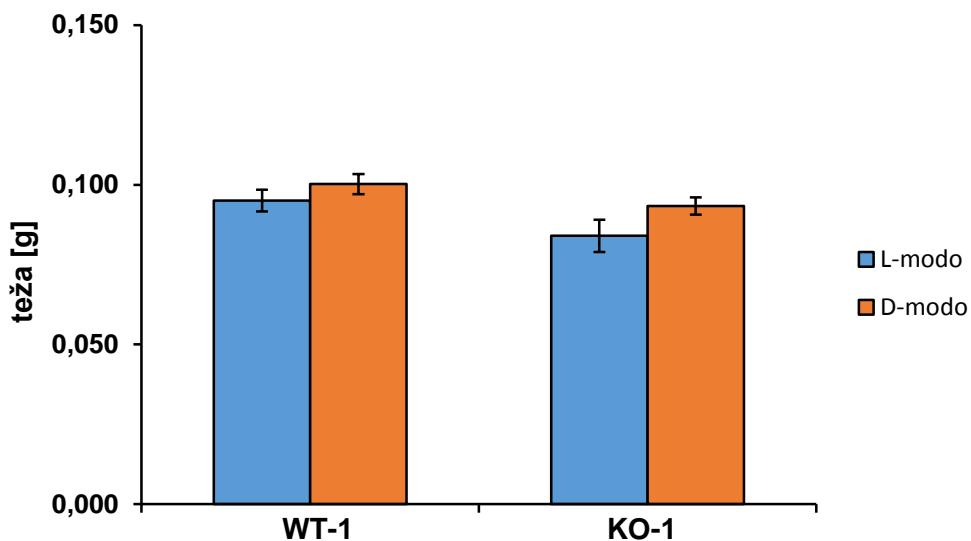
Tako kot pri spolnih in Sertolijevih celicah smo pridobili miši z izničenim genom *Cyp51* v Leydigovih celicah s križanjem miši genotipa *Cyp51*^{lox/lox} s transgenimi mišmi, pri katerih je bila rekombinaza Cre pod uravnavo promoterja gena za receptor tipa 2 za Anti-Müllerjev hormon 2 (Amhr2). Genotip miši *Cyp51*^{lox/lox}; *Amhr2-Cre*⁺ (KO-3) in *Cyp51*^{lox/lox}; *Amhr2-Cre*[−] (WT-3) smo določili z uporabo parov oligonukleotidnih začetnikov 5loxF/3loxR in TK139/TK141 (slika 11, sliki 12).

4.2.4 Telesna masa, masa testisov in dnevna proizvodnja spermijev križancev genotipa *Cyp51*^{lox/−}; *Stra8-Cre*⁺ (Spolne celice, KO-1)

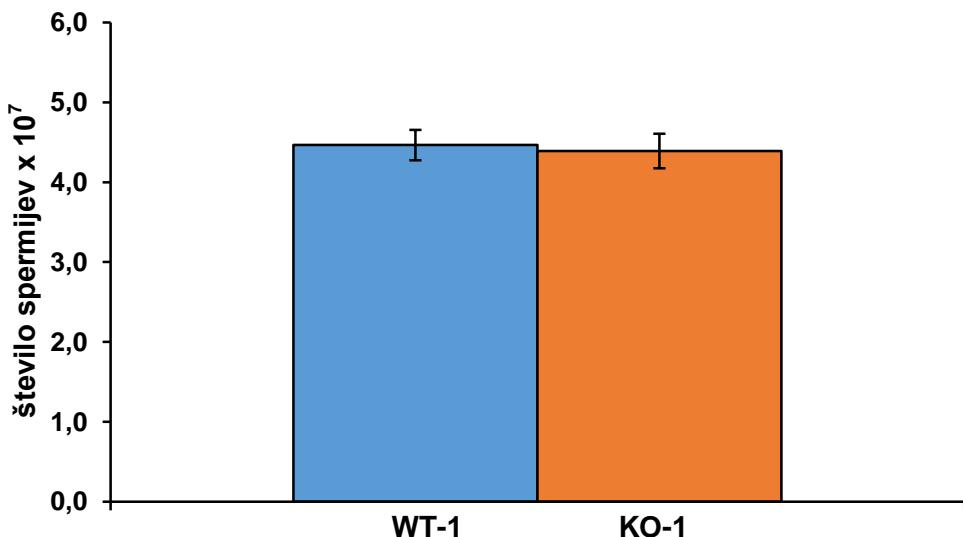
Pri križancih s pogojno izničenim genom *Cyp51* v spolnih celicah (KO-1) nismo ugotovili razlik v telesni masi (slika 13) in v dnevni proizvodnji spermijev (slika 15) v primerjavi s kontrolnimi mišmi (WT-1). Samci KO-1 so imeli lažje testise kot kontrolni samci WT-1, vendar razlika ni dosegla statistične značilnosti ($p=0,07$).



Slika 13: Telesna masa križancev genotipa *Cyp51*^{lox/−}; *Stra8-Cre*⁺
Miši s pogojno izničenim genom *Cyp51* v spolnih celicah se niso razlikovale od miši WT-1 v telesni masi v odraslem obdobju. WT-1 (n= 13), KO (n= 12). Podatki so predstavljeni kot povprečje +/- S.E.M.

Slika 14: Masa testisov križancev genotipa $Cyp51^{lox/-}; Stra8-Cre^+$

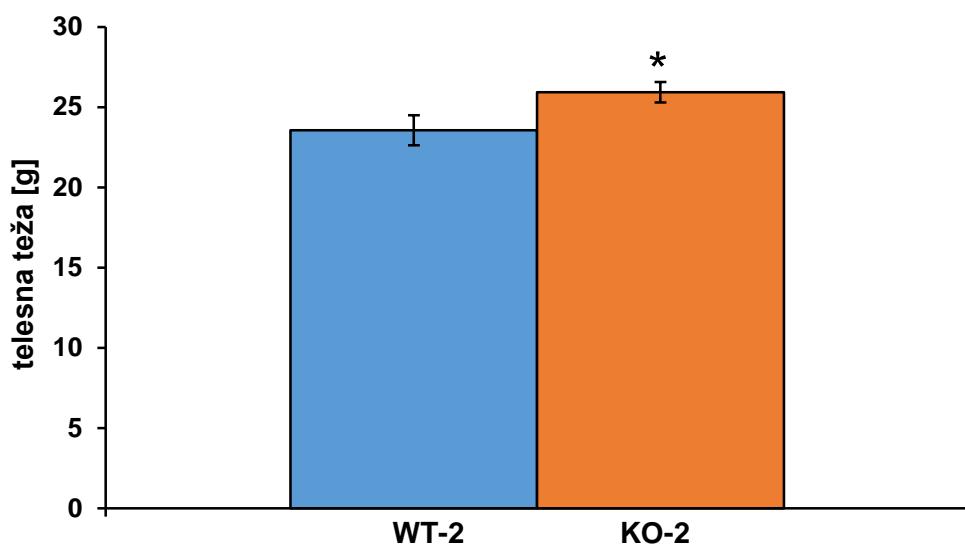
Miši s pogojno izničenim genom *Cyp51* v spolnih celicah so imele lažje testise kot kontrolne miši WT-1, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p < 0,07$). WT-1($n = 13$), KO-1 ($n = 12$). Podatki so predstavljeni kot povprečje +/- S.E.M.

Slika 15: Dnevna proizvodnja spermijev pri križancih genotipa $Cyp51^{lox/-}; Stra8-Cre^+$

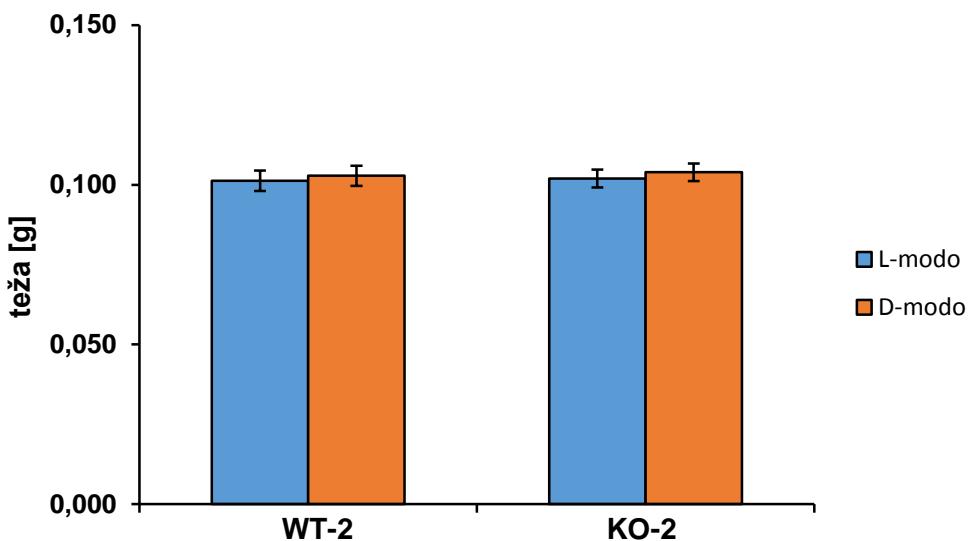
Pogojno izničenje gena *Cyp51* v spolnih celicah ni vplivalo na dnevno proizvodnjo spermijev pri spolno zrelih miših v odraslem obdobju. WT-1 ($n = 13$), KO-1 ($n = 12$). Podatki so predstavljeni kot povprečje +/- S.E.M.

4.2.5 Telesna masa, masa testisov in dnevna proizvodnja spermijev križancev genotipa $Cyp51^{lox/lox}$; AMH-Cre⁺ (Sertolijeve celice, KO-2)

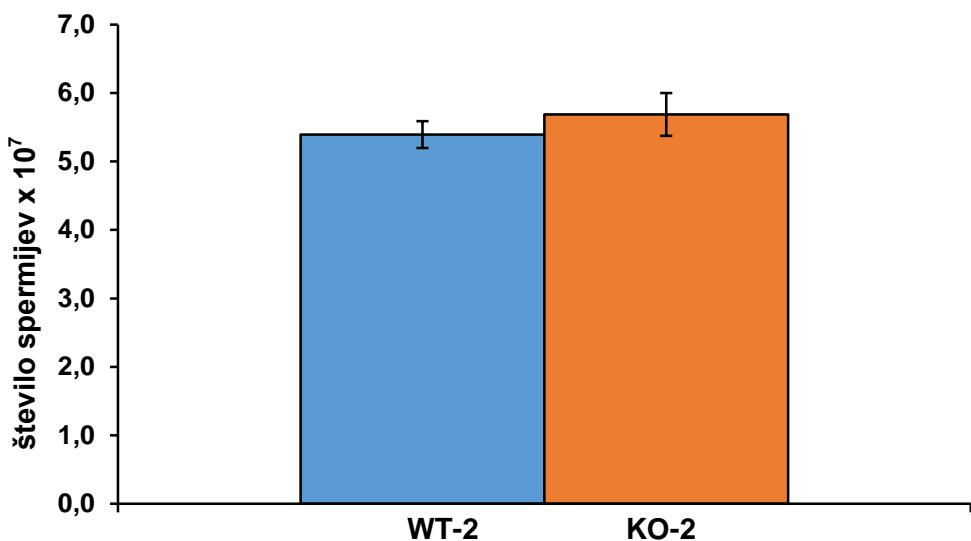
Pri križancih s pogojno izničenim genom *Cyp51* v Sertolijevih celicah (KO-2) nismo ugotovili razlik v masi testisov (slika 17) in v dnevni proizvodnji semena (slika 18) v primerjavi s kontrolnimi mišmi (WT-2). Miši KO-2 so imele statistično značilno ($F(1,23)=4,73$; $p<0,05$) večjo telesno maso kot miši WT-2 (slika 16).



Slika 16: Telesna masa pri križancih genotipa $Cyp51^{lox/lox}$; AMH-Cre⁺. Miši s pogojno izničenim genom *Cyp51* v Sertolijevih celicah (KO-2), so imele statistično značilno večjo telesno maso ($p<0,05$) kot kontrolne miši WT-2. WT-2 (n=12), KO-2 (n= 12). Podatki so predstavljeni kot povprečje +/- S.E.M.



Slika 17: Teža testisov križancev genotipa $Cyp51^{lox/lox}$; AMH-Cre⁺
Miši s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* v Sertolijevih celicah (KO-2) se po teži testisov niso razlikovale od kontrolnih miši (WT-2) v odraslem obdobju. WT-2 (n=12), KO-2 (n=12). Podatki so predstavljeni kot povprečje +/- S.E.M.

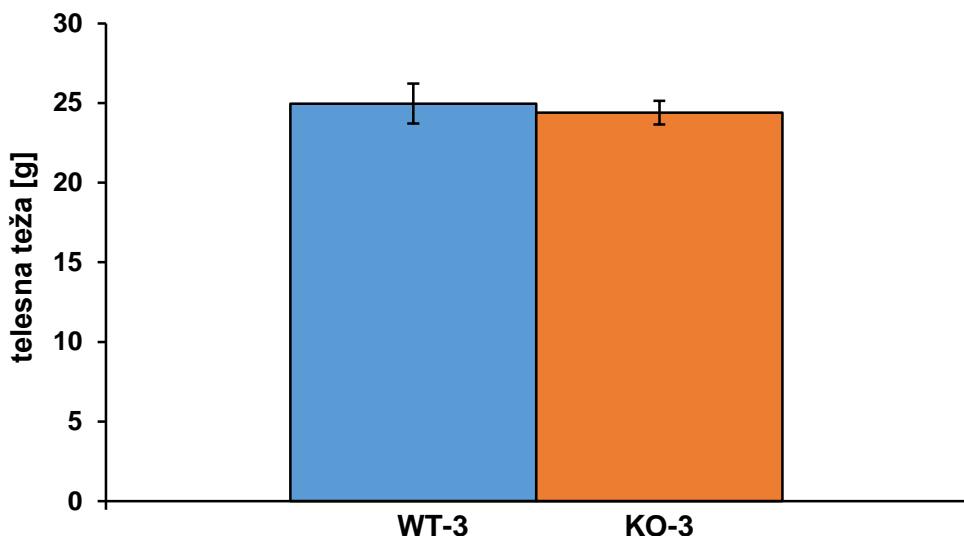


Slika 18: Dnevna proizvodnja spermijev pri križancih genotipa $Cyp51^{lox/lox}$; AMH-Cre⁺
Pogojno izničenje gena *Cyp51* v Sertolijevih celicah ni vplivalo na dnevno proizvodnjo spermijev pri spolno zrelih miših v odraslem obdobju. WT-2 (n= 12), KO-2 (n= 12).

4.2.6 Telesna masa, masa testisov in dnevna proizvodnja spermijev križancev genotipa $Cyp51^{lox/lox}$; $Amhr2\text{-}Cre^+$ (Leydigove celice, KO-3)

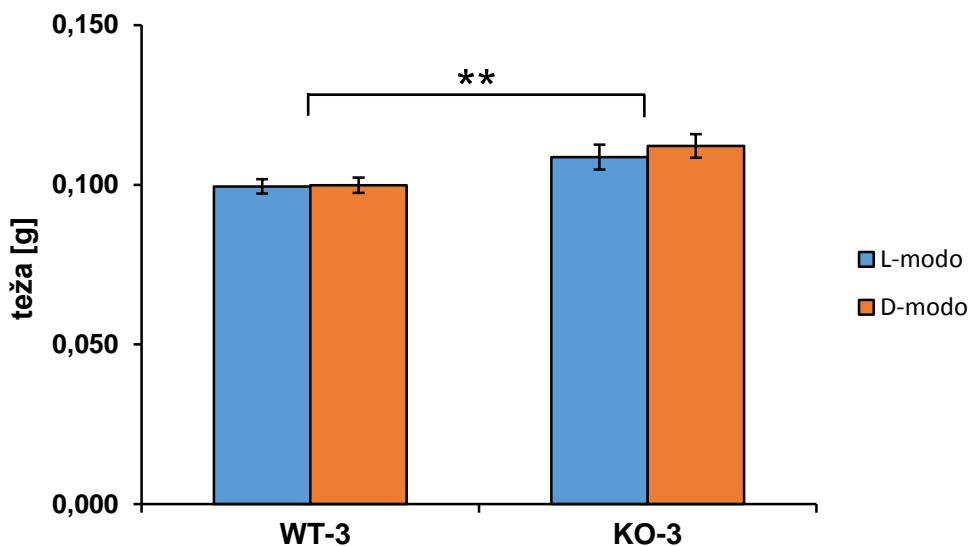
Pri križancih s pogojno izničenim genom *Cyp51* v Leydigovih celicah (KO-3) nismo ugotovili razlik v telesni teži (slika 19) in v dnevni proizvodnji semena (slika 21) v primerjavi s kontrolnimi mišmi (WT-3).

Pogojno izničenje gena *Cyp51* v Leydigovih celicah je vplivalo na težo testisov v odraslem obdobju. Miši KO-3 so imele statistično značilno ($F(1,37)= 10,61$; $p< 0,01$) težje testise kot miši WT-3 (slika 20).

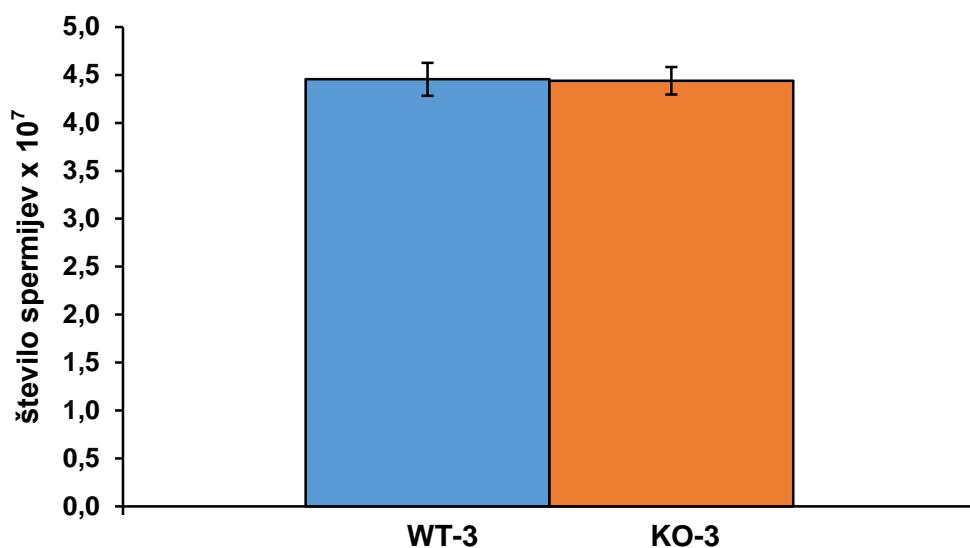


Slika 19: Telesna masa križancev genotipa $Cyp51^{lox/lox}$; $Amhr2\text{-}Cre^+$

Miši s pogojno izničenim genom *Cyp51* v Leydigovih celicah se niso razlikovale od kontrolnih miši WT v telesni masi v odraslem obdobju. WT-3 (n= 8), KO-3 (n= 11). Podatki so predstavljeni kot povprečje +/- S.E.M.



Slika 20: Masa testisov križancev genotipa $Cyp51^{lox/lox}$; Amhr2-Cre⁺
Miši s pogojno izničenim genom *Cyp51* v Leydigovih celicah so imele statistično značilno težje testise ($p < 0,01$) kot kontrolne miši WT-3. WT-3 (n= 8), KO-3 (n= 11). Podatki so predstavljeni kot povprečje +/- S.E.M.



Slika 21: Dnevna proizvodnja spermijev pri križancih genotipa $Cyp51^{lox/lox}$; Amhr2-Cre⁺
Pogojno izničenje gena *Cyp51* v Leydigovih celicah ni vplivalo na dnevno proizvodnjo spermijev pri spolno zrelih miših v odraslem obdobju. WT-3 (n= 8), KO-3 (n= 11). Podatki so predstavljeni kot povprečje +/- S.E.M.

5 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo se osredotočili na preverjanje vpliva pogojnega izničenja gena *Cyp51*, ki sodeluje v biosintezi holesterola, na spermatogenezo, tako da smo spremljali težo testisov in dnevne produkcijo spermijev, pri križancih genotipa *Cyp51^{lox/lox}*; *Stra8-Cre⁺* (KO-1) za spolne celice, križance genotipa *Cyp51^{lox/lox}*; *AMH-Cre⁺* (KO-1) za Sertolijeve celice in križance genotipa *Cyp51^{lox/lox}*; *Amhr2-Cre⁺* (KO-3). Miši s pogojno izničenim genom *Cyp51* smo znotraj vsakega križanja primerjali z mišmi divjega tipa (WT-1, WT-2, WT-3).

Kot že znano je vpliv *de novo* sinteze holesterola pomemben pri tvorbi novih membran med samo spermatogenezo. Med rastjo spolnih celic, se povečuje njihova površina in premer, zato med spermatogenezo pride do povišane sinteze holesterola iz C14 acetata. V različnih fazah razvoja potreba po sintezi holesterola pada in narašča. Koncentracija C14 acetata pa se pretvori v dolihol. Dolihol predstavlja esencialno snov za glikolizacijo proteinov v membrani spermijev, ki so bogate z glikoproteini, ki se nahajajo znotraj membran in igrajo pomembno vlogo pri zorenju spermija. V spolnih celicah potekajo značilni mehanizmi regulacije, ki po stopnjah povečajo sintezo dolihola in zmanjšajo sintezo holesterola (Potter in sod., 1981). Holesterol predstavlja poleg dezmosterola enega izmed glavnih sterolov v semenski tekočini in membrani spermijev pri večini sesalcev (Cross, 1998). Pomen same koncentracije holesterola in drugih sterolov na oploditveno sposobnost spermijev še niso natančno pojasnili, je pa vrstno specifična. Pri sesalcih ovirana aktivnost encima CYP51 s specifičnimi zaviralci izzove upad *de novo* biosinteze holesterola. Med takšne zaviralce sodijo različni azoli, ki ovirajo aktivnost encima CYP51 in so ena glavnih antimikotnih skupin na trgu (Horvat in sod., 2011). CYP51 je iz tega razloga zanimiv pri razvoju novih zdravil za znižanje holesterola, še posebej to velja za humani encim CYP51A1, ki je tarča hipolipidemičnih zdravil (Horvat in sod., 2011). Ker je bilo ugotovljeno, kakšno vlogo ima izničenje gena *Cyp51* na *de novo* sinteze holesterola, le ta pa ima vpliv na proizvodnjo spermijev, smo v tej nalogi namenili pozornost opazovanju parametrov teže testisov in dnevni produkciji spermijev pri miših s pogojni izničenim genom *Cyp51* v spolnih, Sertolijevih ter Leydigovih celicah. Z rekombinazo Cre, ki je bila pod uravnavo promoterja *Stra8*, smo uspeli pogojno izničiti (izničenje je bilo

89-odstotkov uspešno) gen *Cyp51* v spolnih celicah miši (*Cyp51^{lox/}; Stra8-Cre⁺*, KO-1). Izničenje je vplivalo na zmanjšanje intermediata T-MAS v testisih (Keber in sod., 2011), medtem pa morfoloških sprememb zgradbe testisov, zmanjšane oploditvene sposobnosti samcev, teže testisov in dnevne produkcije spermijev nismo ugotovili (ta diplomska naloga, Keber in sod., 2013). Prav tako se miši KO-1 in kontrolne miši WT-1 niso razlikovale v telesni teži.

Naši rezultati kažejo na hipotezo o esencialni vlogi intermediatov MAS in končnega produkta holesterola, ki naj bi izvirala iz *de novo* sinteze v spolnih, Sertolijevih in Leydigovih celicah. V predhodnih raziskavah so preučevali vpliv MAS na podlagi *ex vivo* oziroma *in vitro* testov, v našem poskusu pa smo hipotezo potrjevali *in vivo* na mišjih modelih.

Naši rezultati nakazujejo na to, da MAS ali holesterol (mi nismo mogli diferencirati vpliva teh dveh dejavnikov), ki izvirata iz *de novo* sinteze, nista esencialna za reprodukcijo. Lahko bi rekli, da celično avtonomna biosinteza holesterola v spolnih, Sertolijevih in Leydigovih celicah ni esencialna za spermatogenezo.

Izničenje gena *Cyp51* v spolnih celicah (KO-1)

Pri križancih (*Cyp51^{lox/lox}; Stra8-Cre⁺* →KO-1), kateri so imeli pogojno izničen gen *Cyp51* v spolnih celicah ni bila ugotovljena razlika v telesni masi in dnevni produkciji spermijev, glede na divji tip živali. Opazili smo razlike v masi testisov, in sicer so imele živali s pogojno izničenim genom *Cyp51* lažje testise, kot miši divjega tipa, vendar za razlike ne moremo reči, da so statistično značilne.

Pri vzporedni raziskavi so preučevali tudi histologijo testisov pri sameih s pogojnim izničenjem gena *Cyp51*. To so opravili s standardno metodo imunobarvanja histoloških rezin testisov na protein *Cyp51*, pri katerem so zaznali močan signal v Leydigovih celicah, medtem koga v spolnih niso zaznali (Keber in sod., 2013). Te rezultate so primerjali s predhodnimi rezultati imuno barvanja *Cyp51* v bikovih testisih (Wang in sod., 2008). Pri pregledu različnih prerezov semenskih kanalčkov, so prišli do zaključka, da med testisii

samcev s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* (KO) in samci divjega tipa (WT) ni bilo vidnih opaznih razlik v morfologiji testisov (Keber in sod., 2013).

Izničenje gena *Cyp51* v Sertolijevih celicah (KO-2)

Pri križancih s pogojno izničenim genom *Cyp51* v Sertolijevih celicah (*Cyp51^{lox/lox}*; AMH-Cre⁺ → KO-2) nismo ugotovili razlik v masi testisov in v dnevni proizvodnji semena v primerjavi s kontrolnimi mišmi divjega tipa (WT-2).

Samci KO-2 so bili statistično značilno težji od kontrolnih samcev. Ta razlika najverjetneje ni bila posledica biološkega mehanizma izničenja gena v Sertolijevih celicah, ki bi vplival na uravnavanje energetske homeostaze, ampak posledica vzorčenja. V tem primeru miši s pogojno izničenim *Cyp51* genom (KO-2) niso razvile debelosti, ampak je bila njihova povprečna telesna masa v rangu telesne mase kontrolnih miši (WT-2).

Sertolijeve celice, ki služijo kot podpora spolnim celicam, so sposobne lastne sinteze holesterola *in vitro* (Wiebe in Tilbe, 1979), čeprav večina holesterola izhaja iz krvnega obtoka, saj so potrebe velike. Po tem sklepamo, da ne glede na podatke o dnevni produkciji spermijev, ki ne nakazujejo razlik med KO-2 in WT-2 mišmi, pogojno izničenje gena *Cyp51* pri KO-2, ne bi imelo tako velikega vpliva na samo spermatogenezo zaradi omenjenega mehanizma. Tvorba holesterola v Sertolijevih celicah je zelo nizka, kar so dokazali z zmanjšano količino T-MAS v intersticiju samcev s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* v spolnih celicah. Ves holesterol, ki ga celice potrebujejo za tvorbo novih spolnih celic med spermatogenezo, se po predvidevanjih prenaša iz zunanjosti semenskega kanalčka. Ti mehanizmi prenosa med posameznimi tipi celicami so slabo preučeni. (Keber in sod., 2011).

Izničenje gena *Cyp51* v Leydigovih celicah (KO-3)

Pri križancih s pogojno izničenim genom *Cyp51* v Leydigovih celicah (*Cyp51^{lox/lox}*; *Amhr2*-Cre⁺ → KO-3) nismo ugotovili razlik v telesni masi in v dnevni proizvodnji semena v primerjavi s kontrolnimi mišmi (WT-3). Pogojno izničenje gena *Cyp51* v Leydigovih celicah je imelo vpliv na maso testisov v odraslem obdobju, in sicer pri miših KO-3 smo ugotovili statistično značilna težje testise kot pri miših WT-3.

Glede na povišano maso testisov pri pogojno izničenem genu *Cyp51* v Leydigovih celicah, se nam poraja vprašanje, kaj je vzrok in ali je to posledica delovanja gena *Cyp51*, česar ne moremo potrditi. Glede na raziskavo, v kateri so proučevali vpliv povišanja Sertolijevih celic na težo testisev, so ugotovili, da povišano število Sertolijevih celic vzajemno vpliva na povišanje teže testisov (Oldknow in sod., 2013). Vprašamo se, ali bi lahko prišlo v našem poskusu do neposrednega vpliva Sertolijevih celic na Leydigove celice, in s tem na povišanje teže. Ni pa bilo vpliva na dnevno produkcijo spermijev, kot smo ugotovili tudi v našem poskusu. Da bi potrdili takšne domneve, bi bile potrebne dodatne raziskave.

Verjetno je tudi, da sterolni intermediati v Leydigovih celicah služijo kot zaloga za nadomestitev hitre potrebe po sintezi holesterola med sintezo testosterona, ali pa se na nam še neznan način prenesejo v semenske kanalčke, kjer opravljajo vlogo med spermatogenezo. Po tej domnevi so intersticijske celice pomemben vir sterolnih intermedirov za potrebe spolnih celic (Keber in sod., 2011). Poleg Leydigovih celic so v intersticiju semenskih kanalčkov prisotni še makrofagi, ki so v povezavi z Leydigovimi celicami odgovorni za uravnavanje količine sterolov v intersticiju testisov, saj izražajo lipazo (HSL – angl.: *hormone-sensitive lipase*), ki je odvisna od hormonov in omogoča sproščanje estre holesterola (Kabbaj in sod., 2003). Na večji del izražanja gena *Cyp51* v celotnih testisih v večini vplivajo Leydigove celice, ki so sicer zastopane v manjšem obsegu (3 %), vendar je njihovo izražanje količine *Cyp51* visoko, zaradi same tvorbe steroidov (Keber in sod., 2011).

Pri dnevni produkciji spermijev nismo dobili razlik med posameznimi linijami križancev. Glede na te rezultate sklepamo, da pogojno izničenje gena *Cyp51* v testisih, pri vse treh linijah križanj, ne vpliva direktno na produkcijo spermijev in samo težo testisov, saj očitno organizem nadomesti vir holesterola iz okolice.

Del diplomske naloge je bil namenjen genotipizaciji križancev mišjih linij s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* v spolnih, Leydigovih in Sertolijevih celicah z metodo PCR.

Za potrebe genotipizacije alela *Cyp51* z vstavljenima flox mestoma in izničenega alela *Cyp51* smo uporabili oligonukleotidne začetnike, ki prepoznavajo zaporedje *Cyp51* navzgor in navzdol od vstavljenih lox mest (slika 10). Miši, ki so imele v genu *Cyp51*

vstavljeni flox mestni (*Cyp51^{lox}*) smo ločili od miši WT (*Cyp51⁺*) z uporabo oligonukleotidnih začetnikov 3loxF in 3loxR. Miši s pogojno izničenim *Cyp51* v spolnih, Sertolijev in Leydigovih celicah smo genotipizirali z uporabo začetnih oligonukleotidov 5loxF in 3loxR, pri čemer smo preverjali prisotnost izničenega alela (*Cyp51⁻*, 187 bp), alela z vstavljenima flox mestoma (*Cyp51^{lox}*; 1881 bp) in alela WT (*Cyp51⁺*; 1707 bp). Prisotnost transgenega zapisa za rekombinazo Cre v bioloških vzorcih smo ugotavljali s parom začetnih oligonukleotidov TK139/TK141. Če je vzorec DNA vseboval zapis za rekombinazo Cre, je dolžina PCR produkta znašala 349 bp (*Cre⁺*), v nasprotnem primeru pri reakciji PCR nismo dobili nobenega produkta (*Cre⁻*).

Naša raziskava na miših s pogojno izničenim genom *Cyp51* v spolnih, Leydigovih in Sertolijevih celicah ni pokazala na vpliv gena *Cyp51* na dnevno produkcijo spermijev. Samci z izničenim genom *Cyp51* v Leydigovih celicah so imeli težje testise od kontrolnih samcev WT. Natančnih vzrokov za ugotovljeno razliko ne poznamo in bi bilo v nadaljevanju potrebno izvesti dodatne poskuse. Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da je vloga gena *Cyp51* in od njega odvisne *de novo* biosinteze holesterola v testisih v procesu spermatogeneze zanemarljiva.

6 SKLEPI

S tehnologijo Cre/lox nam je uspelo pridobiti križance miši s pogojno izničenim genom *Cyp51* za tvorbo holesterola v spolnih celicah mišjih samcev. Usmerjeni smo bili na preverjanje vpliva izničenja gena *Cyp51*, ki sodeluje v procesu spermatogeneze, pri križancih genotipa *Cyp51* za spolne, Sertolijeve in Leydigove celice. Pogojno izničenje gena *Cyp51* smo potrdili z metodo verižne reakcije PCR. Za pogojno izničenje gena smo uporabili tudi linijo miši, katera je izražala rekombinazo Cre pod kontrolo mišjega prionskega proteina *Prp*. Ta mišja linija je v genomu izražala rekombinazo Cre, le v spermatogonijih in primarnih spermatocitih, saj rekombinaza Cre zaradi mesta vključka, omogoči izrez lokusa *Cyp51* samo v zgodnjih stopnjah razvoja spolnih celic. Učinkovitost izreza gena je bil s tem modelom miši učinkovit, vendar zaradi naključne vezave vključka *Prp-Cre-ER^T*, nismo dobili dvojnih homozigotov po križanju z linijo *Cyp51^{lox/lox}*. Predvidevali smo, da je razlog zakaj nismo dobili rekombinant, verjetno v tem, da je razdalja, kjer se nahajata mesto za lox in Cre, preblizu na alelu. Zato smo s temi parjenji zaključili.

Zato smo se osredotočili na preverjanje pogojnega izničenja gena *Cyp51*, ki sodeluje v sintezi spermatogeneze, tako da smo križali linije, ki omogočajo tkivno specifično izničenje gena *Cyp51* v testisih mišjih samcev, in sicer v spolnih, Sertolijevih in Leydigovih celicah. To so bili križanci genotipa *Cyp51* za spolne celice (*Cyp51^{lox/+}*; *Stra8-Cre^{+/−}*), za Sertolijeve (*Cyp51^{lox/lox}*; *AMH-Cre⁺*) in Leydigove celice (*Cyp51^{lox/lox}*; *Amhr2-Cre⁺*). Z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR), smo določili izničenje gena v mišjih modelih *Cyp51*.

Glede na rezultate, ki smo jih dobili s statistično analizo, smo ugotovili da pri miših s pogojni izničenim genom *Cyp51* v spolnih, Leydigovih in Sertolijevih celicah ni prišlo do razlik pri dnevni produkciji spermijev in zelo majhnih razlik pri teži testisov (križanci za Leydigove in Sertolijeve pogojni izničene gene *Cyp51*. Iz tega sklepamo, da je vloga gena *Cyp51* v procesu spermatogeneze zanemarljiva.

Rezultati kažejo, da MAS, ki je produkt *Cyp51* v *de novo* sintezi holesterola, nima vpliva na potek mejoze oziroma spermatogeneze in s tem na reprodukcijske sposobnosti.

7 POVZETEK

Gen *Cyp51* je član naddružine citokromov P450 in je prisoten v vseh bioloških kraljestvih. Kodira protein lanosterol 14 α -demetilazo, ki katalizira pomembno fazo v biosintezi holesterola. Holesterol, kot biološka molekula, igra pomembno vlogo pri regulaciji lastnosti celičnih membran v sesalskih celicah. Pomembno vlogo ima pri tvorbi vitamina D, žolčnih kislin in steroidnih hormonov (androgenov, estrogenov, glikokortikoidov in mineralokortikoidov). Vpliv *de novo* sinteze holesterola je pomemben pri tvorbi novih membran med samo spermatogenezo, saj holesterol v sami celici predstavlja osnovni gradnik celičnih membran, pri katerih regulira njihovo trdnost in prepustnost lipidnega dvosloja.

Razvili smo transgeni mišji model, s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* v spolnih celicah, z namenom, da preučimo njegov vpliv na spermatogenezo. Z uporabo metode sistema Cre/loxP, smo pridobili mišji model s pogojnim izničenjem gena *Cyp51* v poljubnem tkivu. V našem primeru, smo opazovali pogojno izničenje gena *Cyp51* v spermatogonijih.

Metoda pogojnega izničenja gena *Cyp51* v spolnih celicah, je bila uporabljena za preučevanje vloge gena *Cyp51* med spermatogenezo. Da bi preverili našo hipotezo smo za začetek izbrali model miši, ki je vseboval rekombinazo Cre pod kontrolo promotorja gena za protein sinaptonemnega kompleksa 1 (*Sycp1* – angl. *Synaptonemal complex protein 1*). Gen *Sycp1* je izražen v kratkem časovnem okvirju, in sicer med nastankom sinaptonemnega kompleksa v leptotenski in zigotenski fazi prve mejotične delitve. S pomočjo rekombinaze Cre, ki je pod vplivom promotorja *Sycp1*, je mogoče preiskovanje vpliva gena v primarnih spermatocitih ob začetku prve mejotične delitve.

Za pogojno izničenje gena, smo uporabili tudi linijo miši, ki izraža Cre rekombinazo pod kontrolo mišjega prionskega proteina (*Prp* – angl. *Prion protein*). Izražanje gena *Prp* najdemo v različnih delih možganov ter v organih, ki so oživčeni s simpatičnim živčevjem, kamor sodijo tudi testisi. Uporabljena linija miši je v genomu, zaradi mesta vključka izražala Cre rekombinazo, le v spermatogonijih in primarnih spermatocitih, ki omogočajo izrez lokusa *Cyp51* samo v zgodnjih stopnjah razvoja spolnih celic. Učinkovitost izreza

smo preverili s prilagojeno metodo PCR. S tem modelom miši je bil izrez gena *Cyp51* učinkovit, vendar ker je bilo mesto vezave vključka *Prp-Cre-ER^T* naključno, ni bilo mogoče dobiti dvojnih homozigotov po križanju z linijo *Cyp51^{lox/lox}*. Razlog zato je najverjetnejše v vezanem dedovanju lokusov *Cyp51^{lox}* in *Prp-Cre-ER^T* v *trans* konfiguraciji.

Osredotočili smo se na preverjanje vpliva izničenja gena *Cyp51*, ki sodeluje v procesu spermatogeneze, tako da smo spremljali težo testisov in dnevne produkcijo spermijev, pri križancih miši s pogojno izničenim *Cyp51* za spolne celice (*Cyp51^{lox/-}*; *Stra8-Cre^{+/−}*), Sertolijeve (*Cyp51^{lox/lox}*; *AMH-Cre⁺*) in Leydigove celice (*Cyp51^{lox/lox}*; *Amhr2-Cre⁺*). Z metodo PCR, smo določili izničenje gena *Cyp51* v mišjih modelih. Uporabili smo tri različne vrste začetnih oligonukleotidov, kateri so nam s pomočjo PCR reakcije in gelske elektroforeze, služili za preverjanje učinkovitosti izreza lokusa *Cyp51* in prisotnost zapisa za Cre rekombinazo.

S spremeljanjem dnevne produkcije spermijev, smo hoteli pojasniti ali pogojno izničenje gena *Cyp51* v spolnih celicah vpliva na spermatogenezo, pri kateri sodeluje *de novo* sinteza holesterola. S pomočjo statistične analize, smo podatke o telesni masi, masi testisov in dnevni proizvodnji spermijev spremljali pri vseh treh linijah križancev. Ugotovljeno je bilo, da pogojno izničenje gena *Cyp51*, nima vpliva na dnevno produkcijo spermijev, telesno maso in maso testisov, med obema tipoma križancev KO in WT, pri vseh linijah. Iz tega smo sklepali, da kljub temu, da je bil gen *Cyp51* pogojno izničen, ter da sodeluje pri sintezi holesterola, ki igra pomembno vlogo pri spermatogenezi (zaradi tvorbe sterolnih intermediatov - MAS) organizem živali verjetno nadomesti potrebo po sterolnih intermediatih iz intersticija testisov. Ker spermatogeneza poteka nemoteno, domneve da izničenje funkcije gena *Cyp51* v spolnih celicah vpliva na proizvodnjo spermijev, ne moremo potrditi.

8 VIRI

Accad M., Farese R. V. 1998. Cholesterol homeostasis: A role for oxysterols. *Current Biology*, 8: R601–R604

Anderson E.L., Baltus A.E., Roepers-Gajadien H.L., Hassold T.J., de Rooij D.G., van Pelt A.M.M., Page D.C. 2008. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 14976–14980

Aoyama Y., and Yoshida Y. 1986. Evidence for the contribution of a sterol 14-reductase to the 14alpha-demethylation of lanosterol by yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 134, 2: 659-663

Bloch K. 1965. The biological synthesis of cholesterol. *Science*, 150: 19–28

Brown M.S., Goldstein J.L. 1997. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell*, 89: 331–340

Büdefeld T., Jezek D., Rozman D., Majdic G. 2009. Initiation of Steroidogenesis Precedes Expression of Cholesterologenic Enzymes in the Fetal Mouse Testes. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 38: 461–466

Burgos-Trinidad M., Youngblood G.L., Maroto M.R., Scheller A., Robins D.M., Payne A.H. 1997. Repression of cAMP-Induced Expression of The Mouse P450 17 α -Hydroxylase/C17-20 Lyase Gene (*Cyp17*) by Androgens. *Molecular Endocrinology*, 11: 87–96

Byskov A.G., Andersen C.Y., Nordholm L., Thogersen H., Guoliang X., Wassmann O., Andersen J.V., Guddal E., Roed T. 1995. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature*, 374: 559–562

Byskov A.G., and Saxen L. 1976. Introduction of meiosis in fetal mouse testis in vitro.
Developmental Biology, 52, 2: 193-200

Cermelli S., Guo, Y., Gross S.P., Welte M.A. 2006. The Lipid-Droplet Proteome Reveals
that Droplets Are a Protein-Storage Depot. Current Biology, 16: 1783–1795

Charreauf E.H., Calvos J.C., Nozu K., Pignataros O., Catt K.J., Dufaug M.L. 1981.
Hormonal Modulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase
Activity in Gonadotropin-stimulated and -desensitized Testicular Leydig Cells.
Journal of Biological Chemistry, 256: 12719–12724

Cross N.L., 1998. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. Biology of Reproduction,
59: 7–11

Debeljak N., Fink M., Rozman D. 2003. Many facets of mammalian lanosterol 14 α -
demethylase from the evolutionarily conserved cytochrome P450 family CYP51.
Archives of Biochemistry and Biophysics, 409: 159–171

Debeljak N., Horvat S., Komel R., Rozman D. 2000a. Molecular cloning and partial
characterisation of the mouse *Cyp51* cDNA. Pflügers Archiv - European Journal of
Physiology, 439: r007–r008

Debeljak N., Horvat S., Vouk K., Lee M., Rozman D. 2000b. Characterization of the
Mouse Lanosterol 14 α -Demethylase (*Cyp51*), a New Member of the Evolutionarily
Most Conserved Cytochrome P450 Family. Archives of Biochemistry and
Biophysics, 379: 37–45

Dietschy J.M., Turley S.D. 2002. Control of Cholesterol Turnover in the Mouse. The
Journal of Biological Chemistry, 277: 3801–3804

- Dufau M.L., Miyagawa Y., Takada S., Khanum A., Miyagawa H., Buczko E. 1997. Regulation of androgen synthesis: The late steroidogenic pathway. *Steroids*, 62: 128–132
- Eacker S.M., Agrawal N., Qian K., Dichek H.L., Gong E.-Y., Lee K., Braun R.E. 2008. Hormonal Regulation of Testicular Steroid and Cholesterol Homeostasis. *Molecular Endocrinology*, 22: 623–635
- Edwards P.A., Ericsson J. 1999. Sterols and Isoprenoids: Signaling Molecules Derived from the Cholesterol Biosynthetic Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 68: 157–185
- Evans M.J., Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156
- Fakheri R.J., Javitt N.B. 2011. Autoregulation of cholesterol synthesis: Physiologic and pathophysiologic consequences. *Steroids*, 76: 211–215
- Fermentas. Gene Ruler. 2016. <http://bclab.pbworks.com/w/page/4307414/Electrophoresis> (19. avg. 2016)
- Fink M., Ačimovič J., Režen T., Tanšek N., Rozman D. 2005. Cholesterogenic Lanosterol 14 α -Demethylase (*CYP51*) Is an Immediate Early Response Gene. *Endocrinology*, 146: 5321–5331
- Fofana M., Maboundou J.-C., Bocquet J., Le Goff D. 1996. Transfer of cholesterol between high density lipoproteins and cultured rat Sertoli cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 74: 681–686
- Garcia E.L., Mills A.A. 2002. Getting around lethality with inducible Cre-mediated excision. *Seminars in cell & developmental biology*, 13: 151–158

Hales D.B., Sha L.L., Payne A.H. 1987. Testosterone inhibits cAMP-induced de Novo synthesis of Leydig cell cytochrome P-450(17 alpha) by an androgen receptor-mediated mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 262: 11200–11206

Hasler J.A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevila J., Holla V., Helvig C., Falck J.R., Farrell G., Kaminsky L.S., Spivack S.D., Boitier E., Beaune P. 1999. Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine*, 20: 1–137

Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation*, 109: 1125–1131

Horvat S., Mcwhir J., Rozman D. 2011. Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and in humans: lessons for drug development and safer treatments. *Drug Metabolism Reviews*, 43: 69–90

Hugo Gene Nomenclature Committee. 2016. <http://www.genenames.org/> (19. avg. 2016)

Kabbaj O., Yoon S.R., Holm C., Rose J., Vitale M.L., Pelletier R.-M. 2003. Relationship of the hormone-sensitive lipase-mediated modulation of cholesterol metabolism in individual compartments of the testis to serum pituitary hormone and testosterone concentrations in a seasonal breeder, the mink (*Mustela vison*). *Biology of reproduction*, 68: 722–734

Kandutsch A.A., Russell A.E. 1960. Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *The Journal of biological chemistry*, 235: 2256–2261

Keber R., Motaln H., Wagner K.D., Debeljak N., Rassoulzadegan M., Acimovic J., Rozman D., Horvat S. 2011. Mouse Knockout of the Cholesterogenic Cytochrome P450 Lanosterol 14 -Demethylase (*Cyp51*) Resembles Antley-Bixler Syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 29086–29097

Kellner-Weibel G., de la Llera-Moya M. 2011. Update on HDL Receptors and Cellular Cholesterol Transport. *Current Atherosclerosis Reports*, 13: 233–241

Kočevan N., Kreft S., Obermajer N. 2007. Identifikacija in karakterizacija bioloških zdravil ter analiza bioloških vzorcev. V: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. Štrukelj B. in Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 136-184

Korošec T., Ačimovič J., Seliškar M., Kocjan D., Tacer K.F., Rozman D., Urleb U. 2008. Novel cholesterol biosynthesis inhibitors targeting human lanosterol 14 α -demethylase (CYP51). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 209–221

Lamb D.C., Kelly D.E., Manning N.J., Kelly S.L. 1998. A sterol biosynthetic pathway in *Mycobacterium*. *FEBS Letters*, 437: 142–144

Lange Y., Ory D.S., Ye J., Lanier M.H., Hsu F.-F., Steck T.L. 2008. Effectors of Rapid Homeostatic Responses of Endoplasmic Reticulum Cholesterol and 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase. *The Journal of biological chemistry*, 283: 1445–1455

Lepesheva G.I., Waterman M.R. 2011. Structural basis for conservation in the CYP51 family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1814: 88–93

Lécureuil C., Fontaine I., Crepieux P., Guillou F. 2002. Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis*, 33: 114–118

Majdic G., Parvinen M., Bellamine A., Harwood H.J., Ku W.W., Waterman M.R., Rozman D. 2000. Lanosterol 14 α -demethylase (Cyp51), NADPH-cytochrome P450 reductase and squalene synthase in spermatogenesis: Late spermatids of the rat express proteins needed to synthesize follicular fluid meiosis activating sterol. *Journal of Endocrinology*, 16: 463–474

Marston A.L., Amon A. 2004. Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 983–997

Mascaró C., Nadal A., Hegardt F.G., Marrero P.F., Haro D. 2000. Contribution of steroidogenic factor 1 to the regulation of cholesterol synthesis. *The Biochemical journal*, 350, 3: 785–790

Metzger D., Chambon P. 2001. Site- and Time-Specific Gene Targeting in the Mouse. *Methods*, 24: 71–80

Morohashi K., Zanger U.M., Honda S., Hara M., Waterman M.R., Omura T. 1993. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Molecular Endocrinology*, 7: 1196–1204

Mouse Genome Informatics. 2016. <http://www.informatics.jax.org/> (19. avg. 2016)

Nagy A. 2000. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26: 99–109

Neild D.N., Gadella B.M., Agüero A., Stout T.A.E., Colenbrander B. 2005. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 89: 47–56

Nelson J.A., Steckbeck S.R., Spencer T.A. 1981. Biosynthesis of 24,25-epoxycholesterol from squalene 2,3;22,23-dioxide. *The Journal of biological chemistry*, 256: 1067–1068

Nelson D.R. 2009. The Cytochrome P450 Homepage. *Human Genomics*, 4: 59–65

Noshiro M., Aoyama Y., Kawamoto T., Gotoh O., Horiuchi T., Yoshida Y. 1997. Structural and evolutionary studies on sterol 14-demethylase P450 (CYP51), the most conserved P450 monooxygenase: I. Structural analyses of the gene and multiple sizes of mRNA. *Journal of biochemistry*, 122: 1114–1121

O'Day D.H., Human developement. University of Toronto. 2016.
<http://www.utm.utoronto.ca/~w3bio380/pdf/OLD-PDF/2010%20Summer/Spermiogenesis.pdf> (19. avg. 2016)

Oldknow K.J., Seebacher J., Goswami T., Villen J., Pitsillides A.A., O'Shaughnessy P.J., Gygi S.P., Schneyer A.L., Mukherjee A. 2013. Follistatin-like 3 (FSTL3) mediated silencing of transforming growth factor beta (TGF β) signaling is essential for testicular aging and regulating testis size. *Endocrinology*, 154: 1310–1320

Omura T., Sato, R. 1962. Liver Microsomes Spermidine in the Extraction of the Deoxyribosyl-synthesizing System from Escherichia. *The Journal of biological chemistry*, 237: 1375–1376

Paquette S.M., Bak S., Feyereisen R. 2000. Intron–Exon Organization and Phylogeny in a Large Superfamily, the Paralogous Cytochrome P450 Genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA and Cell Biology*, 19: 307–317

Pelletier R.-M. 2011. The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 46: 49–127

Potter J.E., Millette C.F., James M.J., Kandutsch A.A. 1981. Elevated cholesterol and dolichol synthesis in mouse pachytene spermatocytes. *The Journal of biological chemistry*, 256: 7150–7154

Rassoulzadegan M., Magliano M., Cuzin F. 2002. Transvection effects involving DNA methylation during meiosis in the mouse. *The EMBO Journal*, 21: 440–450

Robertson K.M., Schuster G.U., Steffensen K.R., Hovatta O., Meaney S., Hultenby K., Johansson L.C., Svechnikov K., Söder O., Gustafsson J.-Å. 2005. The Liver X Receptor- β Is Essential for Maintaining Cholesterol Homeostasis in the Testis. *Endocrinology*, 146: 2519–2530

Rozman D., Fink M., Fimia G.M., Sassone-Corsi P., Waterman M.R. 1999. Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate(cAMP)/cAMP-Responsive Element Modulator (CREM)-Dependent Regulation of Cholesterogenic Lanosterol 14 α -Demethylase (CYP51) in Spermatids. *Molecular Endocrinology*, 13: 1951–1962

Rozman D., Strömstedt M., Tsui L.-C., Scherer S.W., Waterman M.R. 1996a. Structure and Mapping of the Human Lanosterol 14 α - Demethylase Gene (*CYP51*) Encoding the Cytochrome P450 Involved in Cholesterol Biosynthesis; Comparison of Exon/Intron Organization with other Mammalian and Fungal CYP Genes. *Genomics*, 38: 371–381

Rozman D., Stromstedt M., Waterman M.R., 1996b. The three human cytochrome P450 lanosterol 14 alpha-demethylase (*CYP51*) genes reside on chromosomes 3, 7, and 13: structure of the two retrotransposed pseudogenes, association with a line-1 element, and evolution of the human *CYP51* family. *Archives of biochemistry and biophysics*, 333: 466–474

Russell L.D., Ren H.P., Hikim I.S., Schulze W., Hikim A.P.S. 1990. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the sertoli cell. *American Journal of Anatomy*, 188: 21–30

Sadate-Ngatchou P.I., Payne C.J., Dearth A.T., Braun R.E. 2008. Cre recombinase activity specific to postnatal, premeiotic male germ cells in transgenic mice. *Genesis*, 46: 738–742

Sauer B., Henderson N. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 5166–5170

Seliskar M., Rozman D. 2007. Mammalian cytochromes P450—Importance of tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1770: 458–466

Sigma-Aldrich. BRAND® counting chamber BLAUBRAND® Bürke-Türk. 2016. Sigma-Aldrich(2016). <http://www.sigmapelrich.com/catalog/product/aldrich/br719520?lang=en®ion=SI> (19. avg. 2016)

Simons K., Ikonen E. 2000. How cells handle cholesterol. *Science*, 290: 1721–1726.

Sinensky M., Logel J., Phirwa S., Gayen A.K., Spencer T.A. 1987. Requirement for 24(S),25-epoxycholesterol for the viability of cultured fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 171: 492–497

Smith L. 2011. Good planning and serendipity: exploiting the Cre/Lox system in the testis. *Reproduction*, 141: 151–161

Strömstedt M., Rozman D., Waterman M.R. 1996. The Ubiquitously Expressed Human *CYP51* Encodes Lanosterol 14 α -Demethylase, a Cytochrome P450 Whose Expression Is Regulated by Oxysterols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 329: 73–81

Stromstedt M., Waterman M.R., Haugen T.B., Tasken K., Parvinen M., and Rozman D. 1998. Elevated expression of lanosterol 14 α -demethylase (*Cyp51*) and the synthesis of oocyte meiosis-activating sterols in postmeiotic germ cell of male rats. *Endocrinology*, 139, 9: 3771–3771

Strushkevich N., Usanov S.A., Park H.-W. 2010. Structural Basis of Human *CYP51* Inhibition by Antifungal Azoles. *Journal of Molecular Biology*, 397: 1067–1078

Thayer K.A., Ruhlen R.L., Howdeshell K.L., Buchanan D.L., Cooke P.S., Preziosi D., Welshons W.V., Haseman J., vom Saal F.S. 2001. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 α -ethinyl oestradiol. *Human Reproduction*, 16: 988–996

Travis A.J., Kopf G.S. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *Journal of Clinical Investigation*, 110: 731–736

Vidal F., Sage J., Cuzin F., Rassoulzadegan M. 1998. Cre expression in primary spermatocytes: A tool for genetic engineering of the germ line. *Molecular Reproduction and Development*, 51: 274–280

Walker W.H., Cheng J. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, 130: 15–28

Wang Y., Rogers P.M., Su C., Varga G., Stayrook K.R., Burris T.P. 2008. Regulation of Cholesterologenesis by the Oxysterol Receptor, LXR. *Journal of biological chemistry*, 283: 26332–26339

Waterman M.R. 1996. Introduction: transcription and regulation of activities of cytochromes P450 metabolizing endogenous substrates. *FASEB journal*, 10: 1455

Weber P., Schuler M., Gérard C., Mark M., Metzger D., Chambon P. 2002. Temporally Controlled Site-Specific Mutagenesis in the Germ Cell Lineage of the Mouse Testis. *Biology of Reproduction*, 68: 553–559

Wiebe J.P., Tilbe K.S. 1979. De novo synthesis of steroids (from acetate) by isolated rat Sertoli cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 89: 1107–1113

Zabavnik Piano J. 2007. Osnove laboratorijskega proučevanja genetskega materiala. Priročnik za vaje iz genetike za študente veterinarske medicine. 1. izdaja. Ljubljana, Azul: 30-33

Zorc M., Petrovič D. 2010. Histologija. Ljubljana, Littera Picta: 207-219

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Simonu Horvatu, ki mi je omogočil izdelavo diplomske naloge na tako zanimivem področju in seveda za pomoč pri izdelavi. Zahvaljujem se tudi somentorju asist. dr. Roku Kebru, ki me je uvedel v laboratorijsko delo ter mi potrežljivo, strokovno in vedno z dobro voljo pomagal pri vseh postopkih in sami izdelavi naloge.

Ostalim članom komisije, prof. dr. Tanji Kunej in prof. dr. Janezu Salobirju – hvala vam, ker ste tako hitro in korektno pregledali nalogu in seveda za končno oceno.

Hvala tudi Vesni Mrak, Ani Jakopič, Zali Prevoršek in Matjažu Simončiču pri vodenju dela v mišji koloniji.

Najbolj pa se zahvaljujem svoji družini, ker mi daje moč, da ne odneham.

Mami, hvala za vsa dolga šolska leta, ko si mi stala ob strani, me podpirala in se borila skupaj z mano in mojimi nalogami, pa čeprav v nedeljo zvečer. ☺ S tabo sem se naučila vztrajnosti. Hvala, ker verjameš vame.

Oči hvala, ker si me naučil videti in čutiti naravo na prav poseben način. Samo malo volje in ljubezni, pa se vse da.

Eva, ker boljše sestrice na svetu pač ni.

Hvala za vse, rada vas imam.

Hvala tebi Jošt, da si mi z ljubeznijo povrnil moč in mi pokazal, da se da premagati strah ter preplezati še tako visoko goro. *Rada te imam!*

Pa še mojim zvestim prijateljem: Sara in Andrej, hvala za vse skupne podvige, trenutke smeha in joka. In da po vsem tem še navijata zame. Klavdija, s tabo vedno posije sonce. Miha, s tabo ni konca smeha. Tadeja, vesolje se je končno obrnilo v pravo smer. Polona, ker se vedno najdeva, pa čeprav na drugem koncu sveta. ☺ *Druščina the show must go on!!!*

Hvala sodelavcem iz Centra za genomiko živali na VF oz. iz "miškolandije": Gregorju, Tomažu, Tanji, Neži, Katji, Meti, Luku, Katerini, Jasmini, Malan. Hvala, ker ste me spodbujali na moji poti in me dvignili, ko mi je spodrsnilo. Posebej hvala tebi Tomi, ker bi se brez tvoje pomoči še vedno izgubljala v mišjih genih. ☺

Hvala tudi vsem študentom, ki so delali z mano na Centru za genomiko in mi odnesli marsikatero breme. Hvala - Jasmina, Ana, Urška, Matija, Primož, Danijel, Boštjan, Nejc, z vami so bili delavniki polni smeha in dobrih debat.

Dragi sošolci in sošolke, brez vas ta študij ne bi bil enak.

Hvala Sabini Knehtl za vso spodbudo, potrežljivost in toplino. Bila je naša druga mama.

Sandi Kosmač, hvala tebi za tvoje dobrodušno srce in prave besede v trenutkih, ko nisem videla izhoda in da lahko danes pokončno hodim oz. kot praviš "razgrajam" po svetu.

Sandi Kofol, pomagal si mi videti svet v drugačni luči in z druge višine, hvala ti.

Marjanu Dogši in celotni druščini Tai Ji Quan - hvala, preprosto super ste.

Hvala kosmatinkama Lisi in Tari!

Pa še vsi nevidni prijatelji, ki ste mi prišli na pot in mi nesebično pomagali. Hvala. ☺

In na koncu, drage male miške in miškolini, HVALA. Da nam živali in vsa bitja, s katerimi se srečamo, ne postanejo nikoli samoumevna.

PRILOGE

Priloga A: List s paritvami

PRÍLOGE

Prílog A: List s paritvami

Priloga B: List za novo gnezdo

Priloga B: List za novo gnezdo

PODATKI O STARŠIH						Oče	
Linija	Številka generacije	Številka gnezdja	Datum paritve	odstavljivo	Mati		

PODATKI O POTOMCIH

1374

Zap. číslo	ID	spolu	účesna čí.	banka	6 týdny	10 týdny	14 týdny
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

DODATHI
KOMENTAB-

Priloga C: Seznam genotipov potomcev križanj z linijo *Prp-Cre-ER*^T

genotip		
ID vz.	Cyp51	Cre
DTI 1	+/lox	+
DTI 2	+/+	+
DTI 3	lox/lox	-
DTI 4	+/Lox	+
DTI 5	+/Lox	+
DTI 6	+/Lox	+
DTI 7	+/Lox	+
DTI 8	lox/lox	-
DTI 9	+/Lox	+
DTI 10	+/Lox	+
DTI 11	+/+	+
DTI 12	+/+	+
DTI 13	+/Lox	+
DTI 14	+/Lox	+
DTI 15	+/+	+
DTI 16	+/Lox	+
DTI 17	+/Lox	+
DTI 18	+/+	+
DTI 19	lox/lox	-
DTI 20	+/+	+
DTI 21	+/Lox	+
DTI 22	+/Lox	+
DTI 23	+/+	+
DTI 24	+/+	+
DTI 25	lox/lox	-
DTI 26	lox/lox	-
DTI 27	+/Lox	+
DTI 28	+/Lox	+
DTI 29	lox/lox	-
DTI 30	+/+	+
DTI 31	+/Lox	+
DTI 32	+/+	+
DTI 33	+/Lox	+
DTI 34	lox/lox	-
DTI 35	+/Lox	+
DTI 36	lox/lox	-
DTI 37	+/Lox	+
DTI 38	+/Lox	+
DTI 39	lox/lox	-
DTI 40	+/Lox	+
DTI 41	+/Lox	+
DTI 42	lox/lox	-
DTI 43	+/+	-
DTI 44	+/+	+
DTI 45	+/Lox	+
DTI 46	+/lox	+
DTI 47	+/+	+
DTI 48	lox/lox	-
DTI 49	lox/lox	-
DTI 50	+/+	+
DTI 51	+/lox	+
DTI 52	+/+	+
DTI 53	+/lox	+
DTI 54	+/lox	+
DTI 55	+/lox	+
DTI 56	+/+	+
DTI 57	+/lox	+
DTI 58	+/lox	+
DTI 59	lox/lox	-
DTI 60	+/lox	+
DTI 61	+/lox	+
DTI 62	lox/lox	-
DTI 63	+/+	+
DTI 64	lox/lox	-
DTI 65	+/lox	+
DTI 66	lox/lox	-
DTI 67	+/+	+
DTI 68	+/lox	+
DTI 69	+/lox	+
DTI 70	+/lox	+
DTI 71	lox/lox	-
DTI 72	lox/lox	-
DTI 73	+/lox	+
DTI 74	+/+	+
DTI 75	+/+	+
DTI 76	+/lox	+
DTI 77	+/+	+
DTI 78	+/+	+
DTI 79	+/lox	+
DTI 80	+/lox	+
DTI 81	+/lox	+
DTI 82	+/lox	+
DTI 83	+/lox	+
DTI 84	lox/lox	-
DTI 85	+/lox	+
DTI 86	+/+	+
DTI 87	+/+	+
DTI 88	+/lox	+
DTI 89	+/lox	+
DTI 90	lox/lox	-
DTI 91	lox/lox	-
DTI 92	lox/lox	-
DTI 93	+/+	+
DTI 94	+/+	+
DTI 95	+/+	+
DTI 96	+/+	+
DTI 97	+/lox	+
DTI 98	+/+	+
DTI 99	lox/lox	-
DTI 100	lox/lox	-
DTI 101	lox/lox	-
DTI 102	+/+	+
DTI 103	lox/lox	-
DTI 104	+/+	+
DTI 105	+/+	+
DTI 106	lox/+	+
DTI 107	+/+	+
DTI 108	lox/+	+
DTI 109	lox/+	+
DTI 110	lox/+	+
DTI 111	lox/+	+
DTI 112	lox/+	+
DTI 113	lox/lox	-
DTI 114	+/+	+
DTI 115	lox/+	+
DTI 116	lox/lox	-
DTI 117	+/+	+
DTI 118	+/+	+
DTI 119	lox/lox	-
DTI 120	+/+	+
DTI 121	lox/+	+
DTI 122	lox/lox	-
DTI 123	+/+	-
DTI 124	lox/+	+
DTI 125	+/+	+
DTI 126	lox/lox	-
DTI 127	+/lox	+
DTI 128	+/lox	+
DTI 129	+/lox	+
DTI 130	+/lox	+
DTI 131	+/lox	+
DTI 132	lox/lox	-
DTI 133	lox/lox	-
DTI 134	lox/lox	-
DTI 135	+/lox	+

Priloga D: Nadaljevanje seznama genotipov potomcev križanj z linijo *Prp-Cre-ER^T*

genotip			genotip			genotip		
ID vz.	Cyp51	Cre	ID vz.	Cyp51	Cre	ID vz.	Cyp51	Cre
DTI 136	+/lox	+	DTI 181	+/lox	+	DTI 226	+/lox	-
DTI 137	+/lox	+	DTI 182	+/*	+	DTI 227	+/*	+
DTI 138	+/lox	+	DTI 183	+/lox	+	DTI 228	lox/lox	-
DTI 139	+/*	+	DTI 184	+/*	+	DTI 229	lox/lox	-
DTI 140	+/lox	+	DTI 185	+/lox	+	DTI 230	+/lox	+
DTI 141	+/lox	+	DTI 186	+/*	+	DTI 231	+/*	+
DTI 142	+/*	+	DTI 187	lox/lox ?	-	DTI 232	lox/lox	-
DTI 143	+/*	+	DTI 188	lox/lox ?	-	DTI 233	+/*	+
DTI 144	+/*	+	DTI 189	+/*	+	DTI 234	+/lox	+
DTI 145	lox/lox	-	DTI 190	+/lox	+	DTI 235	lox/lox	-
DTI 146	+/lox	+	DTI 191	+/lox	+	DTI 236	+/*	+
DTI 147	+/lox	+	DTI 192	+/lox	+	DTI 237	lox/lox	-
DTI 148	+/lox	+	DTI 193	lox/lox	-	DTI 238	+/lox	+
DTI 149	+/lox	+	DTI 194	+/*	+	DTI 239	lox/lox	-
DTI 150	lox/lox	+/-	DTI 195	+/*	+	DTI 240	+/lox	+
DTI 151	+/lox	+	DTI 196	+/*	+	DTI 241	+/lox	+
DTI 152	+/lox	+	DTI 197	+/lox	+	DTI 242	lox/lox	-
DTI 153	+/*	+	DTI 198	lox/lox	-	DTI 243	lox/lox	-
DTI 154	+/lox	+	DTI 199	lox/lox	-	DTI 244	+/lox	+
DTI 155	+/lox	+	DTI 200	lox/lox	-	DTI 245	+/lox	+
DTI 156	lox/lox	-	DTI 201	+/*	+	DTI 246	+/*	+
DTI 157	lox/lox	-	DTI 202	+/*	+	DTI 247	+/lox	+
DTI 158	+/lox	+	DTI 203	+/lox	+	DTI 248	+/*	+
DTI 159	lox/lox	-	DTI 204	lox/lox	-	DTI 249	+/lox	+
DTI 160	+/lox	+	DTI 205	+/*	+	DTI 250	+/*	+
DTI 161	+/lox	+	DTI 206	lox/lox	-	DTI 251	lox/lox	-
DTI 162	+/lox	+	DTI 207	+/*	+	DTI 252	+/lox	+
DTI 163	+/lox	+	DTI 208	+/*	+	DTI 253	+/lox	+
DTI 164	+/lox	+	DTI 209	+/*	+	DTI 254	+/lox	+
DTI 165	+/lox	+	DTI 210	lox/lox	-	DTI 255	+/lox	+
DTI 166	+/lox	+	DTI 211	+/lox	+	DTI 256	+/lox	+
DTI 167	+/*	+	DTI 212	+/lox	+	DTI 257	+/*	+
DTI 168	+/lox	+	DTI 213	+/*	+	DTI 258	+/lox	+
DTI 169	+/lox	+	DTI 214	+/lox	+	DTI 259	+/*	+
DTI 170	+/*	+	DTI 215	+/lox	+	DTI 260	+/*	+
DTI 171	+/lox	+	DTI 216	lox/lox	-	DTI 261	+/lox	+
DTI 172	lox/lox	-	DTI 217	+/lox	+	DTI 262	+/lox	+
DTI 173	lox/lox	-	DTI 218	+/*	+			
DTI 174	+/*	+	DTI 219	+/lox	+			
DTI 175	+/*	+	DTI 220	+/lox	+			
DTI 176	lox/lox	-	DTI 221	+/lox	+			
DTI 177	+/*	+	DTI 222	+/lox	+			
DTI 178	+/*	+	DTI 223	+/*	+			
DTI 179	lox/lox	-	DTI 224	+/lox	-			
DTI 180	lox/lox	-	DTI 225	lox/lox	-			