

UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

Tanja Španić

HORMONSKO ODVISNA IN HORMONSKO  
NEODVISNA SPOLNA DIFERENCIACIJA MOŽGANOV  
MIŠI BREZ GENA *SF-1*

**Doktorska disertacija**

**Ljubljana, 2015**

UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK: 575.11:612.6.057:612.8.05:591.5:612.616.31:599.323:602.6(043.3)

Tanja Španić, dr. vet. med.

HORMONSKO ODVISNA IN HORMONSKO  
NEODVISNA SPOLNA DIFERENCIACIJA MOŽGANOV  
MIŠI BREZ GENA *SF-1*

**Doktorska disertacija**

HORMONE DEPENDENT AND HORMONE  
INDEPENDENT BRAIN SEXUAL DIFFERENTIATION IN  
MICE LACKING *SF-1* GENE

**Doctoral Dissertation**

**Ljubljana, 2015**

Avtorica: Tanja Španić

Naslov doktorske disertacije: HORMONSKO ODVISNA IN HORMONSKO  
NEODVISNA SPOLNA DIFERENCIACIJA MOŽGANOV MIŠI BREZ GENA *SF-1*

Delo je bilo opravljeno v Centru za genomiko živali Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Predstojnik: prof. dr. Gregor Majdič

Mentor: prof. dr. Gregor Majdič

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

prof. dr. Milka Vrecl, predsednica

prof. dr. Jelka Zabavnik Piano, članica

prof. dr. Marjan Slak Rupnik, član

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Doktorandka: Tanja Španić

"No one will ever win the battle of the sexes.  
There is too much fraternizing with the enemy."

Henry Kissinger



From me to you...



## Kazalo

<b>KAZALO TABEL</b>	<b>5</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>6</b>
<b>IZVLEČEK</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>10</b>
<b>OKRAJŠAVE</b>	<b>11</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>15</b>
<b>1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE</b>	<b>16</b>
<b>2 PREGLED LITERATURE</b>	<b>17</b>
<b>2.1 NASTANEK RAZLIK MED SPOLOMA</b>	<b>17</b>
2.1.1 RAZVOJ SPOLNIH ORGANOV	18
2.1.1.1 Razvoj mod	18
2.1.1.2 Razvoj jajčnikov	19
2.1.2 KROMOSOMSKA SPOLNA DIFERENCIACIJA	20
2.1.2.1 Potek procesa utišanja enega izmed kromosomov X	21
2.1.3 GENETSKA SPOLNA DIFERENCIACIJA	22
2.1.4 HORMONSKA SPOLNA DIFERENCIACIJA	25
<b>2.2 RAZLIKE MED SPOLOMA V MOŽGANIH</b>	<b>26</b>
2.2.1 NASTANEK RAZLIK MED SPOLOMA V MOŽGANIH	26
2.2.2 SPOLNO RAZLIČNA PODROČJA V MOŽGANIH	29
2.2.3 SPOLNO DIMORFNA PODROČJA V MOŽGANIH PRI LJUDEH	34
<b>2.3 MIŠI BREZ GENA ZA STERIDOGENI DEJAVNIK 1</b>	<b>35</b>
2.3.1 STERIDOGENI DEJAVNIK 1 – SF-1	35
2.3.2 PRIPRAVA TRANSGENIH MIŠI BREZ <i>SF-1</i>	36
2.3.3 FENOTIP MIŠI Z MUTACIJO V GENU <i>SF-1</i> IN NJIHOVA UPORABNOST	37
<b>2.4 OBNAŠANJE</b>	<b>38</b>
2.4.1 O OBNAŠANJU IN O PROUČEVANJU OBNAŠANJA	38

2	T. Španić: <i>Hormonsko odvisna in hormonsko neodvisna spolna diferenciacija možganov miši brez gena SF-1</i>	
2.4.2	SPOLNO POGOJENA OBNAŠANJA	40
2.4.2.1	Proučevanje spolno pogojenega obnašanja pri modelnih organizmih	41
2.4.2.2	Žensko spolno obnašanje	43
2.4.2.3	Agresivno obnašanje	44
<b>2.5</b>	<b>POMEN PROUČEVANJA RAZLIK MED SPOLOMA</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>VZREJA IN PRIPRAVA ŽIVALI ZA POSKUS</b>	<b>51</b>
3.1.1	VZREJA ŽIVALI	51
3.1.2	PRIPRAVA POSKUSNIH ŽIVALI	51
3.1.2.1	Priprava živali za ugotavljanje izražanja genov v možganih	51
3.1.2.2	Priprava miši za ugotavljanje vpliva testosterona na obnašanje in izražanje genov v možganih	52
3.1.3	DOLOČANJE GENOTIPA ŽIVALI	54
3.1.4	OPERATIVNA ODSTRANITEV SPOLNIH ŽLEZ PRI MIŠIH DIVJEGA TIPA IN SLEPA OPERACIJA PRI MIŠIH BREZ GENA <i>SF-1</i>	55
<b>3.2</b>	<b>PRIPRAVA HORMONOV IN NJIHOVA UPORABA</b>	<b>56</b>
3.2.1	KORTIKOSTEROIDNI HORMONI	56
3.2.2	PRIPRAVA ESTRADIOL BENZOATA	56
3.2.3	PRIPRAVA PROGESTERONA	56
3.2.4	UPORABA SPOLNIH HORMONOV ESTRADIOL BENZOATA IN PROGESTEONA	56
3.2.5	PRIPRAVA TESTOSTERONSKIH VSADKOV	57
<b>3.3</b>	<b>PROUČEVANJE IZRAŽANJA GENOV V MOŽGANIH</b>	<b>57</b>
3.3.1	IZOLACIJA RNA	57
3.3.2	MIKROMREŽE	58
3.3.3	PRIPRAVA KOMPLEMENTARNE DNA (cDNA)	59
3.3.4	REAKCIJA PCR V REALNEM ČASU OZIROMA KVANTITATIVEN PCR V REALNEM ČASU (qPCR)	60
3.3.5	IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE SVEŽIH, PLAVAJOČIH REZIN ZA PROUČEVANJE IZRAŽANJA GENOV	63
3.3.5.1	Analiza področij v možganih	64
3.3.5.2	Zajemanje digitalnih slik za analizo	64
<b>3.4</b>	<b>IZVEDBA POSKUSOV OBNAŠANJA</b>	<b>65</b>

T. Španić: <i>Hormonsko odvisna in hormonsko neodvisna spolna diferenciacija možganov miši brez gena SF-1</i>	3
3.4.1 POSKUS ŽENSKEGA SPOLNEGA OBNAŠANJA	66
3.4.2 POSKUS AGRESIVNEGA OBNAŠANJA	67
<b>3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV</b>	<b>68</b>
3.5.1 ANALIZA REZULTATOV DNA-MIKROMREŽ	68
3.5.2 ANALIZA REZULTATOV QPCR	69
3.5.3 ANALIZA REZULTATOV TESTOV OBNAŠANJA	70
<b>4 REZULTATI</b>	<b>71</b>
<b>4.1 IZRAŽANJE GENOV V VMESNEM DELU MOŽGANOV PRI MIŠIH BREZ SF-1 IN PRI MIŠIH DIVJEGA TIPA</b>	<b>71</b>
4.1.1 IZRAŽANJE GENOV V OSREDNJEM DELU MOŽGANOV NA DNA-MIKROMREŽAH	71
4.1.2 PREVERJANJE IZRAŽANJA GENOV V VMESNEM DELU MOŽGANOV Z METODO QPCR	73
<b>4.2 OBNAŠANJE MIŠI PO DODAJANJU TESTOSTERONA</b>	<b>76</b>
4.2.1 IZRAŽANJE ŽENSKEGA SPOLNEGA OBNAŠANJA PRI MIŠIH SF-1 KO IN GDX/WT PO DODAJANJU TESTOSTERONA V OBDOBJU OB ROJSTVU	77
4.2.2 AGRESIVNO OBNAŠANJE PRI MIŠIH SF-KO IN GDX/WT PO DODAJANJU TESTOSTERONA V OBDOBJU OB ROJSTVU	83
<b>4.3 VPLIV DODAJANJA TESTOSTERONA V OBDOBJU OB ROJSTVU NA IZRAŽANJE BELJAKOVIN KALBINDIN IN ARGININ VAZOPRESIN V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ SF-1 IN MIŠIH DIVJEGA TIPA</b>	<b>86</b>
4.3.1 IZRAŽENOST BELJAKOVINE KALBINDIN V VMESNIH MOŽGANIH	86
4.3.2 IZRAŽENOST BELJAKOVINE ARGININ VAZOPRESIN V VMESNIH MOŽGANIH	88
<b>5 RAZPRAVA</b>	<b>93</b>
<b>5.1 RAZLIKE V IZRAŽANJU GENOV V VMESNEM DELU MOŽGANOV PRI MIŠIH BREZ SF-1 IN PRI MIŠIH DIVJEGA TIPA</b>	<b>94</b>
<b>5.2 VPLIV DODAJANJA TESTOSTERONA V OBDOBJU OB ROJSTVU NA OBNAŠANJE PRI MIŠIH BREZ GENA SF-1 IN GONADEKTOMIZIRANIH MIŠIH DIVJEGA TIPA</b>	<b>98</b>
5.2.1 ŽENSKO SPOLNO OBNAŠANJE PO DODAJANJU TESTOSTERONA V OBDOBJU OB ROJSTVU	99
5.2.2 AGRESIVNO OBNAŠANJE PO DODAJANJU TESTOSTERONA V OBDOBJU OB ROJSTVU	102
<b>5.3 VPLIV TESTOSTERONA V OBDOBJU OB ROJSTVU NA IZRAŽANJE KALBINDINA IN ARGININ VAZOPRESINA V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ GENA SF-1 IN MIŠIH DIVJEGA TIPA</b>	<b>104</b>
5.3.1 IZRAŽENOST BELJAKOVINE KALBINDIN (CALB) V VMESNIH MOŽGANIH	104

4	T. Španić: <i>Hormonsko odvisna in hormonsko neodvisna spolna diferenciacija možganov miši brez gena SF-1</i>	
5.3.2	IZRAŽENOST BELJAKOVINE ARGININ VAZOPRESIN (AVP) V VMESNIH MOŽGANIH	106
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČKI</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>113</b>
<b>9</b>	<b>ZAHVALA</b>	<b>116</b>
<b>10</b>	<b>REFERENCE</b>	<b>117</b>

## Kazalo tabel

Tabela 1: Prikaz aplikacije TP po skupinah (TP-E – živali so prejemale TP samo pred rojstvom; TP-PN – živali so prejemale TP samo po rojstvu; TP-E&PN – živali so prejemale TP pred in po rojstvu; K-K – kontrolne živali, ki so v obeh obdobjih prejemale samo olje).....	53
Tabela 2: Uradne oznake, polna imena, druga imena in dostopna številka v bazi NCBI Gene za posamezen gen in naloge, ki jih opravlja. ....	62
Tabela 3: Tabela prikazuje število živali uporabljenih v testih obnašanja in za analizo izražanja genov v možganih glede na tretiranje s TP in po posameznih genotipih. ....	65

## Kazalo slik

Slika 1: Slika prikazuje mišje možgane v vzdolžnem prerezu. Preiskovano področje je označeno med dvema črtkanima črtama. Vir slike je <i>The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates</i> (291).....	71
Slika 2: Grafični prikaz primerjave izražanja genov na DNA-mikromrežah pri SF-1 KO samcih (KO M) in SF-1 KO samicah (KO F) (KO M vs. KO F) ter pri CAS/WT samcih (WT M) in OVX/WT samicah (WT F) (WT M vs. WT F). V vsaki skupini so bile po tri živali.....	72
Slika 3: Grafični prikaz relativne izraženosti genov <i>Uty</i> , <i>Eif2s3y</i> , <i>Ddx3y</i> , <i>Kdm5d</i> pri samcih SF-1 KO (KO M) in CAS/WT (WT M).....	73
Slika 4: Grafični prikaz relativne izraženosti <i>Eif2s3x</i> pri samicah SF-1 KO (KO F), samicah OVX/WT (WT F), samcih SF-1 KO (KO M) in pri samcih CAS/WT (WT M).....	74
Slika 5: Grafični prikaz relativne izraženosti <i>Xist-a</i> , gena, ki je odgovoren za inaktivacijo enega kromosoma X pri samicah.....	75
Slika 6: Grafični prikaz relativne izraženosti <i>Utx</i> pri samicah SF-1 KO (KO F), samicah OVX/WT (WT F), samcih SF-1 KO (KO M) in pri samcih CAS/WT (WT M).....	76
Slika 7: Grafični prikaz količnika lordoze (LQ) – povprečja vseh petih analiziranih testov ženskega spolnega obnašanja pri samicah OVX/WT (WT F), samicah SF-1 KO (KO F), samcih SF-1 KO (KO M) in samcih CAS/WT (WT M) in pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).....	78
Slika 8: Grafični prikaz števila lordoz 5 (L5) pri zadnjem testu ženskega spolnega obnašanja pri samicah OVX/WT (WT F), samicah SF-1 KO (KO F), samcih SF-1 KO (KO M) in samcih CAS/WT (WT M) in pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).....	79
Slika 9: Grafični prikaz količnika lordoze (LQ) pri samicah OVX/WT za posamezen test v različno tretiranih skupinah (brez dodajanja TP – WT F K; tiste, ki so prejemale TP samo pred rojstvom – WT F E; tiste, ki so prejemale TP samo po	



rojstvu – WT F PN; tiste, ki so prejemale TP pred in po rojstvu – WT F E&TP).  
..... 80

Slika 10: Grafični prikaz števila naskokov v vseh petih analiziranih testih ženskega spolnega obnašanja pri samicah OVX/WT (WT F), samicah SF-1 KO (KO F), samcih SF-1 KO (KO M) in samcih CAS/WT (WT M) pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN)..... 81

Slika 11: Grafični prikaz števila poskusov naskokov v vseh petih analiziranih testih ženskega spolnega obnašanja pri samicah OVX/WT (WT F), samicah SF-1 KO (KO F), samcih SF-1 KO (KO M) in samcih CAS/WT (WT M) in pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN)..... 82

Slika 12: Grafični prikaz števila ugrizov in napadov v prvem testu agresivnega obnašanja pri samcih CAS/WT (WT M), samicah OVX/WT (WT F), samcih SF-1 KO (KO M) in samicah SF-1 KO (KO F) pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).. 83

Slika 13: Grafični prikaz povprečja skupnega števila ugrizov in napadov v vseh testih agresivnega obnašanja pri samcih CAS/WT (WT M), samicah OVX/WT (WT F), samcih SF-1 KO (KO M) in samicah SF-1 KO (KO F) pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN)..... 84

Slika 14: Grafični prikaz časa v sekundah od začetka testa do prvega agresivnega dogodka v vseh testih agresivnega obnašanja pri samcih CAS/WT (WT M), samicah OVX/WT (WT F), samcih SF-1 KO (KO M) in samicah SF-1 KO (KO F) pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN). ..... 85

Slika 15: Prikaz izražanja kalbindina v MPOA pri miših GDX/WT in SF-1 KO po dodajanju TP v različnih obdobjih (40-kratna povečava). Na delu, ki prikazuje

WT samca brez dodajanja TP je obkroženo t.i. SDN-POA. To področje smo primerjali z vsemi ostalimi skupinami..... 87

Slika 16: Prikaz izražanja kalbindina v MPOA pri miših GDX/WT in SF-1 KO po različnih tretmajih s TP (100-kratna povečava). Na delu, ki prikazuje WT samca brez dodajanja TP je obkroženo t.i. SDN-POA. To področje smo primerjali z vsemi ostalimi skupinami..... 87

Slika 17: Prikaz izražanja arginin vazopresina (AVP) v LS pri miših GDX/WT in SF-1 KO po različnih tretmajih s TP (40-kratna povečava). Na delu, ki prikazuje WT samca brez dodajanja TP, je označena združena anteriorna komisura (aca), septofimbrično jedro (SFi) in LS..... 88

Slika 18: Prikaz izražanja AVP v LS pri WT in SF-1 KO miših po različnih tretmajih s TP (100-kratna povečava). Povečano je prikazano področje LS. .... 88

HORMONSKO ODVISNA IN HORMONSKO NEODVISNA SPOLNA DIFERENCIACIJA  
MOŽGANOV MIŠI BREZ GENA SF-1

## Izvleček

Ključne besede: nevroendokrinologija – veterinarska; spol, diferenciacija; možgani – rast in razvoj; spolno vedenje živali – fiziologija; regulacija genskega izražanja; spolni kromosomi; testosteron – fiziologija; miši z odstranjenim genom; steroidogeni dejavnik 1.

Steroidogeni dejavnik 1 (SF-1, NR5A1) ima pomembno vlogo pri razvoju in delovanju endokrinega sistema. Pri miših brez gena *SF-1* (SF-1 KO) pride že v zgodnjem embrionalnem razvoju do propada zametkov spolnih in nadledvičnih žlez, zato te miši niso nikoli izpostavljene lastnim spolnim hormonom. *SF-1* je pri miših v možganih specifično izražen v ventromedialnem jedru hipotalamusa (VMH), ki se v njegovi odsotnosti ne razvije pravilno. Miši SF-1 KO so primeren model za proučevanje ločenega vpliva hormonov in genov na spolno diferenciacijo. Naše raziskave so pokazale, da se nekateri geni, ki se nahajajo na kromosomu Y (*Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y*, *Kdm5d*) in na kromosomu X (*Xist*), izražajo v možganih neodvisno od prisotnosti spolnih hormonov. Omenjeni geni so različno izraženi med spoloma tako pri miših SF-1 KO kot pri miših GDX/WT, kar kaže, da tudi geni sodelujejo pri spolni diferenciaciji v možganih.

Proučevali smo tudi vpliv dodajanja testosteron propionata (TP) v obdobju ob rojstvu na defeminizacijo in maskulinizacijo. Z opazovanjem ženskega spolnega in agresivnega obnašanja smo ugotovili, da je tretiranje s TP tik po rojstvu imelo večji vpliv na maskulinizacijo v obnašanju. Ti rezultati se ujemajo tudi z izražanjem beljakovin kalbindin (*Calb*) in arginin vazopresin (*AVP*) v možganih. Pri izražanju kalbindina smo ugotovili, da je za maskulinizacijo mišjih možganov pomembnejše obdobje tik po rojstvu, saj se je v medialnem predoptičnem področju t.i. jedro SDN-POA izrazilo pri samicah OVX/WT in miših SF1-KO samo po dodajanju TP po rojstvu ali v obeh obdobjih. Pri samcih WT pa je le-to prisotno ne glede na dodajanje eksogenega TP. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi pri proučevanju izražanja AVP v stranskem pretinu (LS), s to razliko, da so imunopozitivna vlakna prisotna pri vseh genotipih, saj je to posledica aktivacijskega učinka testosterona.

HORMONE DEPENDENT AND HORMONE INDEPENDENT BRAIN SEXUAL  
DIFFERENTIATION IN MICE LACKING *SF-1* GENE

## Abstract

Key words: neuroendocrinology – veterinary; sex differentiation – genetics; brain – growth and development; sexual behaviour, animal – physiology; gene expression, regulation; sex chromosomes; testosterone – physiology; mice, knockout – genetics; steroidogenic factor 1.

Steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1) has an important role in the development and function of endocrine system. Mice lacking *SF-1* gene (SF-1 KO) exhibit an early developmental regression of genital ridges; consequently they are born without adrenal glands and gonads, and are therefore they never exposed to endogenous sex steroid hormones. In the mouse brain *SF-1* is specifically expressed in the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) and in its absence, the VMH is not developed properly. Because of the absence of endogenous sex steroids, they provide an excellent model for separately studying the influence of sex steroid hormones and genes on sexual differentiation.

Our study shows that some Y-chromosome linked genes (*Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y*, *Kdm5d*) and X-chromosome linked gene (*Xist*) are expressed in the brain independently of the sex hormones, since they are differently expressed between sexes in SF-1 KO and GDX/WT mice. This shows that some genes also have a role in sexual differentiation of the brain.

We also studied the influence of the treatment with testosterone propionate (TP) in the period around birth on the defeminisation and masculinisation. Results from female sexual and aggressive behaviour revealed that treatment with TP shortly after birth had a greater influence on masculinisation in behaviour. In the medial preoptic area calbindin (Calb) immunopositive cells, which form SDN-POA, were present in OVX/WT females and SF-1 KO mice only when they were treated with TP after birth or before and after birth. In CAS/WT males this nucleus is present regardless the presence of exogenous TP. Similar was seen in expression of arginine vasopressin (AVP) in LS where the immunopositive fibres were present in all genotypes because of the activation effect of testosterone.

## Okrajšave

AH	medialni hipotalamus; <i>angl.</i> anterior hypothalamus
ALC	odrasle Leydigove celice; <i>angl.</i> adult Leydig cells
AMH	antimüllerjev hormon
AR	androgenski receptor
Arc	arkvratno jedro; <i>angl.</i> arcuate nucleus
AVP	arginin vazopresin, <i>tudi</i> antidiuretični hormon
AVPV	anteroventralni del periventrikularno jedro; <i>angl.</i> anteroventral periventricular nucleus
BNST	spodnje jedro končne strije; <i>angl.</i> bed nucleus of the stria terminalis
BNSTM	medialni del spodnjega jedra končne strije; <i>angl.</i> bed nucleus of stria terminalis-medial
Calb	kalbindin D-28k, <i>angl.</i> calbindin
cc	možganski prečnik, <i>corpus calosum</i>
DAX1	DSS-AHC kritično področje na kromosomu X; <i>angl.</i> DSS-AHC critical region on the X chromosome
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DR	jedro dorzalne rafe; <i>angl.</i> dorsal raphe nucleus
E	embrionalni dan, <i>angl.</i> embryonic day
ER	estrogenski receptor
FLC	zarodkove Leydigove celice; <i>angl.</i> fetal Leydig cells
GABA	gama amino-butirična kislina; <i>angl.</i> gamma-aminobutyric acid
HMG	homeo-zaporedje; <i>angl.</i> high mobility group HMG-box
INAH	intersticialno jedro sprednjega hipotalamusa; <i>angl.</i> interstitial nucleus of anterior hypothalamus
L	lordoza, usločenost hrbta; <i>angl.</i> lordosis
LH	luteinizirajoči hormon
LQ	Količnik lordoze; <i>angl.</i> lordosis quotient
LS	stranski oziroma lateralni pretin; <i>angl.</i> lateral septum
MeA	medialni del amigdale; <i>angl.</i> medial amygdala

miš AFP KO	miš brez gena za $\alpha$ -feto proteina; <i>angl.</i> alpha-phetoprotein knock-out mouse
miš ArKO	miš brez gena za encim aromatazo; <i>angl.</i> aromatase knock-out mouse
miš SF-1 KO	miš brez gena <i>SF-1</i> ; <i>angl.</i> SF-1 knockout mouse
miš SF-1 KO F	samica brez gena <i>SF-1</i> ; <i>angl.</i> SF-1 knockout mouse; tudi KO F
miš SF-1 KO M	samec brez gena <i>SF-1</i> ; <i>angl.</i> SF-1 knockout mouse; tudi KO M
miši CAS/WT	miš divjega tipa z odstranjenimi modi; <i>angl.</i> castrated wild type mouse
miši GDX/WT	miš divjega tipa z odstranjenimi spolnimi žlezami; <i>angl.</i> gonadectomized wild type mouse
miši OVX/WT	miš divjega tipa z odstranjenimi jajčniki; <i>angl.</i> ovariectomized wild type mouse
miši WT	miši divjega tipa, <i>angl.</i> wild type mouse
MPOA	osrednji ali medialni del POA; <i>angl.</i> medial preotic area
PCR	verižna reakcija s polimerazo
POA	predoptično področje; <i>angl.</i> preoptic area
PVN	paraventrikularno jedro hipotalamusa; <i>angl.</i> paraventricular nucleus of the hypothalamus
qPCR	PCR v realnem času oziroma kvantitativni PCR v realnem času; <i>angl.</i> real-time polymerase chain reaction or quantitative real-time PCR
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	obratni prepis in verižna reakcija s polimerazo ; <i>angl.</i> reverse transcription polymerase chain reaction
SDN-POA	spolno dimorfno jedro predoptičnega področja; <i>angl.</i> sexually dimorphic nucleus of the POA
SF-1	steroidogeni dejavnik 1; <i>angl.</i> steroidigenic factor 1; <i>tudi</i> NR5A1
<i>sf-1, SF-1</i>	gen za SF-1
SON	supraoptično jedro; <i>angl.</i> supraoptic nucleus
SOX9	SRY-sorodna beljakovina s homeo-zaporedjem; <i>angl.</i> SRY-related HMG box

Sry	spol določujoče področje na kromosomu Y; sex determining region on Y chromosome
TP	testosteron propionat
TP-E	živali, ki so prejemale TP samo pred rojstvom
TP-E&PN	živali, ki so prejemale TP pred in po rojstvu
TP-PN	živali, ki so prejemale TP samo po rojstvu
VMH	ventromedialno jedro hipotalamusa; <i>nucleus ventromedialis hypothalami</i> ; <i>angl.</i> ventromedial nucleus of the hypothalamus
VMH	ventromedialno jedro hipotalamusa; <i>angl.</i> ventromedial nucleus of the hypothalamus
WNT4	član družine wingless mesta vključitve MMTV; <i>angl.</i> wingless type MMTV integration site family member 4
<i>WT1, Wt1</i>	prepisovalni dejavnik Wilmsovega tumorja 1
XCI	utišanje enega izmed kromosomov X; <i>angl.</i> X chromosome inactivation
XIST	nekodirajoč del RNK na kromosomu X, <i>angl.</i> X-inactive specific transcript

- 14 T. Španić: *Hormonsko odvisna in hormonsko neodvisna spolna diferenciacija možganov miši brez gena SF-1*



## 1 UVOD

Če se na začetku vprašam: zakaj sploh proučevati razlike med spoloma? Menim, da je odgovor na to vprašanje vse prej kot preprost.

Kot razlika med spoloma je definirano karkoli, kar je zanesljivo različno med moškimi in ženskimi osebki. To se nanaša na neko lastnost (npr. lastnost v strukturi, obnašanju, bolezni ...), ki se med spoloma razlikuje v povprečju, varianci, razponu, razmerju ... (1)

Pri sesalcih je genetski spol določen že ob združitvi spolnih celic s komplementom spolnih kromosomov X in Y. Še pred začetkom spolne diferenciacije je v spolnih grebenih izražen gen *Sry*, ki se nahaja na kromosomu Y in je odgovoren za razvoj mod pri moških (XY) zarodkih (2). Moda nato izločajo antimüllerjev hormon (AMH), ki zavre razvoj ženskih spolnih organov, in testosteron, ki sodeluje pri razvoju moških spolnih organov ter kasneje sodeluje pri razvoju sekundarnih spolnih znakov (3).

Možgani so tudi spolno dimorfen organ, vendar tega ne moremo zaznati na prvi pogled. Spolni steroidni hormoni, ki jih v glavnem izločajo spolne žleze, imajo pomembno vlogo pri spolni diferenciaciji možganov in lahko vplivajo na njihovo strukturo začasno ali stalno (4). Poleg steroidnih hormonov iz spolnih žlez lahko na razvoj zarodka delujejo tudi steroidni hormoni iz nadledvičnih žlez, iz centralnega živčnega sistema (nevrosteroidi), sosednjih zarodkov in spolni hormoni iz materine krvi (5, 6, 7). Znano je, da se pri vretenčarjih iz spolnih žlez izločajo spolni hormoni skozi vse življenje (4). Pri glodavcih se že za časa embrionalnega razvoja pri samcih začne izločati testosteron, medtem ko pri samicah jajčniki do kotitve ne izločajo spolnih hormonov (8, 9).

V preteklem desetletju so dokazali, da imajo tudi geni, ki se nahajajo na spolnih kromosomih, neposreden vpliv na spolno diferenciacijo možganov pri sesalcih in pticah, saj so potrdili nekatere razlike med spoloma že pred nastankom primarnih steroidnih tkiv (10).

Znano je, da se nekatere duševne motnje pojavljajo pogosteje pri ženskah kot pri moških. To velja na primer za depresivno motnjo in motnje hranjenja, ki se dvakrat

pogosteje pojavljajo pri ženskah. Medtem ko se avtistične motnje, motnje hiperaktivnosti in pomanjkanja pozornosti tudi do štirikrat pogosteje pojavljajo pri moških.

Da bi razumeli razlike med spoloma v možganih tako v strukturi, pojavnosti motenj in boleznih ter v obnašanju pri človeku velikokrat pri temeljnem proučevanju teh vprašanj uporabimo živalske modele, ki tako veliko doprinesejo k temu razumevanju. Tudi miši brez gena za *SF-1* so eden izmed takih modelov, saj zaradi odsotnosti nadledvičnih in spolnih žlez nikoli niso izpostavljene lastnim spolnim hormonom, kar omogoča proučevanje hormonsko odvisnih in hormonsko neodvisnih razlik med spoloma tako v možganih in obnašanju kot tudi v drugih organskih sistemih.

### **1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE**

Namen naših raziskav je bil ugotoviti ali poleg hormonov tudi geni vplivajo na spolno različno izražene gene v vmesnem delu možganov in ali lahko z dodajanjem eksogenega testosterona dosežemo maskulinizacijo in defeminizacijo v izražanju nekaterih beljakovin in v obnašanju pri miših divjega tipa z odstranjenimi spolnimi žlezami (GDX/WT) seva C57BL/6J in miših istega seva brez gena za steroidogeni dejavnik 1 (SF-1 KO).

Miši SF-1 KO so dober model za ločeno proučevanje vpliva hormonov in genov na nastanek razlik med spoloma v možganih in v obnašanju, ker jim zaradi odsotnosti *SF-1* že v zgodnjem embrionalnem razvoju propadejo zametki spolnih in nadledvičnih žlez. Tako miši SF-1 KO niso niti med razvojem niti po rojstvu izpostavljene lastnim spolnim hormonom.

V naših raziskavah smo hoteli preveriti naslednje hipoteze:

- poleg hormonov tudi geni vplivajo na nastanek razlik v izraženosti genov med spoloma v možganih;
- dodajanje spolnih hormonov pred rojstvom in po njem lahko pri miših brez gena *SF-1* povzroči popolno maskulinizacijo njihovih možganov.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 NASTANEK RAZLIK MED SPOLOMA

Že kot otroci opazimo in spoznamo razlike med spoloma, sprva samo tiste vidne na zunaj, kasneje pa tudi druge, ki so nam na prvi pogled nevidne.

Ključ do razumevanja nastanka razlik med spoloma leži v dejstvu, da že na začetku vsaka zigota prejme polovico genske zasnove od matere in polovico od očeta. Zato pri sesalcih z združitvijo zrele jajčne celice, ki nosi kromosom X, in semenčice, ki nosi kromosom X ali Y, lahko nastanejo potomci XX, ki so ženskega spola, ali XY, ki so moškega spola (11) in tako lahko biološke razlike med spoloma pripišemo spolnima kromosomoma. Različice kromosomskih komplementov vodijo do nastanka treh ključnih genetskih razlik med spoloma (12): moške celice vsebujejo gene s kromosoma Y, ki so pri ženskih celicah odsotni; ženske celice vsebujejo dve kopiji genov s kromosoma X (ena kopija oziroma en kromosom X je običajno že zelo zgodaj inaktiviran oziroma utišan (13)) in ženske celice prejmejo eno očetovsko kopijo kromosoma X, ki pri moških celicah ni prisotna. Te genetske razlike so vzrok za razlike med celicami XX in XY. Najpomembnejša razlika nastane v spolnih žlezah, za katero je odgovoren gen *Sry* (*angl.* sex determining region on Y chromosome), ki se nahaja na kromosomu Y in usmeri nediferencirane gonade v razvoj mod. Vloga gena *Sry* je podrobneje opisana v poglavju 2.1.3 Genetska spolna diferenciacija. Razvita moda pri moškem spolu in jajčniki pri ženskem izločajo različne spolne hormone, ki delujejo na druga tkiva v telesu, da se le-ta razvijejo in delujejo različno v odraslem obdobju. Vplivi spolnih hormonov so lahko na eni strani trajni, nepovratni ali t.i. organizacijski vplivi ali na drugi strani povratni, t.i. aktivacijski vplivi, ki trajajo toliko časa, kolikor so hormoni prisotni (14, 15). Velikokrat je aktivacijski vpliv omejen že s predhodnim organizacijskim učinkom delovanja spolnih hormonov. Oba načina delovanja spolnih hormonov pa sta vzrok za nastanek razlik med spoloma v delovanju različnih tkiv. Te razlike nas pripeljejo do ključnega razumevanja dveh pojmov, in sicer razlik med spoloma (*angl.* sex differences) in spolnega razlikovanja ali spolne diferenciacije (*angl.* sexual differentiation). Pri spolni diferenciaciji gre za biološki proces, ki privede do nepovratnih razlik med spoloma (1).

### **2.1.1 Razvoj spolnih organov**

Spol zarodka je določen že zelo zgodaj, a se sam razvoj spolnih organov začne nekoliko kasneje, in sicer med t.i. procesom organogeneze. Za razliko od ostalih zametkov organskih sistemov se zametki spolnih žlez lahko razvijejo v ženske ali moške spolne žleze, jajčnik ali modo, kar imenujemo bipotentnost (3).

Med spolno diferenciacijo se oblikujejo notranji in zunanji spolni organi.

Spolno diferenciacijo delimo na tri obdobja, in sicer kromosomsko, genetsko in hormonsko, ki vplivajo eno na drugo in so deloma prepletene. Kot posledica nastanejo tako morfološke kot tudi funkcionalne razlike med spoloma, le-te pa vplivajo na spolno identiteto, spolno usmerjenost, spolno obnašanje in kognitivne funkcije (16, 17).

Spolne žleze se razvijejo iz spolnega grebena, ki je mezodermalnega izvora in se nahaja na ventralni strani mezonefrosa, praledvic zarodka. Celice celomskega epitelijskega proliferirajo in vdirajo v mezenhim spolnega grebena ter oblikujejo primarne klične povezke, ki kasneje obdajajo spolne celice. Do te stopnje je razvoj pri obeh spolih isti in so prisotni tako Wolffovi kot Müllerjevi vodi (3).

Pri človeku se spolni greben pojavi pri štirih tednih embrionalnega razvoja in ostane nediferenciran do sedmega tedna, medtem ko se pri miših oblikuje v desetem dnevu embrionalne starosti (3).

#### **2.1.1.1 Razvoj mod**

Ključno obdobje spolne diferenciacije pri miših je med 10,5 in 12,5 dnevom embrionalnega razvoja (E10 in E12). Začne se z izražanjem gena *Sry*, ki leži na kromosomu Y (18, 19), in usmeri indiferentne spolne žleze v razvoj mod. Pri človeku je to obdobje med 41. in 44. dnevom starosti zarodka. Pod vplivom *Sry* se celice v primarnih kličnih povezkih diferencirajo v Sertolijeve celice in začnejo izločati antimüllerjev hormon (AMH), kar privede do propada Müllerjevih vodov in ohranitve Wolffovih. Spolni (semenski) trakovi se razvijajo v zavito semensko cevko. Z združitvijo v globini pa tvorijo mrežje cevk, *rete testis*. Mezenhimalne celice pod celomskim epitelijem se diferencirajo v vezivno plast pod epitelijem (*tunica albuginea*). Razvoj mod se potem nadaljuje med puberteto, ko semenski

trakovi luminizirajo, oblikujejo se zavite semenske cevke, v katerih dozorevajo semenčice. Za ohranitev Wolffovega voda je odgovoren testosteron, ki ga izločajo Leydigove celice. Leydigove celice se razvijejo takoj po pojavu Sertolijevih celic. Iz Wolffovega voda se razvijejo del nadmodka, semenovod in nekatere pomožne spolne žleze (3, 20).

Leydigove celice so zelo pomembne celice pri spolni diferenciaciji tako v času embrionalnega razvoja kot tudi kasneje po rojstvu. Pri glodavcih in večini sesalcev poznamo dve populaciji Leydigovih celic, in sicer t.i. Leydigove celice plodu in odrasle Leydigove celice (21). Ti dve populaciji se ločita po ultrastrukturi, življenjski dobi in tudi po zmožnosti proizvodnje androgenov. Zarodkove Leydigove celice (FLC; *angl.* fetal Leydig cells) so prisotne v času embrionalnega razvoja v modih zarodka in propadejo kmalu po rojstvu. Pri različnih živalskih vrstah se obdobje pojava in delovanja FLC razlikuje (22). Pri miših se FLC pojavijo na E12,5, pri podganah na E14,5, pri človeku pa v sedmem do osmem tednu nosečnosti (23, 9). Pri miših so prisotne do petega dne po rojstvu (PN 5) (24).

Znano je, da imajo FLC večjo zmožnost proizvodnje testosterona kot odrasle (ALC; *angl.* adult Leydig cells) in imajo s tem pomembno vlogo pri maskulinizaciji plodu (25).

#### **2.1.1.2 Razvoj jajčnikov**

Pri zarodku ženskega spola primitivne spolne niti propadejo in takoj se začnejo razvijati nove, ki ne potujejo v globino, ampak ostanejo v bližini zunanje površine organa, zato jih imenujemo spolne niti skorje. Te se oblikujejo v skupke in posamezen skupek obdaja eno zarodno celico. Zarodne celice se razvijejo v jajčne celice, okolni skupki pa v celice granuloze. Celice mezenhimskega veziva, ki obdajajo spolne niti, se diferencirajo v celice teke. Müllerejvi vodi ostanejo in se razvijejo v jajcevoda in maternico (3).

Na razvoj tako spolnih žlez kot tudi možganov ima pomemben vpliv prisotnost ali odsotnost testosterona. Razvoj spolnega sistema pa je odvisen od prisotnosti oziroma odsotnosti mod (26, 17, 3).

### 2.1.2 Kromosomska spolna diferenciacija

Ob združitvi spolnih celic, ko pronukleus semenčice prodre v pronukleus jajčeca in prinese s seboj kromosom X ali Y, je spol kromosomsko določen. Pri sesalcih imajo osebkni ženskega spola en par spolnih kromosomov z dvema kromosoma X, XX, osebkni moškega spola pa en par X in Y, XY. Pri človeku imata oba spola po 22 parov avtosomskih kromosomov. Pri ženskem spolu sta v jajčnikih aktivna oba kromosoma X, medtem ko je povsod drugod po telesu en kromosom X utišan. Razvoj jajčnika je odvisen od prisotnosti dveh kromosomov X in odsotnosti kromosoma Y, medtem ko je kromosom Y odgovoren za determinacijo moškega spola (3).

Proces utišanja enega izmed kromosomov X (*angl.* X chromosome inactivation, XCI) je biološki proces, ki zagotavlja večjo enakost med izraženostjo genov na spolnih kromosomih med spoloma (*angl.* dosage compensation). Ključno vlogo v procesu XCI ima dolg nekodirajoč del RNA, ki je označen kot *Xist* in je zelo visoko ter specifično izražen samo pri utišanem kromosomu X (27). Delovanje in potek procesa utišanja še ni v celoti poznan. Že leta 1961 je bila Lyonova ena prvih, ki je menila, da je proces utišanja enega izmed kromosomov X pri mišjih samicah posledica delovanja genov in da izbira utišanega kromosoma X poteče naključno (28). To je dokazala s proučevanjem mišjih samic, ki so bile heterozigoti za gen za barvo kožuščka, ki je vezan na kromosom X. Na podlagi različno izraženih barv kožuščka je domnevala, da se je enkrat utišal očetov, drugič pa materin kromosom X (28). Kasneje so podobno potrdili tudi za ženske, kjer so ugotavljali, kateri izmed kromosomov X je utišan in ugotovili, da sta pri ženskah prisotni dve populaciji celic, in sicer ena, ki ima utišan očetov, in druga, ki ima utišan materin kromosom X. Zato so poimenovali tak fenotip kot mozaičen, ker se tudi celice znotraj istega organizma razlikujejo pri izraženosti genov, ki so vezani na kromosom X (X-vezani geni). Za laboratorijske miši pa to ne velja v popolnosti, saj so zaradi velikega parjenja v sorodstvu tako očetovski kot materini geni na kromosomu X že zelo podobni. O tem veliko piše in razpravlja Migeonova v knjigi z naslovom "Females are Mosaics, X inactivation and Sex Differences in Disease" (29).

Kakorkoli že, niso pa vsi geni na utišanem kromosomu X res utišani. Geni, ki se nahajajo na t.i. psevdo-avtosomski regiji (*angl.* pseudo-autosomal region, PAR) so

homologni oziroma sorodni genom na kromosomu Y in so odgovorni za rekombinacije med mejozo pri XY fenotipu, pa tudi nekateri drugi posamezni geni niso utišani. Za te gene pravimo, da so ušli utišanju. Pri ljudeh velja, da med 15 do 20 odstotkov X-vezanih genov popolnoma uide utišanju, 10 % pa le delno (30). Pri človeku se na kromosomu Y nahaja okoli 0,15 % vseh genov, kar pomeni 45 genov od približno 20.000, medtem ko jih je na kromosomu X kar 4,5 % ali 1.344 od 20.000 (31, 32, 11, 33).

O pomenu ravnovesja med spolnima kromosomoma, utišanju in prisotnosti obeh kromosomov, pričajo motnje in fenotipske posledice pri na primer odsotnosti drugega kromosoma X (XO), ki je pri ljudeh poznan kot Turnerjev sindrom. Takšne ženske imajo nedelujoče jajčnike, so neplodne, nižje rasti ... (34). Medtem ko sta pri moških poznana dva fenotipa, in sicer XXY – z dodatnim kromosom X, ki je poznan kot Klinefelterjev sindrom, in moški z dodatnim kromosomom Y, YYX, Jacobov sindrom. V obeh primerih so ti moški neplodni (35, 36). Pri ženskah je poznan tudi t.i. XXX kariotip oziroma 47, XXX sindrom, ki pa je nemalokrat spregledan, ker so te ženske običajno plodne, imajo pa različne anatomske nepravilnosti (npr. manjši obseg glave), kot tudi motnje v duševnem razvoju (več je razvojnih motenj v koordinaciji in gibanju, slušnem razumevanju, tudi disleksije, večja pojavnost psihiatričnih motenj) (37).

#### **2.1.2.1 Potek procesa utišanja enega izmed kromosomov X**

Pri miših poteče proces utišanja kromosoma X, XCI, dvakrat. V zgodnji fazi razvoja, na stopnji štirih do osmih celic, pride do utišanja očetovega kromosoma X v vseh celicah zarodka (38, 39). Malo kasneje v razvoju se ta kromosom ponovno aktivira v celicah notranje mase zarodka (embrioblast), medtem ko ostane utišan v ekstraembrionalnem tkivu (trofoblast). Drugič pride do XCI okoli 5,5 dneva embrionalnega razvoja (E5,5). Tokrat je proces utišanja naključen, tako imata očetov in materin kromosom X enako možnost utišanja. Ko je eden izmed kromosomov X utišan v drugem procesu utišanja, je ta kromosom utišan v vseh hčerinskih celicah (27).

Osrednjo vlogo pri XCI ima dolg nekodirajoč del RNA Xist (*angl.* X-inactive-specific-transcript), ki je prepis gena *Xist* in leži v predelu X inaktivacijskega centra (*angl.* X

inactivation center, Xic) na kromosomu X, kjer se nahaja gruča genov in zaporedij DNA, ki uravnavajo proces utišanja kromosoma X, XCI (40). Procesirani prepis *Xist* ovije Xi v *cis* obliko in vključi kromatinski kompleks vključno s PRC2 (jedrni komplement, *angl.* polycomb repressive complex 2), ki metilira lizin 27 na histonu H3 (H3K27me3) (41, 42, 43, 44). Za začetek XCI je tako *Xist* nujno potreben in ovije Xi v vseh diferenciranih somatskih celicah, kar so dokazali z vizualizacijo *Xist* RNA z metodo RNA FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija), kjer ti ovoji *Xist*-a tvorijo značilne "oblake" (45). Ko enkrat pride do stanja Xi, je to utišano stanje stabilno, se prenaša na hčerinske celice in je nepovratno. Ta proces poteče samo v ženskih celicah in je nujen proces za normalno delovanje celic (27).

Antagonist *Xist*-a je *Tsix*, ki je protismiselni prepis *Xist*-a in se v celoti prekriva s *Xist*-om (46). *Tsix* prav tako predstavlja nekodirajoča RNA, ki je prepis aktivnega kromosoma X (*angl.* active X, Xa) že pred in med nastopom XCI ter s tem prepreči delovanje *Xista*-a na ta kromosom (46).

### 2.1.3 Genetska spolna diferenciacija

Znano je, da se spolna diferenciacija začne kaj kmalu po združitvi spolnih celic. Pri človeškem zarodku moškega spola ima le-ta že dva dni po spočetju več celic kot zarodek ženskega spola. Poleg tega pa je tudi presnovna aktivnost pri moškem zarodku višja (47, 17).

Ključni gen za določitev spola je *SRY*, ki je iz enega eksona z zapisom za homeozaporedje (*angl.* high mobility group HMG-box) za vezavo na DNA (48). Mutacije v področju gena *SRY* imajo za posledico nepravilen razvoj mod ali celo njihovo odsotnost, kar so dokazali v več študijah (49, 50, 51, 52, 53).

Pri moškem se *SRY* začne izražati v Sertolijevih celicah pri E41 in je najbolj izražen na E44, potem se izraženost zniža in ostane nizka do konca embrionalnega razvoja. Prisotnost beljakovine *SRY* v jedrih Sertolijevih celic pri človeku so potrdili vse do odraslega obdobja (proučevali so moške do 32. leta starosti) (54). Pri mišjih samcih se *Sry* izraža v obdobju od E10,5 do E12,5, z največjo izraženostjo na E11,5, in sicer v telesnih celicah spolnega grebena, ki se kasneje razvijejo v Sertolijeve celice. Izraženost je prisotna le med embrionalnim razvojem (18, 19).



V razvijajočem se spolnem grebenu *Sry* aktivira gen *Sox9*, ki je avtosomski gen s pomembno vlogo pri gonadogenezi (55). Pri glodavcih se z vezavo *Sry* na področje TESCO (*angl.* testis-specific core enhancer of *Sox9*) na genu *Sox9* (55) v Sertolijevih celicah aktivira mreža genov, ki uravnavajo medcelično komunikacijo, migracijo in diferenciacijo v plodova moda. Homeo-zaporedje *Sry* (*Sry* HMG box) zagotavlja motiv podpisa za veliko družino prepisovalnih dejavnikov (*Sox*; *angl.* *Sry*-related HMG box), ki imajo pomembno vlogo pri razvoju in tkivno specifičnem uravnavanju (56). Sam gen *Sry* pa evolucijsko nastane s podvajanjem *Sox3* gena, ki je na kromosom X vezani član te družine (57). Gen *SOX9* se začne izražati v Sertolijevih celicah na E10,5 z največjo izraženostjo na dan E11,5. Njegovo izražanje sovпада z izražanjem *SRY*, zato domnevajo, da *SRY* posredno ali neposredno deluje na izražanje *SOX9* (58). Pomembno vlogo *Sox9* pri spolni diferenciaciji potrjujejo transgene miši, ki imajo izbrisan 150-bp velik regulatorni del *Sox9* in posledično se take samice razvijejo v sterilne XX samce, kljub odsotnosti *Sry* (59).

Poleg *Sry* so pri spolni diferenciaciji in razvoju spolnih žlez udeleženi še mnogi drugi geni. Prepisovanje *Sry* neposredno uravnava gen Wilmsovega tumorja 1 (*Wt1*, *WT1*; *opomba* – *zapis gena ležeče in z malimi tiskanimi črkami, kjer je samo prva črka velika tiskana predstavlja zapis mišjega gena, medtem ko ležeči zapis z velikimi tiskanimi črkami predstavlja zapis humanega gena*) (60). Pri miših je izražen v predelu mezonefrosa, metanefrosa in spolnega grebena že od E9 dalje (61). Miši, ki so brez gena *Wt1*, kažejo ženski fenotip ne glede na kromosomski spol, vendar zaradi odsotnosti ledvic odmrejo že pred rojstvom (62). Mutacije na genu *WT1* so znane tudi pri ljudeh kot sindrom Denis-Drash in Fraiser (63, 64, 65).

Gen *SF-1* kodira steroidogeni dejavnik 1 (*SF-1*, *NR5A1*), ki je prepisovalni dejavnik iz družine jedrnih receptorjev. *SF-1* ima ključno vlogo pri zgodnjem razvoju tako spolnih kot tudi nadledvičnih žlez ter delovanju primarnih steroidogenih tkiv, kot so skorja nadledvične žleze, Leydigove celice, rumeno telo, celice teke in celice granuloze (66). Pri miših se začne izražati že zgodaj, in sicer na E9. Pri samicah je

izražen le do E12,5, pri samcih pa ostaja izražen tako v jedrih Sertolijevih kot tudi Leydigovih celicah (67, 68). *SF-1* je ključen na kar treh stopnjah razvoja mod: 1. že pred začetkom spolne diferenciacije v spolnem grebenu sodeluje pri pripravi okolja za izražanje *Sry*; 2. v Sertolijevih celicah za uravnavo nastanka AMH in 3. v Leydigovih celicah ureja izražanje encimov, ki sodelujejo pri tvorbi steroidnih hormonov (69).

Na kromosomu X se nahaja gen *DAX1* (*angl.* dosage-sensitive sex-reversal, adrenal hyperplasia congenital X chromosome 1), ki prav tako sodeluje pri razvoju mod. Ob njegovi odsotnosti se Sertolijeve celice ne razvijejo, pride do motenj spermatogeneze, proliferacije in diferenciacije Leydigovih celic (70, 71, 72). Pri prekomernem izražanju *DAX1* pride do zavrtja delovanja *SRY*, *SF-1* in *SOX9* (73). Pri obeh spolih se *DAX1* izraža v prvi polovici embrionalnega razvoja, kasneje pa je prisoten samo pri ženskem spolu, kjer vpliva na razvoj jajčnikov oziroma zavira razvoj mod (74).

Razvoj spolnega sistema v ženskega velja za privzeti način razvoja. Genov, ki bi bili po vlogi sorodni *SRY* in *SOX9* pri razvoju moškega spolnega sistema, še niso dokazali. Dokazali pa so nekatere beljakovine, ki nastajajo v jajčniku in preprečujejo nastanek mod. Eden takih je produkt že prej opisanega gena *DAX1*. Drugi pa je *WNT4* (*angl.* wingless type MMTV (murine mammary tumor virus) integration site family, member 4), ki je pri ženskah izražen v jajčniku v drugi polovici nosečnosti, kjer vzdržuje število oocitov (17). To vlogo pri razvoju ženskega spolnega sistema so potrdili z mišmi brez gena *Wnt4*, kjer pri samicah pride do razvoja Wolffovih vodov in propada Müllerjevih, pri samcih pa je fenotip normalen (75). Tako se pri samicah brez *Wnt4* jajčniki ne razvijejo pravilno in njihove celice izražajo AMH ter encime, ki sodelujejo pri tvorbi testosterona. Na podlagi tega menijo, da *Sry* zavira izražanje *Wnt4* (49).

#### 2.1.4 Hormonska spolna diferenciacija

Pri primarni spolni diferenciaciji gre za razvoj spolnih žlez, jajčnikov ali mod, iz bipotentne zasnove. Ko so spolne žleze že razvite, se začne sekundarna spolna diferenciacija – razvoj ženskega ali moškega fenotipa, ki poteka pod vplivom hormonskega izločanja jajčnikov ali mod. Tako ženska kot moška sekundarna spolna diferenciacija potekata v dveh fazah, in sicer se prva odvije že za časa embrionalnega razvoja, druga pa med puberteto.

Med embrionalnim razvojem hormoni parakrino uravnavajo razvoj gonad in sekundarnih spolnih organov. Pri osebkih ženskega spola so prisotni Müllerjevi vodi, ki se kasneje po vplivom estrogenov razvijejo v maternico, maternični vrat, jajcevod in zgornji del vagine. Wolffovi vodi pa zaradi odsotnosti testosterona propadejo. Pri razvoju moškega fenotipa sta tako pomembna dva testikularna faktorja, in sicer AMH (anti-müllerjev hormon) in testosteron. AMH izločajo Sertolijeve celice in s parakrinim delovanjem povzroči propad Müllerjevih vodov pri miših med E16 in E21, pri človeku pa osmi do deveti teden *intra uterinega* razvoja. Na izločanje AMH imajo direkten vpliv SOX9 skupaj z SF-1, WT1 in GATA4 (beljakovina, ki veže GATA; *angl.* GATA binding protein). AMH deluje preko receptorjev tipa 2, vendar se njihovo število postopoma zmanjšuje. Zato ima AMH manjši vpliv, kljub izločanju med embrionalnim razvojem in do pubertete (76). Pri podganah začnejo FLC izločati testosteron med E18,5 in E19,5, pri miših okoli E16,5, pri človeku pa med dvanajstim in devetnajstim tednom razvoja (77, 26). Začetek tvorbe testosterona v FLC je neodvisen od LH (luteinizirajoči hormon). V hipofizi podgan LH zaznamo šele E16, v plazmi pa E17 (77). Poleg testosterona pa FLC izločajo tudi inzulinu podoben rastni faktor 3 (INSL3), ki je pomemben za razvoj gubernakuluma mod in zgodnji spust mod v trebušni votlini, kasnejši spust v modnik pa je pod vplivom testosterona (72). Pod vplivom testosterona, ki ga izločajo Leydigove celice, se Wolffovi vodi razvijejo v nadmodek, semenovod, sekundarne spolne žleze ter ejakulatorni aparat (3).

V zgodnjem obdobju razvoja jajčnikov pri samicah glodavcev se zarodne celice hitro mitotično delijo med E14 in E15. Meiotična delitev se najprej pojavi v bližini mezonefrosa v sredini jajčnika, zato je verjetno, da mezonefros izloča neko snov, ki sproža mejozo (17).

Veliko raziskav v zadnjem desetletju proučuje neposredni vpliv spolno vezanih genov na možgane (78).

## **2.2 RAZLIKE MED SPOLOMA V MOŽGANIH**

Da so možgani spolno dimorfen organ, je zdaj že dobro znano, vendar na prvi pogled, s prostim očesom, ne moremo določiti njihovega spola. V možganih poznamo razlike med spoloma na ravni celotnih možganov, na posameznih področjih in na celični ravni. Razlike na posameznih področjih pomenijo razlike v velikosti področja, številu celic in položaju strukturnih elementov v posameznem možganskem jedru, v številu gradnikov, ki izražajo določeno beljakovino ali drugo biološko aktivno molekulo. Na celični ravni pa to pomenijo razlike v ultrastrukturi elementov živčnega sistema, velikosti celičnega telesa, jedra ali jedrca, številu in vrsti sinaptičnih povezav ter morfologiji dendritov (79).

### **2.2.1 Nastanek razlik med spoloma v možganih**

Številne študije v zadnjih stotih letih so proučevale in potrdile razlike med spoloma v možganih. Tako imamo prve raziskave že iz začetka 20. stoletja, ki so postavile temelje (80, 81, 14), in kasnejše iz druge polovice 20. ter začetka 21. stoletja, ki so jih potrdile in nadgradile (82, 15, 83, 84, 85, 78).

Za nastanek razlik med spoloma v možganih so ključni spolni steroidni hormoni, ki jih pretežno izločajo spolne žleze. To izločanje pri vretenčarjih običajno poteka skozi celotno življenjsko obdobje, vendar se dinamika izločanja in vrsta hormona razlikuje tako med spoloma kot med vrstami. Vpliv spolnih steroidnih hormonov na možgane je lahko trajen (t.j. organizacijski vpliv) in/ali začasen oziroma prehoden (t.j. aktivacijski vpliv). Pri večini sesalcev spolni hormoni vplivajo na strukturo možganov predvsem v dveh obdobjih, in sicer v perinatalnem obdobju in v času pubertete (79).

Prisotnost oziroma odsotnost spolnega kromosoma Y ima neposreden vpliv na razvoj spolnih žlez in s tem na primarni nastanek razlik med spoloma. S spolno diferenciacijo gonad pride do prvih razlik pri izločanju spolnih hormonov, in sicer pri moškem spolu že pred rojstvom moda začnejo izločati testosteron. Pri miših

pride do prvega vrha izločanja testosterona pri E17 in potem še enkrat takoj po rojstvu (86, 87). Testosteron in AMH, ki ju izločata plodova moda, privedeta do trajnega razvoja moškega fenotipa. Testosteron je tisti, ki je odgovoren za maskulinizacijo možganov. V možganih se testosteron pri večini sesalcev s pomočjo katalitičnega encima aromataze pretvori v estradiol, ki preko vezave na estrogenske receptorje (ER) povzroči maskulinizacijo (88) hipotalamusa in z njim povezanih struktur, vključno z vzpostavitvijo povezav, ki so potrebne za moško spolno obnašanje, predvsem kopulacijo (89). Prav tako pa estradiol preko ER pri samcih v istih možganskih jedrih zavre nastanek povezav, ki so potrebne za razvoj ženskega sprejemljivega ali receptivnega spolnega obnašanja. To sta dva ločena procesa, ki ju označimo kot maskulinizacija in defeminizacija (89). Kako ta sistem deluje pri samcih, še ni natančno poznano.

Pri proučevanju razlik med spoloma v obnašanju in možganih pri glodavcih lahko rečemo, da so le-te posledica treh neodvisnih naravnih procesov, in sicer *feminizacije*, ki je privzeta oblika razvoja in privede do izražanja lordoze (pod ustreznimi hormonskimi pogoji), *maskulinizacije*, ki poteče pod vplivom testosterona oziroma njegovega metabolita estradiola že v prenatalnem obdobju in ima za posledico moško značilno kopulatorno obnašanje v odraslem obdobju, ter *defeminizacije*, ki se prav tako odvija pri moškem fenotipu med delovanjem estradiola preko ER in povzroči izgubo zmožnosti značilnega ženskega spolnega obnašanja (90). Maskulinizacija in defeminizacija pri samcih običajno potekata v tandemu, kjer je estradiol tisti, ki je v možganih odgovoren za njiju. Tu se pojavi vprašanje, zakaj potem niso tudi plodovi ženskega spola maskulinizirani, saj so prav tako izpostavljeni estrogenom, ne lastnim, ampak materinim in estrogenom posteljice, ki prehajajo do ploda. Pri miših so ugotovili, da jetra ploda izločajo  $\alpha$ -feto protein, ki z močno afiniteto nase veže estrogene in to naj bi preprečilo maskulinizacijo pri plodu ženskega spola (88). Z raziskavami na miših brez gena za  $\alpha$ -feto protein (AFP KO) so to vlogo potrdili, saj so bile potomke AFP KO maskulinizirane tako v možganih kot v obnašanju zaradi izgube zaščite pred materinimi estrogeni (91). Kljub temu, da velja ženski fenotip možganov za privzeto obliko diferenciacije, so za njihov razvoj potrebni estrogeni. To so dokazali z uporabo miši brez gena za aromatazo (ArKO), ki je ključen encim pri

nastanku estrogenov. Pri potomkah miši ArKO so ugotovili, da kažejo zmanjšano spolno sprejemljivost in so manj občutljive na vohalne dražljaje (91). Ne samo prenatalno, prisotnost estrogenov je potrebna tudi postnatalno in v času pubertete, za izražanje značilnega ženskega spolnega obnašanja (92), kar je potrdila tudi nedavna raziskava (93).

Steroidni hormoni, ki lahko med razvojem delujejo na plod, izvirajo še iz drugih virov, saj nastajajo tudi v nadledvični žlezi (7), centralnem živčnem sistemu, kjer jim pravimo nevrosteroidi, (94, 95) ali pa pridejo od sosednjih plodov (96) ali so popolnoma eksogenega izvora, iz hrane in vode (npr. fitoestrogeni) (97, 98).

Nedavne študije so dokazale, da so tudi spolni kromosomi neposredno odgovorni za nastanek razlik med spoloma v možganih in da ne delujejo samo preko hormonov, ki jih izločajo spolne žleze. Dewingova in njeni sodelavci so s hibridizacijo *in situ* potrdili prisotnost prepisov *Sry* v predelu črne substance v nevronih srednjih možganov, ki izražajo tirozinsko hidroksilazo, in v skorji pri podganah in pri miših (99).

De Vries in sodelavci so na mišjem modelu premaknili *Sry* s kromosoma Y na avtosom in s tem dosegli, da pride do razvoja testisov neodvisno od prisotnosti kromosoma X in Y. Pridobili so štiri genotipe miši (*angl.* four core genotype – FCG), in sicer XX samice (brez gena *Sry*, miš z jajčniki, ženski fenotip), XY samice z izbranim genom *Sry* na kromosomu Y (XY *Sry*<sup>-</sup>, miši z jajčniki, ženski fenotip), XY samce, ki imajo gen *Sry* premaknjen na avtosom (miš s testisi, moški fenotip) in XX samci z genom *Sry* na avtosomu (XX *Sry*, miši s testisi, moški fenotip). Pri obeh skupinah s testisi, torej pri samcih XX*Sry* in XY, so ugotovili gostejšo prisotnost vlaken, ki izražajo arginin vazopresin (AVP) v stranskem pretinu (LS), torej pri obeh moških skupinah. Poleg razlik v izražanju AVP so pri samcih ugotovili tudi razlike v testih obnašanja (100).

Kar nekaj različnih študij je v zadnjih letih dokazalo, da so spolno vezani geni izraženi tudi v možganih. Z metodama qPCR in northern prenosom so dokazali izražanje genov, ki so vezani na kromosom Y in kromosom X v možganih tako samcev kot samic, ne glede na prisotnost spolnih hormonov (101). Z analizo izražanja genov na DNA-mikromrežah so v možganih samcev in samic ugotovili

prisotnost večjega števila genov vezanih na spolne kromosome (102, 103). V nedavni raziskavi so potrdili izraženost nekaterih spolno vezanih genov že pri zarodkih pred razvojem spolnih žlez (E11,5) in tik pred rojstvom (E18,5) (104).

### **2.2.2 Spolno različna področja v možganih**

Eno najbolj raziskanih in proučevanih spolno dimorfnih področij v možganih je zagotovo preoptično področje (*angl.* preoptic area; POA), ki se nahaja v rostro-ventralnem delu možganov, med sprednjo komisuro (*angl.* anterior commissure) in optičnima živcema (*angl.* optic tract), na kaudalnem delu pa se stika s sprednjim delom srednjega hipotalamusa (*angl.* anterior hypothalamus, AH) in z medialnim delom spodnjega jedra končne strije (*angl.* bed nucleus of stria terminalis-medial, BNSTM). Osrednji ali medialni del POA (*angl.* medial preoptic area, MPOA) ima pomembno vlogo pri uravnavanju reproduktivnega oziroma spolnega obnašanja ter pri endokrinih procesih. Pri podganjih samcih se v MPOA nahaja center za uravnavanje kopulatornega obnašanja (105, 106), pri samicah pa za materinsko obnašanje, lordozo ter uravnava ciklično izločanje gonadotropinov (107, 108). V več raziskavah so pri podganah in mongolskih skakačih ugotovili, da so nevroni, ki izražajo eno izmed oblik estrogenskega receptorja (ER), sposobni vezati estrogene tako med fetalnim življenjem kot tudi v odraslem obdobju (109, 110, 111, 112, 113). Prisotnost estrogenskih receptorjev (ER) v POA so potrdili tudi pri dihurjih (114). Število ER in mest za vezavo estrogenov pa je pri samicah večje kot pri samcih (115). Podobna razlika med spoloma naj bi bila tudi pri androgenskem receptorju (AR) pri podganah (116, 117). Znotraj MPOA se nahaja jedro, ki se po obliki, površini in prostornini močno razlikuje med spoloma. Pri podganah so ga poimenovali kot spolno dimorfno jedro preoptičnega področja ali SDN-POA (*angl.* sexually dimorphic nucleus of the POA) in je pri samcih dva in pol do petkrat večje kot pri samicah (118). Podobno spolno dimorfno področje v POA so opisali še pri več živalskih vrstah (110, 119, 120, 121, 122) in tudi pri človeku (123, 124). Tudi pri miših so preiskovali to področje, vendar z metodo barvanja po Nisslu niso našli razlik (125). Medtem ko so z označevanjem celic, ki izražajo androgenski receptor (AR) in kalbindin D-28k (*angl.* calbindin, Calb), določili mejo, kjer naj bi se pri miših nahajalo spolno dimorfno področje, podobno kot pri podganah (126).

Nastanek razlik v SDN-POA je posledica delovanja spolnih hormonov na možgane, in sicer v odvisnosti od starosti pri izpostavljenosti ter od živalske vrste. Pri tretiranju odraslih podgan s testosteronom niso dosegli vpliva na prostornino jedra (118), medtem ko so pri odraslih mongolskih skakačih to uspeli doseči (110). Ko so kmalu po skotitvi tretirali podganje samice s testosteronom, so dosegli povečanje prostornine SDN-POA. Če pa so v istem obdobju samce kastrirali, se je prostornina SDN-POA zmanjšala in postala podobna tisti pri samicah (118, 127, 112). Pomemben vpliv spolnih hormonov pred rojstvom na razvoj jedra SDN-POA so dokazali na potomcih podganjih samic, ki so bile v času brejosti tretirane s testosteronom (128). S tem tretiranjem pa niso dosegli razlik pri spolnem obnašanju v odraslem obdobju. Ko so tretirali živali tako pred kot po rojstvu, so dosegli morfološko spremembo fenotipa jedra, kar pomeni da so imele tretirane podganje samice jedro primerljive velikosti kot netretirani samci. Podobno so tudi pri drugih živalskih vrstah dokazali, da imajo estrogeni v embrionalnem obdobju ključno vlogo pri oblikovanju SDN-POA (129, 130, 131, 120, 132, 133). Razlike med spoloma v velikosti SDN-POA so lahko posledica različnih pojavov med razvojem možganov, ki potekajo pod vplivom delovanja spolnih hormonov, in sicer v nevrogenezi, apoptozi ali potovanju živčnih celic (134). V nevronih MPOA so z imunohistokemičnim barvanjem ugotovili, da se encim dekarboksilaza glutaminske kisline (*angl.* glutamic acid decarboxylase; GAD67), ki sodeluje pri biosintezi nevrottransmitterja GABA (*angl.* gamma-aminobutyric acid, gama aminobutirična kislina), pri podganah izraža spolno dimorfno (135). Različno izraženost so potrdili še na dan P10 (po rojstvu, *angl.* postnatal; P), na dan P15 pa razlika v izraženosti GAD67 ni bila več prisotna (136). Bach in sodelavci so z uporabo agonista receptorjev GABA, muscimola, pokazali morebiten neposredni vpliv nevrottransmitterja GABA na razvoj POA, saj je tretiranje z muscimolom povzročilo zmanjšanje prostornine SDN-POA pri samcih, pri samicah pa tega vpliva ni bilo (137). Na podlagi te študije bi lahko rekli, da ima tretiranje z muscimolom na SDN-POA enak učinek kot kastracija, s to razliko da so mehanizmi delovanja muscimola neodvisni od steroidnih spolnih hormonov.

V raziskavah, kjer so poškodovali SDN-POA pri podganjih samcih niso ugotovili bistvenih sprememb v kopulatornem obnašanju (138, 139). Po popolni poškodbi



MPOA so pri podganjih samicah ugotovili močno zavrtje materinskega obnašanja (140). Delna poškodba MPOA pa ni povzročila bistvenih odstopanj pri materinskem obnašanju samic (140).

Amigdala se nahaja pod anteriorno-medialnim delom možganske skorje rostralno od hipokampusa. Amigdala je del limbičnega sistema in sestavljena iz več jeder. Eno izmed najbolj spolno dimorfnih jeder amigdale je medialni del (*angl.* medial amygdala, MeA), ki sodeluje pri uravnavanju spolnega obnašanja tako pri samcih (erekcija – (141)) kot pri samicah (lordoza, izločanje prolaktina in luteinizirajočega hormona (LH) – (142)), pri agresivnem obnašanju (143) in pri igri mladičev moškega spola (144). Področje MeA je po velikosti večje pri samcih kot pri samicah (145, 146). Tu so tudi telesa nevronov pri samcih večja v primerjavi s samicami (147, 79, 148). O vplivu spolnih steroidnih hormonov na razvoj MeA je bilo narejenih veliko raziskav, vendar je na tem področju še vedno veliko nejasnega (149, 150, 151). Nishizuka in Arai sta pokazala pomen estrogenov pri razvoju MeA pri samcih in vpliv na maskulinizacijo obnašanja (152, 153). Pri podganah so ugotovili, da je število povezav med nevroni v MeA pri samcih večje kot pri samicah. Nastajanje teh sinaps naj bi urejali spolni steroidni hormoni v zgodnjem obdobju po rojstvu (154). Podobne razlike v MeA so odkrili tudi pri miših seva BALB/c (148), medtem ko takih razlik pri miših seva C57BL/6J niso ugotovili (79).

Področje stranskega oziroma lateralnega pretina (*angl.* lateral septum, LS), ki se nahaja anteriorno-dorzalno od predoptičnega področja ob stranski možganski kletki, sodeluje pri uravnavanju neagresivnih socialnih vrstah obnašanja (155), (156). V LS so aksoni nevronov iz spodnjega jedra končne strije (BNST) in amigdale, ki izražajo arginin vazopresin (AVP). Gostota teh aksonov je pri različnih živalskih vrstah večja pri samcih kot pri samicah (157). Da pa je vsebnost AVP v LS odvisna od spolnih hormonov, so dokazali z odstranitvijo spolnih žlez, po kateri niso več zaznali prisotnosti AVP v LS. To izražanje pa so ponovno izzvali s tretiranjem s testosteronom pri obeh spolih. Na spolno različno izraženost AVP pa naj bi neposredno vplivali tudi spolni kromosomi, kar so dokazali z uporabo

mišjega modela, kjer so imeli štiri različne genotipe, in sicer XX in XY samice z jajčniki ter XY in XX samce z modi (ta model miši je opisan v poglavju 2.2.1) (100).

Vomeronazalni sistem (VNS) je pri glodavcih spolno dimorfno zgrajen. Sestavljajo ga vomeronazalni organ in številna možganska jedra: področje pomožnega vohalnega betiča (*angl.* accessory olfactory bulb, AOB), spodnje jedro pomožnega vohalnega trakta (*angl.* bed nucleus of accessory olfactory tract, BOAT), MeA, BNST, MPOA, AVPV in VMH (79). Ker VNS sodeluje pri prenosu odzivov na dražljaje, ki jih izzovejo feromonske molekule v vomeronazalnem organu, do možganskih jeder, mu pripisujejo ključno vlogo v uravnavanju razmnoževanja pri glodavcih (158).

Anteroventralni del periventrikularnega jedra (*angl.* anteroventral periventricular nucleus, AVPV) se nahaja bilateralno ob razširitvi tretje možganske kletke (*angl.* third ventricle, 3V), v rostralnem delu MPOA in je odgovoren za izločanje sproščujočega hormona gonadotropinov (*angl.* gonadotropin-releasing hormone; GnRH). Tudi v AVPV so prisotne spolno dimorfne razlike. Ugotovili so, da imajo samice večjo prostornino jedra in da je v njem več celic (159). Kasneje so ugotovili, da je za nastanek teh razlik odgovoren testosteron v fetalnem življenju, saj so pri samicah podgan, ki so bile tretirane s testosteronom ugotovili, da se je število celic v AVPV zmanjšalo, medtem ko se je število celic pri kastriranih samcih povečalo v primerjavi s kontrolnimi samci (160). Kot posledica večjega števila nevronov je pri samicah tudi več nevronov, ki izražajo beljakovino tirozinsko hidroksilazo, ki je vključena v biosintezo dopamina (160). Po drugi strani pa je presenetljivo, da so v AVPV pri samcih ugotovili večjo prisotnost nevronov, ki izločajo opioidni peptid enkefalin, kar kaže, da spolni steroidni hormoni vplivajo na specifično populacijo celic med razvojem tudi znotraj enega jedra (161).

Spodnje jedro končne strije (*angl.* bed nucleus of the stria terminalis; BNST) sodeluje pri endokrinem uravnavanju spolnega obnašanja, iskanju partnerja in izražanju lordoze (162, 163). BNST je del vohalnega sistema in povezuje medialnega dela amigdale (*angl.* medial amygdala, MeA) in hipotalamusa ter

drugih bazalnih delov sprednjih možganov. V njem se končujejo eferentne povezave MeA (164). Razlike med spoloma so prisotne samo v posameznih delih BNST, medtem ko se celotna prostornina jedra med spoloma ne razlikuje. Tako so spolno dimorfne razlike prisotne v medialno-posteriornem delu (BNSTMP), ki je pri podganjih samcih večji kot pri samicah (145) in vsebuje tudi večje število celic (165). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi pri morskih prašičkih (119) in ljudeh (166). V lateralno-anteriornem (BNSTLA) in medialno-anteriornem (BNSTMA) delu BNST pa so ugotovili ravno nasprotno, da imajo samice večje število nevronov kot samci (118, 108).

Ventromedialno jedro hipotalamusa (*angl.* ventromedial nucleus of the hypothalamus, VMH) je spolno dimorfen del hipotalamusa, ki leži v srednjem delu hipotalamusa, bilateralno od tretje možganske kletke. Nevroni VMH se povezujejo z mnogimi drugimi možganskimi jedri, kot so supraoptično jedro (*angl.* supraoptic nucleus, SON), arkvatno jedro (*angl.* arcuate nucleus, Arc), mediana eminenca, amigdala, POA, jedri srednjih možganov in podaljšane hrbtenjače. Jedro VMH razdelimo na tri podpodročja, in sicer dorzo-medialno, centralno in ventrolateralno, ki se med seboj razlikuje po izraženosti beljakovin, dovodnih povezavah in vlogi (167). VMH ima pomembno vlogo pri uravnavanju razmnoževanja, predvsem materinskega obnašanja in lordoze, in energetskega stanja v telesu (107). Prostornina VMH je pri podganah večja pri samcih, sami nevroni pa so večji pri samicah (168). Pri samcih, ki so jih kastrirali že na P1, so dosegli feminizacijo VMH, kar se je kazalo kot zmanjšano področje in povečana velikost nevronov v primerjavi s kontrolnimi samci (168). Ob prisotnosti estrogenov in progesterona so takšni samci izražali lordozo. Pri mišjih samcih so ugotovili večje število nevronov, ki izražajo nevrnalno sintazo dušikovih oksidov (*angl.* neural nitric oxide, nNOS), kalbindin D-28k in ER (169, 170, 171). Večje število nevronov, ki izražajo holecistokinin, pa so odkrili pri podganjih samcih (172). Več različnih študij je dokazalo, da se v VMH nekatere beljakovine izražajo različno med spolnim ciklusom, kar kaže na vpliv spolnih steroidnih hormonov na to izražanje (173, 174, 175).

Hipokampus je del najstarejšega dela možganske skorje in je sestavljen iz več področij, in sicer iz hipokampususa (*Amonov rog, CA*), hipokampusove vijuge (*gyrus parahippocampalis*), nazobčene vijuge (*gyrus dentatus*), hipokampusovega vlakna (*fimbria hippocampi*) in svoda (*fornix*). Področje hipokampususa je odgovorno za učenje in prostorsko orientacijo. Pri različnih sevih miši so dokazali razlike med spoloma v številu živčnih celic v področju hipokampususa (176).

### **2.2.3 Spolno dimorfna področja v možganih pri ljudeh**

Proučevanje razlik med spoloma v možganih pri ljudeh nam odpre številna vprašanja. Če imajo spolni steroidi ključno vlogo pri maskulinizaciji možganov pri živalih ali imajo takšno vlogo tudi pri človeku? Ali se moški in ženske različno obnašamo zaradi tega, ker so moški že prenatalno izpostavljeni večji količini testosterona? Ali se obnašamo različno, ker so vloge posameznega spola že indoktrinirane v naši družini in v družbi? Zaradi kompleksnosti človeškega obnašanja, ki je pod močnimi družbenimi vplivi, je na ta vprašanja zelo težko odgovoriti. Zagotovo na diferenciacijo človeških možganov vpliva preplet večih dejavnikov vse od hormonskih, genetskih in v veliki meri družbenih in okoljskih. Kljub temu so na nivoju zgradbe možganov poznane nekatere razlike med spoloma tudi pri ljudeh, tako v velikosti posameznih delov oziroma področij možganov kot na funkcionalni ravni.

Pri človeku je tudi najbolj raziskano in opisano spolno dimorfno jedro v predoptičnem področju, ki je poimenovano kot intersticialno jedro sprednjega hipotalamusa (*angl. interstitial nucleus of anterior hypothalamus 1; INAH1*) in je del intersticialnih jeder 1, 2, 3 in 4 v predoptičnem področju (*INAH1,2,3,4*). Jedro *INAH1* naj bi bilo pri moških večje kot pri ženskah in naj bi pri moških vsebovalo tudi večje število celic (123, 124). V kasnejši raziskavi so ugotovili razlike v področjih *INAH2* in *INAH3*, niso pa potrdili razlik v *INAH1* (124).

V zadnjih desetletjih se je več raziskav ukvarjalo s proučevanjem razlik v možganskem prečniku (*corpus calosum; cc*) pri otrocih (177) in pri odraslih (178) (179). V nedavni raziskavi so z magnetno resonanco (MR) opravili meritve možganskega prečnika pri odraslih ljudeh (starost od 18 do 94 let) in ugotovili, da

je to področje pri ženskah signifikantno večje kot pri moških. Pri obeh spolih pa so ugotovili, da se področje s starostjo zmanjšuje (180).

Nekatere razlike med spoloma, kjer sta močno povezana razvoj možganov pod vplivom spolnih hormonov in posledično obnašanje ljudi, lahko proučujemo pri nekaterih prirojenih napakah kot sta prirojena hiperplazija nadledvične žleze (*angl.* adrenal hyperplasia congenita, AHC) pri ženskah in popolna neodzivnost na androgene zaradi okvare androgenskega receptorja (AR) pri moških. Ženske z AHC so že v času embrionalnega razvoja izpostavljene višjim koncentracijam androgenov, ki jih izločajo nadledvične žleze. Pri takih ženskah je značilno, da je njihovo obnašanje bolj podobno značilnemu moškemu obnašanju in da jih pogosteje spolno privlačijo ženske (181, 182). Moški, ki imajo AR popolnoma neodzivne na androgene, so po videzu bolj podobni ženskam, moda ostanejo v trebušni votlini, razvite imajo zunanje ženske spolne organe in običajno imajo slabšo prostorsko predstavo in boljše komunikacijske sposobnosti, kar običajno bolj pripisujejo ženskam (183).

## **2.3 MIŠI BREZ GENA ZA STEROIDOGENI DEJAVNIK 1**

### **2.3.1 Steroidogeni dejavnik 1 – SF-1**

Steroidogeni dejavnik 1 (*angl.* steroidogenic factor 1; SF-1, NR5A1) je član družine jedrnih receptorjev, kamor uvrščamo tudi beljakovino vinske mušice FTZ-F1 (*angl.* Fushi tarazu factor 1) in homolog jetrnega receptorja LRH-1 (*angl.* liver receptor homolog) pri vretenčarjih (184). SF-1 vsebuje dva cinkova prsta, preko katerih se veže na DNA. Vsa tri področja, in sicer področje prvega heliksa – P, povezovalno področje in področje drugega heliksa – D, so visoko ohranjena med vrstami, pri sesalcih celo 100-odstotno (185). Področje P omogoča prepoznavanje veznega mesta za DNA, področje D pa sodeluje pri nastanku beljakovinske dimere in prepozna velikost presledka med veznima mestoma (186).

Najprej je bil SF-1 opisan kot ključni urejevalec izražanja različnih encimov iz skupine citokromov P450 (184). V nadaljnjih raziskavah so ugotovili, da se SF-1 izraža v različnih tkivih, in sicer v gonadah, skorji nadledvične žleze, možganih v VMH in v parenhimu vranice (187). V teh tkivih uravnava prepisovanje številnih

genov kot so encimi, ki sodelujejo pri nastanku steroidnih hormonov, steroidnega akutnega regulatornega proteina, receptorja za adrenokortikotropni hormon (ACTH), antimüllerjevega hormona,  $\alpha$ -podenote glikoproteinskih hormonov,  $\beta$ -podenote LH in FSH in njihovih receptorjev, receptorja GnRH in drugih (188). SF-1 je prvotno spadal v skupino jedrnih receptorjev sirot, za katere ni točno znano ali je za njihovo delovanje potrebna vezava z drugo spojino ali so v celici aktivni sami. Nato pa je Li s sodelavci ugotovil, da se SF-1 lahko aktivira z metaboliti holesterola (189). Znano je, da ima SF-1 pomembno vlogo pri razvoju in delovanju endokrinega sistema in je nujno potreben pri spolni diferenciaciji. Če v času embrionalnega razvoja *SF-1* ni prisoten, se spolne žleze in nadledvična žleza ne razvijejo, zato se vse miši, ki so brez *SF-1* (SF-1KO), fenotipsko razvijejo kot samice ne glede na genetski spol (190, 191).

Pri mišjih zarodkih so deveti dan embrionalnega razvoja, ko še ni mogoče ločiti med spoloma, z metodo *in situ* hibridizacije potrdili izraženost prepisa *SF-1* v embrionalni zasnovi gonad. Pri E12,5 so z isto metodo dokazali *SF-1* v zasnovi za nadledvične žleze in vmesnih možganov ter v že diferenciranih gonadah. Pri odraslih miših so ugotovili izraženost *SF-1* na ključnih mestih poteka steroidogeneze – v celicah skorje nadledvične žleze, v Leydigovih celicah moda ter v celicah teke in granuloze v jajčniku (67, 192), kar kaže na pomembno vlogo *SF-1* v embrionalnem razvoju in tudi kasneje tako pri steroidogenezi.

### 2.3.2 Priprava transgenih miši brez *SF-1*

S pripravo miši z mutiranim genom *SF-1* se je ukvarjalo več raziskovalnih skupin. Sadovsky in njegovi sodelavci so odstranili del tretjega eksona, ki nosi zapis za vezavo na DNA in ki ga vsebujejo vse izooblike gena *SF-1*. Iz genomske knjižnice miši seva 129Sv so izolirali 14-kb velik genomski klon gena *SF-1*. Sto nukleotidov dolgo zaporedje, regijo med dvema *Pml* 1 (znotraj prvega in drugega cinkovega prsta – domena, ki se veže na DNA), so nadomestili s PGK-neomicinsko kaseto. Ta transgeni konstrukt so z elektroporacijo vnesli v celične linije ES RW4 iz mišjega seva 129Sv. Homologe rekombinate so odbrali z analogom neomicina in jih testirali s prenosom po Southernu. Odbrane celice so injicirali v blastulo seva

C57BL/6 in le-to vnesli v psevdogavidno samico istega seva (193). Na podoben način so do transgenih miši prišli tudi Luo in njeni sodelavci (69). Tretja skupina je odstranila nekoliko večje področje kot prejšnji dve, in sicer na eksonu 5 (194). Nekoliko kasneje je ena izmed skupin inaktivirala gen s spremembo začetne aminokisljine, in sicer so metionin zamenjali z izolevcinom. Uporabili so metodo ciljanja genov in s tem dosegli selektivno omejeno izražanje genov *SF-1* in *ELP3*, ne pa *ELP1* in 2 (195).

Pri vseh poskusih so imele mutacije v genu *SF-1* skoraj enake posledice za razvoj in delovanje endokrinega sistema (196).

### **2.3.3 Fenotip miši z mutacijo v genu *SF-1* in njihova uporabnost**

V odsotnosti *SF-1* v embrionalnem razvoju se spolne žleze in nadledvična žleza ne razvijejo, zato se vse miši brez gena *SF-1* (*angl.* SF-1 knockout, SF-1 KO) fenotipsko razvijejo kot samice ne glede na genetski spol (190, 191). Razvoj spolnega grebena pri miših SF-1KO poteka normalno do E10,5. Po tem času začnejo celice v procesu apoptoze propadati in vsi zametki spolnih in nadledvičnih žlez propadejo do E12,5. Ker miši SF-1 KO nimajo nadledvične žleze, kmalu po rojstvu poginejo. Z dnevno aplikacijo mešanice kortikosteroidov in kasnejšo presaditvijo nadledvične žleze jim omogočimo preživetje in s tem možnost raziskovanja odraslih živali (197). Več o tem v poglavju o materialih in metodah.

Nepravilnosti v strukturi VMH so dokazali pri novorojenih (198) in pri odraslih miših brez *SF-1* (197). Pri odraslih SF-1 KO so poleg strukturnih in funkcionalnih nepravilnosti v VMH ugotovili pozen nastanek debelosti, za kar naj bi bilo odgovorno zmanjšano gibanje živali in ne več zaužite hrane (197).

Miši brez gena *SF-1* so edinstven model za proučevanje hormonsko neodvisnih spolnih razlik v možganih, saj zaradi odsotnosti *SF-1* niso nikoli izpostavljeni endogenim steroidnim hormonom.

## 2.4 OBNAŠANJE

### 2.4.1 O obnašanju in o proučevanju obnašanja

Obnašanje predstavlja povezavo med organizmi in okoljem ter med živčnim sistemom in ekosistemom. Obnašanje ima pomembno vlogo v življenju živali, saj je ključno pri biološkem prilagajanju. Pri ljudeh je obnašanje način definicije našega življenja, komunikacije, interakcije z drugimi, s seboj in z okoljem.

Zapisi o začetkih proučevanja obnašanja živali izvirajo iz časa Darwina, ki je natančno opisoval in zapisoval svoja opažanja.

Pred štirimi desetletji je skupina priznanih znanstvenikov prejela Nobelovo nagrado iz fiziologije ali medicine s področja obnašanja živali. To so bili von Frisch, Lorenz in Tinbergen, ki so bili nagrajeni za odkritja o individualnih in socialnih vzorcih obnašanja.

Današnje študije na živalih običajno izvajamo v laboratorijih in ne v naravnem okolju, saj tako lažje zagotovimo standardne pogoje in čim bolj izključimo faktor vpliva zunanjega okolja ter s tem zagotovimo večjo mero možnosti ponovitve meritve. Zaradi kompleksnosti samega proučevanja obnašanja so pri takih študijah velikokrat vključene različne vede: anatomija, fiziologija, genetika, biokemija, ekologija, farmakologija ... Seveda je tako proučevanje ljudi zelo težko, zato se s tem ukvarja še več ved, kot so sociologija, psihologija, antropologija, filozofija in druge. Njihova dognanja se močno prepletajo in povezujejo.

Kaj sploh obnašanje je? Definicijo sta postavila že pionirja behavioristike v sredini prejšnjega stoletja, Skinner in Hebb, ki sta v različnih delih zapisala, da so obnašanje vsi zaznavni procesi, ki nastanejo kot odziv živali na določeno spremembo, ki lahko pride iz notranjosti telesa ali zunanjega sveta (199). Tako obnašanje obsega vse od preprostega giba okončine do kompleksnih socialnih interakcij. Ko proučujemo obnašanje, ga moramo razdrobiti na posamezne enote, ki jih lahko prepoznamo, ocenimo, ovrednotimo vsakič, ko se pojavijo. Včasih je to preprost gib, kot na primer premik očesne veke, običajno pa je to zaporedje akcij, ki imajo za posledico nek funkcionalen izid kot je hranjenje ali beg pred plenilcem. Na vprašanja o obnašanju lahko odgovorimo na štirih različnih ravneh, ki pa se med seboj prepletajo. Ta vprašanja so poznana kot Tinbergenovi štirje "zakaj" (*angl. Tinbergen's Four Whys*). 1. Čemu je namenjeno obnašanje? Odgovor na to



vprašanje je funkcionalne narave, kot na primer vloga obnašanja pri nadaljevanju vrste. 2. Kako to obnašanje nastane? Odgovor na to vprašanje je razlaga mehanizma nastanka obnašanja. 3. Kako se obnašanje razvije? To se nanaša na razvoj obnašanja vse preko embrionalnega razvoja do socialnih interakcij in vpliva okolja. 4. Od kod izvira obnašanje? Ta se nanaša na evolucijo, preko filogenetskega razvoja vrst in skupnih prednikov (199). Odgovore na vsa ta vprašanja lahko proučujemo in pridobivamo z različnimi metodami, kot so: poskus, opazovanje, primerjava ali modeliranje. Običajno je pri študijah uporabljena kombinacija teh metod. Glede na proučevanje obnašanja ga lahko razdelimo v različne kategorije, in sicer socialno, spolno, starševsko, teritorialno. Če pa gledamo na uporabo posameznih organskih sistemov, ga lahko razdelimo na gibalno, prehranjevalno, spolno, čutno, izobraževalno ... (200) Tako pri živalih kot pri ljudeh proučujemo tudi miselne, čustvene in motivacijske procese, ki so kompleksnejši in zahtevajo višjo organizacijo živčnega sistema. Posamezne čustvene procese običajno proučujemo na mišjih modelih, ki izraziteje izražajo posamezna obnašanja, ki so podobna duševnim motnjam pri ljudeh. To so anksioznost, depresija, avtizem ... (201). Najbolj proučevana miselna procesa pri živalih sta spomin in učenje (202). Motivacijski procesi predstavljajo obnašanja, ki imajo običajno za posledico nagrado. To so procesi, kot so hranjenje, pitje, spolno obnašanje ali pa motnje kot na primer odvisnost od drog in alkohola. Ključni nevrotransmitter, ki sodeluje pri uravnavanju teh procesov, je dopamin. S proučevanjem teh procesov se velikokrat ukvarjajo farmakološke raziskave, saj je razumevanje dogajanja pri določenih motnjah motivacijskega sistema zelo pomembno za reševanje teh težav in zdravljenja specifične motnje (203, 204).

Pri večini živali vzorci obnašanja odražajo kompleksnost in funkcionalno organiziranost živčnega sistema. Če pogledamo evlucijsko skalo, vidimo, da živčni sistem izraža dva trenda, in sicer z višjo diferenciacijo je tudi večja centralizacija. Primerjalne študije med različnimi živalskimi vrstami so pokazale, da so razlike v obnašanju, ki je povezano s prilagajanjem okolju, odraz anatomije centralnega živčnega sistema in njegove razvitosti.

Eden od pomembnejših nadzornih mehanizmov obnašanja je živčni nadzor. Živčni kontrolni mehanizem koordinira odziv živali na dejavnike iz okolja. Zunanje stimuluse žival zazna s čutnimi organi, preko katerih stimulus pride do živčnega

sistema, ki ga na nek način prevede v odziv, ki ga opazimo. Hormoni prenašajo informacije po telesu počasneje od živčnih celic, vendar pa skupaj živčni sistem in kontinuirana prisotnost hormonov tvorita odličen nadzorni mehanizem reakcij oziroma odzivov. Hormoni vplivajo na obnašanje preko različnih poti, vse preko živčnega sistema, čutnega zaznavanja, efektorskega sistema in razvoja. Učinki hormonov so običajno posledica njihovega delovanja, ki so pod vplivom tako genotipa kot okolja (letnega časa, dela dneva) in dosedanjih izkušenj. Nekateri ponavljajoči se vzorci obnašanja so posledica interakcije med hormonskim in živčnim sistemom kot na primer menstrualni cikel (pojavni ciklusi pri živalih) (205). Navsezadnje je obnašanje posledica prepletov genetskih in okoljskih vplivov. Za pravilno izražanje genov je potrebno primerno biokemijsko okolje. To okolje je pod močnim vplivom dejavnikov tako iz organizma kot tistih daleč izven njega. Pri mnogih živalski vrstah so odkrili celične, biokemijske in druge razvojne poti, preko katerih geni vplivajo na obnašanje. Nekateri vplivi so močno povezani z razvojem senzorično-motorne sistema, drugi pa imajo večji vpliv na obnašanje, kot so učenje in čustvenost. Izražanje gena in fenotipske posledice tega izražanja so odvisne tudi od drugih genov v genomu. Vplivi genov na razvoj in evolucijo obnašanja so lahko intra- in intergenomski. Nekateri seksualni spori ali spor starš – potomec so lahko odraz fenotipskega vpliva genov. Izražanje gena, ki ima za posledico nek fenotip obnašanja, se lahko prenese s starša na potomca (temu pravimo vtisnjenje ali vtisk v genom; *angl.* genomic imprinting), kjer so geni podedovani od matere ali očeta v različnih tkivih selektivno utišani. Vtisku v genom pripisujejo velik pomen pri evoluciji anatomije možganov, razumevanja in socialnega obnašanja pri primatih (206).

#### **2.4.2 Spolno pogojena obnašanja**

Moški in ženske se obnašamo različno in če pogledamo z vidika evolucije lahko to razliko pripišemo obstoju dveh različnih spolov. Če pa pogledamo z vidika mehanizma nastanka razlik, se nam porodita dve ključni vprašanji, in sicer: kaj je pravzaprav različno med moškimi in ženskimi možgani in kako se te razlike med spoloma izrazijo preko različnih mehanizmov. V zadnjih desetletjih smo dobili veliko odgovorov predvsem na prvo vprašanje. Zdaj je jasno, da so isti steroidni in peptidni hormoni vključeni v regulacijo proizvodnje gamet, brejosti (nosečnosti),

kotitve (poroda) in starševske nege ter imajo hkrati velik vpliv na možgane, saj ti isti hormoni direktno vplivajo na razvoj spolno dimorfnih področij v možganih in se tem vplivajo tako na reproduktivna kot ne-reproduktivna obnašanja (207) (208). Pri odgovoru na drugo vprašanje imamo več študij. Eno, ki je bila narejena na kuščarjih *Cnemidophorus* (209), in druge, ki so jih naredili pri monogamnih in poligamnih prerijskih voluharicah (210, 211, 212).

Prisotnost spolnih hormonov, tako estrogenov kot testosterona, je ključna za izražanje spolno značilnega obnašanja pri vretenčarjih. Nedavne genetske študije so pokazale, da spolni hormoni sprožijo aktivacijo številnih molekularnih mehanizmov, ki nadzirajo nastanek in potek spolno značilnega obnašanja (213, 214).

#### **2.4.2.1 Proučevanje spolno pogojenega obnašanja pri modelnih organizmih**

Žensko spolno obnašanje pri živalih proučujemo na različnih področjih in z različnih pogledov. Nekateri ga proučujejo izključno s stališča obnašanja, primerjave in evolucije, medtem ko ga drugi dojemajo kot biološko značilno obnašanje in se poglobljajo v nevroendokrine, celične in molekularne mehanizme ženskega spolnega obnašanja.

Pri glodavcih je perinatalna izpostavljenost spolnim hormonom ključna za obnašanja, ki služijo razmnoževanju vrste. To vključuje proceptivno in receptivno oziroma spolno sprejemljivo obnašanje pri samicah ter dvorjenje in kopulacijo pri samcih (215). Za značilno moško obnašanje veljata tudi agresivno in teritorialno, medtem ko je materinsko obnašanje značilno žensko obnašanje. Vse to je posledica organizacijske vloge spolnih hormonov med razvojem (216). Da bi dokazali vpliv hormonov med razvojem na obnašanje, so izvedli različne poskuse. Pokazali so, da neonatalno kastrirani samci izražajo lordozo – usločenost hrbta – v odraslem obdobju, če jim dodajamo estrogene in progesteron. To obnašanje je lahko izničeno, če istočasno s kastracijo dodajamo androgene ali estrogene hormone. Neonatalno tretiranje samic z androgeni ali estrogeni privede do izražanja značilnega moškega obnašanja v odraslem obdobju. Pojavi se celo agresivno obnašanje proti vsiljivcu in nekatere značilnosti teritorialnega obnašanja (14, 217, 218, 213, 216). Motena pretvorba androgenov v estrogene z blokado aktivnosti

aromataze pri samcih prvih nekaj dni po rojstvu ali izbris gena za encim aromatazo pri miših prepreči maskulinizacijski učinek androgenov in ne pride do spolne diferenciacije v možganih. V tem primeru estrogeni odigrajo ključno vlogo pri trajni organizacijski obliki dimorfnega živčnega sistema (219, 220, 221, 222). Miši, ki so jim tarčno izbrisali gen za estrogenski receptor (ER) in so brez obeh izoform estrogenskega receptorja, ER $\alpha$  in ER $\beta$ , so pomemben model za proučevanje nastanka spolno različnega obnašanja. Pri odsotnosti ER $\alpha$  so ugotovili, da je ER $\alpha$  nujen za razmnoževanje in izražanje spolnega obnašanja, ki je posledica delovanja estrogenov, medtem ko za ER $\beta$  niso ugotovili tako pomembnih učinkov (223, 224). Kljub temu, da razloga za fenotip obnašanja miši brez ER $\alpha$  ne moremo neposredno povezovati z organizacijsko vlogo steroidov med razvojem in kasnejšo aktivacijsko v odraslem obdobju, so s primerjavo spolnega obnašanja mišjih samcev brez ER $\alpha$  in tistih brez ER $\beta$  prišli do pomembnih ugotovitev. Namreč, pri samcih brez ER $\alpha$  so ugotovili močno zmanjšano kopulatorno obnašanje, tako vstopo v nožnico kot ejakulacijo (225). Medtem ko pri pomanjkanju funkcionalnih ER $\beta$  niso ugotovili sprememb pri moškem spolnem obnašanju, kar kaže, da imajo signalne poti, ki potekajo preko ER $\alpha$  pomembno vlogo pri maskulinizaciji spolnega obnašanja (224, 226). Na drugi strani pa, ko so kastriranim mišim brez ER $\beta$  dodajali estrogene in progesteron ter jih potem testirali za žensko spolno obnašanje, so le-ti izražali lordozo, ki je bila dvakrat bolj izražena kot pri miših divjega tipa (226), kar kaže na vlogo ER $\beta$  pri procesu defeminizacije spolnega obnašanja. Do podobnih ugotovitev so prišli z uporabo farmakoloških pripravkov: pri tretiranju novorojenih mišjih samic z ER $\beta$  selektivnimi agonisti je prišlo do signifikantno spremenjenega izražanja lordoze, medtem ko selektivna aktivacija ER $\alpha$  ni povzročila podobnega učinka (227). Ti podatki kažejo tudi na to, da sta proces maskulinizacije in defeminizacije ločena procesa in potekata preko različnih ER.

Za spolno značilno obnašanje, moško in žensko, je pomembna prisotnost spolnih hormonov pred (organizacijski učinek) in po rojstvu, tudi v odraslem obdobju (aktivacijski učinek) (228, 229, 230, 231, 232, 233).

#### **2.4.2.2 Žensko spolno obnašanje**

Žensko spolno obnašanje pri glodavcih razdelimo v tri faze, in sicer privlačnost, proceptivnost in receptivnost. V prvi fazi privlačnosti lahko ocenimo, koliko je samica privlačna za samca in obratno. V veliki meri ja ta faza odvisna od feromonov, ki jih izločata. Druga faza je proceptivnost ali prekopulatorna faza, ki nastopi pred kopulacijo. Tu lahko ocenimo, koliko je samica motivirana za parjenje (234). Samica, ki je pripravljena na paritev, nemalokrat prva vzpostavi stik s samcem. Običajno ga ovohava v anogenitalnem predelu ali pa se ga s smrčkom dotakne na stranskih delih trupa. Hitro se mu približuje in oddaljuje, kar stimulira samca, da se ji približa in začne ovohavati anogenitalni predel (235, 236). Tretja faza je receptivnost ali spolna sprejemljivost, kjer samica s svojim obnašanjem samcu dovoli naskok, zato to fazo imenujemo tudi kopulacijska. Ko samec naskoči samico, se le-ta refleksno usloči, to je t.i. lordozni refleks ali lordoza (*L, angl. lordosis*), pri kateri poleg usločenega hrbta in dvignjene glave samica umakne rep na stran in privzdigne področje perineuma, da omogoči kopulacijo oziroma vstop penisa v nožnico (32). Po uspešni kopulaciji in ejakulaciji se samica umakne, da prepreči ponovne stike s samcem. V tem času se izloča prolaktin, ki pripravi maternico na vsaditev zarodka.

Ventromedialno jedro hipotalamusa (VMH) in predoptično področje (POA) sta področji v možganih, ki uravnavata refleks lordoze. Jedro VMH vsebuje veliko koncentracijo estrogenskih, progesteronskih in oksitocinskih receptorjev, zato je pomemben urejevalec mnogih signalnih poti. Študije so pokazale, da neposredno dovajanje estrogenov v VMH zadostuje za nastanek lordoze. Če je to področje poškodovano, je refleks lordoze zavrt (237, 238). Rubin in Barfield sta dokazala, da kombinacija estrogenov in progesterona deluje močnejše kot sami estrogeni (239). Za POA velja, da je ključno področje pri zaviranju lordoze. S farmakološko poškodbo POA je bila lordoza pri podganjih samicah izboljšana, ko pa so to področje električno stimulirali, se je refleks lordoze poslabšal (240). Sam potek refleksa lordoze je že dodobra znan. Med naskokom se že pri vzpenjanju preko dotikanja kože v ledvenem predelu pri spolno sprejemljivi samici sproži lordoza. Ta čutni signal potuje preko dorzalnih korenin ganglijev do hrbtenjače, kjer potem potuje naprej do mreževine v možganskem deblu (*angl. medullary reticular*

formation in the hind brain) in do centralne sivine v srednjih možganih (*angl.* midbrain central gray, MCG). VMH in POA z ustreznimi hormoni pošljeta signal preko srednjega dela hipotalamusa naprej do ostalih predelov možganov. Signal se potem vrača preko centralne sivine v mreževino v srednjih možganih in v medialno kolenasto telo talamusa (*angl.* medial geniculate body). Mreževina in medialno kolenasto telo skupaj aktivirata motorične živce v hrbtenjači in pride do lordoze oziroma usločenega hrbta (234, 241). Izražanje lordoze je odvisno od prisotnosti estrogenov in velikokrat tudi progesterona. Do izražanja lahko pride tudi v odsotnosti progesterona, vendar so potem potrebne višje koncentracije estrogenov (242). Pri miših brez progesteronskih receptorjev, kljub dodajanju obeh potrebnih hormonov, niso uspeli izzvati izražanja lordoze (243). Podobno so dokazali tudi pri podganah, ki so jim injicirali protismiselno DNA (*angl.* antisense DNA) za progesteronski receptor neposredno v hipotalamus in potem z dodajanjem estrogenov ter progesterona dosegli bistveno slabše izražanje lordoze kot pri kontrolni skupini (244). Poleg nujno potrebnih estrogenov in progesterona je za pravilno izražanje lordoze potrebna prisotnost tudi nekaterih drugih neuropeptidov in neurotransmiterjev. Eden pomembnejših je oksitocin, ki nastaja v PVN (paraventrikularno jedro hipotalamusa) in SON. Druga sta kateholamin, ki deluje kot neurotransmiter in neurohormon, in dopamin. V eni zgodnejših študij so pri podganah dokazali, da so z dodajanjem dopaminskega agonista in estrogenov izzvali izražanje lordoze (245). Pri refleksu izražanja lordoze sodelujejo še acetilholin, serotonin, GABA, opioidi in prolaktin (246). Spolni hormoni posredno in neposredno vplivajo na izločanje neurotransmiterjev, ki spodbudijo ali zavrejo določeno obnašanje, kar je odvisno od področja v živčnem sistemu, kjer delujejo.

#### **2.4.2.3 Agresivno obnašanje**

Agresivno obnašanje sodi v skupino socialnega obnašanja in je različno med spoloma. Širši pojem socialnega obnašanja zajema medsebojne vplive med posamezniki, od katerih ima vsaj eden ali več posameznikov korist, kar so tako agresivne kot neagresivne oblike medsebojnih vplivov. Če pogledamo na agresivno obnašanje s strani osebka, ki je tarča agresivnega obnašanja, lahko rečemo, da je to nasprotno od socialnega obnašanja. Če pa pogledamo s strani osebka, ki agresivno obnašanje izvaja, pa lahko rečemo, da so na nek način socialni stiki celo izboljšani.

Kot na primer pri zaščiti kolonije pred plenilci oziroma vsiljivci, materinska agresivnost... Za agresivno obnašanje ni značilna samo fizična oblika stika, lahko gre tudi samo za kretnjo, grožnjo, obred ali aktivnost, ki nakazuje poraženca (204). Raziskave, ki se ukvarjajo s proučevanjem agresivnosti tako v humani kot v veterinarski medicini, si prizadevajo k boljšemu razumevanju in nadzoru patološke agresivnosti (247), medtem ko pri poskusih v laboratoriju uporabljamo živalske modele, ki izražajo značilno oziroma vrstno specifično agresivno obnašanje. Ko proučujemo agresivno obnašanje pri živalih, je zelo pomembno, da upoštevamo etologijo agresivnega obnašanja za posamezno živalsko vrsto. Agresivni znak, drža in dejanje so orodja živali, da doseže želeni cilj ali da se ubrani napadalcu (248). Agresivno obnašanje se pojavi, ko posamezniki tekmujejo za ozemlje (območje – v primeru laboratorijskih pogojev), hrano, vodo ali druge dobrine, povezane s preživetjem in razmnoževanjem. Ko pa gre za zaščito območja ali potomcev pa govorimo o teritorialni (ozemeljski) ali materinski agresiji (249). Vrsto agresije, ko gre za zaščito ozemlja, teritorialna agresija, imenujemo rezident-vsiljivec (*angl.* resident-intruder aggression). V tem primeru rezident (domačin) ščiti svoj teritorij. To je značilno agresivno obnašanje med samci (*angl.* intermale aggression), ki se odraža kot napadi, ugrizi, odrivanje, preganjanje vsiljivca (250, 251). Agresivno obnašanje ima nemalokrat pozitivne strani tako za posameznika kot za vrsto, kot na primer hierarhična dominanca, ki se vzpostavi med rivalskimi samci. Zmagovalni samec tako doseže, da se na določenem teritoriju pari samo on. Podoben učinek lahko v laboratorijskih pogojih dosežemo z izolacijo ali posamično nastanitvijo samcev in dosežemo t.i. z izolacijo izzvano agresivnost (*angl.* isolation-induced aggression) (252, 249).

Samo agresivno obnašanje lahko opredelimo glede na način izražanja in posledico kot napadalno (*angl.* offensive) ali obrambno (*angl.* defensive). Obrambno obnašanje se pojavi kot odgovor na grožnjo ali na dražljaj, ki izzove strah, in se običajno zaključi s pobegom (253). Pri samcih glodavcev se obrambno obnašanje kaže kot pobeg, otopelost, obrambna poza ali grožnja nazaj proti napadalcu (254, 255, 256). Samice glodavcev po porodu kažejo materinsko agresivnost, ki vključuje tako obrambne kot napadalne elemente z namenom, da bi zaščitila potomce pred moškim vsiljivcem (257).

Nasilje velja med etologi za nekoliko sporen izraz, kljub temu pa je opredeljeno kot eskalirano, patološko in nenormalno agresivno obnašanje, ki se kaže kot podaljšani in pogostejši napadi in ugrizi ter z močno zmanjšano latenco (latenca je čas od začetka testa do izražanja določene aktivnosti) v primerjavi s prilagojeno agresivnostjo oziroma pričakovano agresivnostjo (248, 258). To pomeni, da se ugrize v bolj občutljive predele telesa smatra za nenormalno oziroma nasilno v primerjavi z ugrizi prilagojene ali pričakovane agresivnosti, kjer napadalec grize v predel hrbta ali bokov (259). Agresivnost pri ljudeh in pri živalih ima nekatere podobnosti, vendar pri živalih agresivnost ni tako kompleksna kot je pri ljudeh. Družbene norme postavljajo meje, kaj je sprejemljivo in primerno agresivno obnašanje, medtem ko je neprimerno, pretirano agresivno obnašanje oziroma nasilje resno vprašanje v sociološki in medicinski stroki, ki se ukvarja z duševnim zdravjem (260). Agresija je vključena kot simptom pri mnogih duševnih motnjah kot so shizofrenija, anksioznost, prilagoditvena motnja, manična depresija, avtizem in druge (253).

Agresivno obnašanje je tudi spolno dimorfno izraženo, in sicer je bolj intenzivno pri samcih/moških kot pri samicah/ženskah. Izražati se začne v puberteti, ko se moda pod vplivom LH (luteinizirajočega hormona) povečajo in začno izločati več androgenov. Če pogledamo to obdobje pri glodavcih, je povezano z odstavitvijo iz gnezda, iskanjem in vzpostavljanjem teritorija, iskanjem hrane in samic za parjenje (261). Že med razvojem in tudi potem v odraslem obdobju androgeni pomembno vplivajo na agresivno obnašanje. Pri miših že zgodnja odstranitev mod, takoj po rojstvu, značilno zmanjša agresivnost, kljub dodajanju testosterona v odraslem obdobju. Ravno obratno pa dodajanje testosterona samicam takoj po rojstvu bistveno poveča njihovo agresivnost v odraslem obdobju (262). Pri miših in podganah so ugotovili, da ima celo položaj plodov v maternici vpliv na razvoj spolno različnega nevroendokrinega sistema. Ugotovili so, da so samice, ki so v maternici ležale med dvema moškima plodoma, izražale bolj agresivno obnašanje kot tiste, ki so ležale med dvema samicama. Isto so ugotovili pri samcih. Poleg tega so ugotovili še razlike v nekaterih fizioloških parametrih in v morfologiji. Nastanek teh sprememb naj bi bil posledica delovanja testosterona, ki ga izločajo samčki v času fetalnega razvoja in prehaja na sosednje plodove (96). Če odstranimo moda,



se pri večini živalskih vrst agresivnost močno zmanjša. Pri samcu prerijske voluharice, kalifornijske miši in pri miših linije CD-1 pa vpliva kastracije na zmanjšanje agresivnosti niso ugotovili (263, 264, 265). Z merjenjem koncentracije testosterona v krvi so hoteli dokazati povezavo med koncentracijo in izražanjem agresivnega vedenja, vendar so nekatere raziskave dokazale pozitivno povezavo med koncentracijo testosterona v krvi in agresivnostjo, druge pa ne (266). Vpliv testosterona na povečano agresivnost je verjetno prisoten samo v mejah fizioloških vrednosti, saj so ugotovili, da pri povišanih koncentracijah testosterona v krvi agresivnost ni bila povečana (267).

Testosteron vpliva na agresivno obnašanje v nespremenjeni ali pa v metaboliziranih oblikah. V možganih se pretvori v  $5\alpha$ -dihidrotestosteron ali v estradiol (251). Pri samcih brez gena za ER $\alpha$  je agresivno obnašanje proti drugemu samcu le redko izraženo, kar kaže na pomembno vlogo ER $\alpha$  pri agresivnem obnašanju (268, 225). Medtem ko pri samcih brez ER $\beta$  niso opazili bistvenih sprememb v agresivnem obnašanju v primerjavi s kontrolno skupino (269).

Agresivno obnašanje uravnavajo področja MPOA, LS, sprednji hipokampus, VMH, področje sivine ob ventriklih (*angl.* periaqueductal gray, PAG), MeA in BNST, ki pa se povezujejo še z možgansko skorjo in področji, ki sprejemajo dražljaje iz čutil. Pri glodavcih so za uravnavanje agresivnega obnašanja najpomembnejši vohalni betiči. Pri vrstah, kjer je čutilo za vid in sluh bolj razvito, pa so pomembnejša področja tista, ki sprejemajo dražljaje iz teh čutil (270). Ko so podganam poškodovali področja LS, BNST, sprednjega hipokampusa in MeA, se je agresivno obnašanje zmanjšalo (271). Ko pa so poškodovali področje orbitofrontalnega dela možganske skorje, je bilo agresivno obnašanje močnejše izraženo, kar kaže zaviralno vlogo tega področja na agresivno obnašanje (272).

Pri samem uravnavanju agresivnosti pa imajo posamezna jedra različne vloge, tako na primer dorzomedialni del VMH in kavdoventralni del MeA sodelujeta pri obrambnem obnašanju, medtem ko posterodorzalni del amigdale sodeluje pri napadalnem obnašanju (273).

V sistem agresivnega obnašanja je vključenih več nevrottransmitterjev. Eden ključnih je serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT). Nepravilno uravnavanje vseh podvrst serotoninjskih receptorjev, transporterjev, sintetizirajočih in metaboličnih

encimov, je neposredno povezano s spremenjenim agresivnim obnašanjem (253). Znižana koncentracija serotonina povečuje agresivnost, zvišana pa zmanjšuje. Nizko koncentracijo lahko uravnavamo z dodajanjem različnih farmakoloških snovi, kot so: metaboliti predhodnikov serotonina, zaviralci ponovnega prevzema serotonina ali z agonisti serotoninskih receptorjev 5-HT<sub>1A</sub> in 5-HT<sub>1B</sub>. Z dodajanjem teh snovi so pri miših zmanjšali agresivno obnašanje (274, 275). Da serotoninska receptorja 1A in 1B različno delujeta na agresivno obnašanje, so dokazali pri miših, ki so brez gena za 5-HT<sub>1A</sub> in miših, ki so brez gena za 5-HT<sub>1B</sub>. Miši se fenotipsko močno razlikujejo. Miši brez 5-HT<sub>1A</sub> receptorjev kažejo več tesnobnega in manj reaktivnega obnašanja, so tudi manj agresivne (276). Serotoninski sistem pa se povezuje tudi z drugimi nevrottransmitterji, ki imajo vpliv tudi na agresivno obnašanje. To so GABA, glutamat in CRF (kortikotropin sproščujoči dejavnik; *angl.* corticotropin releasing factor). Povezuje pa se tudi z neuropeptidi, kot so arginin vazopresin, oksitocin, neuropeptid Y (NPY, *angl.* neuropeptide Y), opioidi. S proučevanjem genetsko spremenjenih miši so ugotovili tudi neposreden in posreden vpliv nekaterih molekul na uravnavanje izražanja agresivnega obnašanja. Ena pomembnejših je nNOS (nevralna sintaza dušikovih oksidov) (253). Poleg že omenjenih snovi pa pri uravnavanju agresivnosti zaradi socialnega srečanja sodelujejo tudi dopamin in noradrenalin (270).

S proučevanjem in opazovanjem obnašanja pri miših ugotavljamo tako njihova naravna/običajna obnašanja in vedenjske vzorce, ki so posledica fizioloških procesov, kot tudi obnašanja, ki so posledica patofizioloških procesov. Obnašanja, ki so posledica patofizioloških procesov proučujemo z uporabo standardiziranih testov za proučevanje posameznih duševnih motenj (kot na primer anksioznost, depresija, obsesivno kompulzivne motnje ...).

## **2.5 POMEN PROUČEVANJA RAZLIK MED SPOLOMA**

Naj na tem mestu predstavim še čisto praktični primer, zakaj je proučevanje razlik med spoloma pomemben tudi pri ljudeh.

Vemo, da smo si med spoloma različni, tako vizualno kot tudi na najmanjšem celičnem, genetskem področju, vendar pa se sodobna medicina in načini

zdravljenja bolezni tega velikokrat ne zavedajo. Z razvojem znanosti in posledično tudi zdravil pa gre zdravljenje v smeri razvoja osebnega zdravljenja, prilagajanja zdravljenja posamezniku.

V večini primerov, ko so proučevali izražanja shizofrene motnje pri ljudeh, so običajno proučevali moške. Vendar so nedavne študije Jiménezza in njegovih sodelavcev pokazale, da to ni ravno dobra izbira (277, 278). Ne samo, da so ugotovili razlike med spoloma, ugotovili so tudi razlike pri ženskah znotraj menstrualnega ciklusa. Z metodo MRI so primerjali, katera področja v možganih so aktivna v poskusu, ko morajo primerjati 3D strukture v običajni in potem v rotirani ali zrcalni obliki, kar je poznano kot t.i. mentalna rotacijska naloga (*angl.* mental rotation task). V širši populaciji ljudi velja, da imajo moški boljšo prostorsko, torej 3D predstavo, kot ženske, kar so pokazale številne študije (pregled v (279)). V študiji bolnikov s shizofrenijo v primerjavi z zdravimi ljudmi se je pokazalo, da imajo zdravi moški veliko boljšo prostorsko predstavo kot zdrave ženske, medtem ko pri bolnikih s shizofrenijo pride do ravno obratnega pojava. Moški s shizofrenijo imajo močno zmanjšano prostorsko predstavo v primerjavi z zdravimi moškimi, hkrati pa tudi nižjo kot zdrave ženske in ženske s shizofrenijo. Pri ženskah s shizofrenijo pa ostane ta zmožnost prostorske predstave približno ista kot pri zdravih ženskah. Če bi torej proučevali izražanje tega simptoma samo pri enem spolu (test mentalne rotacije je zelo pogost test pri psihiatričnih motnjah), bi nemara ta simptom pri enem izmed spolov spregledali ali ga ocenili kot zelo pomembnega. In to je samo eden izmed mnogih primerov, kjer se je izkazalo, da je potrebno proučevati oba spola, saj so spolne razlike v pojavnosti ali v resnosti simptomov znane pri številnih duševnih boleznih kot so depresivna motnja, anksiozna motnja, avtizem, pa tudi nevrodegenerativne bolezni, kot sta alzheimerjeva in parkinsonova bolezen.

Nedavno je ameriški nacionalni inštitut za zdravje (NIH) sprejel konvencijo, da je za predklinične študije potrebno uporabiti živali in celične kulture obeh spolov. To je povzročilo nemalo negodovanja med znanstveniki, češ da bo to zelo zvišalo stroške raziskav (280). Na to so se odzvali znanstveniki s področja proučevanja razlik med spoloma in opozorili na stroške, ki jih povzročijo raziskave, ki ne upoštevajo razlik med spoloma. Pride do neuspešnih kliničnih študij (ki so običajno veliko dražje kot predklinične), do napačnih diagnoz in običajno neprimerne

zdravljenja žensk, saj se v največ primerih že v bazičnih raziskavah uporablja predvsem ali samo samce (281).

Področje proučevanja razlik med spoloma ima zato velik pomen za razvoj personaliziranega pristopa zdravljenja ne samo v psihiatriji. Ta pomembnost se kaže tudi na drugih medicinskih področjih, saj se tudi številne druge bolezni pojavljajo med spoloma različno pogosto, skoraj zagotovo kot posledica razlike v delovanju naših teles. Med takšne bolezni spadajo tudi številna rakasta obolenja in prav v onkologiji se že uspešno uporablja osebni pristop k zdravljenju vsakega bolnika, glede na značilnosti njegove bolezni. Vendar pa ostaja na tem področju še veliko odprtih vprašanj, na katera še nimamo odgovora, med katerimi so izjemno pomembna tudi vprašanja glede razlik med spoloma.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 VZREJA IN PRIPRAVA ŽIVALI ZA POSKUS

#### 3.1.1 Vzreja živali

Celotna raziskava je bila narejena na laboratorijskih miših, *Mus musculus*, seva C57BL/6J, ki so bile vzrejene na Centru za genomiko živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Za raziskavo smo pridobili dovoljenje s strani Veterinarske uprave republike Slovenije (pod številko 34401-32/2012/8) in je bila opravljena v skladu z etičnimi načeli direktive Evropske Unije (2010/63/EU). Miši smo vzrejali pri standardnih laboratorijskih pogojih, in sicer pri temperaturi med 20 in 25 °C, vlažnosti 40 do 60 % in z umetno osvetlitvijo s ciklusom svetloba proti tema 12:12 ur. Hrano brez fitoestrogenov (Harlan Teklad 2016, Velika Britanija) in vodo z dodatkom klorovodikove kisline (1mL HCL/500mL vode) so imele na voljo *ad libitum*.

#### 3.1.2 Priprava poskusnih živali

Za raziskavo smo uporabili model gensko spremenjenih miši, ki imajo del gena za SF-1, ki kodira vezavno domeno za DNA, izrezan in preostanek prekinjen z zapisom za gen za neomicin (*SF-1 neo*) (195). Miši so bile prvotno pripravljene na Univerzi DUKE v Severni Karolini (ZDA) (v laboratoriju prof. dr. Kietha Parkerja), od koder smo jih pripeljali v hlevček Centra za genomiko živali v Ljubljani. Da bi pridobili miši, ki so homozigoti za izbiti gen *SF-1*, SF-1 KO, smo morali med seboj pariti miši, ki so heterozigoti za izbiti gen SF-1 (SF-1 HET).

##### 3.1.2.1 Priprava živali za ugotavljanje izražanja genov v možganih

Raziskava je bila opravljena v dveh delih. V prvem delu raziskave smo med seboj parili miši SF-1HET tako, da smo združili enega samca in tri samice. Vsako samico smo pri vidni brejosti odstavili od samca in je bila nato do odstavitve mladičev sama z njimi. Vsi mladiči so od rojstva (P0) do 7. dneva po rojstvu (P7) prejeli mešanico kortikosteroidov (400 µg/mL hidrokortizona; 400 ng/mL deksametazona; 100 ng/mL fludrokortizona); raztopljenih v koruznem olju. Dnevno so mladiči pod kožo (s.c.) prejeli 50 µL kortikosteroidne mešanice. Za

določitev genotipa smo med P4 in P6 odvzeli biološki material, ker fenotipsko ne moremo določiti spola. Po genotipizaciji smo mladičem SF-1 KO presadili nadledvično žlezo, da smo jih ohranili pri življenju brez kortikosteroidnih injekcij (197). Za darovalce nadledvične žleze smo uporabili samice divjega tipa (*angl.* wild type, WT) iz istega gnezda ali iz sorodnih gnezd, ki se v starosti niso razlikovali več kot tri dni od prejemnika. Nadledvični žlezi darovalca smo takoj po odvzemu dali v hladno sterilno raztopino rekombinatnega človeškega rastnega dejavnika fibroblastov (*angl.* fibroblast growth factor, FGF; - 25ng/mL, Sigma) v 0,05 M fosfatnem pufri z NaCl (pH 7,2 do 7,4) (*angl.* phosphate buffered saline, PBS). Mišim SF-1 KO smo v pazdušnem področju naredili vbod z iglo (21G x 19/16" 0,8 x 40 mm, Novico, Italija) in obe žlezi pazljivo vstavili pod kožo. Ker so miši že več kot 20 generacij povratno parjene, do zavrnitvenih reakcij ne prihaja. Po presaditvi so prejele še tri dodatne injekcije kortikosteroidov, in sicer na P9, P12 in P16. Enaindvajseti dan, P21, so bile miši odstavljen od matere. Miši WT, ki smo jih uporabili za kontrolne živali v raziskavi, so bile izpostavljene istemu protokolu (vbod v pazdušno področje in kortikosteroidne injekcije). Po odstavitvi, med P21 in P25, smo mišim WT, da bi zagotovili boljše kontrole za miši SF-1KO, odstranili spolne žleze. Tako smo pridobili miši divjega tipa z odstranjenimi spolnimi žlezami – GDX/WT (*angl.* wild type gonadectomised mice), kastrirane samce (CAS/WT) in sterilizirane samice (OVX/WT). Pri miših SF-1 KO smo izvedli enak postopek, vendar samo z zarezami in brez odstranitve žlez, ki jih zaradi odsotnosti SF-1 nimajo. Med posegom so bile živali anestezirane s 50 µL mešanice anestetikov (ketamin, acepromazin, ksilazin). Živali smo potem nastanili v skupinah (tri do pet živali) po spolu in jih ob starosti 60 do 65 dni (P60-P65) žrtvovali z ogljikovim dioksidom, CO<sub>2</sub>, in jim čim prej odvzeli del možganov, ki je bil namenjen za izolacijo RNA, ter ga zamrznili na -80 °C.

### **3.1.2.2 Priprava miši za ugotavljanje vpliva testosterona na obnašanje in izražanje genov v možganih**

V drugem delu raziskave smo prav tako proučevali miši brez gena *SF-1* in za kontrolne uporabili miši divjega tipa, GDX/WT. V tem poskusu smo živalim dodajali testosteron propionat (TP) na tri različne načine. Živali v prvi skupini so bile izpostavljene TP-ju pred rojstvom (skupina TP-E), druga skupina po rojstvu

(TP-PN), tretja skupina pred in po rojstvu (TP-E&PN) ter kontrolna skupina (K-K), ki ni prejela TP, ampak samo prefiltrirano koruzno olje.

Samce in samice SF-1 HET smo parili v skupinah – en samec in tri samice. Vsako dopoldne smo preverili ali je pri samici prisoten kopulatorni čep (*angl. plug*), kar je pomenilo, da je prišlo do parjenja in ejakulacije. Dan, ko smo ga opazili, je bil označen kot polovica embrionalnega dne, E0,5, in takrat smo samico odstavili od samca.

Breje samice so na embrionalni dan E13,5 in E16,5 prejele podkožno injekcijo testosteron propionata, TP, ki smo ga najprej raztopili v 96 % etanolu (Etanol, Merck), tako da smo pripravili koncentrat 20 mg TP/1 ml etanola. Koncentrat smo nato redčili s koruznim oljem (Corn oil, Sigma-Aldrich), tako da smo imeli končno koncentracijo 2 mg TP/ml. Živali so na dan prejele 100 µg TP na volumnu 50 µL, ali pa samo koruzno olje.

Mladiči so po rojstvu prejeli prej opisano kortikosteroidno mešanico od rojstva do P7. Na P1, P3 in P5 so poleg kortikosteroidne mešanice dobili še TP v koncentraciji 100 µg TP na žival na dan. Za lažje razumevanje še prikaz skupin testnih živali in obdobja prejemanja TP v Tabeli 1.

Aplikacija TP	TP-E	TP-PN	TP-E&PN	K-K
V času embrionalnega razvoja (preko brejih samic) – E13,5 in E16,5	TP	-----	TP	-----
Mladiči po rojstvu (P1, P3 in P5)	-----	TP	TP	-----

**Tabela 1:** Prikaz aplikacije TP po skupinah (TP-E – živali so prejemale TP samo pred rojstvom; TP-PN – živali so prejemale TP samo po rojstvu; TP-E&PN – živali so prejemale TP pred in po rojstvu; K-K – kontrolne živali, ki so v obeh obdobjih prejemale samo olje).

Tako smo pridobili živali za nadaljnja testiranja, in sicer samice in samce *SF-1* KO in WT. Po odstavitvi, PN 21, smo tudi te živali operirali, in sicer smo odstranili mišim WT spolne žleze (GDX/WT), miši *SF-1* KO pa samo zarezali iz zašili.

Po 70. dnevu starosti smo začeli s testi obnašanja, in sicer najprej s testom ženskega spolnega obnašanja, potem pa še agresivnega. Po zaključku testiranja, ko so bile živali stare 3 do 4 mesece, smo živali žrtvovali s postopkom tkivne perfuzije ter odvzeli kri in možgane za nadaljnje proučevanje. Pred žrtvovanjem so bile miši anestezirane z mešanico anestetikov, kot je opisano pri operativnem posegu. Najprej smo jim odvzeli kri iz levega srčnega prekata s s heparinom (1 U/ml, Sigma) preprano injekcijo in iglo (0,8x 40 mm 21Gx1 9/16"). Kri smo nato centrifugirali 5 minut na 3000 obratih/minuto pri 4 °C, odpipetirali krvno plazmo in jo shranili pri -20 °C. Sledil je postopek t.i. tkivne perfuzije, kjer smo s peristaltično črpalko (Ecoline ISM1076, Ismatech SA, Zürich, Švica) iz živali sprali preostalo kri s hladnim 0,05 M fosfatnim pufrom s soljo (PBS), ki mu je sledilo učvrščevanje z raztopino 4-odstotnega paraformaldehida v 0,05 M PBS, s hitrostjo pretoka 5 mL/minuto. Po končani fiksaciji (5 minut) smo živalim odvzeli možgane in jih še čez noč pustili v 4-odstotnem paraformaldehidu ter ga naslednji dan zamenjali z 0,1M fosfatnim pufrom (PB), kjer smo jih hranili do uporabe za imunohistokemično barvanje na 4 °C.

### 3.1.3 Določanje genotipa živali

Genotip živali smo določili z uporabo metode verižne reakcije s polimerazo (*angl.* polymerase chain reaction, PCR). Mladičem v starosti P4 do P6 smo odvzeli košček prsta na zadnji nogi in poleg pridobitve materiala za genotipizacijo, smo ta način uporabili za označevanje živali (od 1 do 10). Tkivu smo v epruveto (500 µL, Eppendorf) dodali 200 µL puфра za razgradnjo (5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer, Promega, WI, ZDA) in 15 µL proteinaze K (15 mg/mL, Sigma) ter ga čez noč pustili na stresalniku pri 55 °C in 400 obratov na minuto (Thermomixer, Compact, Eppendorf). Razgrajeno tkivo smo uporabili za določitev genotipa z metodo PCR. Za to smo uporabili oligonukleotidne začetnike SF-1 F 5'-ACAAGCATTACACGTGCACC-3' in SF-1 R 5'-TGACTAGCAACCACCTTGCC-3' za določitev alela WT; SF-1-neo R 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' za določitev alela



SF-1KO; za določitev prisotnosti gena *Sry* začetnika F 5'-AGGCGCCCCATGAATGCATT-3' in R 5'-TCCATGAGGCTGATATTTATAG-3'.

Za posamezno reakcijo smo uporabili 3  $\mu$ L razgrajenega tkiva, po 50 ng vsakega oligonukleotidnega začetnika in sterilno destilirano vodo do volumna 10  $\mu$ L. Pri temperaturi 95  $^{\circ}$ C smo dodali 10  $\mu$ L mešanice nukleotidov in polimeraze DNA (Promega, WI, ZDA) in s tem zmanjšali nastanek nespecifičnih produktov PCR. Končni volumen reakcije je bil 20  $\mu$ L. Za PCR reakcijo smo uporabili napravo za PCR (ciklični termostat; 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA) in protokol:

95  $^{\circ}$ C 5 minut;

40 ciklov: 94  $^{\circ}$ C 30 s, 54  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s;

72  $^{\circ}$ C 8 minut.

Nastale produkte (*SF-1* ~ 500 bp; *SF-1 neo* ~ 500 bp; *Sry* ~ 200 bp) smo analizirali z gelsko elektroforezo v 2 % agaroznem gelu (Sigma) (U=130V).

#### **3.1.4 Operativna odstranitev spolnih žlez pri miših divjega tipa in slepa operacija pri miših brez gena *SF-1***

Operacijo smo izvedli med P21 in P25, pred nastopom pubertete. Za operacijo smo živali anestezirali z mešanico anestetikov: ketamin (Bioketan (100 mg/mL ketamina), Vetoquinol, Poljska; uporabljena koncentracija 100  $\mu$ g/g telesne teže), acepromazin (Calmivet (5mg/mL acepromazina), Vetoquinol, Francija, uporabljena koncentracija 2  $\mu$ g/g telesne teže) in ksilazin (Xylased (20 mg/ml), Bioveta, Češka; uporabljena koncentracija 10  $\mu$ g/g telesne teže). Vsaka žival je prejela 50  $\mu$ l mešanice s.c. Samicam WT smo odstranili jajčnike, jajcevode in del rogov maternice (OVX/WT) skozi zarezo, ki je potekala po beli črti (*linea alba*), medtem ko smo pri samcih WT (CAS/WT) naredili zarezo na vsaki strani v področju dimelj in skozi odprtino odstranili modo in nadmodek. Miši SF-1 KO smo izpostavili istim pogojem: anestezirali smo jih z mešanico anestetikov in naredili kirurško rano glede na genetski spol miši. Pri vseh smo rane zašili z resorbtivno kirurško nitjo 6.0 (Safil, Braun, Esculap, Tuttlingen, Nemčija). Takoj po posegu je miš prejela protibolečinsko terapijo, s.c. 50  $\mu$ L butorfanola (Butador (10 mg/ml butorfanola); Richter Pharma ag, Avstrija; uporabljena koncentracija 3 mg/kg telesne teže), kar smo čez 4 ure ponovili.

## **3.2 PRIPRAVA HORMONOV IN NJIHOVA UPORABA**

### **3.2.1 Kortikosteroidni hormoni**

Da smo ohranili miši SF-1 KO pri življenju, smo vsem mladičem od rojstva do P7 vsak dan injicirali 50  $\mu$ L mešanico kortikosteroidnih hormonov s.c., in sicer v koncentracijah 400  $\mu$ g/mL hidrokortizona (H4001, Sigma), 400 ng/mL deksametazona (D1159, Sigma) in 100 ng/mL fludrokortizona (F6127, Sigma); raztopljenih v koruznem olju (Corn oil, Sigma-Aldrich). Olje smo predhodno prefiltrirali skozi celuloznoacetatno filtrirno membrano s porami premera 0,2  $\mu$ m (Sartorius, Goettingen, Nemčija). Hidrokortizon smo raztopili v 95 % etanolu (Ethanol, Merk) (4 mg/mL), deksametazon smo raztopili v sterilni destilirani vodi (4 mg/mL), fludrokortizon pa smo raztopili v 95 % etanolu (5 mg/mL). Za pripravo mešanice za injiciranje smo uporabili 18 mL koruznega olja in mu dodali prej pripravljene koncentracije, in sicer 2 mL hidrokortizona, 2  $\mu$ L deksametazona in 2  $\mu$ L fludrokortizona.

### **3.2.2 Priprava estradiol benzoata**

Estradiol benzoat (EB) ( $\beta$ -estradiol 3-benzoat, E-8515, Sigma) smo raztopili v 96 % etanolu v koncentraciji 1 mg/mL. To smo še dodatno redčili v prefiltriranem koruznem olju do koncentracije 20  $\mu$ g/mL; živali so prejele 1  $\mu$ g EB/žival/dan (injiciran volumen je znašal 50  $\mu$ L; s.c.).

### **3.2.3 Priprava progesterona**

Progesteron (PR) (P-0130, Sigma) smo raztopili neposredno v prefiltriranem koruznem oljem v koncentraciji 16 mg/mL, kar je predstavljalo 0,8 mg PR/žival/dan (v 50  $\mu$ L/dan).

### **3.2.4 Uporaba spolnih hormonov estradiol benzoata in progesteona**

Estradiol benzoat (EB) in progesteron (PR) smo poskusnim mišim injicirali pod kožo po protokolu za testiranje ženskega spolnega obnašanja (opisano v poglavju 3.4.1).

### **3.2.5 Priprava testosteronskih vsadkov**

Za testosteronske vsadke smo uporabili kristalinični testosteron propionat (Testosterone propionat, Fluka Chemie AG, Sigma-Aldrich) in medicinsko silikonsko cevko (Laboratory tubing, Silastic) 1,02 mm notranjega in 2,16 mm zunanega premera. Cevke smo narezali na 15 mm dolge koščke. Cevko smo na eni strani zalepili z medicinskim silikonskim gelom (Medical Adhesive Silicone Type A Not Sterile, Silastic, Mich., ZDA). Skozi odprtino na drugi strani smo cevko napolnili s kristaliničnim testosteron propinoatom v dolžini 10 mm ter na nasprotni strani ponovno zalepili s silikonskim gelom. Testosteronske vsadke smo z operativnim posegom (v enaki anesteziji kot je opisano zgoraj) vstavili živalim v podkožje v področje leve lopatice že pred testom agresivnega obnašanja in jih pustili do žrtvovanja. Vsi načini dajanja spolnih hormonov so bili že opisani v literaturi in se uporabljajo za vzpodbuditev določenih vzorcev obnašanja (231, 1, 282).

## **3.3 PROUČEVANJE IZRAŽANJA GENOV V MOŽGANIH**

### **3.3.1 Izolacija RNA**

Vsi postopki za izolacijo RNA ter nadaljnja priprava poteka s sterilnim priborom in materialom, ki je brez prisotnih encimov, ki razgrajujejo RNA in DNA (RNaze in DNaze).

Pri starosti 60 do 65 dni smo po trem živalim vsakega genotipa (SF-1 KO samice in samci ter GDX/WT samice in samci); torej skupno 12-im živalim; odvzeli vmesni del možganov. Vzorec je obsegal predoptično področje, področje hipotalamusa, talamusa, amigdale, hipokampus in možganske skorje v tem področju (prikazano na Sliki 1). Žrtvovali smo jih s CO<sub>2</sub> in jim čim prej odvzeli možgane. Možgane smo položili na stekleno podlago na možgansko skorjo in z ventralne strani zarezali na točki, kjer se križata očesna živca, ter tik za hipokampusom. Možgane smo zamrznili na -80 °C. Ko smo imeli vse vzorce smo iz njih izolirali RNA po standardnem postopku s Trizolom<sup>®</sup>. Možgane smo homogenizirali v 1 mL Trizola s homogenizatorjem (IKA T10 Basic Ultra – Turrax, Nemčija). Po homogenizaciji smo pustili vzorec 5 minut pri temperaturi med 15 in 30 °C, da so beljakovinski kompleksi popolnoma razpadli. Potem smo dodali 200 µL kloroforma in močno

stresali 15 sekund in ponovno pustili 2 do 3 minute na 15 do 30 °C. Sledilo je 15-minutno centrifugiranje na 4 °C pri 10.000 obratih. Po tem smo imeli vzorce na ledu in odpipetirali zgornjo brezbarvno vodno fazo v novo epruveto in RNA precepitali s 500 µL hladnega izopropil alkohola. Po 10-minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo epruveto centrifugirali na 4 °C pri 13000 obratih 20 minut. V tej fazi se je RNA oborila na dnu epruvete. Odpipetirali smo supernatant in RNA sprali s 500 µL 75 % etanola, nato smo vsebino epruvete dobro premešali, vorteksirali in nato odpipetirali etanol, RNA usedlino smo sušili na zraku približno 10 minut. RNA smo raztopili v 20 µL vode brez nukleaz in jo shranili na -80 °C do nadaljevanja dela na Centru za funkcijsko genomiko in biočipe na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani.

### **3.3.2 Mikromreže**

Mikromreže smo uporabili za ugotavljanje profila izražanja genov v osrednjem delu možganov. V poskusu smo uporabili DNA-mikromreže Affymetrix, ki vsebujejo vse gene mišjega genoma t.i. Gene Chip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, ZDA). V tem primeru gre za enobarvne mikromreže, ker lahko na njih analiziramo oziroma hibridiziramo le po en vzorec. Vsebujejo 45000 setov sond, s katerimi analiziramo preko 39000 prepisov RNA, od tega jih je 34000 anotiranih.

Postopek priprave in izvedbe poskusa na mikromrežah traja tri dni. Sestavljen je iz več korakov, in sicer najprej pripravimo vzorec za hibridizacijo, nato ga hibridiziramo na mikromreži, sledi spiranje, označevanje in vizualizacija mikromreže ter preverjanje kvalitete. Temu sledi normalizacija in obdelava podatkov z interpretacijo rezultatov.

Pripravo cDNA za mikromreže smo izvedli po navodilih proizvajalca. Za vsak vzorec smo potrebovali 5 µg celotne izolirane RNA in pripravljen kit GeneChip® Expression 3'-Amplification One-Cycle Target Labeling and Control Reagents Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, ZDA). Vzorce smo hibridizirali na mikromreže GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, ZDA) in jih sprali z GeneChip® Fluidics Station 450, kot priporoča proizvajalec. Mikromreže

smo skenirali z GeneChip® Scanner 3000 7G in slike analizirali z GCOS (GeneChip® Operating Software).

### 3.3.3 Priprava komplementarne DNA (cDNA)

Za preverjanje rezultatov, ki smo jih dobili iz DNA-mikromrež, smo uporabili PCR v realnem času oziroma kvantitativni PCR v realnem času (*angl.* real-time polymerase chain reaction ali quantitative real-time PCR; qPCR; ). Zato smo morali pripraviti komplementarno cDNA z metodo PCR z obratnim prepisom (*angl.* reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR).

Najprej smo izmerili koncentracijo in kvaliteto izolirane RNA, tako da smo izmerili absorbanco (pri 260 nm) RNA s spektrofotometrom (SmartSpec 3000™, Bio-Rad, ZDA). Izračunali smo približno koncentracijo (upoštevajoč, da je pri  $A_{260}=1$  koncentracija RNA 40 µg/mL, koncentracija =  $A_{260} \times 40 \times$  redčitev).

Za reakcijo RT-PCR smo uporabili 2 µg izolirane RNA. Skupni volumen posamezne reakcije je bil 20 µL.

Za pripravo cDNA smo uporabili High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814).

Pripravili smo reakcijo v skupnem volumnu 20 µL:

2 µL PCR pufer (10x RT Buffer );

0,8 µL mešanica deoksiribonukleotidov (25x dNTP Mix, 100 mM);

2 µL naključni oligonukleotidni začetniki (10x RT Random Primers);

1 µL RNazni inhibitor (RNase inhibitor);

2 µg RNA;

do 20 µL DEPC vode (voda brez nukleaz).

Reakcijske epruvete smo nato vstavili v napravo za PCR, kjer je reakcija potekala po protokolu priporočenem za kit, ki smo ga uporabili (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems):

25 °C 10 minut;

37 °C 120 minut;

85 °C 5 minut;

4 °C neomejeno (shranjevanje).

### 3.3.4 Reakcija PCR v realnem času oziroma kvantitativen PCR v realnem času (qPCR)

Gene, ki so se statistično značilno različno izrazili med spoloma na DNA-mikromrežah, smo preverili še z metodo qPCR.

Za izvedbo qPCR smo uporabili napravo Applied Biosystems Abi Prism 7000 in reagente TaqMan® Gene Expression Assay in reakcijo izvajali na 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah (Applied Biosystems), s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za: *Uty* (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, na kromosomu Y), *Eif2s3y* (eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, strukturni gen na kromosomu Y); *Ddx3y* (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, na kromosomu Y); *Kdm5d* (lysine (K)-specific demethylase 5D, na kromosomu Y); *Xist* (inactive X specific transcripts; na kromosomu X); *Eif2s3x* (eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, strukturni gen na kromosomu x); *Actb* (beta-aktin, na avtosomu 5). *Actb*, aktin-beta je eden izmed t.i. vzdrževalnih ali hišnih genov, zato smo ga uporabili za notranjo kontrolo. Dodaten gen, ki smo ga preverili, kljub temu, da se razlika na DNA-mikromrežah ni pokazala je *Utx* (lysine (K)-specific demethylase 6A; na kromosomu X) (Tabela 2).

Oznaka	Uradno ime	Druge oznake	Dostopna številka	Naloga
Uty	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene	Hydb; mKIAA4057	NM_009484.2	Demetilacija histonov; dioksidazna aktivnost; vezava kovinskih ionov; oksireduktazna aktivnost (283)
<i>Eif2s3y</i>	eukaryotic translation initiation factor 2, podenota 3	Spy; Tfy; Eif-2gy	NM_012011.1	Vezava nukleotidov; vezava GTP-jev; prevajanje začetnega dejavnika (284)
<i>Ddx3y</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) zaporedje polipeptida 3	Dby; D1Pas1-rs1; 8030469F12 Rik	NM_012008.2	Vezava ATP; vezava RNA; hidrolazna aktivnost; vijačna aktivnost; (285)
<i>Kdm5d</i>	lysine (K)-specific demethylase 5D	HY; Smcy; Jarid1d	NM_011419.3	Vezava DNA; dioksidazna aktivnost; vezava cinkovih ionov; (286)
<i>Xist</i>	inactive X specific transcripts	AI314753; A430022B1 1	Non-coding RNA	Ne-kodirajoč gen znotraj XIC (X inactivation center) (287)
<i>Actb</i>	beta-aktin	Actx; beta-actin; E430023M0 4Rik	NM_007393.3	Vezava ATP; vezava NOS; vezava nukleotidov; vezava protein kinaze (288)

<i>Utx</i>	lysine (K)-specific demethylase 6A	Kdm6a	NM_009483.1	Demetilacija histonov; vezava kromatina; oksireduktana aktivnost (289)
------------	------------------------------------	-------	-------------	--

*Tabela 2: Uradne oznake, polna imena, druga imena in dostopna številka v bazi NCBI Gene za posamezen gen in naloge, ki jih opravlja.*

Za vsak gen smo najprej pripravili umeritveno krivuljo in se na podlagi teh rezultatov odločili, da bomo za nadaljnje raziskave uporabili koncentracijo 5 ng cDNA za posamezno reakcijo. Umeritveno krivuljo smo pripravili iz koncentracij 2, 5, 10 in 25 ng cDNA.

Pripravili smo reakcijske mešanice v končnem volumnu 15 µL. Vse reagente in mikrotitrsko ploščo smo med pripravo hranili na ledu.

Posamezna reakcijska mešanica qPCR končnega volumna 15 µL je vsebovala:

7,5 µL izhodiščne zmesi (TaqMan® Universal Master Mix II with UNG (Uracil-N-Glikozilaza), 2x);

0,75 µL mešanice specifičnih oligonukleotidnih začetnikov TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific Inc., Applied Biosystems);

do 15 µL vzorca (cDNA koncentracije 5 ng) + vode DEPC.

Mikrotitrne plošče smo vstavili v napravo za PCR v realnem času (Applied Biosystems Abi Prism 7000) in reakcija je potekla po protokolu:

50 °C 2 minuti (inkubacija Uracil-N-Glikozilaze, UNG);

95 °C 10 minut (aktivacija polimeraze);

40 ciklov:

95 °C 15 sekund (denaturacija DNA);

60 °C 1 minuta (prileganje začetnih oligonukleotidov in ustvarjanje novih verig DNA).

Sledila je statistična analiza podatkov, ki je opisana v poglavju 3.5.2.



### 3.3.5 Imunohistokemično barvanje svežih, plavajočih rezin za proučevanje izražanja genov

Možgane, ki smo jih predhodno pridobili s perfuzijo, smo pred rezanjem zalili v 5 % agarozo (Agarose, Sigma) in jih v hladnem 0,05M PBS-u z vibrotomom (Leica VT1000 S, Leica Biosystems Nussloch, Nemčija) razrezali na 50 µm debele rezine. Rezine smo najprej inkubirali v 0,1 M glicinu (Sigma), raztopljenem v 0,05 M PBS-ju 30 minut, nato pa v 0,5 % natrijevem borohidridu (Sigma) za 15 minut na 4 °C na stresalniku (50 tresljajev/minuto, Tehtnica, Domel, Slovenija), s čimer smo odstranili sledi fiksativa v tkivu rezin in prekinili ob fiksaciji nastale povezave med beljakovinami v celicah. Glicin in natrijev borohidrid smo sprali s 15- in 20-minutnim spiranjem v hladnem 0,05M PBS-u. Na rezinah smo blokirali nespecifična vezna mesta s 5 % normalnim kozjim serumom (*angl.* normal goat serum, NGS, Chemicon, Temecula, CA, ZDA) z 0,5 % detergentom Triton X-100 (Sigma) in 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Nemčija) za 30 do 120 minut na 4 °C. Nato smo rezine prestavili v posodice in jim dodali ustrezno razredčena primarna protitelesa v 0,05 M PBS-ju, ki je vseboval 1 % goveji serumski albumin (*angl.* bovine serum albumin, BSA, Sigma) in 0,5 % Triton X-100. V našem poskusu smo uporabili primarna protitelesa v naslednjih razredčitvah: mišja proti beljakovini za vezavo Ca<sup>2+</sup> (Kalbindin D-28K, kalbindin, CALB1; 1:20.000; Sigma) in kunčja proti arginin vazopresinu (AVP; 1:15.000; ImunoStar, WI, ZDA). Rezine smo inkubirali s primarnimi protitelesi na stresalniku 2 do 3 dni na 4 °C. Nato smo jih štirikrat po 15 minut spirali na sobni temperaturi v 0,05 M PBS-ju, ki je vseboval 1 % NGS in 0,02 % detergentom Triton X-100.

Po spiranju smo na rezine dali sekundarna protitelesa v 0,05 M PBS-u z 1 % NGS in 0,5 % detergentom Triton X-100. Rezine smo inkubirali s sekundarnimi protitelesi vsaj 2 uri in nato ponovno štirikrat spirali po 15 minut v 0,05 M PBS-u z 0,02 % detergentom Triton X-100. Sekundarna proti-mišja protitelesa pridobljena iz oslov (DAM, Jackson Immunoresearch, PA, ZDA) in vezana z biotinom smo uporabljali v razredčitvah 1:2500, proti-kunčja pridobljena v oslu (DAR) pa v koncentraciji 1:500. Spiranju je sledila enourna inkubacija v streptavidinu, na katerega je vezan encim peroksidaza (Jackson Immunoresearch, ZDA) razredčenem v 0,05 M PBS-u z 0,5 % Triton X-100 (redčitev 1:2500) pri sobni temperaturi in s tem smo označili

vezana sekundarna protitelesa. Sledilo je spiranje eno uro v 0,05 M slanem pufru Tris (TBS; 0,05 M Tris-HCl/0,9 % NaCl; pH 7.5; Sigma) pri sobni temperaturi.

Da so vezani kompleksi postali vidni, smo uporabili kromogeno raztopino 0,025 % DAB (3'3' - diaminobenzidin/amonijev niklov (II) sulfat, Sigma) v Tris pufru (pH 7,5), ki je vseboval 0,02 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na sobni temperaturi 5 minut. Peroksidazno reakcijo smo prekinili s spiranjem v pufru nizke ionske jakosti trikrat po 10 minut na stresalniku pri sobni temperaturi. Po imunohistokemičnem barvanju smo rezine nanесли na predmetnice, obdelane z adhezivom (APES, Sigma), in jih pustili sušiti čez noč. Naslednji dan smo rezine na predmetnicah sprali z destilirano vodo, jih posušili ter pokrili s hidrofobnim medijem za pripravo trajnih mikroskopskih preparatov (Pertex Medite, Burgdorf, Nemčija). Kontrolo in oceno delovanja primarnih protiteles ter imunoreaktivne vzorce distribucije smo ocenili pod svetlobnim mikroskopom.

Postopek je bil predhodno optimiziran in preverili smo protitelesa, zato v posamezni seriji nismo delali pozitivne in/ali negativne kontrole. Uporabili smo rezine od začetka predoptičnega področja pa do začetka hipokampusu.

### **3.3.5.1 Analiza področij v možganih**

Pri kvalitativni in kvantitativni analizi biokemijsko označenih elementov (telesa nevronov, dendriti in aksoni, podporne celice) ter analizi mesta nahajanja v rezinah možganov moramo biti pozorni predvsem na dve stvari, in sicer na kot, pod katerim so možgani rezani, in na meje področja v možganih, ki ga proučujemo. Načini so opisani in uporabljeni v literaturi (4, 290, 171). Vse strukture in področja v možganih ter oddaljenost posameznih rezin od bregme, ki so uporabljeni v tej analogi, smo določili na osnovi atlasa mišjih možganov pod naslovom "The mouse brain in stereotaxic coordinates" (291, 292).

### **3.3.5.2 Zajemanje digitalnih slik za analizo**

Možgane smo slikali s svetlobnim mikroskopom, ki ima vgrajeno digitalno kamero (Microphot FXA mikroskop s 3CCD-kamero Nikon, Japonska in mikroskop Eclipse 80i z digitalno kamero DS-Fi1, Nikon). Digitalne slike smo uredili s programom Photoshop CS za operacijski sistem Windows (Windows7, Microsoft, ZDA). Pri tem

je šlo za urejanje osvetlitve in kontrasta slike pri analizi možganov. S tem nismo vplivali na kakovost imunohistokemičnega barvanja na sliki.

### 3.4 IZVEDBA POSKUSOV OBNAŠANJA

V poskusih obnašanja smo opazovali samice in samce brez gena *SF-1* (*SF-1 KO* samice – *SF-1 KO F*; *SF-1 KO* samci – *SF-1 KO M*) ter samice in samce divjega tipa, ki smo jim predhodno odstranili spolne žleze (*OVX/WT* in *CAS/WT*). Živali so bile poleg spola in genotipa razdeljene glede na izpostavljenost testosteron propionatu v 4 skupine, kot je opisano v poglavju 3.1.2. Skupno je bilo testiranih 113 živali. Podrobnejša sestava skupin testiranih živali je prikazana v Tabeli 3. Vsi poskusi so bili opravljeni “na slepo”, kar pomeni, da opazovalec ni vedel, katero miš (glede na spol, genotip, tretiranje ...) opazuje. Živali so bile nastanjene skupinsko od 3 do 5 živali v kletki. Vse poskuse smo opravili v skladu s predpisi (v skladu s priporočilom Komisije 2007/527/EC in z Uredbo EC 1069/2009) in v skrbi za dobrobit živali. Poskuse smo snemali z digitalno kamero (*DCR-DVD 101E*, Sony, Japonska). Opazovanja in pojav različnih dogodkov med opazovanji smo ocenjevali s programom *StopWatch+* (Center for Behavioral Neuroscience, Atlanta, ZDA). Nekaj dni pred začetkom poskusov smo živalim zadnjič zamenjali nastilj, da ne bi s svežim povzročali stresa zaradi navajanja, saj si miši z izločki označujejo svoj teritorij. Med poskusom smo iz mrež odstranili hrano in vodo in po koncu poskusa zamenjali del nastilja.

	<b>Kontrole (brez TP)</b>	<b>TP pred rojstvom</b>	<b>TP po rojstvu</b>	<b>TP pred in po rojstvu</b>
<b>SF-1 KO F</b>	8	9	6	7
<b>OVX/WT</b>	6	8	10	6
<b>SF-1 KO M</b>	7	7	5	6
<b>CAS/WT</b>	7	7	8	6
<b>Skupno število</b>	28	31	29	25

*Tabela 3: Tabela prikazuje število živali uporabljenih v testih obnašanja in za analizo izražanja genov v možganih glede na tretiranje s TP in po posameznih genotipih.*

### 3.4.1 Poskus ženskega spolnega obnašanja

Opazovanje ženskega spolnega obnašanja smo izvedli na vsaki živali šestkrat in med vsakim testom je bilo 3 do 6 dni odmora, da smo s tem posnemali pojavni cikel miši, ki v povprečju traja 4 do 6 dni (293). Živali so bile testirane v temnem delu ciklusa vsaj 2 uri po začetku teme, saj so takrat bolj aktivne. Stimulusne živali (samce z izkušnjami v parjenju) smo vsaj 6 ur pred testiranjem prestavili v akvarijske posode, da so se privadili na okolje, nastilj smo jim odstranili tik pred testiranjem. Testne živali smo tretirali s hormoni, in sicer z 1 µg estradiol benzoata (EB) okoli 48 ur pred poskusom in potem še 0,8 mg progesterona (PR) 3 do 8 ur pred testiranjem (294). Poskuse smo običajno že sproti ocenjevali s programom StopWatch+, poleg tega pa smo jih tudi snemali, da smo lahko kasneje določene parametre dodatno preverili. Poskus se je začel, ko smo tesno žival dali k stimulusnemu samcu. Če samec v 5-ih minutah ni pokazal zanimanja za testno žival, smo uporabili drugega. Skupno smo v vseh testiranjih uporabili 23 stimulusnih samcev (WT ali SF-1 HET). Poskus je trajal največ 20 minut ali do ejakulacije ali pa do napada oziroma ugriza testne živali. Spolno sprejemljivost smo ocenjevali z oceno od 1 do 5, kot je opisano malo kasneje.

V poskusu smo ocenjevali in beležili po protokolu, ki je predstavljen v delu dr. Grgurevič (295):

- število in začetek poskusov naskoka (kot poskus naskoka smo zabeležili akt, ko se je stimulusni samec s sprednjimi tačkami poskušal vzpeti na ledveni del testne živali, vendar mu je pri tem testna žival zbežala ali celo brcala);
- število naskokov (za naskok smo šteli akt, ko je stimulusni samec s sprednjima tačkama tesno prijel žival in se povzpel na njo, testna žival pa je stala na tleh vsaj s tremi tačkami). To smo izračunali s seštevkom ocene spolne sprejemljivosti (L0 do L5);
- število in začetek potiskov medenice, ki sledijo naskoku;
- število in začetek kopulacije;
- spolno sprejemljivost testne živali, ki smo jo ocenjevali kot usločenost hrbta oziroma lordoze z oceno od 1 do 5 kot je opisano v prispevku Burns-Cusatovove in njenih sodelavcev (86);

- število in začetek agresivnega obnašanja testne živali, ob ugrizu smo poskus končali;
- čas ejakulacije (konec poskusa).

Ocenjevanje lordoze smo prilagodili in izvedli, kot je opisano (295), in sicer:

L1 – testna miš se ob poskusu naskoka za kratek čas ustavi, vendar hitro konča stik s samcem;

L2 – testna miš pusti samcu, da se vzpne na ledveni del, vendar se ob poskusu kopulacije odmakne in tako prekine kopulacijo;

L3 – testna miš pusti samcu, da se vzpne na ledveni del; ko poskuša kopulirati, se premika in lahko tudi oglašča; kopulacijo prekine stimulusni samec;

L4 – testna miš pusti samcu naskok in kopulacijo, se pri tem lahko oglašča in lahko tudi rahlo premika; kopulacijo prekine samec;

L5 – testna miš pusti samcu naskok in kopulacijo; med kopulacijo je pri miru in se ne oglašča; kopulacijo prekine samec.

Zaradi ugotovitev med opazovanji smo dodali še L0, ko je testna žival stala na tleh samo z dvema ali s tremi tačkami, vendar je kljub temu dovolila naskok.

Iz ocen lordoze smo izračunali t.i. količnik lordoze (*angl.* lordosis quotient; LQ), ki v našem primeru predstavlja delež naskokov z dobro lordozo (L4 in L5) glede na vse naskoke ( $LQ = \text{skupno število lordoz 4 in 5} / \text{število naskokov}$ ) (296).

### **3.4.2 Poskus agresivnega obnašanja**

Za ugotavljanje agresivnega obnašanja smo uporabili iste miši kot za žensko spolno obnašanje. Tri do 6 dni po končanem testiranju ženskega spolnega obnašanja smo mišim vstavili vsadke s testosteron propionatom in nato začeli s testiranjem agresivnega obnašanja 7 dni po vsaditvi vsadkov.

Poskus agresivnega obnašanja smo izvedli v zadnjem delu svetlega dela ciklusa. Za stimulusno žival smo uporabili odraslega samca linije A/J. Testno žival smo vsaj 6 ur pred poskusom nastanili v akvarijsko kletko in ji prenesli nastilj iz skupinske kletke, da se je privadila na okolje, ki je do konca testiranja predstavljala njeno domače okolje. Stimulusni samec je predstavljal vsiljivca, ki je pri testni miši vzpodbudil agresivno obnašanje. To je t.i. test "resident-intruder" (155, 297). Posamezen test je trajal največ 15 minut oziroma 2 minuti od začetka agresivnega

obnašanja. Test smo izvajali v treh zaporednih dneh in tako vsako miš testirali trikrat. Posamezen test smo ocenjevali sproti s programom StopWatch+ in jih tudi snemali za kasnejše preverjanje. S programom StopWatch+ smo beležili naslednje parametre:

- začetek in število ugrizov;
- začetek in število napadov (ko je testna miš s tačkami udarila stimulusnega samca ali pa se je zagnala vanj);
- začetek, število in trajanje agresivnega negovanja (ko je testna miš stimulusni pulila dlake ali brke ali jo kakorkoli vidno nadlegovala, stimulusna miš obstane, se umika ali celo cvili);
- začetek in število vibriranj z repom;
- začetek, število in trajanje prerivanja (ko obe miši stojita na zadnjih tačkah in se s sprednjimi prerivata);
- začetek, število in trajanje preganjanja (ko poskusna miš podi nasprotnika po kletki).

Testirane miši smo v treh dneh po koncu testiranja žrtvovali s postopkom tkivne perfuzije in odvzeli možgane za kasnejše proučevanje.

### **3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV**

#### **3.5.1 Analiza rezultatov DNA-mikromrež**

Analiza podatkov, ki smo jih pridobili po skeniranju DNA-mikromrež z GeneChip® Scanner 3000 7G in analizi slik z GCOS (GeneChip® Operating Software), je bila opravljena z uporabo statističnega programa Orange (Laboratorij za bioinformatiko, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana), s pomočjo dr. Petra Juvana.

Pred samo analizo podatkov smo izvedli še postopek normalizacije in s tem preverili, če je prišlo do kakšnega večjega odstopanja, ki je lahko posledica tovarniške napake pri izdelavi mikromreže ali napake pri izvedbi poskusa.

Po statistični obdelavi podatkov smo za diferenčno (razlikovalno) izražene gene upoštevali tiste, katerih prilagojena  $p$ -vrednost je nižja od 0,05. Prilagojena  $p$ -vrednost je popravljena  $p$ -vrednost za primer lažno pozitivnih rezultatov, t.i.

korekcija FDR (*angl.* false discovery rate), saj je zaradi velikega števila testiranih genov verjetnost lažno pozitivnih rezultatov zelo velika.

### 3.5.2 Analiza rezultatov qPCR

Obdelavo podatkov smo opravili po metodi po Pfafflu (298, 299).

Za analizo podatkov pridobljenih v poskusu qPCR smo najprej izračunali relativno izraženost genov po metodi z učinkovitostjo (*angl.* efficiency, E) popravljene  $\Delta Ct$  (*delta Ct*), ki smo jo normalizirali z napako ene notranje kontrole (HKG, vzdrževalni ali hišni gen, *angl.* house keeping gene) (*angl.* efficiency corrected  $\Delta Ct$  method normalized with single control normalization error). Vsak vzorec smo delali v dveh zaporednih vzorcih, zato smo za nadaljnje izračune uporabili povprečje teh dveh praznih ali kvantitativnih ciklov – Cq (*angl.* quantification cycle) (300). Učinkovitost (E) smo izračunali po enačbi:

$$E = (10^{-1/k} - 1) \times 100$$

k – naklon premice, ki ga dobimo iz umeritvene krivulje.

Naša enačba za izračun razlik med relativno izraženostjo se je glasila:

$$\text{Količnik razlike} = \frac{\left( \frac{E^{-Cq_{GOI\ KO}}}{NF_{KO}} \right)}{\left( \frac{E^{-Cq_{GOI\ WT}}}{NF_{WT}} \right)}$$

Količnik razlike (*angl.* fold change) – med relativno izraženostjo gena pri SF-1 KO živali in pri živali GDX/WT

GOI – preiskovani gen (*angl.* gene of interest)

HKG – vzdrževalni ali hišni gen

Povprečja Cq smo izračunali za vsak vzorec in vsak gen.

Izračunali smo relativno količino gena popravljeno z učinkovitostjo za vsak vzorec in gen ( $E^{-Cq}$ ).

Normalizacijski faktor – NF (*angl.* normalization factor) smo izračunali po formuli:

$$NF_{\text{vzorec}} = B_{\text{vzorec}}/C$$

Za izračun B in C smo morali pred tem izračunati A. In sicer:

A = z učinkovitostjo popravljeno količino vzorca delimo z najvišjo količino posameznega gena za vsak posamezen vzorec in vsak HKG

B = geometrična sredina vseh A za posamezni vzorec

C = geometrična sredina vseh B

Po izračunu relativne izraženosti posameznega gena smo te primerjali med SF-1 KO in GDX/WT živalmi in ugotavljali ali so statistično značilno različno izraženi z metodo analize variance.

### 3.5.3 Analiza rezultatov testov obnašanja

Podatke smo statistično analizirali s statističnim programom NCSS (NCSS 7, Kaysville, UT, ZDA).

Uporabili smo metodo analize variance (ANOVA) ponavljajočih meritev, ker smo tako poskuse ženskega spolnega kot tudi agresivnega obnašanja izvajali večkrat. Statistično smo preverili razliko v vsakem posameznem parametru obnašanja (opisani pri izvedbi obnašanja). Upoštevali smo več neodvisnih spremenljivk, in sicer spol (moški, ženski), genotip (KO, WT) in tretiranje s testosteron propionatom (pred rojstvom, po rojstvu, pred in po rojstvu ter kontrolne). Posamezne teste pa smo upoštevali kot ponavljajoča se meritev. Za statistično značilno razliko smo upoštevali rezultat, kjer je bila vrednost p nižja od 0,05.

Razlike med posameznimi skupinami znotraj ene spremenljivke smo dodatno ovrednotili s Fisherjevim LSD (*angl.* Fisher's least significant difference) *post hoc* testom.

Vsi rezultati na diagramih so prikazani kot povprečne vrednosti, ki smo jih izračunali iz vseh ponovitev poskusov pri posameznih živalih s standardno napako.

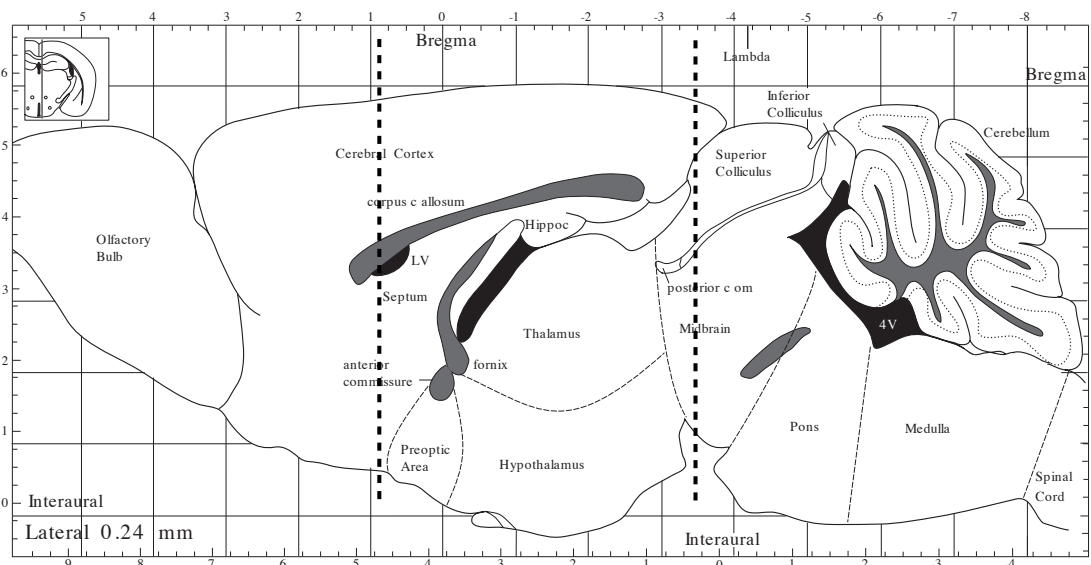


## 4 REZULTATI

### 4.1 IZRAŽANJE GENOV V VMESNEM DELU MOŽGANOV PRI MIŠIH BREZ *SF-1* IN PRI MIŠIH DIVJEGA TIPA

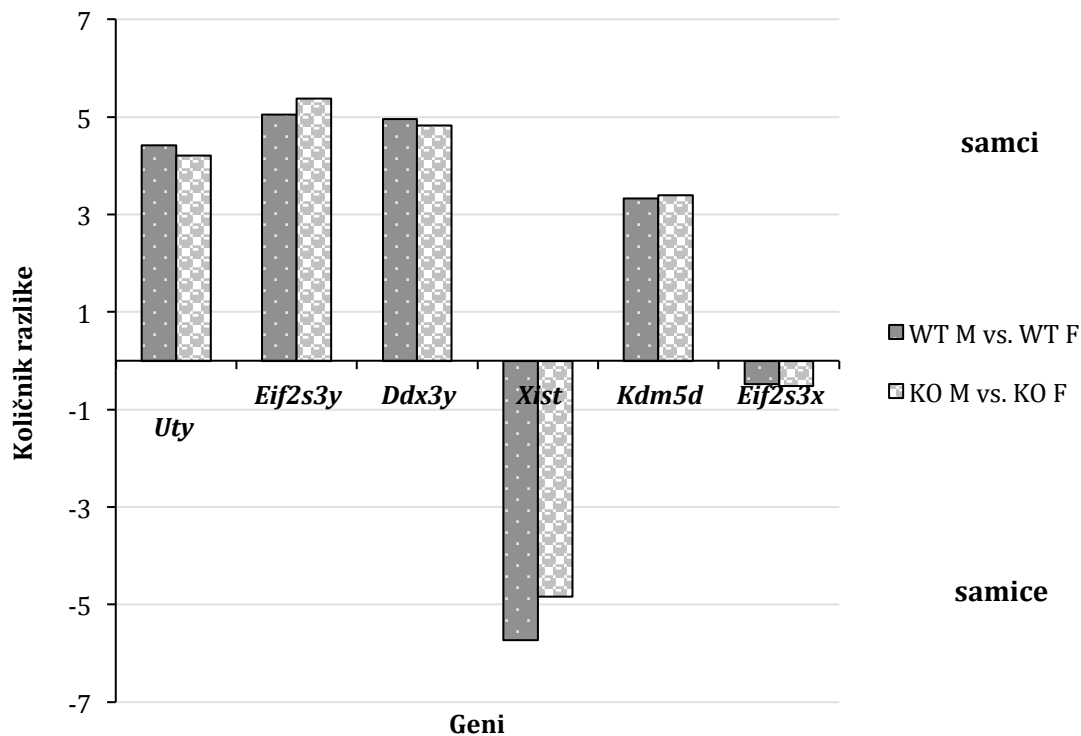
#### 4.1.1 Izražanje genov v osrednjem delu možganov na DNA-mikromrežah

Za proučevanje izražanja genov pri miših brez gena *SF-1* (*SF-1* KO) in pri miših divjega tipa, ki smo jim pred puberteto odstranili spolne žleze (*GDX/WT*), smo vzeli vmesni del možganov v odraslem obdobju (pri starosti 60 dni, *PN60*), ki je obsegal predoptično področje, področje hipotalamusa, talamusa, amigdale, hipokampusa in možganske skorje v tem področju kot je prikazano na sliki 1.



**Slika 1:** Slika prikazuje mišje možgane v vzdolžnem prerezu. Preiskovano področje je označeno med dvema črtkanima črtama. Vir slike je *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (291).

Po obdelavi podatkov, pridobljenih po hibridizaciji in skeniranju DNA-mikromrež, je analiza pokazala razlike pri izražanju genov med spoloma, in sicer dobili smo 6 različno izraženih genov. Štirje od teh genov *Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y*, *Kdm5d* so vezani na kromosom Y in izraženi le pri samcih obeh genotipov, *SF-1* KO in *CAS/WT*, vendar brez razlik med genotipoma samcev. Druga dva različno izražena gena, *Xist* in *Eif2s3x*, sta bila signifikantno višje izražena pri samicah obeh genotipov in sta vezana na kromosom X (prikaz na sliki 2).



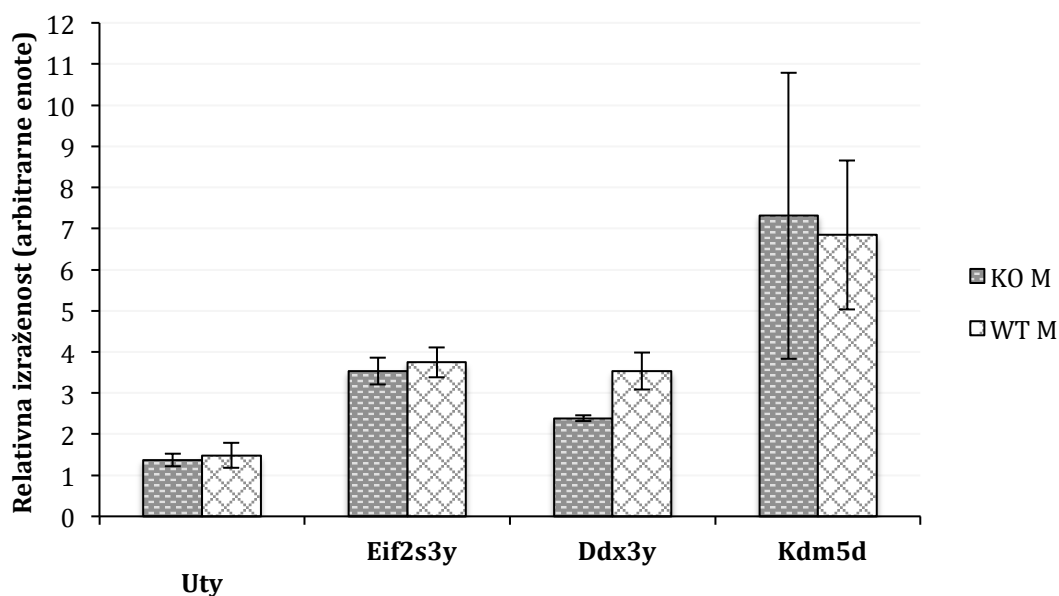
**Slika 2:** Grafični prikaz primerjave izražanja genov na DNA-mikromrežah pri SF-1 KO samcih (KO M) in SF-1 KO samicah (KO F) (KO M vs. KO F) ter pri CAS/WT samcih (WT M) in OVX/WT samicah (WT F) (WT M vs. WT F). V vsaki skupini so bile po tri živali.

Geni *Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y*, *Kdm5d* so izraženi pri samcih obeh genotipov statistično značilno višje kot pri samicah (prikazani na zgornjem delu grafikona), medtem ko sta *Xist* in *Eif2s3x* bolj izražena pri samicah obeh genotipov (prikazana na spodnjem delu grafikona).

Rezultati po analizi DNA-mikromrež so podani za vrednost  $p < 0,05$  z upoštevanjem stopnje lažnih odkritij (FDR; *angl.* false discovery rate).

#### 4.1.2 Preverjanje izražanja genov v vmesnem delu možganov z metodo qPCR

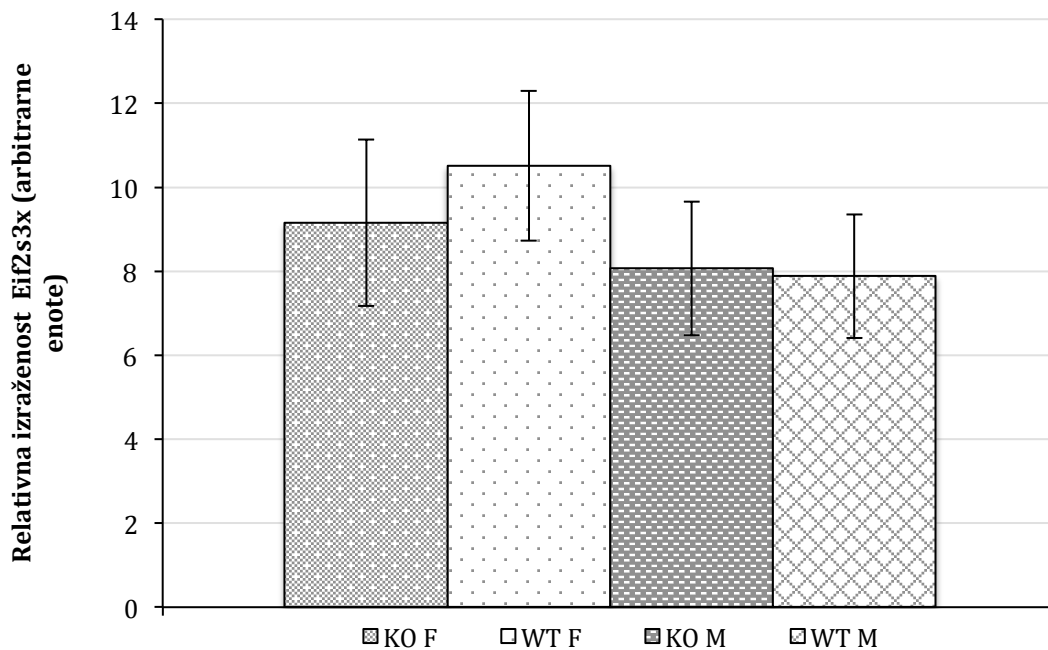
Rezultate, pridobljene iz poskusa na DNA-mikromrežah, smo preverili z metodo qPCR. Za poskus smo uporabili isti vzorec izolirane RNA kot za mikromreže. Preverili smo izražanje vsakega gena posebej (*Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y*, *Kdm5d*, *Eif2s3x*, *Xist*) in ga normalizirali glede na izraženost HKG *Actb*, ki je predstavljal notranjo kontrolo oziroma normalizacijo v našem poskusu. Vsi rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativne izraženosti posameznega gena z označeno standardno napako povprečja (S.E.M.) za posamezen genotip, ki smo jo izračunali, kot je opisano v poglavju 3.5.2. Rezultati so prikazani na slikah 3, 4 in 5.



**Slika 3:** Grafični prikaz relativne izraženosti genov *Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y*, *Kdm5d* pri samcih SF-1 KO (KO M) in CAS/WT (WT M).

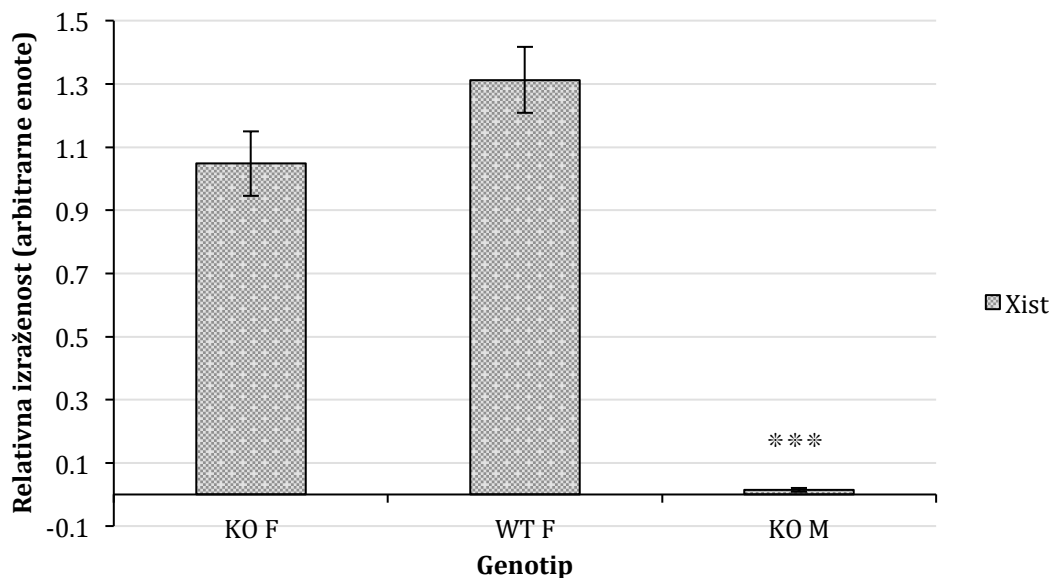
Relativna izraženost genov je podana v arbitrarnih enotah. Izraženost genov med genotipoma (SF-1 KO in WT) se statistično značilno ne razlikuje. V vsaki skupini so bile po tri živali. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezen genotip.

Izražanje teh genov smo preverili tudi pri samicah obeh genotipov, vendar le-ti pri njih niso bili izraženi, saj so vsi štirje geni vezani na kromosom Y.



**Slika 4:** Grafični prikaz relativne izraženosti *Eif2s3x* pri samicah SF-1 KO (KO F), samicah OVX/WT (WT F), samcih SF-1 KO (KO M) in pri samcih CAS/WT (WT M).

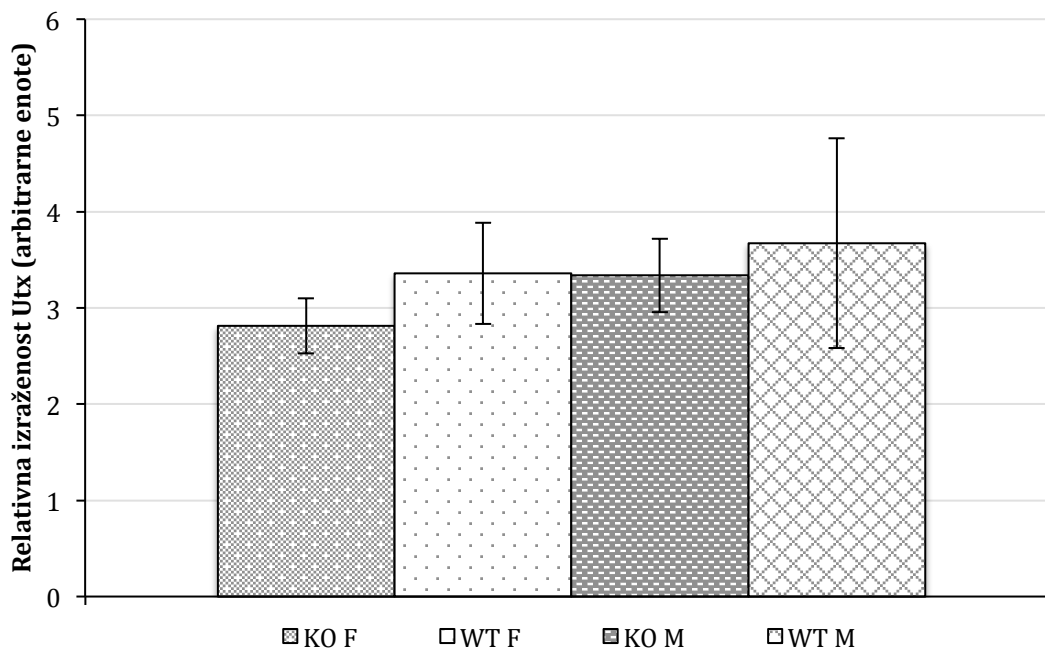
Rezultati kažejo, da je izraženost *Eif2s3x* podobna pri vseh štirih genotipih ne glede na spol. To kaže, da je tista rahla razlika v korist ženskega spola, ki se je izrazila pri rezultatih iz DNA-mikromrež, statistično neznačilna. V vsaki skupini so bile po tri živali. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezen genotip.



**Slika 5:** Grafični prikaz relativne izraženosti *Xist-a*, gena, ki je odgovoren za inaktivacijo enega kromosoma X pri samicah.

Relativna izraženost med samicami SF-1 KO (KO F) in samicami OVX/WT (WT F) se statistično ne razlikuje. Pri samcih SF-1 KO (KO M) se je pojavila zelo nizka izraženost *Xista-a*, ki bi jo bilo za dokončno potrditev potrebno preveriti z drugimi metodami. Pri samcih CAS/WT nismo ugotovili izražanja *Xist-a*. V vsaki skupini so bile po tri živali. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezen genotip (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

Znano je, da del genov, ki se nahajajo na kromosomu X, uide inaktivaciji enega kromosoma X pri samicah (pri ženskah do 15%) (30). Po podatkih iz literature je gen *Utx* eden izmed genov, ki običajno uidejo tej inaktivaciji (301). Ker so naši rezultati na DNA-mikromrežah pokazali razliko v *Uty* (ki je homolog *Utx-a* na kromosomu Y), smo dodatno preverili še relativno izražanje *Utx* v naših vzorcih, vendar razlike med genotipi nismo ugotovili (Slika 6).



**Slika 6:** Grafični prikaz relativne izraženosti *Utx* pri samicah SF-1 KO (KO F), samicah OVX/WT (WT F), samcih SF-1 KO (KO M) in pri samcih CAS/WT (WT M).

Relativna izraženost *Utx* ne kaže statistično značilnega izražanja med SF-1 in WT mišmi, niti med spoloma. V vsaki skupini so bile po tri živali. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezen genotip.

#### 4.2 OBNAŠANJE MIŠI PO DODAJANJU TESTOSTERONA

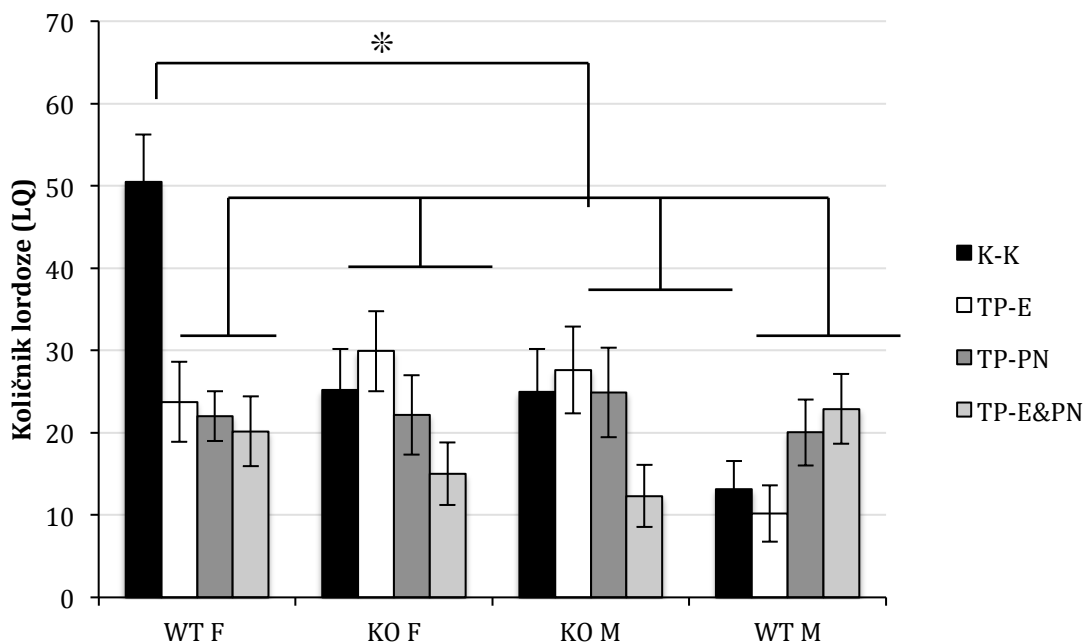
V odraslem obdobju smo miši brez gena *SF-1* (SF-1 KO) in miši divjega tipa (GDX/WT) obeh spolov naprej testirali v testu ženskega spolnega obnašanja, potem smo jim vstavili testostेरonske vsadke in jih testirali še za agresivno obnašanje. Imeli smo štiri različne skupine tretiranja:

- tretirane pred rojstvom (TP na E13 in E16) (oznaka TP-E);
- tretirane po rojstvu (TP na PN 1, PN3 in PN5) (oznaka TP-PN);
- tretirane pred in po rojstvu (TP na E13, E16 in PN 1, PN3 in PN5) (oznaka TP-E&PN);
- kontrolne (samo olje, brez TP) (oznaka K-K).

Oznake o tretiranju veljajo tako za žensko spolno obnašanje kot tudi za agresivno obnašanje.

#### **4.2.1 Izražanje ženskega spolnega obnašanja pri miših SF-1 KO in GDX/WT po dodajanju testosterona v obdobju ob rojstvu**

V odraslem obdobju, po starosti 70 dni, smo živali začeli testirati v testu za žensko spolno obnašanje. Vsaka žival je bila testirana 6-krat. Ocenjevali smo lordozo in druge parametre ženskega spolnega obnašanja, ki ocenjujejo tudi stimulusnega samca. Prikazani so rezultati za količnik lordoze (LQ) (Slika 7) in število lordoz (L), ocenjenih z oceno 5 v zadnjem, šestem testu, kjer se je pokazala velika razlika med vsemi genotipi v primerjavi s samicami divjega tipa (Slika 8), kar kaže na defeminizacijo in maskulinizacijo pri živalih, tretiranih s testosteronom. Pri kontrolnih živalih brez gena *SF-1* (tistih, ki niso prejemale TP) pa kaže, da te živali niso popolnoma feminizirane, saj ne kažejo popolnega ženskega spolnega obnašanja in torej kljub temu, da fenotipsko samci in samice SF-1 KO izgledajo kot samice OVX/WT, njihovo obnašanje ne ustreza obnašanju samic WT (OVX/WT) ( $p < 0.05$ ). Na Sliki 9 je prikazan LQ pri samicah WT (OVX/WT) v posameznih testih in v vseh štirih različno tretiranih skupinah. Rezultati kažejo, da imajo samice, ki niso prejemale TP, najvišji količnik lordoze in da imajo vse ostale v drugem, tretjem in četrtem testu statistično značilno nižji LQ. V zadnjem, šestem testu (označen kot 5, ker prvega nismo analizirali), pa je ta razlika prisotna samo še v primerjavi med samicami, ki niso prejemale TP, in tistimi, ki so prejemale TP po rojstvu ( $p < 0,05$ ). Na Slikah 10 in 11 je prikazano število naskokov in poskusov naskokov, kjer pa se niso pokazale statistično značilne razlike niti med spoloma niti med genotipoma in niti med različno tretiranimi skupinami. Vsi rezultati testov obnašanja so bili analizirani z analizo variance (ANOVA) ponavljajočih se meritev in ovrednoteni s Fisherjevim LSD *post hoc* testom. Število posameznih živali v skupini je prikazano v poglavju 3.4 v Tabeli 3.

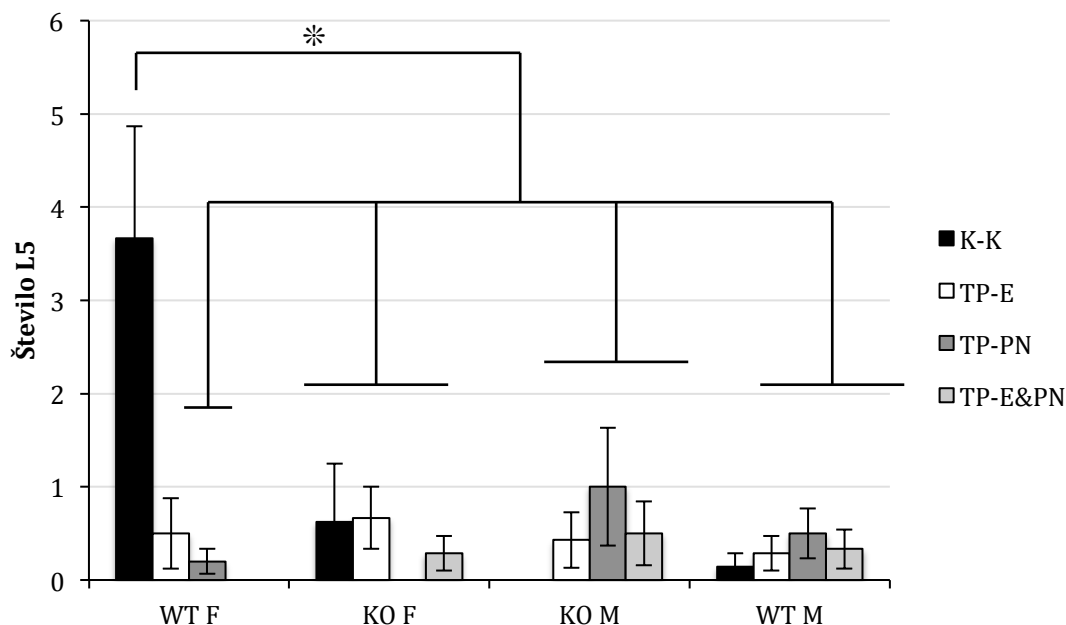


**Slika 7:** Grafični prikaz količnika lordoze (LQ) – povprečja vseh petih analiziranih testov ženskega spolnega obnašanja pri samicah OVX/WT (WT F), samicah SF-1 KO (KO F), samcih SF-1 KO (KO M) in samcih CAS/WT (WT M) in pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).

Iz grafa je razvidna statistično značilna razlika med kontrolnimi samicami OVX/WT (WT F) v primerjavi z vsemi ostalimi genotipi, SF-1 KO samicami (KO F) in samci (KO M) ter CAS/WT samci (WT M) v vseh skupinah in samicami OVX/WT ostalih tretiranih skupin.

Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti LQ z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezno testirano skupino miši (\*  $p < 0,05$ ).

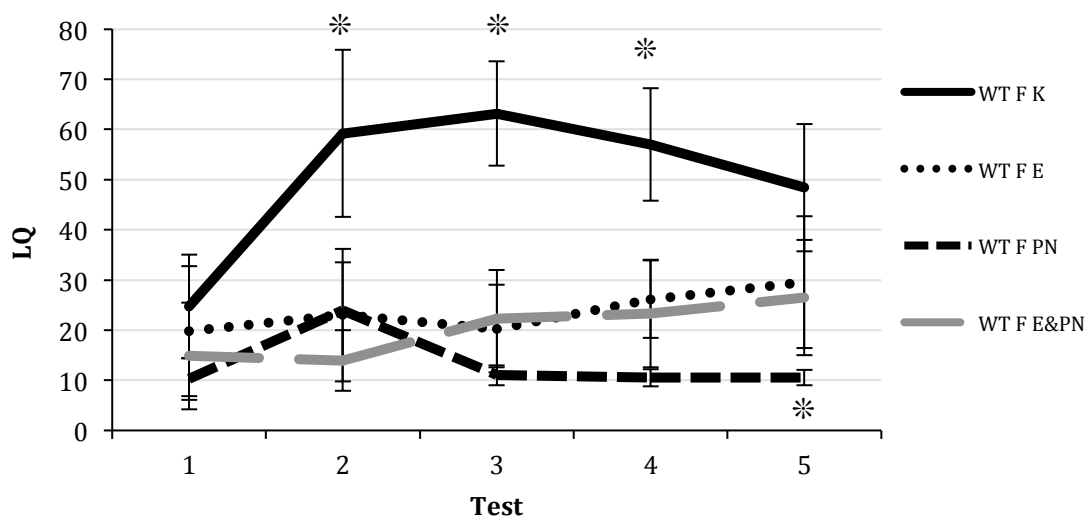




**Slika 8:** Grafični prikaz števila lordoz 5 (L5) pri zadnjem testu ženskega spolnega obnašanja pri samicah OVX/WT (WT F), samicah SF-1 KO (KO F), samcih SF-1 KO (KO M) in samcih CAS/WT (WT M) in pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).

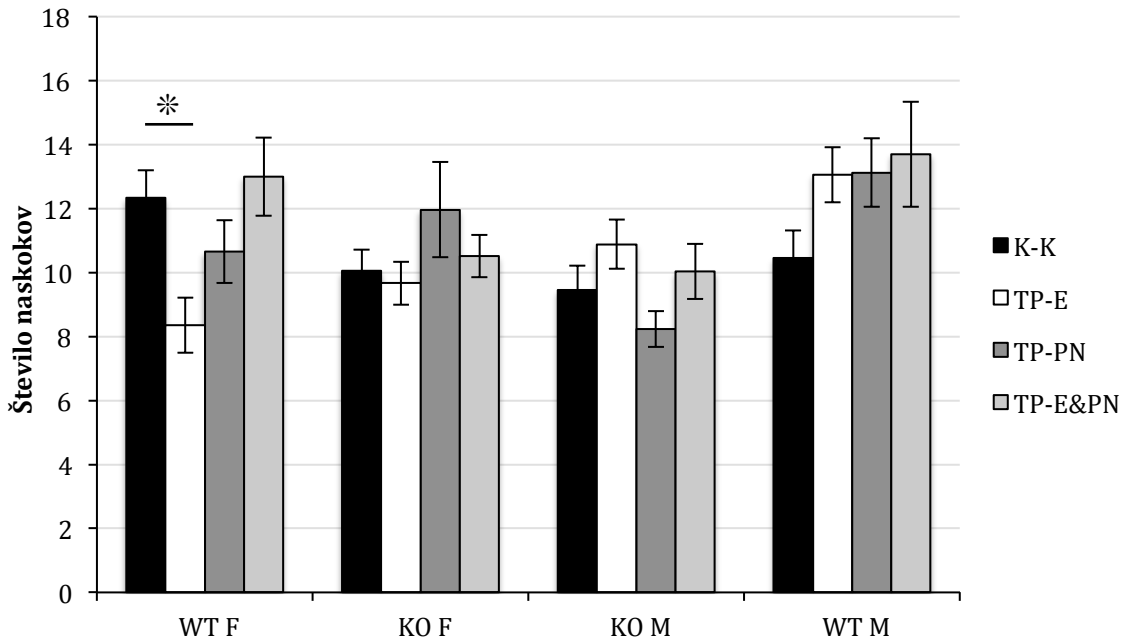
Graf prikazuje statistično značilne razlike med netretiranimi samicami OVX/WT K-K in vsemi ostalimi skupinami živali, ki smo jih testirali pri ženskem spolnem obnašanju.

Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti L5 v zadnjem testu z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezno testirano skupino miši (\*  $p < 0,05$ ).



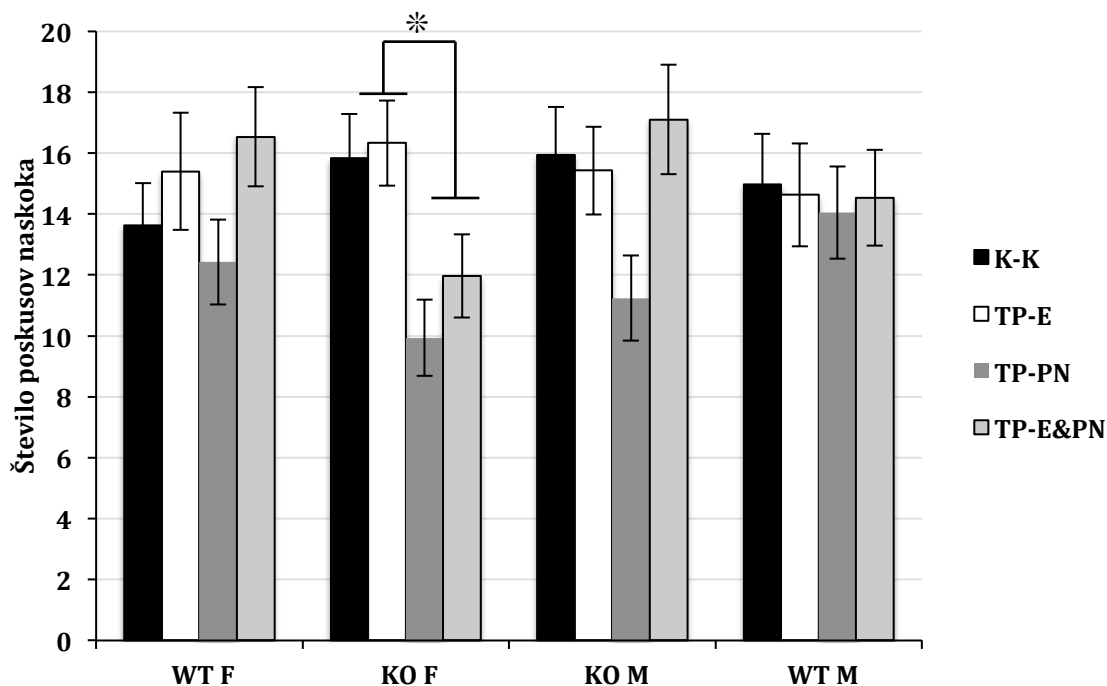
**Slika 9:** Grafični prikaz količnika lordoze (LQ) pri samicah OVX/WT za posamezen test v različno tretiranih skupinah (brez dodajanja TP – WT F K; tiste, ki so prejemale TP samo pred rojstvom – WT F E; tiste, ki so prejemale TP samo po rojstvu – WT F PN; tiste, ki so prejemale TP pred in po rojstvu – WT F E&TP). LQ je pri OVX/WT, ki niso prejemale TP (WT F K), pri drugem, tretjem in četrtem testu statistično značilno višji od ostalih, tretiranih skupin. Pri zadnjem testu pa je ta razlika prisotna samo še med netretiranimi (WT F K) in tretiranimi po rojstvu (WT F PN).

Rezultati so prikazani kot povprečna vrednosti LQ v posameznem testu ženskega spolnega obnašanja z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezno testirano skupino miši OVX/WT (\*  $p < 0,05$ ).



**Slika 10:** Grafični prikaz števila naskokov v vseh petih analiziranih testih ženskega spolnega obnašanja pri samicah OVX/WT (WT F), samicah SF-1 KO (KO F), samcih SF-1 KO (KO M) in samcih CAS/WT (WT M) pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).

Graf prikazuje povprečno število naskokov z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezno testirano skupino. Med skupinami ni izražene nobene statistično značilne razlike. Pri samicah OVX/WT, ki so prejemale TP samo pred rojstvom, je bilo število naskokov nižje kot pri ostalih skupinah samic OVX/WT (\* $p < 0,05$ ), vendar se ta razlika ne pokaže pri drugih ocenjenih parametrih.

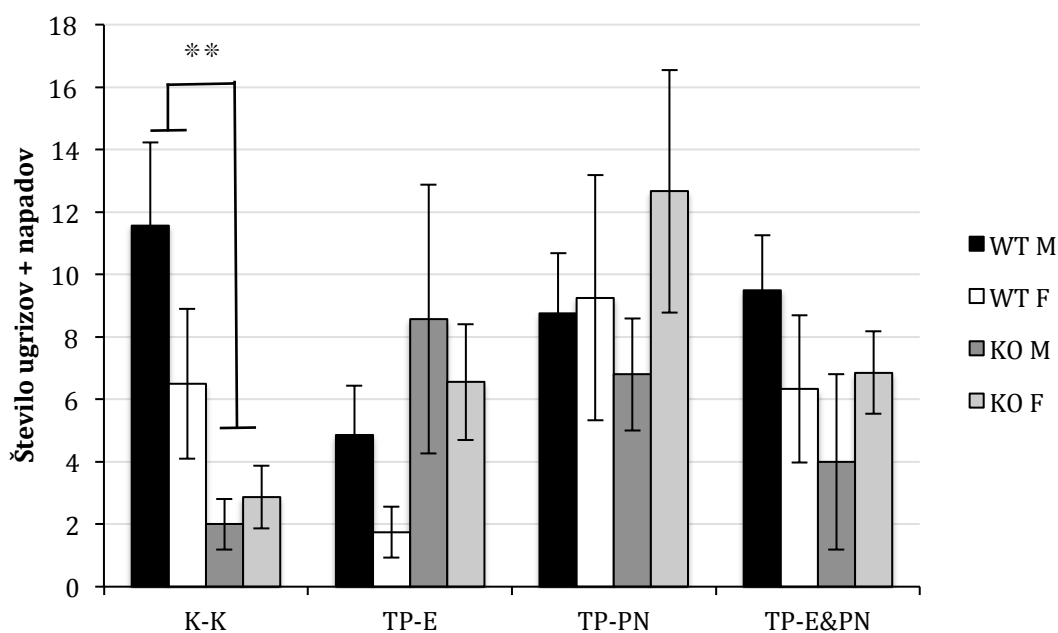


**Slika 11:** Grafični prikaz števila poskusov naskokov v vseh petih analiziranih testih ženskega spolnega obnašanja pri samicah OVX/WT (WT F), samicah SF-1 KO (KO F), samcih SF-1 KO (KO M) in samcih CAS/WT (WT M) in pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).

Graf prikazuje povprečno število poskusov naskokov z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezno testirano skupino. Med skupinami ni izražene nobene statistično značilne razlike. Znotraj skupine samic SF-1 KO (KO F) je statistično značilna razlika med kontrolno, netretirano skupino (K-K), in tisto, ki so prejele TP samo pred rojstvom (TP-E), v primerjavi z ostalima dvema skupinama (TP-E in TP-E&PN). Ta razlika se pri drugih opazovanih parametrih ni izrazila (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Agresivno obnašanje pri miših SF-KO in GDX/WT po dodajanju testosterona v obdobju ob rojstvu

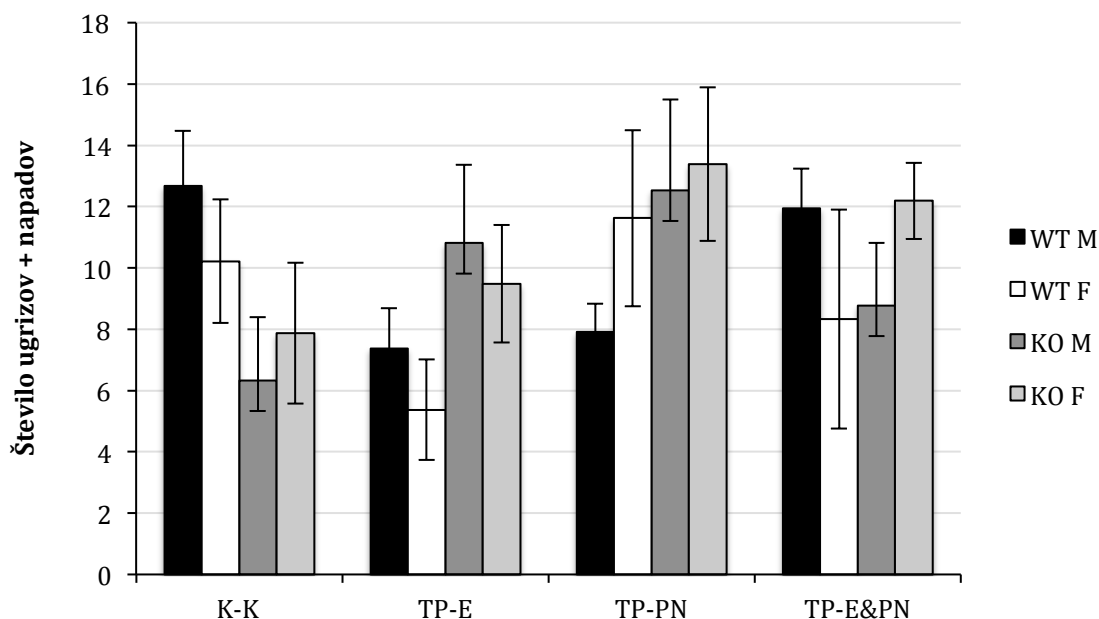
Po statistični obdelavi podatkov za posamezen parameter (ugriz, napad, agresivno negovanje ...) glede njihovega števila in časa od začetka testa do začetka posamezne aktivnosti (latenca), se je pri večini pokazal močan vpliv testa, zato je prikazan posebej diagram za 1. test (Slika 12), ki prikazuje razliko med WT samci in ostalimi genotipi v kontrolni skupini, pri ostalih, tretiranih skupinah pa ta razlika že pri prvem testu izgine. Pri vplivu testa gre za pričakovan rezultat, saj ima testna miš že izkušnjo od prejšnjega dne, ker test poteka v treh zaporednih dneh. Običajno je razlika največja med prvim in tretjim testom. Zaradi prevelikega števila posameznih parametrov so predstavljeni rezultati pri posameznem genotipu in vplivu testa v času od začetka testa do prvega agresivnega dogodka (za katerega smo upoštevali ali pojav ugriza ali napada ali agresivnega negovanja) in skupno število najbolj agresivnih obnašanj (napadi in ugrizi).



**Slika 12:** Grafični prikaz števila ugrizov in napadov v prvem testu agresivnega obnašanja pri samcih CAS/WT (WT M), samicah OVX/WT (WT F), samcih SF-1 KO (KO M) in samicah SF-1 KO (KO F) pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).

Prikazana je statistično značilna razlika med samci in samicami GDX/WT (WT M in WT F) v primerjavi s SF-1 KO samci in samicami (KO M in KO F) znotraj kontrolne skupine, skupne, ki ni prejela TP (K-K) (\*\* p<0,01). Pri ostalih, tretiranih skupinah, se takšna razlika ne pokaže.

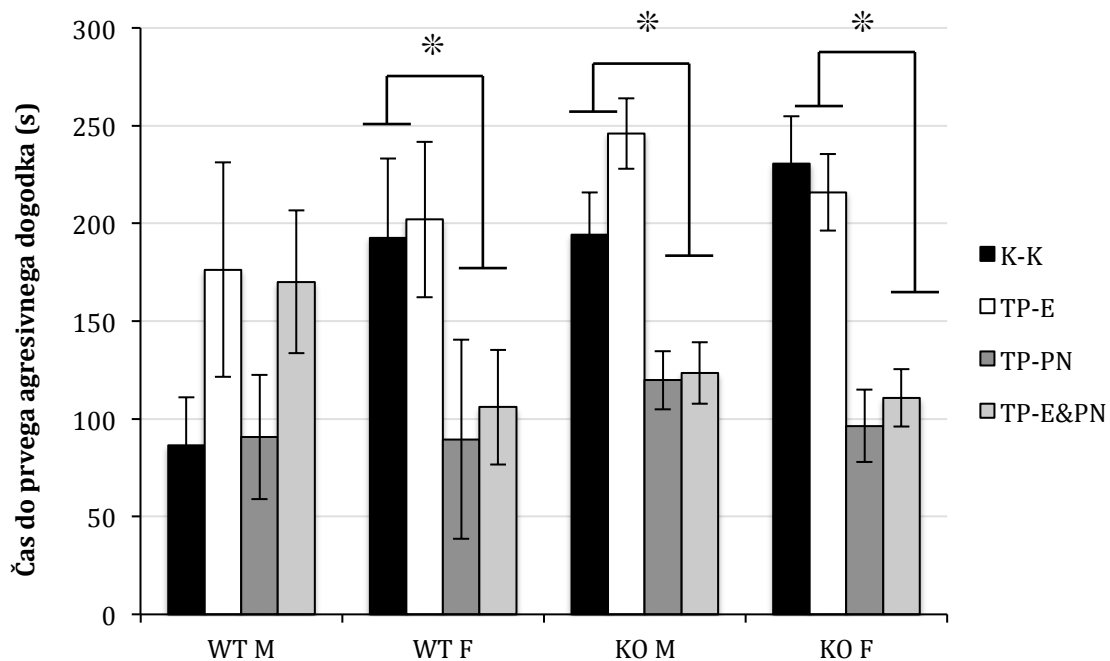
Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezno testirano skupino.



**Slika 13:** Grafični prikaz povprečja skupnega števila ugrizov in napadov v vseh testih agresivnega obnašanja pri samcih CAS/WT (WT M), samicah OVX/WT (WT F), samcih SF-1 KO (KO M) in samicah SF-1 KO (KO F) pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).

Pri številu ugrizov in napadov, upoštevajoč vse tri teste, razlika iz prvega testa ni več statistično značilna.

Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezno testirano skupino.



**Slika 14:** Grafični prikaz časa v sekundah od začetka testa do prvega agresivnega dogodka v vseh testih agresivnega obnašanja pri samcih CAS/WT (WT M), samicah OVX/WT (WT F), samcih SF-1 KO (KO M) in samicah SF-1 KO (KO F) pri vseh štirih različnih tretiranjih, in sicer brez dodanega TP (K-K), TP samo v obdobju pred rojstvom (TP-E), TP v obdobju po rojstvu (TP-PN) in TP tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).

Statistično značilna razlika se kaže pri samicah OVX/WT in pri miših SF-1 obeh spolov, kjer imajo miši, ki so bile tretirane po rojstvu (TP-PN) ter pred in po rojstvu (TP-E&PN) statistično značilen krajši čas do prvega agresivnega dogodka, v primerjavi s kontrolno skupino (K-K) in skupino, ki je dobivala testosteron samo pred rojstvom (TP-E) (\*  $p < 0.05$ ). Pri WT samcih statistična obdelava ni pokazala značilnih razlik. Samice OVX/WT, miši SF-1 KO, tretirani s TP po rojstvu in tretirani pred in po rojstvu, so po latencah podobni WT samcem.

Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti z označeno  $\pm$ S.E.M. za posamezno testirano skupino.

### **4.3 VPLIV DODAJANJA TESTOSTERONA V OBDOBJU OB ROJSTVU NA IZRAŽANJE BELJAKOVIN KALBINDIN IN ARGININ VAZOPRESIN V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ SF-1 IN MIŠIH DIVJEGA TIPA**

Z metodo imunohistokemičnega barvanja smo na plavajočih rezinah možganov proučevali izraženost beljakovine za vezavo  $Ca^{2+}$  (Kalbindin D-28K, kalbindin, Calb) in arginin vazopresina (AVP) v vmesnih možganih pri miših brez gena *SF-1* in divjega tipa. Primerjali smo miši brez gena *SF-1* in divjega tipa z odstranjenimi spolnimi žlezami obeh spolov. Miši so bile razdeljene v skupine glede na izpostavljenost eksogenemu testosteron propionatu (TP) kot že prej opisano. Uporabili smo živali po končanih testih obnašanja. Žrtvovali smo jih s postopkom tkivne perfuzije znotraj treh dni po koncu testa agresivnega obnašanja, da so bili TP podkožni vsadki še aktivni, saj je za izražanje AVP potrebna prisotnost testosterona. Proučevali smo rezine vmesnega dela možganov rostralno od bregme 0,38 mm ter do 2,06 mm kaudalno od bregme (označeno tudi kot -2,06 mm) pod 40-kratno in 100-kratno povečavo.

#### **4.3.1 Izraženost beljakovine kalbindin v vmesnih možganih**

Za primerjavo izraženosti kalbindina smo izbrali rezine 0,10 mm kaudalno (291) od bregme, kjer se nahaja medialno predoptično področje (MPOA). Na Sliki 15 so prikazane slike rezin pod 40-kratno povečavo. Primerjali smo izražanje kalbindina med WT samci, SF-1 KO samci in samicami ter WT samicami v vseh štirih skupinah, in sicer tistimi, ki niso prejemale eksogenega testosteron propionata (TP), tistimi, ki so ga prejemale samo pred rojstvom, tistimi, ki so ga prejemale po rojstvu, ter tistimi, ki so TP prejeli tako pred kot tudi po rojstvu. Ugotavljali smo, če se je tudi pri ostalih skupinah pojavilo t.i. spolno dimorfno/različno jedro v POA (SDN-POA), ki je značilno za samce WT. Kot kažejo fotografije, je pri samcih WT v vseh štirih skupinah (ne glede na tretiranje) izraženo SDN-POA (na Sliki 15 je obkrožen pri samcu WT brez dodatnega TP). Pri ostalih genotipih, samicah WT, SF-1 KO samcih in samicah, pa samo v primeru tretiranja s TP po rojstvu ter pred in po rojstvu, ne pa tudi pri živalih, ki so prejemale testosteron samo pred rojstvom. Na Sliki 16 je prikazano SDN-POA pod večjo (100-kratno) povečavo.



Za vse slike od 15 do 18 veljajo oznake:

- WT M K – samci WT, brez dodajanja TP (K-K);
- WT M E – samci WT, ki so prejeli TP pred rojstvom (TP-E);
- WT M PN – samci WT, ki so prejeli TP po rojstvu (TP-PN);
- WT M E-PN – samci WT, ki so prejeli TP pred in po rojstvu (TP-E&PN);
- WT F K – samice WT, brez dodajanja TP (K-K);
- WT F E – samice WT, ki so prejeli TP pred rojstvom (TP-E);
- WT F PN – samice WT, ki so prejemale TP po rojstvu (TP-PN);
- WT F E-PN – samice WT, ki so prejemale TP pred in po rojstvu (TP-E&PN);
- SF-1 KO K – samci brez *SF-1*, brez dodajanja TP (K-K);
- SF-1 KO E – samci brez *SF-1*, ki so prejeli TP pred rojstvom (TP-E);
- SF-1 KO PN – samci brez *SF-1*, ki so prejeli TP po rojstvu (TP-PN);
- SF-1 KO E-PN – samci brez *SF-1*, ki so prejeli TP pred in po rojstvu (TP-E&PN);
- SF-1 KO K – samice brez *SF-1*, brez dodajanja TP (K-K);
- SF-1 KO E – samice brez *SF-1*, ki so prejemale TP pred rojstvom (TP-E);
- SF-1 KO PN – samice brez *SF-1*, ki so prejemale TP po rojstvu (TP-PN);
- SF-1 KO E-PN – samice brez *SF-1*, ki so prejemale TP pred in po rojstvu (TP-E&PN).

**Slika 15:** Prikaz izražanja kalbindina v MPOA pri miših GDX/WT in SF-1 KO po dodajanju TP v različnih obdobjih (40-kratna povečava). Na delu, ki prikazuje WT samca brez dodajanja TP je obkroženo t.i. SDN-POA. To področje smo primerjali z vsemi ostalimi skupinami.

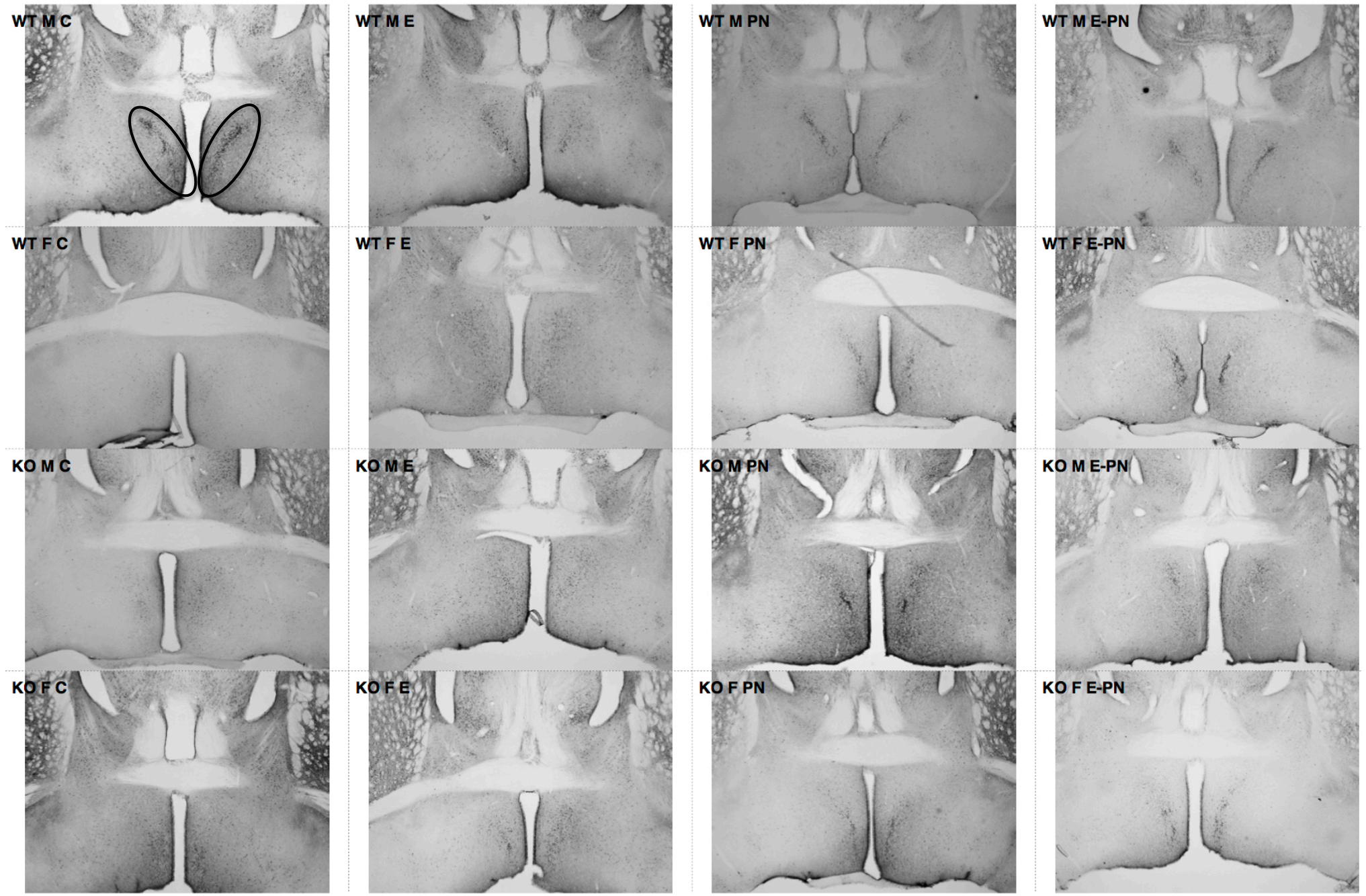
**Slika 16:** Prikaz izražanja kalbindina v MPOA pri miših GDX/WT in SF-1 KO po različnih tretmajih s TP (100-kratna povečava). Na delu, ki prikazuje WT samca brez dodajanja TP je obkroženo t.i. SDN-POA. To področje smo primerjali z vsemi ostalimi skupinami.

#### 4.3.2 Izraženost beljakovine arginin vazopresin v vmesnih možganih

Za proučevanje izraženosti AVP smo izbrali rezine 0,14 mm rostralno (291) od bregme, kjer se nahaja stranski pretin (LS), v predelu, ko se anteriorna (sprednja) komisura (aca) že zduži in se na sredini med LS obeh strani že pojavlja septofimbrialno jedro (SFi). Na Sliki 17 so prikazane slike rezin pod 40-kratno povečavo. Primerjali smo izražanje AVP med WT samci, SF-1 KO samci in samicami ter WT samicami v vseh štirih skupinah, in sicer tisti, ki ni prejela eksogenega testosterona propionata (TP), tisti, ki so ga prejemale samo pred rojstvom, tisti, ki so ga prejemale po rojstvu, ter tisti, ki so TP prejeli tako pred kot tudi po rojstvu. Na Sliki 18 je prikazano enostransko povečano področje LS (100-kratna povečava). Rezultati kažejo, da je AVP očitno izražen pri samicah OVX/WT samo, kadar so te prejemale TP po rojstvu ali pred in po rojstvu, ne pa tudi, če so ga prejemale samo pred rojstvom. Zanimivo pa je, da je pri miših brez gena *SF-1* prisotna izraženost AVP v LS tudi pri miših, ki niso bile izpostavljene testosteronu propionatu, čeprav je izraženost očitno nižja, kot pri samcih divjega tipa.

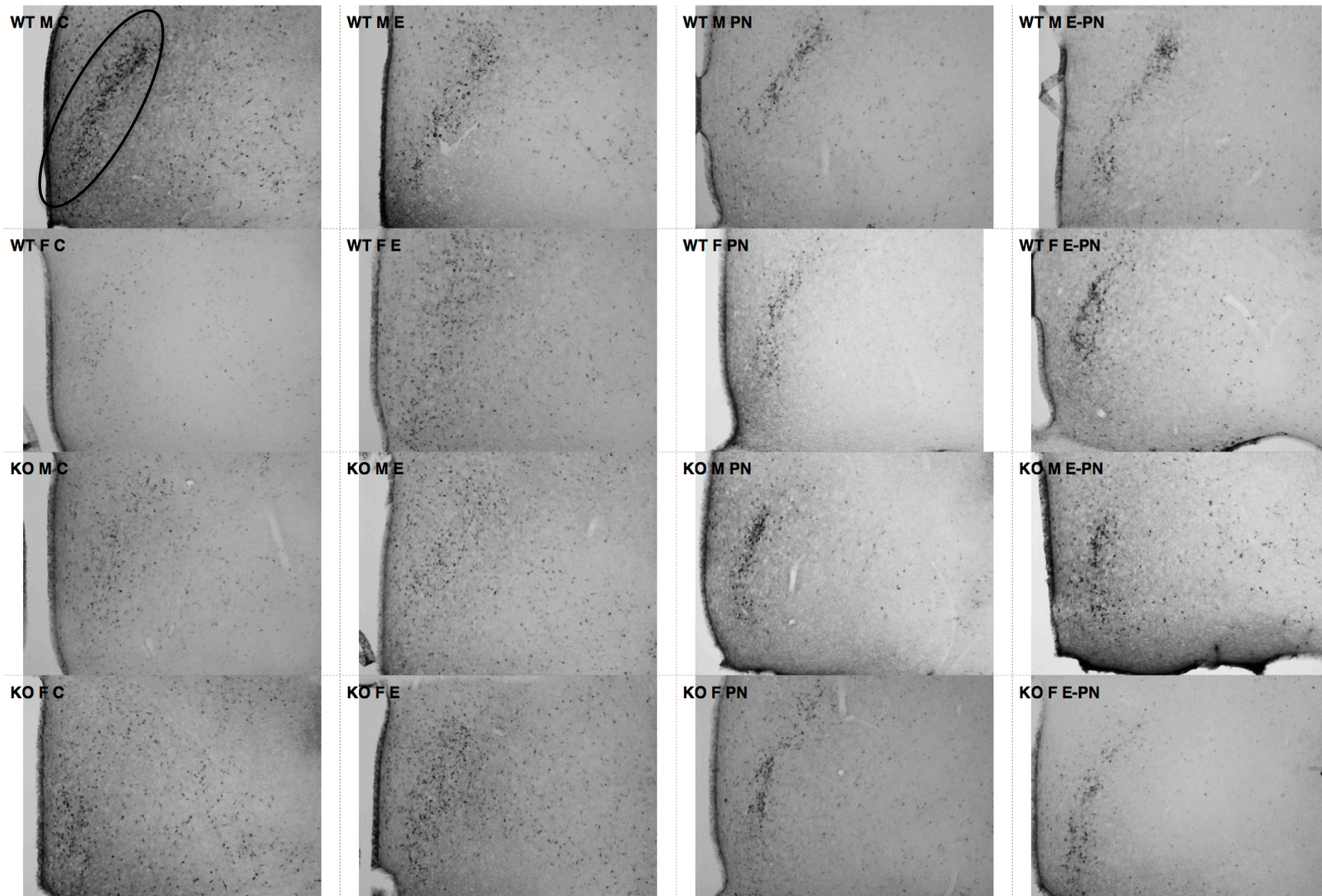
**Slika 17:** Prikaz izražanja arginin vazopresina (AVP) v LS pri miših GDX/WT in SF-1 KO po različnih tretmajih s TP (40-kratna povečava). Na delu, ki prikazuje WT samca brez dodajanja TP, je označena združena anteriorna komisura (aca), septofimbrialno jedro (SFi) in LS.

**Slika 18:** Prikaz izražanja AVP v LS pri WT in SF-1 KO miših po različnih tretmajih s TP (100-kratna povečava). Povečano je prikazano področje LS.

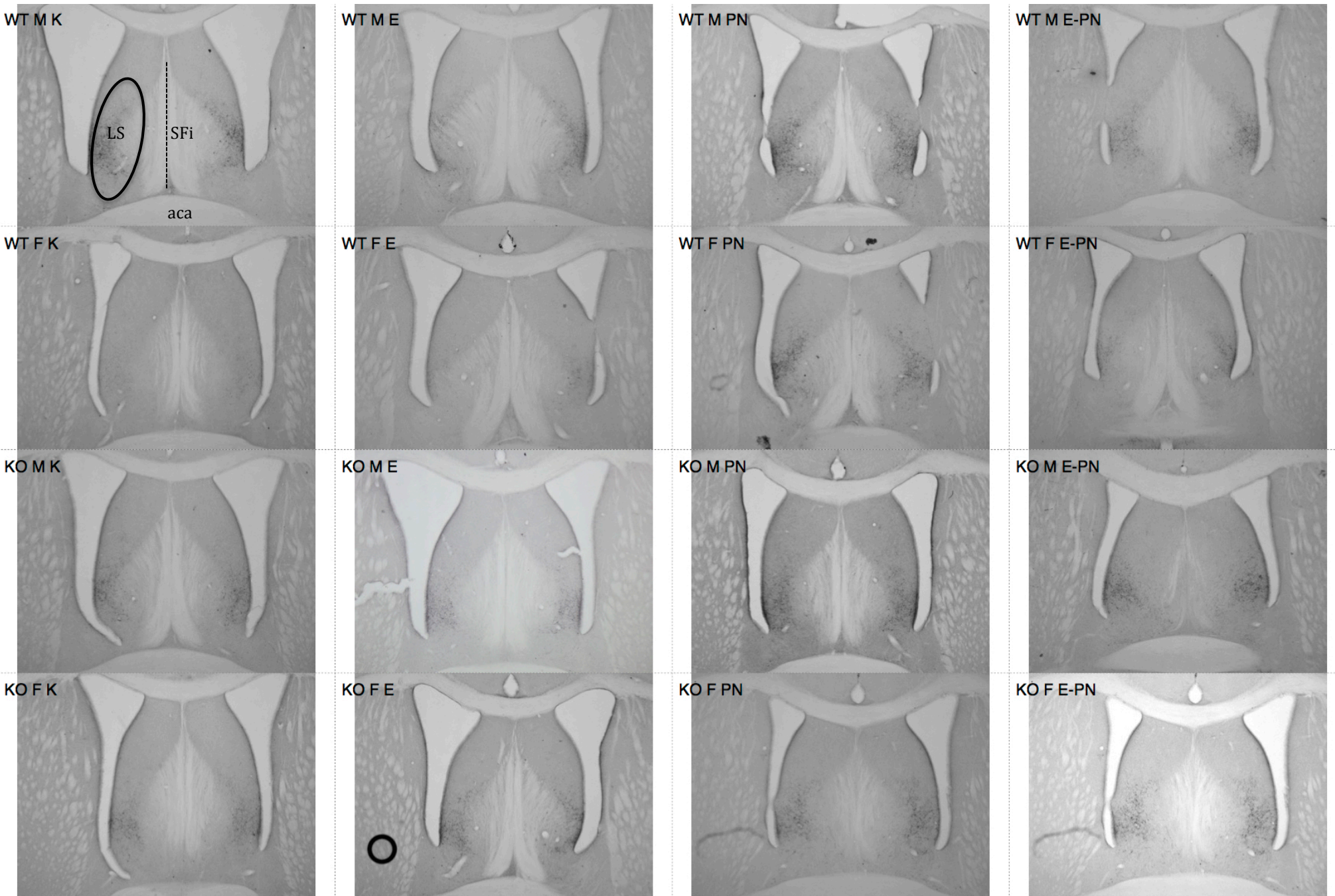


Slika 15



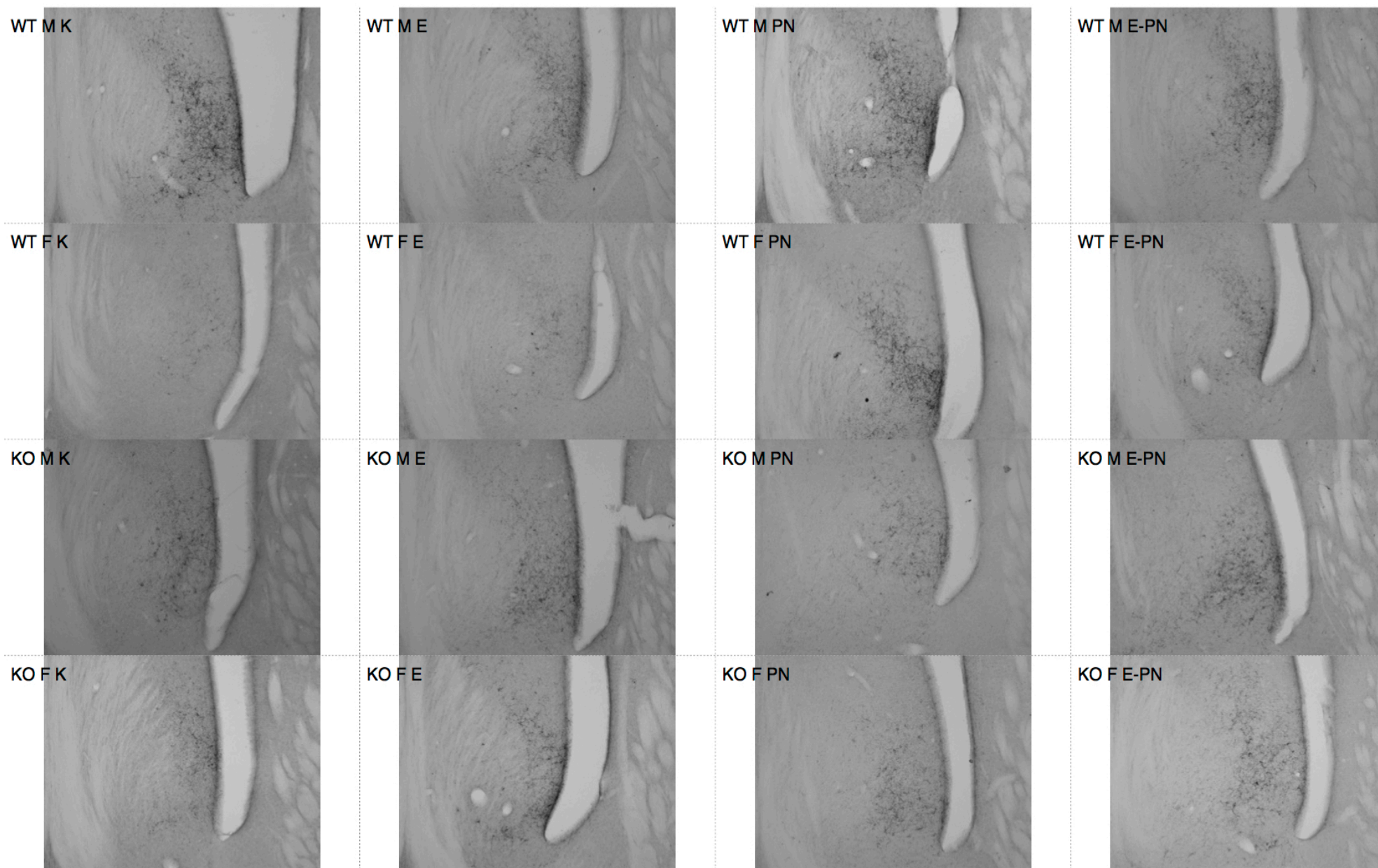


Slika 16



Slika 17





Slika 18

## 5 RAZPRAVA

V Slovarju slovenskega knjižnega jezika je zapisano:

“**razlíka** -e ž (ī) **1.** kar kaže na neenakost med primerjanimi stvarmi: razlika nastane, obstaja, se poveča; odpraviti razlike; spoznati, ugotoviti razlike; bistvena, majhna, opazna, velika razlika; razlika med človekom in živaljo; razlike med spoloma; razlika v barvi, obliki, velikosti; razlike v ceni, kakovosti izdelkov; razlike v izobrazbi, vzgoji; razlike v pogledih ...” (302)

Že pod prvo točko opredelitve pojma razlika so omenjene razlike med spoloma, razlike, ki jih vidimo, razlike, ki jih čutimo in razlike, ki jih raziskujemo, preiskujemo, proučujemo in nemalokrat tudi občudujemo. Zakaj jih proučevati, v čem smo si tako različni in ali je realnost, ki jo poznamo, res posledica neke kemije, delovanja molekul, hormonov, genov, okolja, in ne nazadnje družbe in družbenih norm? Odgovor na ta vprašanja je zapleten, dolg in v celoti zagotovo še nepoznan. Delo preteklih let, proučevanje živalskih modelov, tudi miši brez gena za *SF-1*, odpiranje novih vprašanj in iskanje rešitev ter tu predstavljeni rezultati predstavljajo le drobec v mozaiku tega še neraziskanega področja.

Razlike med spoloma pri sesalcih izvirajo že od same združitve spolnih celic, ko se v zigoti združita pronukleusa jajčeca in semenčice, in s tem določita kromosomski spol; XX ali XY. Vsoto vseh spolno vezanih dejavnikov, ki vplivajo na delovanje genov (njihovo omrežje) in celičnih sistemov ter s tem privedejo do razlik med spoloma, sta Arnold in Lusi nedavno opredelila kot seksom (*angl. sexome*) (303). Menita, da je za razumevanje delovanja seksoma in seksomike pomembno prepoznati in razumeti tri ključne spolno vezane dejavnike. Prvi izmed teh dejavnikov naj bi bila ravno spolna kromosoma X in Y, ki že sama po sebi predstavljata neenakost v zigoti, če primerjamo žensko zigoto (XX) z moško (XY). V ženski zigoti sta prisotna dva kromosoma X (in s tem dve kopiji genov s kromosomov X), v moški pa en kromosom X in en Y ter s tem geni s kromosoma Y, ki so prisotni samo pri moškem fenotipu (304). Eden pomembnejših spolno vezanih dejavnikov je zagotovo gen *Sry*, ki se nahaja na kromosomu Y in usmeri

nediferencirane gonade, da se razvijejo kot moda in ta kasneje izločajo testosteron. Pri ženskem fenotipu se ob odsotnosti *Sry* pod vplivom delovanja genov iz avtosomov in kromosoma X razvijejo jajčniki, ki kasneje izločajo spolne hormone. Delovanje spolnih hormonov, ki jih izločajo ženske in moške spolne žleze, je zelo pomembno in predstavlja drugega izmed treh spolno vezanih dejavnikov. Hormoni imajo dva ključna učinka, in sicer organizacijskega in aktivacijskega. Organizacijski učinek delovanja hormonov se začne že zgodaj med razvojem in povzroči trajno, nepovratno diferenciacijo genitalij, možganov in drugih organov (14, 305). Aktivacijski učinek pa je povraten učinek delovanja spolnih hormonov, ki različno delujejo na omrežje genov in celične sisteme. Tretji izmed spolno vezanih dejavnikov so geni na kromosomih X in Y, ki na nastanek razlik med spoloma delujejo preko poti, ki ne gredo preko spolnih žlez (304).

### **5.1 RAZLIKE V IZRAŽANJU GENOV V VMESNEM DELU MOŽGANOV PRI MIŠIH BREZ *SF-1* IN PRI MIŠIH DIVJEGA TIPA**

Miši, ki nimajo prisotnega gena *SF-1* (*SF-1 KO*), so rojene brez nadledvičnih in spolnih žlez, zato nikoli niso izpostavljene lastnim, endogenim spolnim hormonom. Ravno zaradi tega predstavljajo edinstven model za proučevanje vplivov genetskih dejavnikov ločeno od hormonskih tako na razvoj in delovanje centralnega živčnega sistema kot tudi drugih mehanizmov spolne diferenciacije. Kljub temu pa obstaja možnost, da so v času embrionalnega razvoja v neki meri izpostavljene vplivu spolnih hormonov, ki prehajajo preko posteljice, od matere ali sosednjih plodov (96). Možgani so tudi sami izvor nekaterih spolnih steroidnih hormonov t.i. nevrosteroidov oziroma živčnih steroidnih hormonov (306, 307, 308). V nedavni raziskavi smo tudi v možganih miši brez *SF-1* že v času embrionalnega razvoja potrdili prisotnost nekaterih encimov, ki sodelujejo pri nastanku nevrosteroidov (309). Delovanje nevrosteroidov je dokaj specifično in naj bi zaradi njihove zgradbe imeli pomembnejšo vlogo pri spolni diferenciaciji živčevja pri sesalcih (310, 311) kot pri pticah, kjer se pretvorijo v testosteron (312).

Beljakovina *SF-1* ima vlogo tudi pri razvoju VMH, saj so spremembe v strukturi tega jedra dokazali tako med razvojem kot tudi pri odraslih miših brez *SF-1*, zato so primeren model tudi za proučevanje razvoja in funkcije tega jedra (198, 194, 197).



Z uporabo qPCR in prenosa northern je Xu s sodelavci ugotavljal izraženost osmih genov vezanih na kromosom Y in njihovih homologov na kromosomu X v možganih miši, ne glede na genetski spol oziroma prisotnost spolnih hormonov. Proučevali so možgane plodov starih 13,5 dni (E13,5), novorojenih (PN1) in odraslih miši. Proučevali so izražanje genov v možganih pri petih različnih genotipih oziroma fenotipih, in sicer pri samcih XY (z modi), samicah XY (zaradi izbrisa gena *Sry* so te miši imele jajčnike, bile so fenotipsko samice), samcih XY-*Sry* (te miši so imele *Sry* na avtosomu, zato so imele prisotna moda), samicah XX (z jajčniki) in samcih XX*Sry* (te miši so imele gen *Sry* vezan na avtosom, zato so razvile moda). Prepisi šestih na kromosom Y vezanih genov *Usp9y*, *Uba1y*, *Kdm5d*, *Eif2s3y*, *Uty* in *Ddx3y*, so bili izraženi vsaj pri eni ali pri večjih starostnih skupinah tako pri samcih XY kot pri samicah XY, zato menijo, da za izražanje teh genov v možganih ni potrebna prisotnost testikularnih spolnih hormonov. Tudi vseh šest homologov na kromosomu X (*Usp9x*, *Uba1x*, *Kdm5c*, *Eif2s3x*, *Utx* and *Ddx3x*) je bilo izraženih v možganih, s tem da so bili pri odraslih miših vsi statistično značilno močnejše izraženi pri samicah kot pri samcih, ne glede na utišanje enega izmed kromosomov X (101).

Pri proučevanju izražanja genov v vmesnem delu možganov pri odraslih miših brez gena *SF-1* (*SF-1* KO) in pri miših divjega tipa z odstranjenimi spolnimi žlezami (GDX/WT) smo ugotavljali razlike med genotipoma (*SF-1* KO proti WT) in tudi med spoloma (samice proti samcem). Rezultati poskusa na DNA-mikromrežah so pokazali šest diferenčno izraženih genov, in sicer *Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y* in *Kdm5d*, ki so vezani na kromosom Y in dveh, *Xist* in *Eif2s3x*, ki sta vezana na kromosom X (Slika 2). Geni s kromosoma Y so bili statistično značilno bolj izraženi pri samcih obeh genotipov, kar kaže na hormonsko neodvisno izražanje teh genov v možganih, saj so samci *SF-1* KO brez lastnih spolnih hormonov. Oba, na kromosom X vezana gena *Xist* in *Eif2s3x*, sta bila bolj izražena pri samicah kot pri samcih in ponovno brez razlik med samicami *SF-1* KO in OVX/WT. Tudi ta dva gena se v možganih pri samicah izražata ne glede na prisotnost spolnih hormonov iz jajčnikov. Rezultati iz DNA-mikromrež niso pokazali nobenega diferenčno izraženega avtosomskega gena. To lahko v neki meri pripišemo veliki sorodnosti miši, uporabljenih v raziskavi, ali pa velikosti vzorca, kjer se lahko zaradi

razredčitev in priprave vzorcev šibkeje izraženi geni izgubijo in zaznamo samo bolj robustno diferenčno izražene gene.

V nedavni raziskavi je Wolstenhome-ova s sodelavci na miših, ki imajo zaradi prerazporejenega psevdoavtosomalnega območja (*angl.* pseudoautosomal region, PAR) edinstven kromosom Y (označen kot Y\*), ugotavljala izražanje spolno dimorfnih genov v možganih v času embrionalnega razvoja (E11,5 in E18,5). Edinstven kromosom Y\* vsebuje gene iz kromosoma Y, obrnjeno podvojitev dela PAR in manjši del genov iz kromosoma X vključno s centromerom (313, 314). S parjenjem normalnih XX samic in XY\* samcev so pridobili potomce štirih različnih genotipov, in sicer normalne XX samice (XX), samice z enim kromosomom X (XY\*<sup>x</sup>), samce z dvema kromosomoma X (XXY\*) in samce z enim kromosomom X (XY\*). S poskusom na DNA-mikromrežah in qPCR, so ugotovili pri samcih Y\*, ne glede na starost in prisotnost kromosoma X, da so na kromosom Y vezani geni (*Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y* in *Kdm5d*) bolj izraženi pri samcih kot pri samicah, ne glede na starostno skupino. Pred razvojem spolnih žlez (E11,5) so ugotovili izraženost šestih na kromosom X vezanih genov (*Xist*, *Kdm5c*, *Eif2s3x*, *Tsix* in neoznačen prepis 5530601H04Rik), ki so ubežali utišanju enega kromosoma X in so bili bolj izraženi pri živalih XX. Po razvoju gonad pa sta ostala pri samicah bolj izražena samo *Xist* in *Tsix* (104).

V predhodni raziskavi so na zarodkih starih 10,5 dni (E10,5), prav tako že pred razvojem spolnih žlez, ugotovili v možganih različno izražene gene s kromosoma Y (*Ddx3y* in *Eif2s3y*) ali X (*Xist*, *Utx* in *Eif2s3x*) (10). Reinius in njegovi sodelavci so pri odraslih miših v različnih predelih možganov tudi potrdili izraženost genov na kromosomu Y in X, in sicer 10 že znanih (*Xist*, *Kdm5c*, *Kdm5d*, *Eif2s3x*, *Eif2s3y*, *Utx*, *Uty*, *Ddx3x*, *Ddx3y*, *Jpx*) in 7 še neznanih prepisov s kromosomov Y in X (315).

Gene, ki so se v našem poskusu na DNA-mikromrežah pokazali za diferenčno izražene, smo preverili še z metodo qPCR. Za vsak gen smo preverili relativno izraženost normalizirano glede na izraženost HKG *Actb* v naših vzorcih vmesnega dela možganov odraslih miši brez gena *SF-1* in gonadektomiziranih miših WT. Pri vseh štirih, na kromosom Y vezanih genih *Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y* in *Kdm5d*, je bila relativna izraženost prisotna samo pri samcih obeh genotipov, SF-1 KO in CAS/WT, vendar brez razlik med njima, kar je potrdilo rezultate iz DNA-mikromrež (Slika 3). Na podlagi teh dveh poskusov menimo, da za izražanje teh štirih na kromosom Y

vezanih genov v možganih, ni potrebna prisotnost spolnih hormonov, kar se ujema z dosedanjimi raziskavami (101, 99, 315, 104). Pri preverjanju izražanja *Eif2s3x*, za katerega menijo in so v nekaterih študijah dokazali, da uide utišanju kromosoma X (316, 317, 10, 101, 315) pa se z metodo qPCR v naših vzorcih ni pokazalo, da je različno izražen (Slika 4), kar sovпада z nedavno študijo Wolstenholme-ove in sodelavcev, ki so ugotovili, da sta edina različno izražena X-vezana gena v možganih po razvoju spolnih žlez (E18,5) *Xist* in *Tsix* (104). Pri ugotavljanju izraženosti *Xista* v naših vzorcih (Slika 5) se je izkazalo, da je bil izražen pri samicah obeh genotipov, SF-1 KO in OVX/WT, in brez razlik med njima. Pojavila pa se je tudi šibka izraženost (100-krat manjša kot pri samicah) pri samcih SF-1 KO. Ta izraženost je zaradi prisotnosti samo enega kromosoma X in prisotnosti kromosoma Y nenavadna, zato bi morali za potrditev te izraženosti opraviti še dodatno preverjanje izraženosti genov z drugimi metodam, npr. *in situ* hibridizacijo, saj *Xist* izraža samo utišan kromosom X. Možna bi bila tudi navzkrižna reakcija ologonukleotidnih začetkov z genom *Tsix*, vendar je to manj verjetno, saj se pri WT samcih, ki imajo tudi prisoten *Tsix*, izraženost ni pojavila.

V nedavno objavljeni raziskavi so ugotavljali ali ima dodajanje testosterona pred rojstvom vpliv na izražanje spolno dimorfnih genov v skorji možganov in hipokampusu novorojenih miši. Preverili so izražanje treh, na kromosom Y vezanih genov (*Ddx3y*, *Eif2s3y* in *Kdm5d*), ter štirih, na kromosom X vezanih (*Eif2s3x*, *Mid1*, *Kdm6a* in *Xist*), in enega avtosomskega gena (*Klk8*). Ugotovili so, da dodajanje testosterona pred rojstvom nima vpliva na izražanje teh genov v nekaterih predelih možganov, kar je še dodaten dokaz, da se ti geni izražajo ne glede na prisotnost spolnih hormonov (318).

Za izražanje gena *Utx* v možganih je več raziskav pokazalo, da je bolj izražen pri genotipu XX kot XY, kar kaže na to, da uide utišanju kromosoma X (319, 320, 301). Zato smo preverili ali se tudi v naših vzorcih pojavi razlika med samci in samicami. Izkazalo se je, da je bila izraženost *Utx* pri vseh štirih genotipih približno enaka (Slika 6).

Pri ugotavljanju izraženosti genov v vmesnem delu možganov z metodama DNA-mikromreže in qPCR pri miših SF-1 KO in GDX/WT smo ugotovili, da se vezani na

kromosom Y (*Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y* in *Kdm5d*) izražajo pri samcih obeh genotipov neodvisno od prisotnosti spolnih žlez in spolnih hormonov. Za izraženost genov vezanih na kromosom X v istem predelu možganov, pa smo s qPCR potrdili samo različno izraženost *Xista* med spoloma in brez razlik med samicami SF-1 KO in OVX/WT.

## **5.2 VPLIV DODAJANJA TESTOSTERONA V OBDOBJU OB ROJSTVU NA OBNAŠANJE PRI MIŠIH BREZ GENA *SF-1* IN GONADEKTOMIZIRANIH MIŠIH DIVJEGA TIPA**

V drugem delu raziskave smo proučevali vpliv dodajanja testosteron propionata (TP) v obdobju pred rojstvom in tik po njem pri miših brez *SF-1* in miših divjega tipa (GDX/WT) seva C57/Bl6J. Testosteron propionat smo injicirali 13. in 16. dan embrionalnega razvoja (E13,5 in E16,5) ter prvi, tretji in peti dan po rojstvu (PN 1, 3, 5). Pred rojstvom smo izbrali E13,5 in E16,5, ker so na E13,5 spolne žleze že diferencirane, saj ta del razvoja pri miših poteče med E10,5 in E12,5 (18, 19), E16,5 pa zato, ker se na E17 prvič pojavi povišano izločanja testosterona, temu dvigu testosterona pa takoj po rojstvu sledi še en dvig (86, 87), zato še aplikacije TP na 1., 3. in 5. dan po rojstvu. V tem obdobju naj bi imel testosteron oziroma njegov aromatiziran metabolit estradiol pri glodavcih ključno vlogo pri maskulinizaciji in defeminizaciji možganov in s tem tudi obnašanja (213). O vplivu perinatalnega dodajanja eksogenega testosterona na spolno obnašanje pri glodavcih je bilo v preteklosti opravljenih že nekaj različnih raziskav, med drugimi je najbolj znana na morskih prašičkih (14), potem pa so bile še nekatere na podganah, ki so proučevale vpliv testosterona prisotnega v obdobju ob rojstvu (118, 127, 129). Vendar pa še vedno ni znano, katera obdobja so najbolj pomembna za razvoj možganov samcev in zato miši brez gena *SF-1*, ki nimajo endogenih spolnih hormonov, predstavljajo odličen model za proučevanje časovnih točk, v katerih je nujno potrebna prisotnost spolnih hormonov za pravilen razvoj možganov v smer moškega ali ženskega fenotipa.

V našem primeru smo proučevali vpliv eksogenega testosterona v obdobju ob rojstvu preko ženskega spolnega obnašanja, kjer smo ugotavljali defeminizacijo v obnašanju, in agresivnega, kjer smo opazovali maskulinizacijo v obnašanju. Testne živali so bile miši samice in samci SF1-KO (oznake na slikah KO F in KO M) ter

samice in samci GDX/WT (oznake na slikah WT F in WT M) v štirih različnih skupinah tretiranja (prikaz skupin v Tabeli 1 in prikaz skupnega števila živali v posamezni skupini v Tabeli 3), tako v testu ženskega spolnega obnašanja kot tudi agresivnega obnašanja. Vsem mišim divjega tipa smo pred puberteto odstranili spolne žleze.

### **5.2.1 Žensko spolno obnašanje po dodajanju testosterona v obdobju ob rojstvu**

V testu ženskega spolnega obnašanja smo opazovali spolno sprejemljivost (lordozo, L) testnih živali, ki smo jo ocenjevali po lestvici od nič do pet, ter nekatere značilnosti stimulusnih samcev, kot so poskusi naskoka, naskoki, potiski, ejakulacija. Vse živali smo testirali šestkrat, analizirali smo teste od drugega do šestega in jih označili kot test od ena do pet.

Za normalno žensko spolno obnašanje pri samicah glodavcev je značilno izražanje lordoze oziroma usločenosti hrbta, za kar je potrebna prisotnost estrogenov in progesterona. Pravimo, da je takrat samica spolno sprejemljiva in ob pristopu samca dovoli naskok, usloči hrbet, odmakne rep in privzdigne perineum. Po odstranitvi jajčnikov miši in podgane potrebujejo večkratno izpostavljenost estrogenom in progesteronu, preden dosežejo visoko stopnjo spolne sprejemljivosti (321, 322, 323), medtem ko samice nekaterih drugih vrst glodavcev (morski prašiček, hrček) že po eni sami aplikaciji estrogenov izražajo žensko spolno obnašanje (324). Zato smo v naših poskusih vsako miš testirali šestkrat, analizirali pa pet testov. Prvega smo izpustili iz analiz, da bi s prvo aplikacijo hormonov dosegli boljše izražanje ženskega spolnega obnašanja.

Po analizi naših rezultatov se je pokazala ključna statistično značilna razlika v količniku lordoze (LQ), ki je najvišji pri samicah OVX/WT (WT F) skupine, ki ni prejela TP (označena kot kontrola, K-K) in je značilno višji kot pri vseh ostalih skupinah miši (Slika 7). Ta skupina samic, WT F K, naj bi predstavljala normalno izraženo žensko spolno obnašanje, feminizirano obliko obnašanja, in to se je tudi potrdilo. Če jo primerjamo z ostalimi skupinami miši znotraj skupine, ki ni prejela TP, vidimo, da imajo vse tri skupine, tako samice SF-1 KO kot oba genotipa samcev (SF-1 KO M in CAS/WT), značilno nižji LQ v primerjavi samicami OVX/WT. Do podobne ugotovitve smo prišli v pred kratkim objavljeni raziskavi, kjer smo proučevali žensko spolno obnašanje pri miših brez *SF-1* in ugotovili, da so

samice OVX/WT imele najvišji LQ v primerjavi z ostalimi genotipi. Ugotovili smo tudi razliko v LQ med spoloma tako med mišmi GDX/WT kot tudi med SF-1 KO (325), kar pa v naši raziskavi za SF-1 KO miši nismo ugotovili niti v kontrolni, netretirani skupini. Miši v obeh raziskavah so bile podvržene enakim protokolom, zato vemo, kaj bi lahko bil vzrok teh odstopanj. Razlika je bila samo v izvajalcih oziroma opazovalcih poskusov.

Ena izmed razlik med samicami OVX/WT in SF-1 KO v naših poskusih, ki bi lahko vplivala na to, da samice SF-1 KO signifikantno slabše izražajo lordozo, je v tem, da imajo samice OVX/WT do starosti 25 dni prisotne jajčnike, kar pa je v obdobju embrionalnega razvoja in do pubertete. Znano je, da jajčniki že v obdobju pred puberteto (med petim in sedmi dnevom po rojstvu) in v času adolescence pri miših izločajo progesteron in androstenedion, glede na aktivnost encima citokrom P450 aromataza v jajčnikih pa domnevajo, da jajčniki izločajo tudi estrogene (326). Menijo, da estradiol preko različnih mehanizmov pri samcih, po tem ko je aromatiziran metabolit testosterona, povzroči maskulinizacijo in defeminizacijo, pri samicah pa v nekoliko kasnejšem obdobju po rojstvu (a pred puberteto) sodeluje pri feminizaciji (327) možganov in posledično tudi obnašanja. Pomen prisotnosti estradiola pred puberteto in v adolescentnem obdobju potrjuje raziskava na miših, ki so brez gena za encim aromatazo (ArKO), kjer so ugotovili, da samice ArKO slabše izražajo lordozo, kljub dodajanju estradiola in progesterona v odraslem življenju, kot samice divjega tipa (221). V kasnejši raziskavi so prav tako na miših ArKO to potrdili tako, da so samicam dodajali estrogene med 16. in 26. dnevom po rojstvu, s čimer so dosegli boljše izražanje lordoze v odraslem obdobju (primerljivo s samicami divjega tipa), medtem ko se po dodajanju estrogenov med 6. in 16. dnem po rojstvu izražanje lordoze ni izboljšalo (328). Prisotnost jajčnikov do 25. dneva starosti bi tako lahko razložila razliko med samicami SF-1 KO in WT v izražanju lordoze, ki smo jo ugotovili v naši raziskavi.

Pri samcih glodavcev je znano, da maskuliniziran stranski pretin (LS), medialno predoptično področje (MPOA) in dorzalno jedro rafe (*angl.* dorsal raphe nucleus, DR) zavirajo izražanje lordoze in hkrati uravnavajo moško spolno obnašanje, agresivno in anksiozno obnašanje (329, 330, 331, 332, 333). Pri samcih SF-1 KO, ki

niso prejeli testosteron propionata in so bili kljub temu v testu ženskega spolnega obnašanja v obnašanju bolj podobni samcem CAS/WT, pa je možno, da je to posledica spremembe v strukturi VMH ali pa neposrednega delovanja genov na spolnih kromosomih v možganih. O tem poroča več študij (povzete v: (334, 335, 336)) in v neki meri tudi naš prvi poskus v ugotavljanju izražanja genov v vmesnem delu možganov, kjer smo ugotovili, da se geni, vezani na kromosom Y, pri samcih SF-1 KO izražajo podobno kot pri samcih CAS/WT in bi na ta način lahko pripomogli k maskulinizaciji in defeminizaciji možganov pri njih.

Za slabšo spolno sprejemljivost pri miših SF-1 KO obeh spolov je verjetno odgovorna tudi spremenjena struktura VMH, saj je VMH eden izmed ključnih urejevalcev izražanja lordoze (239). V predhodni raziskavi na miših SF-1 KO smo ugotovili tudi, da imajo miši SF-1 KO v področju VMH manj imunoreaktivnih celic, ki izražajo progesteronski receptor (PR) kot miši GDX/WT (325). O spremenjenem položaju nekaterih celic in živčnih vlaken v področju VMH pri miših SF-1 KO je poročalo že več raziskav (337, 338, 339, 197). V dveh raziskavah so ugotovili tudi razlike pri estrogenskem receptorju alfa ( $ER\alpha$ ) (339, 197), za katerega menijo, da je potreben tudi za izražanje progesteronskega receptorja. Z okvaro ali s popolnim utišanjem gena za  $ER\alpha$  so ugotovili, da ima  $ER\alpha$  pomembno vlogo pri ženskem spolnem obnašanju, saj so živali z utišanim  $ER\alpha$  slabše izražale značilno žensko spolno obnašanje kot pa živali divjega tipa (324, 225), medtem ko pri miših z okvarjenim genom za  $ER\beta$  takšnih sprememb v ženskem spolnem obnašanju niso potrdili (230).

Naši rezultati pri skupinah, ki so prejemale testosteron propionat (TP) v različnih obdobjih, pred, po ter pred in po rojstvu, kažejo, da razlike v LQ med samicami OVX/WT in ostalimi genotipi izginejo, kar kaže na defeminizacijo pri samicah OVX/WT. Med ostalimi genotipi pa vpliva tretiranja nismo zaznali. Pri analizi LQ pri samicah OVX/WT (Slika 9) smo ugotovili, da je LQ v drugem, tretjem in četrtem testu značilno višji pri samicah, ki niso prejemale TP, kot pri vseh treh ostalih tretiranih skupinah. V zadnjem testu pa je razlika prisotna samo še med samicami OVX/WT, ki niso prejemale TP (K-K), in tistimi, ki so ga prejemale samo po rojstvu (TP-PN). Menimo, da te razlike v LQ kažejo na defeminizacijo pri samicah OVX/WT,

ki smo jo opazili po dodajanju TP pred rojstvom (TP-E) ter pred in po rojstvu (TP-E&PN) pri proučevanju ženskega spolnega obnašanja.

Pri analizi ostalih parametrov, tako v številu naskokov in poskusov naskokov (Slika 10 in 11) kot tudi v latencah (rezultati niso prikazani), nismo ugotovili razlik med testnimi skupinami, kar kaže na to, da so bile testne živali po dodajanju estrogenov in progesterona približno enako privlačne za izkušene samce ne glede na genetski spol. Da bi to natančneje potrdili, bi morali stimulusne samce preizkusiti še v vohalnem testu, kjer bi jih izpostavili vonju različno tretiranih živali po posameznih genotipih.

Naši rezultati pri proučevanju ženskega spolnega obnašanja tako kažejo, da imajo spolni hormoni pomembno vlogo pri defeminizaciji ženskega spolnega obnašanja, saj z dodajanjem estrogenov in progesterona v odraslem obdobju niti pri samicah divjega tipa, ki so prejemale TP v različnih obdobjih ob rojstvu, nismo dosegli takšnega nivoja izražanja lordoze kot pri samicah OVX/WT, ki niso prejemale TP v nobenem obdobju. To kaže, kako pomemben je organizacijski (nepovraten) učinek testosterona v tem obdobju in da je ta organizacijski učinek trajen ter ga aktivacijski učinek estrogenov v odraslem obdobju ne more spremeniti.

### **5.2.2 Agresivno obnašanje po dodajanju testosterona v obdobju ob rojstvu**

Po končanih testiranjih ženskega spolnega obnašanja smo živalim vstavili podkožne vsadke testosteron propinata (TP), saj je dobro znano, da so spolni hormoni, predvsem testosteron, potrebni za nastanek/pojav agresivnega obnašanja. O tem so poročali že pred več kot 50-imi leti (14). V našem poskusu smo uporabili t.i. test rezident – vsiljivec za proučevanje agresivnosti med dvema samcema (*angl.* intermale aggression), ki je spolno različno obnašanje, značilno za samce. Zaradi izolacije testne miši razvijejo teritorialno agresivno obnašanje. Testna miš je bila rezident, domača v kletki (izolirana v akvarijski stekleni kletki), za vsiljivca smo uporabili odraslega samca linije A/J. Vsaka miš je bila testirana trikrat v treh zaporednih dneh.

Po analizi podatkov so se največje razlike pokazale v prvem testu (Slika 12), kjer so živali GDX/WT večkrat napadle in ugriznile kot miši SF-1 KO, vendar samo v primerjavi skupin, ki ob rojstvu niso prejemale eksogenega TP (K-K). Pri ostalih skupinah, ki so bile izpostavljene TP z injiciranjem pred (TP-E), po ter pred in po



rojstvu (TP-E&PN), se ta razlika ni pokazala. S ponovitvijo testov je razlika izginila tudi pri netretirani skupini (Slika 13), kar lahko pripišemo izkušnji iz prejšnjega testa oziroma lahko delno pripišemo aktivacijskemu učinku testosterona iz podkožnih vsadkov. Lahko rečemo, da se je iz testa v test agresivnost povečevala (vsi rezultati niso prikazani).

Pri primerjavi časa od začetka poskusa do pojava prvega agresivnega dogodka (latenca) so se pokazale razlike pri samicah OVX/WT ter pri miših SF-1 KO (samicah in samcih), ki niso prejemale TP (K-K) in tistimi, ki so ga prejemale pred rojstvom (TP-E), v primerjavi s tistimi, ki so ga prejemale po rojstvu ter pred in po rojstvu (Slika 14). Pri samcih CAS/WT ta razlika ni prisotna, kar potrjuje že znano dejstvo, da ima endogeni testosteron (oziroma njegov metabolit estradiol) med razvojem pri samcih ključno vlogo pri maskulinizaciji možganov in s tem tudi obnašanja v odraslem obdobju, t.i. organizacijska vloga testosterona (88, 90, 340). Pri samicah OVX/WT in miših SF-1 KO (samicah in samcih) pa smo to vlogo testosterona potrdili z dodajanjem TP po rojstvu ter pred in po rojstvu. V primeru, ko so prejemale TP samo pred rojstvom, so bile latence podobne kot pri tistih, ki so bile brez TP. Rezultati kažejo, da je za pojav značilnega agresivnega obnašanja med samcema potrebna prisotnost testosterona že v obdobju ob rojstvu, da pa je bolj pomembno obdobje po rojstvu kot pred njim. Druga razlaga, zakaj je bilo agresivno obnašanje manj izraženo pri miših, ki so prejemale TP samo pred rojstvom, pa je morda tudi v času tretiranja, ker smo TP injicirali na E13,5 in E16,5, kar je nekoliko pred najvišjim izločanjem endogenega testosterona na dan E17,5 (86, 88). Ker smo testosteron injicirali pod kožo in v olju, zaradi česar bi se moral resorbirati počasneje, menimo, da je ta razlaga manj verjetna in da je bolj verjetno, da je obdobje po rojstvu bolj pomembno za razvoj agresivnega obnašanja. Ti naši izsledki se ujemajo z nekaterimi predhodnimi raziskavami, ki so pokazale, da lahko z dodajanjem testosterona tik po rojstvu pride tudi do agresivnega obnašanja pri samicah v odraslem obdobju (341, 342). Samci miši brez gena za encim aromatazo (ArKO), ki imajo zmanjšano agresivno obnašanje, pa so se v odraslem obdobju obnašali značilno agresivno, če so dobivali eksogene estrogene kmalu po rojstvu (343), in sicer na dan rojstva in potem še vsak četrti dan do odstavitve ter 3. dan po rojstvu in potem vsak četrti dan do odstavitve. Ko so z dodajanjem estrogenov

začeli šele sedmi dan po rojstvu in nadaljevali vsak četrti dan, pa živali v odraslem obdobju niso izražale agresivnega obnašanja (343).

Naši rezultati tako kažejo, da je za maskulinizacijo agresivnega obnašanja dovolj kombinacija prisotnosti testosterona v zgodnjem obdobju po rojstvu (organizacijski učinek) in kot aktivator v odraslem obdobju, saj so bile samice WT in miši SF-1 KO po dodajanju TP primerljivo agresivne kot samci WT.

### **5.3 VPLIV TESTOSTERONA V OBDOBJU OB ROJSTVU NA IZRAŽANJE KALBINDINA IN ARGININ VAZOPRESINA V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ GENA SF-1 IN MIŠIH DIVJEGA TIP**

Z metodo imunohistokemičnega barvanja smo proučevali izraženost beljakovine za vezavo Ca<sup>2+</sup> (Kalbindin D-28K, kalbindin, Calb) in arginin vazopresina (AVP) v vmesnih možganih pri miših SF-1 KO in GDX/WT. Po zaključku testov obnašanja smo za raziskavo uporabili živali iz vseh štirih različno tretiranih skupin.

Vpliv dodajanja testosterona v obdobju ob rojstvu na maskulinizacijo in defeminizacijo možganov ter na žensko spolno in agresivno obnašanje v odraslem obdobju smo ugotavljali s proučevanjem izražanje kalbindina (Calb) in arginin vazopresina (AVP) v vmesnem delu možganov. Osredotočili smo se na predele od predoptičnega področja do konca hipotalamusa, saj se v tem delu nahajajo glavni centri za urejanje endokrinih procesov pri sesalcih. Do zdaj je bilo v tem delu možganov opisanih največ morfoloških razlik med spoloma in ta področja vsebujejo največ nevronov, ki izražajo receptorje za steroidne hormone, preko katerih le-ti vplivajo kot najpomembnejši dejavnik pri razvoju in delovanju vmesnih možganov (344, 345, 346). Za izraženost beljakovine Calb v nevronih in AVP v stranskem pretinu (LS) je glede na predhodne raziskave potrebna prisotnost testosterona (4), zato so bile vse živali, pri katerih smo ugotavljali izraženost teh beljakovin, pred žrtvovanjem na še aktivnih testosteronskih vsadkih.

#### **5.3.1 Izraženost beljakovine kalbindin (Calb) v vmesnih možganih**

Prisotnost imunoreaktivnih celic za beljakovino kalbindin (Calb) smo primerjali na rezinah 0,10 mm kaudalno od bregme (Bregma -0,10) (291), kjer se nahaja medialno predoptično področje (MPOA).

Sprva se kalbindin ni uporabljal za dokazovanje spolno različnih področij v možganih, vendar je kasneje kar nekaj študij uporabilo označevanje s kalbindinom za proučevanje spolno dimorfne področij v možganih pri podganah in s tem potrdilo prisotnost spolno dimorfne jedra v predoptičnem področju (SDN-POA) (347, 348, 349, 350, 351). Temu so sledile tudi raziskave pri miših, ki so z uporabo označevanja s kalbindinom ugotovile, da imajo samci v področju medialnega POA (MPOA) večje število Calb imuonoreaktivnih celic kot samice, kar kaže na podobno spolno dimorfno jedro kot pri podganah (352, 290, 171) s pomembno razliko, da lahko pri podganah (in večini drugih živalskih vrst) to jedro vidimo že z navadnim histološkim barvanjem (npr. po Nisslu), pri miših pa le z obarvanjem celic, ki vsebujejo kalbindin.

V našem poskusu smo primerjali izražanje kalbindina (Calb) med samci CAS/WT, samicami OVX/WT, samci in samicam SF-1 KO v vseh štirih skupinah, ki smo jim dodajali testosteron propionat pred rojstvom (TP-E), po rojstvu (TP-PN), pred in po rojstvu (TP-E&PN), ali pa jim testosteron propionata nismo dodajali (K-K) (Slika 15 in 16). Pričakovano smo pri skupini, ki ni prejela testosteron propionata, ugotovili prisotnost SDN-POA samo v skupini samcev CAS/WT, ki so bili normalno izpostavljeni testosteronu med razvojem, do pubertete, zaradi prisotnosti mod, ne pa pri ostalih treh skupinah (samice OVX/WT, samci in samice SF-1 KO). Rezultati kažejo, da je pri samcih CAS/WT v vseh štirih skupinah (ne glede na tretiranje) izraženo SDN-POA (obkroženo pri samcu WT brez dodatnega TP – Slika 15). Če to področje primerjamo z ostalimi genotipi in različno tretiranimi skupinami, ugotovimo, da se podobno področje pojavi pri samicah WT ter pri obeh spolih SF-1 KO miši samo v primeru, ko smo jih po rojstvu in v kombinaciji pred in po rojstvu tretirali s TP. V primeru, ko so bile miši brez dodanega TP ali ko so ga prejemale samo pred rojstvom, se pri samicah OVX/WT ter pri samcih in samicah SF-1 KO to jedro ne oblikuje. Naši rezultati tako kažejo, da je za nastanek SDN-POA pri miših pomembna prisotnost testosterona v zgodnjem postnatalnem obdobju, ne pa samo pred rojstvom, kar se ujema z rezultati Orikase in Sakume (353), ki sta z izražanjem kalbindina dokazala pomembnost prisotnosti testosterona po rojstvu pri samicah WT dveh različnih sevov miši (C57BL/6J in ddN). O vlogi SDN-POA ne vemo še zelo veliko. Raziskave

na podganah so pokazale, da samci s poškodovanim SDN-POA slabše izražajo kopulatorno obnašanje, ki je značilnost moškega spolnega obnašanja (354, 139). Ob tretiranju z zaviralci aromataze pa je SDN-POA pri podganjih samcih izginilo in tudi moško spolno obnašanje je bilo spremenjeno (355). Naši rezultati so pokazali tudi, da je samo prisotnost testosterona v zgodnjem obdobju po rojstvu dovolj za normalno oblikovanje jedra SDN-POA, ter da na spolne razlike v oblikovanju jedra ne vplivajo spolni kromosomi, saj se je jedro ob izpostavljenosti testosteronu po rojstvu podobno izoblikovalo pri vseh štirih genotipih miši.

### 5.3.2 Izraženost beljakovine arginin vazopresin (AVP) v vmesnih možganih

Razlika v številu vlaken, ki izražajo AVP v stranskem pretinu (LS), je ena najbolj opisanih in proučevanih spolnih razlik v možganih sesalcev (157). Večje število vlaken, ki izražajo AVP, najdemo pri samcih, vendar je ta izraženost odvisna od aktivacijskega učinka testosterona. Telesa nevronov, ki oživčujejo LS, se nahajajo v BNST in v amigdali (157). Pri podganah so ugotovili, da je število nevronov, ki izražajo AVP v BNST, spolno dimorfno in da je za maskulinizacijo tega sistema odgovoren testosteron v zgodnjem obdobju po rojstvu (356).

Za primerjanje izraženosti AVP pri naših živalih smo izbrali rezine 0,14 mm rostralno (291) od bregme (Bregma 0,14), kjer je LS (Slika 17 in 18). Primerjali smo imunoreaktivna vlakna, ki izražajo AVP, med samci CAS/WT, samci in samicami SF-1 KO ter samicami OVX/WT v vseh štirih skupinah, in sicer tisti, ki ni prejela eksogenega TP (K-K), tisti, ki ga je prejela samo pred rojstvom (TP-E), tisti, ki ga je prejela po rojstvu (TP-PN), ter tisti, ki je TP prejela tako pred kot tudi po rojstvu (TP-E&PN).

Večja izraženost AVP v LS pri samcih je delno odvisna tudi od prisotnosti samih spolnih kromosomov (100), kar so dokazali z uporabo t.i. modela "four core genotype", kjer so imele samice  $XYSry^-$  (prisotna oba različna spolna kromosoma, kromosom X in Y, vendar brez gena *Sry*) višjo izraženost AVP kot samice XX.

Predhodna študija, kjer so ugotavljali razlike pri izraženosti AVP pri miših SF-1 KO in GDX/WT, ni pokazala razlik med samci in samicami SF-1 KO, saj po dodajanju testosterona v odraslem obdobju ni bilo opaznih razlik med spoloma tako pri miših

GDX/WT kot pri miših SF-1 KO (357). To se lahko razloži s tem, da miši niso dobivale dodatnega testosterona v obdobju ob rojstvu, tudi pred žrtvovanjem pa so bile v tej raziskavi izpostavljene testosteronu krajši čas kot pa v naši raziskavi.

Naši rezultati potrjujejo, da je za izražanje AVP v LS nujno potrebna prisotnost testosterona. Pri samcih CAS/WT je izraženost AVP podobna v vseh skupinah ne glede na dodajanje TP, medtem ko slike kažejo, da je pri samicah OVX/WT več AVP imunopozitivnih vlaken v primeru, ko so prejemale TP po rojstvu ter pred in po rojstvu. Podoben vzorec se kaže tudi pri živalih SF-1 KO, s tem da so pri samcih in samicah SF-1 KO AVP imunopozitivna vlakna prisotna tudi v skupinah, ki niso bile izpostavljene eksogenemu TP in ko so ga prejemale samo pred rojstvom. S primerjavo vseh štirih genotipov, ki so prejemali TP po rojstvu ter pred in po rojstvu, med skupinami ni vidnih večjih razlik. Podobno kot pri izražanju kalbindina rezultati kažejo, da je pomembnejše delovanje testosterona v zgodnjem obdobju po rojstvu kot pred rojstvom.

Naj na tem mestu povzamem, kaj kažejo rezultati obeh naših raziskav predstavljenih v tej disertaciji. V prvem delu smo dokazali, da se geni, vezani na kromosom Y (*Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y* in *Kdm5d*), izražajo neodvisno od prisotnosti spolnih hormonov, saj so tudi pri miših SF-1 KO izraženi različno med spoloma, kar pa je isto kot pri miših WT. Za gene, vezane na kromosom X, smo pri odraslih miših potrdili, da je *Xist* tisti, ki je različno izražen med spoloma, vendar brez razlik med samicami SF-1 KO in WT.

Pri proučevanju ženskega spolnega in agresivnega obnašanja po različnih obdobjih dodajanja testosteron propionata (TP) lahko na podlagi rezultatov opazovanj zaključimo, da smo s tretiranjem s TP dosegli defeminizacijo in maskulinizacijo v obnašanju, ki pa je bila bolj izrazita ob dodajanju testosterona po rojstvu, kar kaže na to, da je zgodnje obdobje po rojstvu bolj pomembno za pravilen razvoj zmožnosti izražanja teh obnašanj, kot obdobje pred rojstvom. Podobno vlogo testosterona po rojstvu kaže tudi oblika jedra SDN-POA, ki ga oblikujejo celice, ki izražajo kalbindin (*Calb*) in izražanje arginin vazopresina (AVP) v vmesnem delu možganov pri SF-1 KO in WT miših, saj smo le v primeru dodajanja testosterona po rojstvu dosegli maskulinizacijo možganov. V primeru izražanja kalbindina smo tako pri miših, ki so prejemale testosteron po rojstvu ugotovili v medialnem

predoptičnem področju (MPOA) jedro, ki je pri podganah označeno kot spolno dimorfno (SDN), pri miših, ki so testosteron prejemale samo pred rojstvom, pa do oblikovanja tega jedra ni prišlo. Pričakovano pa je bilo to jedro prisotno pri samcih CAS/WT v vseh skupinah, ne glede na tretiranje s testosteronom. Tako lahko rečemo, da je testosteron v perinatalnem obdobju odgovoren za organizacijo tega področja, ki se oblikuje kot posledica delovanja testosterona oziroma njegovega aromatiziranega metabolita estradiola v perinatalnem obdobju. Za izražanje imunoreaktivnih vlaken, ki izražajo AVP v stranskem pretinu, bi lahko rekli, da velja podobno, vendar so vlakna prisotna v vseh skupinah in genotipih zaradi aktivacijskega učinka testosterona v odraslem obdobju.

## 6 Zaključki

Naši rezultati kažejo, da se nekateri geni, ki so vezani na kromosom Y (*Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y* in *Kdm5d*) in na kromosom X (*Xist*), izražajo v možganih neodvisno od prisotnosti spolnih hormonov, kar potrjuje našo prvo hipotezo. Omenjeni geni so različno izraženi med spoloma tako pri miših SF-1 KO kot pri miših GDX/WT. S tem poskusom smo potrdili vlogo genov pri spolni diferenciaciji v možganih.

Z dodajanjem testosteron propionata (TP) v obdobju ob rojstvu smo dosegli defeminizacijo in maskulinizacijo v obnašanju, kar potrjujejo rezultati iz proučevanja ženskega spolnega in agresivnega obnašanja. Rezultati kažejo, da je obdobje tik po rojstvu pomembnejše kot obdobje pred rojstvom.

Podobno kot pri proučevanju obnašanja smo tudi pri izražanju beljakovine kalbindin (*Calb*) ugotovili, da je za maskulinizacijo mišjih možganov pomembnejše obdobje tik po rojstvu, saj se je v medialnem preoptičnem področju t.i. jedro SDN-POA izrazilo pri samicah OVX/WT in miših SF1-KO samo po dodajanju testosterona po rojstvu ali v obeh obdobjih. Pri samcih OVX/WT pa je prisotno ne glede na dodajanje eksogenega TP. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi pri proučevanju izražanja beljakovine arginin vazopresin (*AVP*), s to razliko, da so imunopozitivna vlakna prisotna pri vseh genotipih, saj je to posledica aktivacijskega učinka testosterona.

## 7 Povzetek

Pri sesalcih poznamo fenotipsko dva različna spola, in sicer ženskega in moškega, ki sta genetsko določena že ob združitvi spolnih celic ob prisotnosti kromosomov X in Y. Pri moških osebkih (XY), kjer je prisoten kromosom Y in s tem gen *Sry*, pride do razvoja mod, ki že v času fetalnega razvoja izločajo testosteron in AMH, ki sta že v zgodnjem razvoju odgovorna za razvoje moškega fenotipa. Testosteron se v možganih glodavcev aromatizira v estradiol. Estradiol vzpodbudi razvoj neuroendokrinega sistema in posledično tudi obnašanja značilnega za moški spol (pravimo da ju maskulinizira) in zavre razvoj neuroendokrinega sistema in obnašanja, ki sta značilna za ženski spol, tj. ju defeminizira. Pri XX, torej ženskih osebkih, *Sry* ni prisoten in gre razvoj spolnih organov v ženske spolne organe: v jajčnike, jajcevođe in maternico iz Müllerjevih vodov. Jajčniki v fetalnem obdobju ne izločajo spolnih hormonov. Zato je dolgo časa veljalo prepričanje, da se ženski fenotip možganov razvije brez vpliva spolnih hormonov, kar pa ne velja popolnoma, saj je kar nekaj raziskav dokazalo, da jajčniki kmalu po rojstvu, v obdobju pred puberteto, izločajo estrogene.

Pri sekundarni spolni diferenciaciji sodelujejo različni genetski mehanizmi, ki delujejo tudi neodvisno od hormonov, vendar je o teh vplivih veliko manj znanega, saj je zelo težko izključiti vpliv spolnih žlez med razvojem.

V naših raziskavah smo uporabili miši brez gena za prepisovalni dejavnik steroidogeni faktor 1 (SF-1 KO), ki so zaradi odsotnosti SF-1 brez spolnih in nadledvičnih žlez že od zgodnjega embrionalnega razvoja in posledično niso izpostavljeni spolnim hormonom. Miši SF-1 KO fenotipsko, ne glede na genetski spol, izgledajo kot samice. Zaradi tako zgodnjega propada zametkov spolnih žlez možgani miši SF-1 KO niso nikoli izpostavljeni lastnim spolnim hormonom in tako predstavljajo dober model za proučevanje ločenega vpliva hormonov in genov tako na strukturo kot tudi na delovanje možganov, posameznih jeder v možganih ter na obnašanje. Poleg vpliva na razvoj spolnih in nadledvičnih žlez pa ima SF-1 pomembno vlogo tudi pri razvoju ventromedialnega jedra v hipotalamusu (VMH), zato imajo miši SF-1 KO spremenjeno strukturo tega jedra in predstavljajo dober model tudi za proučevanje vlog in delovanja VMH.



Namen naših raziskav je bil ugotoviti ali se geni v možganih izražajo neodvisno od prisotnosti spolnih žlez in posledično hormonov, ki jih le-te izločajo. In ali lahko z dodajanjem eksogenega testosterona v obdobju pred, po, pred in po rojstvu dosežemo maskulinizacijo in defeminizacijo možganov pri miših SF-1 KO.

Rezultati v raziskavi izražanja genov z metodama na DNA-mikromrežah in qPCR kažejo, da se nekateri geni, ki so vezani na kromosom Y (*Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y* in *Kdm5d*) in na kromosom X (*Xist*), izražajo v možganih neodvisno od prisotnosti spolnih steroidnih hormonov, ki jih izločajo spolne žleze. Ti geni so bili različno izraženi med spoloma tako pri miših SF-1 KO kot pri miših GDX/WT, niso pa bili različno izraženi med genotipoma SF-1 KO in WT.

Z dodajanjem spolnih hormonov, natančneje testosteron propionata (TP), pred in po rojstvu, smo želeli pri miših brez gena *SF-1* in pri samicah OVX/WT doseči v možganih fenotip, ki bo podoben samcem CAS/WT, torej smo želeli povzročiti maskulinizacijo in defeminizacijo pri obnašanju in tudi v možganih teh miši. Tako smo v raziskavi z dodajanjem TP v obdobju ob rojstvu pri proučevanju ženskega spolnega obnašanja ugotovili, da samo samice divjega tipa (OVX/WT) brez tretiranja izražajo visok količnik lordoze (LQ) in da se je le-ta po tretiranju s TP značilno znižal ne glede na obdobje tretiranja. To kaže na vpliv testosterona na defeminizacijo v obnašanju pri samicah OVX/WT. Pri ostalih genotipih, tudi pri samicah SF-1 KO, je bil LQ statistično slabše izražen kot pri samicah OVX/WT. Nismo pa ugotovili razlik med spoloma znotraj miši SF-1 KO. Pri analizi podatkov za agresivno obnašanje smo ugotovili, da so miši GDX/WT, ki niso prejemale TP, bolj agresivne (imele so večje skupno število ugrizov in napadov) od miši SF-1 KO brez dodanega testosterona. Dodajanje testosterona po rojstvu je povečalo agresivno obnašanje tako pri samicah OVX/WT kot pri samcih in samicah SF-1 KO, kar kaže, da je obdobje po rojstvu pomembnejše za maskulinizacijo obnašanja samcev pod vplivom testosterona kot obdobje pred rojstvom. Pri samcih CAS/WT nismo ugotovili značilnih razlik glede na tretiranje s TP.

Pri izražanju beljakovine kalbindin (*Calb*) v medialnem predoptičnem področju (MPOA) smo ugotovili, da so pri samcih CAS/WT prisotne celice, ki so oblikovane v

jedro podobno spolno dimorfnemu jedru pri podganah (SDN-POA), ne glede na dodajanje TP. Pri ostalih genotipih pa smo opazili oblikovanje tega jedra le ob dodajanju testosterona po rojstvu ter pred in po rojstvu, kar kaže, podobno kot pri agresivnem obnašanju, na pomembnejšo vlogo TP na maskulinizacijo v zgodnjem obdobju po rojstvu kot pred rojstvom. Pri izražanju beljakovine AVP v stranskem pretinu (LS) pa smo ugotovili prisotnost imunopozitivnih vlaken pri vseh genotipih, saj je za to izražanje potreben aktivacijski učinek testosterona pred proučevanjem oziroma žrtvovanjem miši. Kljub temu pa se kaže, da je pri samcih CAS/WT večja izraženost v primeru brez TP in pri tretiranju pred rojstvom v primerjavi z ostalimi genotipi.

S proučevanjem miši SF-1 KO smo tako pokazali, da se nekateri geni izražajo v možganih ne glede na prisotnost spolnih hormonov, ki jih izločajo spolne žleze, ter da je za maskulinizacijo in defeminizacijo možganov in obnašanja pomembnejše zgodnje obdobje po rojstvu kot pa obdobje pred rojstvom.

## 8 Summary

In mammals there are two phenotypically distinct sexes, female (XX) and male (XY), which are determined at the time of fertilisation, when two sex cells merge. In males with the Y chromosome, *Sry* gene from Y chromosome is responsible for undifferentiated gonads to develop as testes, which start to secrete, testosterone and AMH early during development and these two hormones are responsible for development of male phenotype. In the brain, at least in rodents, testosterone is aromatised into estradiol. Estradiol then induces the neuroendocrine system and consequently behaviour to develop towards the male phenotype (masculinisation) and inhibits development into the female phenotype (defeminisation). In females, where *Sry* gene is not present, fetal genital ridges develop into female gonads, namely ovaries and other parts of the female reproductive system (oviducts, uterus and upper part of vagina) develop from Müllerian ducts. During fetal development, ovaries do not excrete steroid hormones. Until recently, it was thought that female brain phenotype develops without the influence of sex hormones, but some very recent studies suggest that low prepubertal secretion of estrogens exists.

In addition to hormones, genes from sex chromosomes might differentially regulate development of male and female cells also in the brain, although the role of sex chromosomes in brain sexual differentiation is still largely not understood.

In our studies, mice without transcription factor steroidogenic factor 1 (SF-1 KO) were used. Due to the absence of SF-1, these mice are born without adrenal glands and gonads, and are consequently not exposed to endogenous sex steroid hormones during development. Therefore, regardless of the genetic sex, male and female SF-1 KO mice appear phenotypically females. SF-1 KO mice are never exposed to endogenous sex steroids due to early regression of developing gonads and that is why they provide an excellent model for studying independent influence of sex steroid hormones and genes on sexual differentiation of the brain and individual nuclei of the brain, on brain structure and function, and on behaviour. However, besides its role in the development of adrenal glands and gonads, SF-1 has an important role in the development of the ventromedial

nucleus of the hypothalamus (VMH). SF-1 KO mice have an impaired structure of the VMH and are therefore also a good model for studying function of the VMH.

The purpose of our study was to determine if there are sex differences in brain gene expression regardless on the presence of gonads, and if it is possible to induce complete masculinisation and defeminisation of the brain by administration of exogenous testosterone to the SF-1 KO mice during prenatal, postnatal or pre- and postnatal development.

Experiments using genomic DNA microarrays and qPCR revealed that some Y-linked genes (*Uty*, *Eif2s3y*, *Ddx3y* in *Kdm5d*) and one X-linked gene (*Xist*) are expressed in the adult brain in sex dependent manner independently of the presence of gonads, as they are differentially expressed also between SF-1 KO males and females, the same as in GDX/WT mice.

With administration of exogenous testosterone propionate (TP) before and after birth, we wanted to induce masculinisation and defeminisation of the brain similar to WT males also in SF-1 KO mice and OVX/WT females. In tests of female sexual behaviour, OVX/WT females without added TP expressed the highest lordosis quotient (LQ), which was significantly decreased in mice receiving neonatal TP treatment. In all other genotypes, including SF-1 KO females, LQ was significantly lower in comparison to untreated OVX/WT females regardless of neonatal testosterone treatment, and there were no differences between SF-1 KO males and females observed. Analyses of aggressive behaviour revealed that GDX/WT mice without TP treatment had much higher total number of attacks and bites in comparison to SF-1 KO mice. Administration of TP after birth, but not before birth only, increased aggressiveness in OVX/WT females and in male and female SF-1 KO mice, suggesting that postnatal period is more important in masculinisation of aggressive behaviour than the prenatal period.

Cells expressing calbindin (Calb) protein in the medial preoptic area (MPOA) in CAS/WT males are forming a nucleus similar to sexual dimorphic nucleus in the rat brain (SDN-POA), and this was, as expected, not influenced by neonatal

testosterone treatment in CAS/WT males. In other groups/genotypes, this nucleus was present only after treatment with TP during postnatal and during pre- and postnatal period, what is similar to the results from the behavioural study and again suggests that postnatal treatment has more important influence on masculinisation of the brain than prenatal testosterone treatment.

Expressions of arginine vasopressin (AVP) in the fibres of LS require activational effect of testosterone in adulthood. Although in the present study all mice were treated with testosterone before sacrifice, there were still apparent differences between genotypes with CAS/WT males having more immuno-positive AVP fibres in comparison to all other groups.

In conclusion, results of our studies reveal that some genes are expressed in sexually dimorphic manner even in complete absence of gonads in SF-1 KO mice. Furthermore, behavioural studies and studies of calbindin immunoexpression suggest that postnatal exposure to testosterone is crucial and more important for complete masculinisation and defeminisation than prenatal exposure to testosterone.

## 9 Zahvala

Najprej naj se zahvalim mojemu najdražjemu, ki mi stoji ob strani že skoraj 18 let: Nenad – hvala ti! Hvala ti za vse, še posebno pa za zadnja leta, ki so bila še posebno zanimiva in vihrava ...

Hvala moji mami in mojemu tati ter najdražji sestri! Hvala vam, ker me podpirate pri vsem delu in verjamete vame! Hvala tudi Leonu in seveda malemu Levčku. Hvala Ivana, Gordana in Josip.

Gregor, hvala ti za to življenjsko priložnost in izkušnjo. Hvala za vso pomoč in vodenje pri delu ter za prijetna druženja, ki smo jih imeli kot celoten kolektiv. Hvala, da si mi omogočil toliko udeležb na kongresih in predvsem za trenutke, kot je bila večerja s prof. Artom Arthurjem. V čast mi je, da sem v teh letih spoznala toliko velikih in pomembnih ljudi s področja proučevanj razlik med spoloma.

Hvala tudi članom strokovne komisije, prof. dr. Milki Vrecl, prof. dr. Jelki Zabavnik Piano in prof. dr. Marjanu Slaku Rupniku – hvala vam, ker ste se tako hitro in učinkovito odzvali ter mi dali konstruktivne komentarje in seveda končno oceno. Hvala Roku Koširju za vso pomoč pri izvedbi poskusov z mikromrežami.

Potem pa: hvala, Tomi! Brez tebe bi moje delo trajalo še kakšno leto več ☺ Hvala za vse znanje, ki si mi ga predal in vse ure pogovorov o nevroznanosti ter za vse ure smeha in NFS!

Katra, tudi brez tebe bi zelo težko. V teh letih sva postali veliko več kot sodelavki. Pogovori, smeh in nepogrešljive kave ...

Neža, Katja, Nina, Jasmina – v Centru za genomiko je bilo z vami super! Hvala za vso pomoč pri miših in poskusih, za konstruktivne debate in prijetna druženja!

Luka, Nejc, Urška, Vesna, Meta – ekipa celičarjev – malo nam je tesno, ampak zato toliko bolj zabavno!

Nikakor ne morem mimo moje Gaje! Gajči, skupaj sva začeli to znanstveno pot in približno istočasno tudi zaključili. Kljub kilometrom med nama, sva še vedno zelo blizu!

Petra in Sara – hvala vama! V zadnjih letih smo precej narazen, ampak v mislih in srcih pa zelo blizu!

Pa seveda: Vesna, Tilen, Samo, Maria, Gašper, Ajda, Sara ... - za vsa ta leta!

In ne nazadnje, hvala ti življenje, da si mi prineslo moje "fefke": Jana, Rebeka in Simona! Ne morem brez vas! Hvala vam! Rada vas imam! Skupaj gremo naprej! Die Fantastischen 4!

Hvala tudi celotni ekipi Europe Donne in ostalim puncam!

Hvala ti, moj kosmatinko, Ruby!

## 10 Reference

1. Eckel L, Arnold A, Hampson E, Becker J, Blaustein J, Herman J. Research and methodological issues in the study of sex differences and hormone-behavior relations. In: Becker JB, ed. *Sex differences in the brain: from genes to behavior*: Oxford ; New York: Oxford University Press, 2008: 741—52.
2. Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990; 348: 450—2.
3. Gilbert SF. *Developmental biology*. 9<sup>th</sup> ed. Sunderland, Sinauer Associates, 2010: 20—80.
4. Tobet SA FT. Sex differences in neural morphology influenced hormonally throughout life. In: Gerall AA, Moltz H, Ward IL, eds. *Handbook of behavioral neurobiology, sexual differentiation*. New York: Plenum Press, 1992: 363.
5. vom Saal FS. Sexual differentiation in litter-bearing mammals: influence of sex of adjacent fetuses in utero. *J Anim Sci* 1989; 67: 1824—40.
6. London SE, Schlinger BA. Steroidogenic enzymes along the ventricular proliferative zone in the developing songbird brain. *J Comp Neurol* 2007; 502: 507—21.
7. Nguyen AD, Conley AJ. Adrenal androgens in humans and nonhuman primates: production, zonation and regulation. *Endocr Dev* 2008; 13: 33—54.
8. Greco TL, Payne AH. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 1994; 135: 262—8.
9. Majdic G, Saunders PT, Teerds KJ. Immunoeexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 alpha-hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol Reprod* 1998; 58: 520—5.

10. Dewing P, Shi T, Horvath S, Vilain E. Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 118: 82—90.
11. Rhen T CD. Why are there two sexes? In: Becker JB BK, Geary N, Hampson E, Herman JP, and Young EA, eds. *Sex Differences in the Brain, From Genes to Behavior*. New York: Oxford University Press, 2008: Chapter 1: 3—14.
12. Arnold AP, Burgoyne PS. Are XX and XY brain cells intrinsically different? *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 6—11.
13. Lyon MF. X-chromosome inactivation. *Curr Biol* 1999; 9: R235—7.
14. Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 1959; 65: 369—82.
15. Arnold AP, Breedlove SM. Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Horm Behav* 1985; 19: 469—98.
16. Berne RM, Koepfen BM, Stanton BA. The Hypothalamus and pituitary gland. In: Berne RM, eds. *Physiology*: 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier, 2004: 819.
17. Wilson CA, Davies DC. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction* 2007; 133: 331—59.
18. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990; 346: 245—50.
19. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 1995; 121: 1603—14.
20. Bavdek S. *Temelji embriologija za študente veterinarske medicine*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Ljubljana, 1993:30—42.
21. Roosen-Runge EC, Anderson D. The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. *Acta Anat (Basel)* 1959; 37: 125—37.
22. McGeady TA. *Veterinary embryology*. Oxford: Blackwell, 2006: 244—5.
23. Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 201: 125—40.



24. Baker PJ, O'Shaughnessy PJ. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* 2001; 122: 227—34.
25. George FW, Simpson ER, Milewich L, Wilson JD. Studies on the regulation of the onset of steroid hormone biosynthesis in fetal rabbit gonads. *Endocrinology* 1979; 105: 1100—6.
26. Berne RM. *Physiology*. 5th. St. Louis, Mo.: Mosby, 2004: 920—6.
27. Pontier DB, Gribnau J. Xist regulation and function explored. *Hum Genet* 2011; 130: 223—36.
28. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus L.*). *Nature* 1961; 190: 372—3.
29. Migeon BR. *Females are mosaics: X inactivation and sex differences in disease*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press, 2014.
30. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 2005; 434: 400—4.
31. Carvalho AB, Dobo BA, Vibranovski MD, Clark AG. Identification of five new genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13225—30.
32. Becker JB. *Sex differences in the brain : from genes to behavior*. New York: Oxford University Press, 2008: 109—53.
33. List of human proteins in the Uniprot Human reference proteome. <http://www.uniprot.org/> (06. 05. 2015)
34. Leppig KA, Distèche CM. Ring X and other structural X chromosome abnormalities: X inactivation and phenotype. *Semin Reprod Med* 2001; 19: 147—57.
35. Lee JT, Bartolomei MS. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell* 2013; 152: 1308—23.
36. Chery J, Larschan E. X-marks the spot: X-chromosome identification during dosage compensation. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839: 234—40.

37. Otter M, Schrandner-Stumpel CT, Curfs LM. Triple X syndrome: a review of the literature. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 265—71.
38. Huynh KD, Lee JT. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* 2003; 426: 857—62.
39. Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 2004; 303: 644—9.
40. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 1996; 379: 131—7.
41. Baumgartner BJ, Eusterman VD, Willard CC, Morris JT. Pathology quiz case 1. Diagnosis: *Mycobacterium tuberculosis* cervical lymphadenitis (scrofula) with left parotid gland. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 990; diag 2—3.
42. Mak W, Baxter J, Silva J, Newall AE, Otte AP, et al. Mitotically stable association of polycomb group proteins eed and enx1 with the inactive x chromosome in trophoblast stem cells. *Curr Biol* 2002; 12: 1016—20.
43. Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 2003; 300: 131—5.
44. Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* 2008; 322: 750—6.
45. Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafreniere RG, Xing Y, et al. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* 1992; 71: 527—42.
46. Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet* 1999; 21: 400—4.
47. Mittwoch U. Genetics of sex determination: exceptions that prove the rule. *Mol Genet Metab* 2000; 71: 405—10.
48. Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, et al. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* 1994; 13: 6115—24.

49. Veitia R, Ion A, Barbaux S, Jobling MA, Souleyreau N, et al. Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum Genet* 1997; 99: 648—52.
50. McElreavey KD, Vilain E, Boucekkine C, Vidaud M, Jaubert F, et al. XY sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. *Genomics* 1992; 13: 838—40.
51. McElreavey K, Vilain E, Barbaux S, Fuqua JS, Fechner PY, et al. Loss of sequences 3' to the testis-determining gene, SRY, including the Y pseudoautosomal boundary associated with partial testicular determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 8590—4.
52. Jager RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G. A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Hum Genet* 1992; 90: 350—5.
53. Vilain E, McElreavey K, Jaubert F, Raymond JP, Richaud F, et al. Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1008—11.
54. Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, et al. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 2000; 91: 403—7.
55. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 2008; 453: 930—4.
56. Guth SI, Wegner M. Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3000—18.
57. Katoh K, Miyata T. A heuristic approach of maximum likelihood method for inferring phylogenetic tree and an application to the mammalian SOX-3 origin of the testis-determining gene SRY. *FEBS Lett* 1999; 463: 129—32.
58. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, et al. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 1996; 14: 62—8.
59. Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, et al. A transgenic insertion upstream of sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* 2000; 26: 490—4.

60. Hossain A, Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem* 2001; 276: 16817—23.
61. Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, et al. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 1993; 119: 1329—41.
62. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993; 74: 679—91.
63. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, et al. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991; 67: 437—47.
64. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 1997; 9: 209—25.
65. Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, et al. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 1997; 17: 467—70.
66. Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Baity LA, Meade JC, et al. A cell-specific nuclear receptor regulates the steroid hydroxylases. *Steroids* 1995; 60: 10—4.
67. Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP, et al. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 852—60.
68. Majdic G, Saunders PT. Differential patterns of expression of DAX-1 and steroidogenic factor-1 (SF-1) in the fetal rat testis. *Endocrinology* 1996; 137: 3586—9.
69. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994; 77: 481—90.
70. Yu RN, Ito M, Jameson JL. The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1010—22.

71. Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Recan D, et al. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 1994; 372: 672—6.
72. Sharpe RM. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20: 91—110.
73. Park SY, Jameson JL. Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* 2005; 146: 1035—42.
74. Vilain E, McCabe ER. Mammalian sex determination: from gonads to brain. *Mol Genet Metab* 1998; 65: 74—84.
75. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999; 397: 405—9.
76. Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarras P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211: 21—31.
77. El-Gehani F, Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. Vasoactive intestinal peptide stimulates testosterone production by cultured fetal rat testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 140: 175—8.
78. Arnold AP. Sex chromosomes and brain gender. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 701—8.
79. Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19: 323—62.
80. Lillie FR. The theory of the Free-Martin. *Science* 1916; 43: 611—3.
81. Jost A. The age factor in the castration of male rabbit fetuses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1947; 66: 302.
82. McEwen BS. Gonadal steroids and brain development. *Biol Reprod* 1980; 22: 43—8.
83. Itoh Y, Melamed E, Yang X, Kampf K, Wang S, et al. Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. *J Biol* 2007; 6: e2: 15.

84. Breedlove SM. Sexual differentiation of the human nervous system. *Annu Rev Psychol* 1994; 45: 389—418.
85. Simerly RB. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci* 2002; 25: 507—36.
86. Burns-Cusato M, Scordalakes EM, Rissman EF. Of mice and missing data: what we know (and need to learn) about male sexual behavior. *Physiol Behav* 2004; 83: 217—32.
87. Motelica-Heino I, Edwards DA, Roffi J. Intermale aggression in mice: does hour of castration after birth influence adult behavior? *Physiol Behav* 1993; 53: 1017—9.
88. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; 211: 1294—302.
89. Davis EC, Popper P, Gorski RA. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res* 1996; 734: 10—8.
90. McCarthy MM, Arnold AP. Sex differences in the brain: what's old and what's new In: Becker JB, Berkley, K. J., Geary N., eds. *Sex differences in the brain: from genes to behavior*: Oxford ; New York: Oxford University Press, 2008: 15—34.
91. Bakker J, De Mees C, Douhard Q, Balthazart J, Gabant P, et al. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat Neurosci* 2006; 9: 220—6.
92. Sisk CL, Zehr JL. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front Neuroendocrinol* 2005; 26: 163—74.
93. Kercmar J, Tobet SA, Majdic G. Social isolation during puberty affects female sexual behavior in mice. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: e337(8).  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4179611/> (06.05.2015)
94. Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 2003; 13: 226—34.

95. Amateau SK, Alt JJ, Stamps CL, McCarthy MM. Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology* 2004; 145: 2906—17.
96. Ryan BC, Vandenberg JG. Intrauterine position effects. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26: 665—78.
97. Tilson HA, Kodavanti PR, Mundy WR, Bushnell PJ. Neurotoxicity of environmental chemicals and their mechanism of action. *Toxicol Lett* 1998; 102—103: 631-5.
98. Lephart ED, West TW, Weber KS, Rhees RW, Setchell KD, et al. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicol Teratol* 2002; 24: 5—16.
99. Dewing P, Chiang CW, Sinchak K, Sim H, Fernagut PO, et al. Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. *Curr Biol* 2006; 16: 415—20.
100. De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB, Yang LY, Scordalakes EM, et al. A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neurosci* 2002; 22: 9005—14.
101. Xu J, Burgoyne PS, Arnold AP. Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1409—19.
102. Yang X, Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, et al. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res* 2006; 16: 995—1004.
103. Yang J, Zou Y, Zhu J. Identifying differentially expressed genes in human acute leukemia and mouse brain microarray datasets utilizing QTModel. *Funct Integr Genomics* 2009; 9: 59—66.
104. Wolstenholme JT, Rissman EF, Bekiranov S. Sexual differentiation in the developing mouse brain: contributions of sex chromosome genes. *Genes Brain Behav* 2013; 12: 166—80.
105. Lisk RD. Copulatory activity of the male rat following placement of preoptic-anterior hypothalamic lesions. *Exp Brain Res* 1968; 5: 306—13.
106. Szechtman H, Caggiula AR, Wulkan D. Preoptic knife cuts and sexual behavior in male rats. *Brain Res* 1978; 150: 569—95.

107. Madeira MD, Lieberman AR. Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol* 1995; 45: 275—333.
108. Segovia S, Guillamon A. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Brain Res Rev* 1993; 18: 51—74.
109. Maurer RA, Woolley DE. Demonstration of nuclear 3H-estradiol binding in hypothalamus and amygdala of female, androgenized-female, and male rats. *Neuroendocrinology* 1974; 16: 137—47.
110. Commins D, Yahr P. Adult testosterone levels influence the morphology of a sexually dimorphic area in the Mongolian gerbil brain. *J Comp Neurol* 1984; 224: 132—40.
111. Commins D, Yahr P. Autoradiographic localization of estrogen and androgen receptors in the sexually dimorphic area and other regions of the gerbil brain. *J Comp Neurol* 1985; 231: 473—89.
112. Handa RJ, Corbier P, Shryne JE, Schoonmaker JN, Gorski RA. Differential effects of the perinatal steroid environment on three sexually dimorphic parameters of the rat brain. *Biol Reprod* 1985; 32: 855—64.
113. Jacobson CD, Arnold AP, Gorski RA. Steroid autoradiography of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res* 1987; 414: 349—56.
114. Holbrook PG, Baum MJ. Characterization of estradiol receptors in brain cytosols from perinatal ferrets. *Brain Res* 1983; 283: 1—8.
115. Brown TJ, Naftolin F, Maclusky NJ. Sex differences in estrogen receptor binding in the rat hypothalamus: effects of subsaturating pulses of estradiol. *Brain Res* 1992; 578: 129—34.
116. Tobet SA, Baum MJ, Tang HB, Shim JH, Canick JA. Aromatase activity in the perinatal rat forebrain: effects of age, sex and intrauterine position. *Brain Res* 1985; 355: 171—8.
117. Tobet SA, Shim JH, Osiecki ST, Baum MJ, Canick JA. Androgen aromatization and 5 alpha-reduction in ferret brain during perinatal development: effects of sex and testosterone manipulation. *Endocrinology* 1985; 116: 1869—77.



118. Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res* 1978; 148: 333—46.
119. Hines M, Davis FC, Coquelin A, Goy RW, Gorski RA. Sexually dimorphic regions in the medial preoptic area and the bed nucleus of the stria terminalis of the guinea pig brain: a description and an investigation of their relationship to gonadal steroids in adulthood. *J Neurosci* 1985; 5: 40—7.
120. Tobet SA, Zahniser DJ, Baum MJ. Sexual dimorphism in the preoptic/anterior hypothalamic area of ferrets: effects of adult exposure to sex steroids. *Brain Res* 1986; 364: 249—57.
121. Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Calacagni M, Anselmetti GC, Schumacher M, et al. Sexual differentiation and hormonal control of the sexually dimorphic medial preoptic nucleus in the quail. *Brain Res* 1987; 416: 59—68.
122. Ayoub DM, Greenough WT, Juraska JM. Sex differences in dendritic structure in the preoptic area of the juvenile macaque monkey brain. *Science* 1983; 219: 197—8.
123. Swaab DF, Fliers E. A sexually dimorphic nucleus in the human brain. *Science* 1985; 228: 1112—5.
124. Allen LS, Hines M, Shryne JE, Gorski RA. Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. *J Neurosci* 1989; 9: 497—506.
125. Young JK. A comparison of hypothalami of rats and mice: lack of gross sexual dimorphism in the mouse. *Brain Res* 1982; 239: 233—9.
126. Shah NM, Pisapia DJ, Maniatis S, Mendelsohn MM, Nemes A, et al. Visualizing sexual dimorphism in the brain. *Neuron* 2004; 43: 313—9.
127. Jacobson CD, Csernus VJ, Shryne JE, Gorski RA. The influence of gonadectomy, androgen exposure, or a gonadal graft in the neonatal rat on the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *J Neurosci* 1981; 1: 1142—7.
128. Ito S, Murakami S, Yamanouchi K, Arai Y. Prenatal androgen exposure, preoptic area and reproductive functions in the female rat. *Brain Dev* 1986; 8: 463—8.

129. Dohler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, et al. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is determined by the perinatal hormone environment. *Neurosci Lett* 1982; 33: 295—8.
130. Dohler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, et al. Pre- and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain Res* 1984; 302: 291—5.
131. Dohler KD, Srivastava SS, Shryne JE, Jarzab B, Sipos A, et al. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. *Neuroendocrinology* 1984; 38: 297—301.
132. Byne W, Bleier R. Medial preoptic sexual dimorphisms in the guinea pig. I. An investigation of their hormonal dependence. *J Neurosci* 1987; 7: 2688—96.
133. Hines M, Alsum P, Roy M, Gorski RA, Goy RW. Estrogenic contributions to sexual differentiation in the female guinea pig: influences of diethylstilbestrol and tamoxifen on neural, behavioral, and ovarian development. *Horm Behav* 1987; 21: 402—17.
134. Jacobson CD, Gorski RA. Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. *J Comp Neurol* 1981; 196: 519—29.
135. Flugge G, Wuttke W, Fuchs E. Postnatal development of transmitter systems: sexual differentiation of the GABAergic system and effects of muscimol. *Int J Dev Neurosci* 1986; 4: 319—26.
136. McCarthy MM, Frank A, Beach Award. Functional significance of steroid modulation of GABAergic neurotransmission: analysis at the behavioral, cellular, and molecular levels. *Horm Behav* 1995; 29: 131—40.
137. Bach F, Flugge G, Wuttke W. GABAergic influence on the development of the sexually dimorphic nucleus of male and female rats. *Brain Res* 1992; 573: 341—4.
138. Arendash GW, Gorski RA. Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. *Brain Res Bull* 1983; 10: 147—54.

139. De Jonge FH, Louwerse AL, Ooms MP, Evers P, Endert E, et al. Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male Wistar rats.

Brain Res Bull 1989; 23: 483—92.

140. Jacobson CD, Terkel J, Gorski RA, Sawyer CH. Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: retrieving and nest building in the rat.

Brain Res 1980; 194: 471—8.

141. Kondo Y, Sachs BD, Sakuma Y. Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous females.

Behav Brain Res 1997; 88: 153—60.

142. Rajendren G, Moss RL. The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system.

Brain Res 1993; 617: 81—6.

143. Vochtelloo JD, Koolhaas JM. Medial amygdala lesions in male rats reduce aggressive behavior: interference with experience.

Physiol Behav 1987; 41: 99—102.

144. Meaney MJ, McEwen BS. Testosterone implants into the amygdala during the neonatal period masculinize the social play of juvenile female rats.

Brain Res 1986; 398: 324—8.

145. Hines M, Allen LS, Gorski RA. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat.

Brain Res 1992; 579: 321—6.

146. Cooke BM, Tabibnia G, Breedlove SM. A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 7538—40.

147. Staudt J, Dorner G. Structural changes in the medial and central amygdala of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. Endokrinologie 1976; 67: 296—300.

148. Morris JA, Jordan CL, King ZA, Northcutt KV, Breedlove SM. Sexual dimorphism and steroid responsiveness of the posterodorsal medial amygdala in adult mice. Brain Res 2008; 1190: 115—21.

149. Osterlund M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Hurd YL. Differential distribution and regulation of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA within the female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 54: 175—80.
150. DonCarlos LL, Garcia-Ovejero D, Sarkey S, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. Androgen receptor immunoreactivity in forebrain axons and dendrites in the rat. *Endocrinology* 2003; 144: 3632—8.
151. Morris JA, Jordan CL, Dugger BN, Breedlove SM. Partial demasculinization of several brain regions in adult male (XY) rats with a dysfunctional androgen receptor gene. *J Comp Neurol* 2005; 487: 217—26.
152. Nishizuka M, Arai Y. Organizational action of estrogen on synaptic pattern in the amygdala: implications for sexual differentiation of the brain. *Brain Res* 1981; 213: 422—6.
153. Nishizuka M, Arai Y. Synapse formation in response to estrogen in the medial amygdala developing in the eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7024—6.
154. Nishizuka M, Arai Y. Regional difference in sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *Exp Brain Res* 1983; 49: 462—5.
155. Gatewood JD, Wills A, Shetty S, Xu J, Arnold AP, et al. Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. *J Neurosci* 2006; 26: 2335—42.
156. Veenema AH, Neumann ID. Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours. *Prog Brain Res* 2008; 170: 261—76.
157. De Vries GJ, Panzica GC. Sexual differentiation of central vasopressin and vasotocin systems in vertebrates: different mechanisms, similar endpoints. *Neuroscience* 2006; 138: 947—55.
158. Halpern M. The organization and function of the vomeronasal system. *Annu Rev Neurosci* 1987; 10: 325—62.
159. Bleier R, Byne W, Siggelkow I. Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamic areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse. *J Comp Neurol* 1982; 212: 118—30.
160. Simerly RB, Swanson LW, Handa RJ, Gorski RA. Influence of perinatal androgen on the sexually dimorphic distribution of tyrosine hydroxylase-

immunoreactive cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 1985; 40: 501—10.

161. Simerly RB. Prodynorphin and proenkephalin gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the rat: sexual differentiation and hormonal regulation. *Mol Cell Neurosci* 1991; 2: 473—84.

162. Emery DE, Sachs BD. Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav* 1976; 17: 803—6.

163. Lopez HS, Carrer HF. Investigation of peripeduncular-hypothalamic pathways involved in the control of lordosis in the rat. *Brain Res* 1982; 253: 287—302.

164. de Olmos JS, Heimer L. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 877: 1—32.

165. Guillamon A, Segovia S, del Abril A. Early effects of gonadal steroids on the neuron number in the medial posterior region and the lateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat.

*Brain Res Dev Brain Res* 1988; 44: 281—90.

166. Allen LS, Gorski RA. Sex difference in the bed nucleus of the stria terminalis of the human brain. *J Comp Neurol* 1990; 302: 697—706.

167. McClellan KM, Parker KL, Tobet S. Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 2006; 27: 193—209.

168. Dorner G, Staudt J. Structural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinology* 1969; 4: 278—81.

169. Yokosuka M, Okamura H, Hayashi S. Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon, and the amygdala in the rat.

*J Comp Neurol* 1997; 389: 81—93.

170. Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, Hayashi S. Sexually dimorphic and estrogen-dependent expression of estrogen receptor beta in the ventromedial hypothalamus during rat postnatal development. *Endocrinology* 2003; 144: 5098—104.

171. Budefeld T, Grgurevic N, Tobet SA, Majdic G. Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads.

Dev Neurobiol 2008; 68: 981—95.

172. Micevych PE, Park SS, Akesson TR, Elde R. Distribution of cholecystokinin-immunoreactive cell bodies in the male and female rat: I. Hypothalamus. J Comp Neurol 1987; 255: 124—36.

173. Luine V, Hearn M. Relationship of gonadal hormone administration, sex, reproductive status and age to monoamine oxidase activity within the hypothalamus. J Neuroendocrinol 1990; 2: 423—8.

174. Lauber AH, Mobbs CV, Muramatsu M, Pfaff DW. Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. Endocrinology 1991; 129: 3180—6.

175. Funabashi T, Brooks PJ, Kleopoulos SP, Grandison L, Mobbs CV, et al. Changes in preproenkephalin messenger RNA level in the rat ventromedial hypothalamus during the estrous cycle. Brain Res Mol Brain Res 1995; 28: 129—34.

176. Wimer RE, Wimer C. Three sex dimorphisms in the granule cell layer of the hippocampus in house mice. Brain Res 1985; 328: 105—9.

177. de Lacoste MC, Holloway RL, Woodward DJ. Sex differences in the fetal human corpus callosum. Hum Neurobiol 1986; 5: 93—6.

178. Bishop KM, Wahlsten D. Sex differences in the human corpus callosum: myth or reality? Neurosci Biobehav Rev 1997; 21: 581—601.

179. Holloway RL, Anderson PJ, Defendini R, Harper C. Sexual dimorphism of the human corpus callosum from three independent samples: relative size of the corpus callosum. Am J Phys Anthropol 1993; 92: 481—98.

180. Ardekani BA, Figarsky K, Sidtis JJ. Sexual dimorphism in the human corpus callosum: an MRI study using the OASIS brain database. Cereb Cortex 2013; 23: 2514—20.

181. Ehrhardt AA, Meyer-Bahlburg HF. Effects of prenatal sex hormones on gender-related behavior. Science 1981; 211: 1312—8.

182. Berenbaum SA HM. Early androgens are related to childhood sex-typed toy preferences. Physiol Science 1992; 3: 203—6.

183. Money J, Schwartz M, Lewis VG. Adult erotosexual status and fetal hormonal masculinization and demasculinization: 46,XX congenital virilizing adrenal

hyperplasia and 46,XY androgen-insensitivity syndrome compared. *Psychoneuroendocrinology* 1984; 9: 405—14.

184. Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1249—58.

185. Wong M, Ramayya MS, Chrousos GP, Driggers PH, Parker KL. Cloning and sequence analysis of the human gene encoding steroidogenic factor 1. *J Mol Endocrinol* 1996; 17: 139—47.

186. Umesono K, Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989; 57: 1139—46.

187. Bakke M, Zhao L, Hanley NA, Parker KL. SF-1: a critical mediator of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171: 5—7.

188. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 1997; 18: 361—77.

189. Li Y, Choi M, Cavey G, Daugherty J, Suino K, et al. Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1. *Mol Cell* 2005; 17: 491—502.

190. Zhao L, Bakke M, Hanley NA, Majdic G, Stallings NR, et al. Tissue-specific knockouts of steroidogenic factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215: 89—94.

191. Zhao L, Bakke M, Parker KL. Pituitary-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185: 27—32.

192. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 654—62.

193. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA, et al. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids.

*Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 10939—43.

194. Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, et al. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn* 1995; 204: 22—9.

195. Luo X, Ikeda Y, Schlosser DA, Parker KL. Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse Ftz-F1 gene. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 1233—9.

196. Shima Y, Zubair M, Komatsu T, Oka S, Yokoyama C, et al. Pituitary homeobox 2 regulates adrenal4 binding protein/steroidogenic factor-1 gene transcription in the pituitary gonadotrope through interaction with the intronic enhancer. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 1633—46.

197. Majdič G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, et al. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 2002; 143: 607—14.

198. Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 478—86.

199. Barnard CJ. *Animal behavior : mechanism, development, function, and evolution*. Harlow, England: Pearson Education, 2004: 2—32.

200. Crawley JN. *What's wrong with my mouse?: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*. 2<sup>nd</sup> ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2007: 253.

201. Crawley JN. *What's wrong with my mouse?: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*. New York: Wiley-Liss, 2000: 179—209.

202. Crawley JN. *What's wrong with my mouse?: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*. 2<sup>nd</sup> ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2007: 83—131.

203. Barnard CJ. *Animal behavior: mechanism, development, function, and evolution*. Harlow, England: Pearson Education, 2004: 167—219.

204. Crawley JN. *What's wrong with my mouse?: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*. 2<sup>nd</sup> ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2007: 209—27.

205. Barnard CJ. *Animal behavior : mechanism, development, function, and evolution*. Harlow, England: Pearson Education, 2004: 94—166.



206. Barnard CJ. *Animal behavior : mechanism, development, function, and evolution*. Harlow, England: Pearson Education, 2004: 220—54.
207. Jonasson Z. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 28: 811—25.
208. Cahill L. Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 477—84.
209. Crews D. Evolution of neuroendocrine mechanisms that regulate sexual behavior. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 354—61.
210. Carter CS, DeVries AC, Getz LL. Physiological substrates of mammalian monogamy: the prairie vole model. *Neurosci Biobehav Rev* 1995; 19: 303—14.
211. Young LJ, Murphy Young AZ, Hammock EA. Anatomy and neurochemistry of the pair bond. *J Comp Neurol* 2005; 493: 51—7.
212. Nair HP, Young LJ. Vasopressin and pair-bond formation: genes to brain to behavior. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 146—52.
213. Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM. Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat Neurosci* 2004; 7: 1034—9.
214. Baum MJ. Activational and organizational effects of estradiol on male behavioral neuroendocrine function. *Scand J Psychol* 2003; 44: 213—20.
215. Gagnidze K, Pfaff DW, Mong JA. Gene expression in neuroendocrine cells during the critical period for sexual differentiation of the brain. *Prog Brain Res* 2010; 186: 97—111.
216. Wu MV, Manoli DS, Fraser EJ, Coats JK, Tollkuhn J, et al. Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. *Cell* 2009; 139: 61—72.
217. Beach FA, Noble RG, Orndoff RK. Effects of perinatal androgen treatment on responses of male rats to gonadal hormones in adulthood. *J Comp Physiol Psychol* 1969; 68: 490—7.
218. Baum MJ. A comparison of the effects of methyltrienolone (R 1881) and 5 alpha-dihydrotestosterone on sexual behavior of castrated male rats. *Horm Behav* 1979; 13: 165—74.

219. Simon NG, Whalen RE. Sexual differentiation of androgen-sensitive and estrogen-sensitive regulatory systems for aggressive behavior. *Horm Behav* 1987; 21: 493—500.
220. Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. Sexual partner preference requires a functional aromatase (cyp19) gene in male mice. *Horm Behav* 2002; 42: 158—71.
221. Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci* 2002; 22: 9104—12.
222. McCarthy MM, Wright CL, Schwarz JM. New tricks by an old dogma: mechanisms of the Organizational/Activational Hypothesis of steroid-mediated sexual differentiation of brain and behavior. *Horm Behav* 2009; 55: 655—65.
223. Ogawa S, Taylor JA, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Reversal of sex roles in genetic female mice by disruption of estrogen receptor gene. *Neuroendocrinology* 1996; 64: 467—70.
224. Ogawa S, Chan J, Chester AE, Gustafsson JA, Korach KS, et al. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12887—92.
225. Ogawa S, Washburn TF, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, et al. Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor-alpha gene disruption in male mice. *Endocrinology* 1998; 139: 5058—69.
226. Kudwa AE, Bodo C, Gustafsson JA, Rissman EF. A previously uncharacterized role for estrogen receptor beta: defeminization of male brain and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4608—12.
227. Kudwa AE, Michopoulos V, Gatewood JD, Rissman EF. Roles of estrogen receptors alpha and beta in differentiation of mouse sexual behavior. *Neuroscience* 2006; 138: 921—8.
228. Scordalakes EM, Rissman EF. Aggression in male mice lacking functional estrogen receptor alpha. *Behav Neurosci* 2003; 117: 38—45.

229. Raskin K, de Gendt K, Duittoz A, Liere P, Verhoeven G, et al. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J Neurosci* 2009; 29: 4461—70.
230. Kudwa AE, Rissman EF. Double oestrogen receptor alpha and beta knockout mice reveal differences in neural oestrogen-mediated progesterin receptor induction and female sexual behaviour. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 978—83.
231. Wersinger SR, Sannen K, Villalba C, Lubahn DB, Rissman EF, et al. Masculine sexual behavior is disrupted in male and female mice lacking a functional estrogen receptor alpha gene. *Horm Behav* 1997; 32: 176—83.
232. Juntti SA, Tollkuhn J, Wu MV, Fraser EJ, Soderborg T, et al. The androgen receptor governs the execution, but not programming, of male sexual and territorial behaviors. *Neuron* 2010; 66: 260—72.
233. Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, Walker VR, Gustafsson JA, et al. Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 14737—41.
234. Nelson R. *An introduction to behavioral endocrinology*. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005: 319—85.
235. Erskine MS. Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. *Horm Behav* 1989; 23: 473—502.
236. Garey J, Kow LM, Huynh W, Ogawa S, Pfaff DW. Temporal and spatial quantitation of nesting and mating behaviors among mice housed in a semi-natural environment. *Horm Behav* 2002; 42: 294—306.
237. Yamanouchi K. Inhibitory and facilitatory neural mechanisms involved in the regulation of lordosis behavior in female rats: effects of dual cuts in the preoptic area and hypothalamus. *Physiol Behav* 1980; 25: 721—5.
238. Clark AS, Pfeifle JK, Edwards DA. Ventromedial hypothalamic damage and sexual proceptivity in female rats. *Physiol Behav* 1981; 27: 597—602.
239. Rubin BS, Barfield RJ. Induction of estrous behavior in ovariectomized rats by sequential replacement of estrogen and progesterone to the ventromedial hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1983; 37: 218—24.

240. Hoshina Y, Takeo T, Nakano K, Sato T, Sakuma Y. Axon-sparing lesion of the preoptic area enhances receptivity and diminishes proceptivity among components of female rat sexual behavior. *Behav Brain Res* 1994; 61: 197—204.
241. Knobil E, Neill JD, eds. In: *Encyclopedia of reproduction*. San Diego: Academic Press, 1998:123—57.
242. Pak TR, Honda RJ. Steroid hormone receptors and sex differences in behavior. In: Becker JB, ed. *Sex differences in the brain: from genes to behavior*; New York: Oxford University Press, 2008: 109—39.
243. Mani SK, Blaustein JD, O'Malley BW. Progesterone receptor function from a behavioral perspective. *Horm Behav* 1997; 31: 244—55.
244. Ogawa S, Olazabal UE, Parhar IS, Pfaff DW. Effects of intrahypothalamic administration of antisense DNA for progesterone receptor mRNA on reproductive behavior and progesterone receptor immunoreactivity in female rat. *J Neurosci* 1994; 14: 1766—74.
245. Hamburger-Bar R, Rigter H. Apomorphine: facilitation of sexual behaviour in female rats. *Eur J Pharmacol* 1975; 32: 357—60.
246. Meisel R. Copulation, mammals. In: Knobil E, Neill JD, eds. *Encyclopedia of reproduction*. San Diego: Academic Press, 1998: 675—80.
247. Volavka J, Czobor P, Citrome L, McQuade RD, Carson WH, et al. Efficacy of aripiprazole against hostility in schizophrenia and schizoaffective disorder: data from 5 double-blind studies. *J Clin Psychiatry* 2005; 66: 1362—6.
248. Miczek KA, Fish EW, De Bold JF, De Almeida RM. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology (Berl)* 2002; 163: 434—58.
249. Miczek KA, de Almeida RM. Oral drug self-administration in the home cage of mice: alcohol-heightened aggression and inhibition by the 5-HT1B agonist anpirtoline. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 157: 421—9.
250. Miczek KA, O'Donnell JM. Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. *Psychopharmacology (Berl)* 1978; 57: 47—55.

251. Simon NG, Cologer-Clifford A, Lu SF, McKenna SE, Hu S. Testosterone and its metabolites modulate 5HT1A and 5HT1B agonist effects on intermale aggression. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 23: 325—36.
252. Brain P, Benton D. The interpretation of physiological correlates of differential housing in laboratory rats. *Life Sci* 1979; 24: 99—115.
253. Takahashi A, Quadros IM, de Almeida RM, Miczek KA. Behavioral and pharmacogenetics of aggressive behavior. *Curr Top Behav Neurosci* 2012;12:73—138.
254. Blanchard RJ, Wall PM, Blanchard DC. Problems in the study of rodent aggression. *Horm Behav* 2003; 44: 161—70.
255. Pellis SM, Pellis VC. Play-fighting in the Syrian golden hamster *Mesocricetus auratus* Waterhouse, and its relationship to serious fighting during postweaning development. *Dev Psychobiol* 1988; 21: 323—37.
256. Rasia-Filho AA, Giovenardi M, de Almeida RM. Drugs and aggression. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2008; 3: 40—9.
257. Parmigiani S, Ferrari PF, Palanza P. An evolutionary approach to behavioral pharmacology: using drugs to understand proximate and ultimate mechanisms of different forms of aggression in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 23: 143—53.
258. Miczek KA, Fish EW, De Bold JF. Neurosteroids, GABAA receptors, and escalated aggressive behavior. *Horm Behav* 2003; 44: 242—57.
259. Haller J, Mikics E, Halasz J, Toth M. Mechanisms differentiating normal from abnormal aggression: glucocorticoids and serotonin. *Eur J Pharmacol* 2005; 526: 89—100.
260. Ferris CF, Stolberg T, Kulkarni P, Murugavel M, Blanchard R, et al. Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. *BMC Neurosci* 2008; 9: e111(35 str).  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2202/9/111/> (06.05.2015)
261. Nelson RJ. An introduction to behavioral endocrinology. 4<sup>th</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2011: 455—520.
262. Edwards D. Early androgen stimulation and aggressive behavior in male and female mice. *Physiol Behav* 1969; 4: 333—8.

263. Demas GE, Moffatt CA, Drazen DL, Nelson RJ. Castration does not inhibit aggressive behavior in adult male prairie voles (*Microtus ochrogaster*).

Physiol Behav 1999; 66: 59—62.

264. Trainor BC, Marler CA. Testosterone, paternal behavior, and aggression in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*).

Horm Behav 2001; 40: 32—42.

265. Trainor BC, Greiwe KM, Nelson RJ. Individual differences in estrogen receptor alpha in select brain nuclei are associated with individual differences in aggression. Horm Behav 2006; 50: 338—45.

266. Johnson F, Whalen RE. Testicular hormones reduce individual differences in the aggressive behavior of male mice: a theory of hormone action.

Neurosci Biobehav Rev 1988; 12: 93—9.

267. Albert DJ, Jonik RH, Watson NV, Gorzalka BB, Walsh ML. Hormone-dependent aggression in male rats is proportional to serum testosterone concentration but sexual behavior is not. Physiol Behav 1990; 48: 409—16.

268. Ogawa S, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 1476—81.

269. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta.

Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 15677—82.

270. Nelson RJ, Trainor BC. Neural mechanisms of aggression.

Nat Rev Neurosci 2007; 8: 536—46.

271. Kruk MR. Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. Neurosci Biobehav Rev 1991; 15: 527—38.

272. de Bruin JP, van Oyen HG, Van de Poll N. Behavioural changes following lesions of the orbital prefrontal cortex in male rats.

Behav Brain Res 1983; 10: 209—32.

273. Swanson LW. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior.

Brain Res 2000; 886: 113—64.

274. Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, et al. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1277—81.
275. Miczek KA, Maxson SC, Fish EW, Faccidomo S. Aggressive behavioral phenotypes in mice. *Behav Brain Res* 2001; 125: 167—81.
276. Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC, et al. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21: 52S—60S.
277. Soriano MF, Jimenez JF, Roman P, Bajo MT. Inhibitory processes in memory are impaired in schizophrenia: evidence from retrieval induced forgetting. *Br J Psychol* 2009; 100: 661—73.
278. Jimenez JA, Mancini-Marie A, Lakis N, Rinaldi M, Mendrek A. Disturbed sexual dimorphism of brain activation during mental rotation in schizophrenia. *Schizophr Res* 2010; 122: 53—62.
279. Bosco A, Longoni AM, Vecchi T. Gender effects in spatial orientation: cognitive profiles and mental strategies. *Appl Cogn Psychol* 2004; 18: 519—32.
280. Clayton JA, Collins FS. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature* 2014; 509: 282—3.
281. McCullough LD, McCarthy MM, de Vries GJ. NIH policy: status quo is also costly. *Nature* 2014; 510: 340.
282. Dominguez-Salazar E, Bateman HL, Rissman EF. Background matters: the effects of estrogen receptor alpha gene disruption on male sexual behavior are modified by background strain. *Horm Behav* 2004; 46: 482—90.
283. National Center for Biotechnology Information. Uty, ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM\\_009484](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_009484) (11.11.2014)
284. National Center for Biotechnology Information. Eif2s3y, eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26908> (11.11.2014)
285. National Center for Biotechnology Information. Ddx3y, DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26900> (11.11.2014)

286. National Center for Biotechnology Information. Kdm5d; lysine (K)-specific demethylase 5D.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20592> (11.11.2014)

287. National Center for Biotechnology Information. Xist; inactive X specific transcripts.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/213742> (11.11.2014)

288. National Center for Biotechnology Information. Actb; actin, beta.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11461> (11.11.2014)

289. National Center for Biotechnology Information. Utx, lysine (K)-specific demethylase 6.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22289> (11.11.2014)

290. Edelmann M, Wolfe C, Scordalakes EM, Rissman EF, Tobet S. Neuronal nitric oxide synthase and calbindin delineate sex differences in the developing hypothalamus and preoptic area. *Dev Neurobiol* 2007; 67: 1371—81.

291. Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Compact 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2004:5—45.

292. Paxinos G, Franklin KBJ, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2001: 16.

293. Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice.

*Curr Protoc Neurosci* 2009; Appendix 4: (11 str.).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2755182/> (06.05.2015)

294. Sinchak K, Micevych PE. Progesterone blockade of estrogen activation of mu-opioid receptors regulates reproductive behavior. *J Neurosci* 2001; 21: 5723—9.

295. Grgurevič N. Genetsko pogojene razlike med obnašanjem samcev in samic pri miših brez gena za steroidogeni faktor 1. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2011. Doktorska disertacija.

296. Crawley JN. Reproductive behavior. In: Crawley JN, ed. What's wrong with my mouse?: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: 2<sup>nd</sup> ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2007: 190—2.

297. Crawley JN. What's wrong with my mouse?: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York: Wiley-Liss, 2000: 167—79.



298. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45 (6 str).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55695/> (06.05.2015)

299. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: (7 str).

<http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034> (06.05.2015)

300. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611—22.

301. Xu J, Deng X, Watkins R, Disteché CM. Sex-specific differences in expression of histone demethylases Utx and Uty in mouse brain and neurons.

*J Neurosci* 2008; 28: 4521—7.

302. "Razlika". Slovar slovenskega knjižnega jezika.

[http://bos.zrc-sazu.si/cgi/a03.exe?name=sskj\\_testa&expression=razlika&hs=1](http://bos.zrc-sazu.si/cgi/a03.exe?name=sskj_testa&expression=razlika&hs=1)

(15.1.2015)

303. Arnold AP, Lusk AJ. Understanding the sexome: measuring and reporting sex differences in gene systems. *Endocrinology* 2012; 153: 2551—5.

304. Arnold AP. The end of gonad-centric sex determination in mammals.

*Trends Genet* 2012; 28: 55—61.

305. Arnold AP. The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues.

*Horm Behav* 2009; 55: 570—8.

306. Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjoval J, Baulieu EE. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain.

*Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 4704—7.

307. Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjoval J, et al. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res* 1983; 270: 119—25.

308. Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids Biosynthesis and function.

*Trends Endocrinol Metab* 1994; 5: 1—8.

309. Spanic T, Fabjan T, Majdic G. Expression levels of mRNA for neurosteroidogenic enzymes 17beta-HSD, 5alpha-reductase, 3alpha-HSD and cytochrome P450 aromatase in the fetal wild type and SF-1 knockout mouse brain. *Endocr Res* 2015; 40: 44—8.
310. Baulieu EE. Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell* 1991; 71: 3—10.
311. Plassart-Schiess E, Baulieu EE. Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 37: 133—40.
312. Soma KK, Alday NA, Hau M, Schlinger BA. Dehydroepiandrosterone metabolism by 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase in adult zebra finch brain: sex difference and rapid effect of stress. *Endocrinology* 2004; 145: 1668—77.
313. Eicher EM, Lee BK, Washburn LL, Hale DW, King TR. Telomere-related markers for the pseudoautosomal region of the mouse genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 2160—4.
314. Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Perry J, Palmer SJ, Ashworth A. The Y\* rearrangement in mice: new insights into a perplexing PAR. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 80: 37—40.
315. Reinius B, Shi C, Hengshuo L, Sandhu KS, Radomska KJ, et al. Female-biased expression of long non-coding RNAs in domains that escape X-inactivation in mouse. *BMC Genomics* 2010; 11: e614 (16 str).  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/614/> (06.05.2015)
316. Ehrmann IE, Ellis PS, Mazeyrat S, Duthie S, Brockdorff N, et al. Characterization of genes encoding translation initiation factor eIF-2gamma in mouse and human: sex chromosome localization, escape from X-inactivation and evolution. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1725—37.
317. Agulnik AI, Mitchell MJ, Mattei MG, Borsani G, Avner PA, et al. A novel X gene with a widely transcribed Y-linked homologue escapes X-inactivation in mouse and human. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 879—84.

318. Armoskus C, Mota T, Moreira D, Tsai HW. Effects of prenatal testosterone exposure on sexually dimorphic gene expression in the neonatal mouse cortex and hippocampus. *J Steroids Horm Sci* 2014; 5:e139 (22 str).  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25411648> (06.05.2015)
319. Disteche CM, Filippova GN, Tsuchiya KD. Escape from X inactivation. *Cytogenet Genome Res* 2002; 99: 36—43.
320. Brown CJ, Grealley JM. A stain upon the silence: genes escaping X inactivation. *Trends Genet* 2003; 19: 432—8.
321. Dohanich GP, Clemens LG. Inhibition of estrogen-activated sexual behavior by androgens. *Horm Behav* 1983; 17: 366—73.
322. Blasberg ME, Clark AS. Anabolic-androgenic steroid effects on sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav* 1997; 32: 201—8.
323. Tsukahara S, Yamanouchi K. Distribution of glutamic acid decarboxylase, neurotensin, enkephalin, neuropeptide Y, and cholecystokinin neurons in the septo-preoptic region of male rats. *J Reprod Dev* 2003; 49: 67—77.
324. Rissman EF, Early AH, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. Estrogen receptors are essential for female sexual receptivity. *Endocrinology* 1997; 138: 507—10.
325. Grgurevic N, Budefeld T, Spanic T, Tobet SA, Majdic G. Evidence that sex chromosome genes affect sexual differentiation of female sexual behavior. *Horm Behav* 2012; 61: 719—24.
326. Mannan MA, O'Shaughnessy PJ. Steroidogenesis during postnatal development in the mouse ovary. *J Endocrinol* 1991; 130: 101—6.
327. Tsukahara S, Kanaya M, Yamanouchi K. Neuroanatomy and sex differences of the lordosis-inhibiting system in the lateral septum. *Front Neurosci* 2014; 8: e299 (24 str).  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166118/> (06.05.2015)
328. Brock O, Baum MJ, Bakker J. The development of female sexual behavior requires prepubertal estradiol. *J Neurosci* 2011; 31: 5574—8.
329. Albert DJ, Wong RC. Hyperreactivity, muricide, and intraspecific aggression in the rat produced by infusion of local anesthetic into the lateral septum or surrounding areas. *J Comp Physiol Psychol* 1978; 92: 1062—73.

330. Albert DJ. Hyperreactivity following temporary chemical lesions in the region ventral to the anterior septum but not in the anterior olfactory nucleus, the lateral olfactory tract, or the olfactory bulb. *Physiol Behav* 1980; 25: 481—3.
331. Van De Poll NE, Van Dis H. The effect of medial preoptic--anterior hypothalamic lesions on bisexual behavior of the male rat. *Brain Res Bull* 1979; 4: 505—11.
332. Hennessey AC, Wallen K, Edwards DA. Preoptic lesions increase the display of lordosis by male rats. *Brain Res* 1986; 370: 21—8.
333. Kakeyama M, Yamanouchi K. Lordosis in male rats: the facilitatory effect of mesencephalic dorsal raphe nucleus lesion. *Physiol Behav* 1992; 51: 181—4.
334. McCarthy MM, Arnold AP. Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat Neurosci* 2011; 14: 677—83.
335. Arnold AP. Conceptual frameworks and mouse models for studying sex differences in physiology and disease: why compensation changes the game. *Exp Neurol* 2014; 259: 2—9.
336. Cox KH, Bonthuis PJ, Rissman EF. Mouse model systems to study sex chromosome genes and behavior: relevance to humans. *Front Neuroendocrinol* 2014; 35: 405—19.
337. Budefeld T, Grgurevič N, Tobet SA, Majdič G. Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. *Dev Neurobiol* 2008; 68: 981—95.
338. Budefeld T, Tobet SA, Majdic G. Altered position of cell bodies and fibers in the ventromedial region in SF-1 knockout mice. *Exp Neurol* 2011; 232: 176—84.
339. Dellovade TL, Young M, Ross EP, Henderson R, Caron K, et al. Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. *J Comp Neurol* 2000; 423: 579—89.
340. Majdic G, Tobet S. Cooperation of sex chromosomal genes and endocrine influences for hypothalamic sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 2011; 32: 137—45.

341. vom Saal FS. Prenatal exposure to androgen influences morphology and aggressive behavior of male and female mice. *Horm Behav* 1979; 12: 1—11.
342. Whitsett JM, Bronson FH, Peters PJ, Hamilton TH. Neonatal organization of aggression in mice: correlation of critical period with uptake of hormone. *Horm Behav* 1972; 3: 11—21.
343. Toda K, Saibara T, Okada T, Onishi S, Shizuta Y. A loss of aggressive behaviour and its reinstatement by oestrogen in mice lacking the aromatase gene (Cyp19). *J Endocrinol* 2001; 168: 217—20.
344. Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1990; 294: 76—95.
345. Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 2003; 144: 2055—67.
346. Sato S, Braham CS, Putnam SK, Hull EM. Neuronal nitric oxide synthase and gonadal steroid interaction in the MPOA of male rats: co-localization and testosterone-induced restoration of copulation and nNOS-immunoreactivity. *Brain Res* 2005; 1043: 205—13.
347. Stuart E, Lephart ED. Dimorphic expression of medial basal hypothalamic-preoptic area calbindin-D(28K) mRNA during perinatal development and adult distribution of calbindin-D(28K) mRNA in Sprague-Dawley rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 73: 60—7.
348. Lephart ED. Dimorphic expression of calbindin-D28K in the medial basal hypothalamus from perinatal male and female rats. *Brain Res Dev Brain Res* 1996; 96: 281—4.
349. Brager DH, Sickel MJ, McCarthy MM. Developmental sex differences in calbindin-D(28K) and calretinin immunoreactivity in the neonatal rat hypothalamus. *J Neurobiol* 2000; 42: 315—22.

350. Sickel MJ, McCarthy MM. Calbindin-D28k immunoreactivity is a marker for a subdivision of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the rat: developmental profile and gonadal steroid modulation.

*J Neuroendocrinol* 2000; 12: 397—402.

351. Orikasa C, Kondo Y, Sakuma Y. Transient transcription of the somatostatin gene at the time of estrogen-dependent organization of the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area. *Endocrinology* 2007; 148: 1144—9.

352. Bodo C, Rissman EF. The androgen receptor is selectively involved in organization of sexually dimorphic social behaviors in mice.

*Endocrinology* 2008; 149: 4142—50.

353. Orikasa C, Sakuma Y. Estrogen configures sexual dimorphism in the preoptic area of C57BL/6J and ddN strains of mice. *J Comp Neurol* 2010; 518: 3618—29.

354. Arendash GW, Gorski RA. Suppression of lordotic responsiveness in the female rat during mesencephalic electrical stimulation.

*Pharmacol Biochem Behav* 1983; 19: 351—7.

355. Houtsmuller EJ, Brand T, de Jonge FH, Joosten RN, van de Poll NE, et al. SDN-POA volume, sexual behavior, and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. *Physiol Behav* 1994; 56: 535—41.

356. Wang Z, Bullock NA, De Vries GJ. Sexual differentiation of vasopressin projections of the bed nucleus of the stria terminals and medial amygdaloid nucleus in rats. *Endocrinology* 1993; 132: 2299—306.

357. Budefeld T. Gensko pogojene razlike med spoloma pri urejanju telesne teže in izraženosti genov v vmesnih možganih pri miših brez gena za SF-1. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2009. Doktorska disertacija.

