UNIVERZA V LJUBLJANI VETERINARSKA FAKULTETA

Tomaž Büdefeld

GENSKO POGOJENE RAZLIKE MED SPOLOMA PRI UREJANJU TELESNE TEŽE IN IZRAŽENOSTI GENOV V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ GENA *SF-1*

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.09:57.08:577.25:612.6.05:611.815:636.082:599.323.4(043.3)

Tomaž Büdefeld, univ. dipl. mikrobiol.

GENSKO POGOJENE RAZLIKE MED SPOLOMA PRI UREJANJU TELESNE TEŽE IN IZRAŽENOSTI GENOV V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ GENA *SF-1*

Doktorska disertacija

GENE DEPENDENT SEX DIFFERENCES IN BODY WEIGHT REGULATION AND GENE EXPRESSION IN DIENCEPHALON IN SF-1 KO MICE

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2009

Avtor: Tomaž Büdefeld

Naslov doktorske disertacije: GENSKO POGOJENE RAZLIKE MED SPOLOMA PRI UREJANJU TELESNE TEŽE IN IZRAŽENOSTI GENOV V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ GENA *SF-1*

Delo je bilo opravljeno v Centru za genomiko živali Veterinarske fakultete, v Ljubljani, katerega predstojnik je prof. dr. Gregor Majdič.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: prof. dr. Gregor Majdič

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Prof. dr. Jelka Zabavnik Piano – predsednica

Prof. dr. Simon Horvat – član

Prof. dr. Gregor Majdič – član

Prof. dr. Janez Sketelj – član

We should consider every day lost which we have not devoted to science

KAZALO

IZVLEČEK	8
ABSTRACT	9
OKRAJŠAVE	10
1 UVOD	18
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	20
2 PREGLED LITERATURE	21
2.1 SPOLNA DIFERENCIACIJA ŽIVČNEGA SISTEMA	
2 1 1 SPOLNA DIFERENCIACLIA MOŽGANOV PRI SESALCIH	22
2.1.1.1 Predoptično področie in področie sprednjega hipotalamusa (POA/AH)	
2.1.1.2 Spodnje jedro končne strije (BNST)	
2.1.1.3 Anteroventralni del periventrikularnega jedra (AVPV)	
2.1.1.4 Mandelj – amigdala (corpus amigdaloideum)	
2.1.1.5 Ventromedialno jedro hipotalamusa (VMH)	
2.1.1.6 Področje stranskega pretina (LS)	
2.1.1.7 Vomeronazalni sistem	
2.1.1.8 Hipokampus	
2.1.1.9 Motorni nevroni hrbitenjače pri podganah	
2.1.1.10 Sistem podpornih celic – nevroglia	
2.1.1.11 Spoine razinke v mozganin pri ijuden	
2.2 KAZVOJ SPOLNIH ZLEZ IN DIFEKENCIACIJA SPOLNIH OKGANOV	
2.2.1 KAZVOJ SPOLNIH ZLEZ	
2.2.2 LEYDIGOVE CELICE	
2.2.3 IZVOR SPOLNIH CELIC PRI SESALCIH	
2.2.4 SRY: OSREDNJI GEN ZA DOLOCITEV SPOLA	41
2.2.5 DRUGI GENI, KI SODELUJEJO PRI RAZVOJU SPOLNIH ZLEZ IN ORGANOV	
2.2.6 HORMONALNA URAVNAVA RAZVOJA SPOLNIH ŽLEZ	
2.3 URAVNAVANJE ENERGETSKE HOMEOSTAZE V CENTRALNEM ŽIVČNEM SISTEMU	46
2.3.1 INFORMACIJE O ZALOGAH ENERGIJE V TELESU	47
2.3.2 CENTRI ZA OHRANJANJE ENERGETSKE HOMEOSTAZE	47
2.3.2.1 Arkvatno jedro	
2.3.2.2 Paraventrikularno jedro	
2.3.2.3 VMH – center za sitost	50
2.3.2.4 Področje stranskega hipotalamusa	
2.3.2.5 Druga področja hipotalamusa	
2.3.2.6 Dopaminski sistem srednjih možganov	
2.5.2. / Kavdaini dei mozgańskega debia in avtonomno zivcevje	
2.4 WISI DREZ UENA S Γ -1	
2.4.1 SF-1, PREPISOVALNI DEJAVNIK SIEROIDOGENI DEJAVNIK – 1	
2.4.1.1 Struktura prepisovalnega dejavnika SF-1	
2.4.1.2 OCHSKI ZAPIS ZA SF-1	
2.7.2 NILOTA ILIVALANJA OF-1	/ J
2.7.2.1 Steroidogena tkiva v embrionalnem obdobiu	
2.4.2.2 otorodogena terva v emorionament obdobju	
2 4 3 GENI, KATERIH PREPISOVANIE URAVNAVA SF-1	
2 4 4 VLOGA SF-1 IN VIVO	
2.4.4.1 Prinrava transgenih miši SF-1/eGFP s transgenezo z hakteriiskimi umetnimi kromosomi	
2.4.5 LASTNOSTI MIŠI BREZ GENA SF-1	

2.4.5.1 Primarna steroidogena tkiva	61
2.4.5.2 Hipofiza in hipotalamus	62
2.4.5.3 Miši brez gena SF-1; model za študij debelosti	63
3 MATERIALI IN METODE	65
3.1 SESTAVINE ZA ANASTEZIJO IN ANALGEZIJO	66
3.2 STEROIDNI HORMONI	66
3.3 ŽIVALI	67
3.3.1 TEHTANJE MIŠI, SPREMLJANJE HRANJENJA IN AKTIVNOSTI	69
3.3.2 STRADANJE	
3.4 JEMANJE BIOLOŠKEGA MATERIALA	70
3.4.1 KRI/PLAZMA	
3.4.2 MOŽGANI	
3.5 RAZGRADNJA TKIVA IN DOLOČANJE GENOTIPA Z METODO PCR	70
3.6 DOLOČANJE KORTIKOSTERONA IN TESTOSTERONA V SERUMU Z OBRNJENIM	
KOMPETETIVNIM ENCIMSKIM TESTOM	71
3.7 ANALIZA MOŽGANOV	72
3.7.1 BARVANJE SVEŽIH REZIN MOŽGANOV Z BARVILOM CRESYL VIOLET	72
3.7.2 OZNAČEVANJE MOŽGANOV Z LIPOFILNIM FLUORESCENČNIM BARVILOM	72
3.7.3 PROUČEVANJE IZRAŽANJA GENOV – IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE SVEŽIH.	
PLAVAJOČIH REZIN MOŽGANOV	73
3.7.3.1 Imunohistokemično označevanje s fluorofori cianina (Cy)	
3.7.4 ANALIZA PODROČIJ V MOŽGANIH	75
3.7.4.1 Anteroventralni del periventrikularnega jedra (AVPV)	
3.7.4.2 Stranski pretin (LS)	
3.7.4.3 Medialni del predoptičnega področja (mPOA)	76
3.7.4.4 Kavdalni del predoptičnega področja in področje sprednjega hipotalamusa (POA/AH)	
3.7.4.5 Spodnje jedro končne strije (BNST)	
3.7.4.0 Paraventrikularno jedro (Pa)	/ /
3.7.4.8 Mandeli	····· / / 77
3.7.4.9 Stranski hipotalamus (LH) in področje sive grbe (TC)	
3.7.5 PRIPRAVA DIGITALNIH SLIK IN ANALIZA	78
3.8 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	78
A DE7111 TATI	90
4.1 TELESNA TEZA PRI MISIH WT IN MISIH BREZ GENA <i>SF-1</i>	80
4.2 PORABA HRANE PRI MISIH WT IN MISIH BREZ GENA SF-1 V KLETKAH S KOLESI ZA TE	K82
4.3 AKTIVNOST PRI MISIH WT IN MISIH BREZ GENA <i>SF-1</i>	83
4.3.1 FIZIČNA AKTIVNOST PRI MIŠIH V KLETKAH S KOLESI ZA TEK	83
4.3.2 MERJENJE SPONTANE CELOTNE AKTIVNOSTI MIŜI S SISTEMOM ZA MERJENJE	
AKTIVNOSTI MOTOR MONITOR	86
4.4 PROUČEVANJE NEVRONSKIH POVEZAV Z LIPOFILNIM BARVILOM NEUROVUE	88
4.5 IZRAŽENOST BELJAKOVIN V MOŽGANIH PRI MIŠIH GDX/WT IN MIŠIH BREZ GENA SF	-190
4.5.1 IZRAZENOST NEVRALNE SINTAZE DUSIKOVIH OKSIDOV (nNOS) V VMESNIH MOZGA	NIH90
4.5.1.1 Anteroventralni del periventrikularnega jedra (AVPV)	
4.5.1.2 Kavdalni del predoptičnega področja (POA/AH)	
4.5.1.5 spoulje jeulo kolicile sulje (DNS1)	94
4.5.1.5 Mandeli	
4.5.2 IZRAŽENOST BELJAKOVINE KALBINDIN D-28k (KALBINDIN) V VMESNIH MOŽGANIH	
4.5.2.1 Kavdalni del predoptičnega področja (POA/AH)	
4.5.2.2 Spodnje jedro končne strije (BNST)	

4.5.2.3 Ventromedialno jedro hipotalamusa (VMH)	101
4.5.2.4 Mandelj	105
4.5.3 IZRAŽENOST PEPTIDA ARGININ VAZOPRESINA (AVP) V VMESNIH MOŽGANIH	
4.5.3.1 Področje stranskega pretina (LS)	107
4.5.3.2 Struktura ventromedialnega hipotalamusa in njegove neposredne okolice	108
4.6 IZRAŽENOST PEPTIDOV, KI SODELUJEJO PRI UREJANJU ENERGETSKE HOMEOSTAZE	112
4.6.1 IZRAŽENOST NPY IN AgRP V PARAVENTRIKULARNEM JEDRU	
4.6.2 IZRAŽENOST AgRP, CART IN NPY V SREDNJEM IN STRANSKEM HIPOTALAMUSU	.115
4.6.3 IZRAŽENOST NPY V PODROČJU MANDLJA	.128
4.6.4 PODROČJE STRANSKEGA PRETINA – NPY	. 129
4.6.5 IZRAŽENOST PREDHODNIKA OREKSINOV V STRANSKEM HIPOTALAMUSU	.131
4.7 IZRAŽENOST PRESNOVNIH PEPTIDOV V HIPOTALAMUSU PO ŠTIRIINDVAJSETURNEM	
STRADANJU	135
4.7.1 PARAVENTRIKULARNO JEDRO – AgRP, NPY	.136
4.7.2 SREDNJE IN STRANSKO PODROČJE HIPOTALAMUSA – AgRP, NPY, CART	.137
4.7.3 PODROČJE STRANSKEGA HIPOTALAMUSA – PPOX	.140
4.8 MIŠI BREZ GENA SF-1 Z VSTAVLJENIM SPOROČILNIM GENOM ZA EGFP (SF-1 KO/EGFP)	140
4.8.1 IZRAŽENOST BELJAKOVINE eGFP V NEVRONIIH JEDRA VMH	.141
5 RAZPRAVA	144
5 1 MIŠI BREZ GENA <i>SF-1</i> : MODEL ZA ŠTUDU RAZVOJA CENTRALNEGA ŽIVČNEGA SISTEM	A
IN DEBELOSTI V ODRASLEM OBDOBIU	145
5 2 AKTIVNOST HRANJENJE IN TELESNA TEŽA PRI MIŠIH BREZ GENA <i>SF-1</i>	146
5 3 STRUKTURA IN IZRAŽENOST BELJAKOVIN V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ GE	NA
SF-1	.150
5.4 IZRAŽENOST PRESNOVNIH PEPTIDOV V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ GENA SI	F-1
V OBDOBJU DEBELOSTI IN PRI AKUTNEM ODZIVU NA POMANJKANJE KRME	156
5.5 TRANSGENE MIŠI Z VSTAVLJENIM ZAPISOM ZA POROČEVALSKO ZELENO	
FLUORESCENČNO BELJAKOVINO (EGFP)	161
5.6 ZAKLJUČEK	162
6 POVZETEK	163
7 SUMMARY	166
8 ZAHVALA	169
9 LITERATURA	170
10 PRILOGA	206

GENSKO POGOJENE RAZLIKE MED SPOLOMA PRI UREJANJU TELESNE TEŽE IN IZRAŽENOSTI GENOV V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ GENA *SF-1*

IZVLEČEK

Značilnosti spola – genetika; miši z odstranjenim genom – genetika; možgani – anatomija in histologija – rast in razvoj; telesna teža – fiziologija; gensko izražanje, regulacija – genetika; ventromedialno jedro hipotalamusa – metabolizem; protein – biosinteza; dušikov-oksid, sintaza tip I

Prepisovalni dejavnik – steroidogeni dejavnik 1 (*angl.* steroidogenic factor 1, SF-1) – je ključen dejavnik pri uravnavanju izražanja beljakovin, ki sodelujejo pri biosintezi steroidnih hormonov in drugih genov, pomembnih za razvoj in delovanje endokrinega sistema. Pri miših brez gena *SF-1* (SF-1 knockout, SF-1 KO) spolne in nadledvične žleze propadejo v zgodnjem fetalnem obdobju pred začetkom biosinteze steroidnih hormonov, zato predstavljajo poseben model za proučevanje genskih vplivov pri spolno dimorfnem razvoju možganov. Naše raziskave so pokazale na obstoj spolnih razlik v izraženosti nekaterih beljakovin v posameznih področjih vmesnih možganov pri miših seva C57BL/6J. V nekaterih primerih so bile opažene spolne razlike najverjetneje posledica vpliva spolnih hormonov ali spolnih kromosomov, v nekaterih primerih pa medsebojnega vpliva obeh dejavnikov. SF-1 je pri miših v vmesnih možganih specifično izražen le v ventromedialnem jedru hipotalamusa (ventromedial hypothalamus, VMH), kjer vpliva na pravilen razvoj jedra VMH in njegove bližnje okolice. Nevroni, ki izražajo kalbindin D-28k in nNOS (nevralna sintaza dušikovih oksidov) so bili pri miših brez gena *SF-1* v jedru VMH pomaknjeni dorzomedialno, kar potrjuje prejšnja opažanja, da ventromedialni del jedra VMH ni pravilno razvit pri miših brez gena *SF-1*.

Miši brez gena *SF-1* razvijejo debelost v zgodnjem odraslem obdobju. Proučevanja aktivnosti miši brez gena *SF-1* v naših poskusih potrjujejo prejšnja opažanja o zmanjšani fizični aktivnosti teh miši na kolesih za tek. Miši brez gena *SF-1* so imele tudi zmanjšano spontano celotno aktivnost, dnevno-nočni ritem spontane celotne aktivnosti pa pri teh miših ni bil spremenjen. Vlakna, ki vsebujejo presnovni peptid, sorođen agoutijevi beljakovini (agouti related peptide, AgRP), in nevropeptid Y (neuropeptide Y, NPY), ki se nahajajo na meji jedra VMH in v arkvatnem jedru, so bila pri miših brez gena *SF-1* pomaknjena v področje jedra VMH, tako da je bila njihova imunoreaktivna površina na mestu jedra VMH povišana. Število imunoreaktivnih nevronov, ki vsebujejo presnovni peptid povezan s kokainom in z amfetaminom (cocaine and amphetamine related transcript, CART), v območju jedra VMH in število imunoreaktivnih nevronov za predhodnik oreksinov (prepro-orexin, PPOX) v stranskem hipotalamusu in sivi grbi je bilo prav tako povišano pri miših brez gena *SF-1*. Po stradanju v jedru VMH so imele miši brez gena *SF-1* višjo imunoreaktivno površino peptidov AgRP, NPY in CART kot miši z odstranjenimi spolnimi žlezami WT/GDX.

Izsledki naših raziskav pri miših brez gena *SF-1* dodatno pojasnjujejo nastanek nekaterih spolnih razlik v vmesnih možganih pri miših. Po telesni teži in aktivnosti se miši brez gena *SF-1* niso razlikovale med spoloma. Razlike v primerjavi s kontrolnimi mišmi brez spolnih žlez in izsledki na molekularni ravni pa kažejo na vlogo jedra VMH pri razvoju debelosti pri miših brez gena *SF-1*.

GENE DEPENDENT SEX DIFFERENCES IN BODY WEIGHT REGULATION AND GENE EXPRESSION IN DIENCEPHALON IN SF-1 KNOCKOUT MICE

ABSTRACT

Sex characteristics – genetics; mice, knockout – genetics; brain – anatomy and histology – growth and development; body weight – physiology; gene expression regulation – genetics; ventromedial hypothalamic nucleus – metabolism; peptides – biosynthesis; nitric oxide synthase type I

Transcripton factor steroidogenic factor 1 (SF-1) regulates expression of proteins involved in steroidogenesis and other genes important for development and function of endocrine axis. Mice lacking SF-1 (SF-1 KO) are not exposed to endogenous steroid hormones due to regression of genital ridges at early embryonic stages. Therefore SF-1 KO mice represent a unique model for studying gene dependent brain sexual differentiation. Our results showed different origins of sex differences in gene expression in various regions throughout mouse hypothalamus; the effect of steroid hormones or sex chromosomes alone or the effect of sex chromosomes and steroid hormones.

It has been shown that SF-1 is cruical for proper development of VMH and medial hypothalamus. In our study, calbindin D-28k and neural nitric oxide synthase (nNOS) imunoreactive neurons in SF-1 KO mice in the VMH were positioned more dorsomedially towards the third ventricle in comparison to wild type (WT) mice, confirming previous reports about improper formation of VMH.

SF-1 KO mice become obese in adulthood. Our results confirmed reduced running wheel activity and showed reduced home cage activity in habituated environment, although circadian rhythm was not disrupted in SF-1 KO mice. To study the regulation of energy homeostasis at a molecular level we examined expression patterns of some metabolic peptides in the hypothalamus. No differences were found in agouti related peptide (AgRP) and neuropeptide Y (NPY) expression in paraventricular nucleus and in arcuate nucleus in WT and SF-1 KO mice. In the VMH region, AgRP, NPY and cocaine and amphetamine related transcript (CART) content was increased in SF-1 KO mice due to disrupted cytoarchitecture of VMH with the nerve fibers moving ventrally from their more dorsal position in WT mice. SF-1 KO mice also had increased number of cells expressing prepro-orexin (PPOX) in lateral hypothalamus and tuber cinereum. Changes in gene expression under fasting conditions were found only in the VMH region with higher AgRP and NPY imunoreactivity and number of CART immunoreactive neurons in dorsomedial part of VMH in fasted SF-1 KO mice.

Our results revealed the existence of sex differences in gene expression in distinct regions in mice hypothalamus, some of which appear to be dependent on the presence of different complements of sex chromosomes. Our results also further confirmed that altered VMH is likely the main cause for obesity in SF-1 KO mice and showed that altered cytoarchitecture in the VMH region might be responsible for this obesity.

OKRAJŠAVE

3V	tretja možganska kletka; ventriculus tertius; third ventricle
aca	sprednja komisura, sprednji del; commissura rostralis; anterior
	commissure, anterior
ACTH	kortikotropin; adrenocorticotropic hormone
AgRP	peptid, ki je sorođen agoutijevi beljakovini; agouti related
	peptide
АНС	prirojena hiperplazija nadledvičnih žlez; adrenal hyperplasia
	congenita
AMH	antimüllerjev hormon; anti-Müllerian hormone
AMPK	z AMP aktivirana protein-kinaza; AMP-activated protein kinase
AOB	področje pomožnega vohalnega betiča; bulbus olfactorius
	accessorius; accessory olfactory bulb
AR	androgenski receptor; androgen receptor
Arc	arkvatno jedro; nucleus arcuatus; arcuate nucleus
ATP	adenozin-5'-trifosfat; adenosine 5'-triphosphate
AVP	arginin vazopresin; arginine vasopressin
AVPV	anteroventralni del periventrikularnega jedra; nucleus
	periventricularis ventralis; anteroventral periventricular nucleus
BAC	bakterijski umetni kromosom; bacterial artificial chromosome
Bcl2	B celični limfom 2
BDNF	nevrotrofični dejavnik možganov; brain derived neurotrophic
	factor
BLA	bazolateralno jedro mandlja, anteriorni del; basolateral
	amygdaloid nucleus, anterior
BLP	bazolateralno jedro mandlja, posteriorni del; basolateral
	amygdaloid nucleus, posterior
BLV	bazolateralno jedro mandlja, ventralni del; basolateral
	amygdaloid nucleus, ventral
BMA	bazomedialno jedro mandlja, anteriorni del; basomedial
	amygdaloid nucleus, anterior

BMP	bazomedialno jedro mandlja, posteriorni del; basomedial
	amygdaloid nucleus, posterior
BNST	spodnje jedro končne strije; nucleus stria terminalis; bed nucleus
	of stria terminalis
BNSTLA	spodnje jedro končne strije, lateralno-anteriorni del; bed nucleus
	of stria terminalis, lateral division, anterior
BNSTLP	spodnje jedro končne strije, lateralno-posteriorni del; bed nucleus
	of stria terminalis, lateral division, posterior
BNSTM	spodnje jedro končne strije, medialni del; bed nucleus of stria
	terminalis, medial
BNSTMA	spodnje jedro končne strije, medialno-anteriorni del; bed nucleus
	of stria terminalis, medial division, anterior
BNSTMP	spodnje jedro končne strije, medialno-posteriorni del; bed
	nucleus of stria terminalis, medial division, posterior
BNSTMPI	medialni del spodnjega jedra končne strije, posterointermedialni
	del; bed nucleus of stria terminalis, medial division,
	posterointermedial
BNSTMPM	medialni del spodnjega jedra končne strije, posteromedialni del;
	bed nucleus of stria terminalis, medial division, posteromedial
BNSTp	spodnje jedro končne strije, inkapsularni del; bed nucleus of stria
	terminalis, principal
BOAT	spodnje jedro pomožnega vohalnega betiča; bed nucleus of the
	accessory olfactory tract
CA	Amonov rog; Cornu Ammonis
cAMP	adenozin-3', 5'-monofosfat; cyclic adenosine monophosphate
CART	presnovni peptid povezan s kokainom in z amfetaminom; cocaine
	and amphetamine related trascript
CB1R	receptor za vezavo snovi iz družine kanabinoidov; cannabinoid
	receptor 1
cc	možganski prečnik; corpus callosum; corpus callosum
ССК	holecistokinin; cholecystokinin
CD	kampomelična displazija; campomelic dysplasia

CeC	centralno jedro mandlja, kapsularni del; central amygdaloid
	nucleus, capsular part
CeL	centralno jedro mandlja, lateralni del; central amygdaloid
	nucleus, lateral division
CRH	sproščajoči hormon kortikotropina; corticotrophin releasing
	hormone
CRHR2	receptor za vezavo kortikotropin sproščajočega hormona 2;
	corticotropin releasing hormone receptor 2
Cy2	cianin 2; cyanine 2
СҮР	citokrom P450; cytochrome P450
CYP11A1	citokrom P450, poddružina 11A, beljakovina 1; cytochrome
	P450, subfamily 11A, polypeptide 1
D3V	dorzalni del tretje možganske kletke; third ventricle, dorsal
DAB	3' 3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid; 3' 3'-diaminobenzidine
	tetrahydrochloride
DAX1	DSS-AHC kritično področje na kromosomu X; DSS-AHC
	critical region on the X chromosome
DDS	Denis-Drashov sindrom; Denis-Drash syndrome
DG-GCL	plast zrnatih celic v nazobčani vijugi; dentate gyrus granular cell
	layer
DHEA	dehidroepiandrosteron; dehydroepiandrosterone
DHEAS	dehidroepiandrosteron-sulfat; dehydroepiandrosterone sulfat
DLN	dorzolateralna skupina motornih nevronov v hrbtenjači; nucleus
	dorsolateralis; dorsolateral nucleus
DMH	dorzomedialno jedro hipotalamusa; nucleus dorsomedialis;
	dorsomedial hypothalamic nucleus
DMRT	prepis soroden prepisoma doublesex in mab-3; doublesex/mab-3
	related transcript
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DSS	sprememba spola odvisna od koncentracije; dosage sensitive sex
	reversal
Ε	embrionalni dan; embryonic day

ec	zunanja ovojnica; capsula externa; external capsule
eGFP	zeleno fluorescirajoča beljakovina; enhanced green fluorescent
	protein
ELP	beljakovina embrionalnih celic, ki se veže na dolge končne
	ponovitve; embryonal long terminal repeat-binding protein
ESR	estrogenski receptor; estrogen receptor
f	svod; <i>fornix</i> ; fornix
FGF	rastni dejavnik fibroblastov; fibroblast growth factor
FSH	folikel stimulirajoči hormon; follicle stimulating hormone
FTZ-F1	dejavnik fushi tarazu 1; fushi tarazu factor, Drosophila, homolog
	1
GABA	gama amino butirična kislina; gamma amino butyric acid
GAD67	dekarboksilaza glutaminske kisline; glutamic acid decarboxylase
GFAP	kisla fibrilarna beljakovina celic glie; glial fibrillary acidic
	protein
GH	rastni hormon; growth factor
GnRH	sproščajoči hormon gonadotropinov; gonadotrophin releasing
	factor
IGF	rastni dejavnik podoben inzulinu; insuline like growth factor
IL	interlevkin
INAH	intersticialno jedro sprednjega hipotalamusa; nuclei interstitiales
	hypothalami anteriores; intersticial nucleus of anterior
	hypothalamus
LH	področje stranskega hipotalamusa; area hypothalamica lateralis;
	lateral hypothalamus
LH	luteinizirajoči hormon; luteinising hormone
LRH1	jetrni homologni receptor 1; liver receptor homolog 1
LS	področje stranskega pretina; lateral septum; lateral septum
LSD	področje stranskega pretina, dorzalni del; lateral septum, dorsal
LSV	področje stranskega pretina, ventralni del; lateral septum, ventral
LTP	dolgotrajen postsinaptični akcijski potencial; long term
	potentiation

LTR	dolga končna ponovitev v genomu virusa; long terminal repeat
LV	stranska možganska kletka; ventriculus lateralis; lateral ventricle
МСН	melanin koncentrirajoči hormon; melanin concentrating hormone
MCR	melanokortinski receptor; melanocortin receptor
MeA	medialno jedro mandlja, anteriorni del; medial amygdaloid
	nucleus, anterior
MePD	medialno jedro mandlja, posterodorzalni del; medial amygdaloid
	nucleus, posterodorsal
MePV	medialno jedro mandlja, posteroventralni del; medial amygdaloid
	nucleus, posteroventral
miš GDX/WT	miš divjega tipa z odstranjenimi spolnimi žlezami, CAS/WT -
	miš brez testisov, OVX/WT – miš brez jajčnikov
miš SF-1 KO	miš brez gena za steroidogeni dejavnik 1 (SF-1 knockout), SF-1
	KO M (KOM) – samec, SF-1 KO F (KOF) – samica
miš SF-1 KO/eGFP	miš brez gena SF-1 in z vstavljenim genom eGFP
miš WT	miš divjega tipa (wild type), WT M – samec, WT F – samica
miš WT/eGFP	miš divjega tipa z vstavljenim genom <i>eGFP</i>
MN-POA/AH	spolno dimorfno jedro v področju POA/AH pri samcih pri
	dihurju; male nucleus of the POA/AH
МРО	medialno predoptično jedro; nucleus preopticus medialis; medial
	preoptic nucleus
MPOC	medialno predoptično jedro, središčni del; medial preoptic
	nucleus, central
mRNK	informacijska RNK; messenger RNA
MSH	melanocite stimulirajoči hormon, izoobliki α MSH, β MSH;
	melanocyte stimulating hormone
mTOR	sesalska tarča rapamicina; mammalian target of rapamycin
NaCl	natrijev klorid; sodium chloride
NGS	normalni kozji serum; normal goat serum
NMDA	N-metil-D-aspartinska kislina; N-metil-D-aspartic acid
nNOS	nevralna sintaza dušikovih oksidov (NO _x), tudi NOS 1; neural
	nitric oxide synthase

NPY	nevropeptid Y; neuropeptide Y
Nr5a1	poddružina jedrnih receptorjev 5, skupina A, član 1; nuclear
	receptor subfamily 5, group A, member 1
NTS	jedro solitarnega trakta; nucleus tractus solitarii; nucleus of
	solitary tract
Ob-R(x)-	receptor za leptin; x označuje različne prepise leptinskega
	receptorja, tudi Lepr; obese phenotype receptor
ОТ	optični trakt, vlakna optičnega živca; optic tract
OX	peptid oreksin/hipokretin; orexin
Р	dan po rojstvu; postnatal day
Pa	paraventrikularno jedro; nucleus paraventricularis hypothalami;
	paraventricular nucleus
PB	fosfatni pufer; phosphate buffer
PBS	fosfatni pufer z NaCl; phosphate buffered saline
PCR	verižna reakcija s polimerazo; polymerase chain reaction
Pe	periventrikularno jedro; nucleus periventricularis; periventricular
	nucleus
PHR1	pankreasni hormonski receptor 1; pancreas hormone receptor 1
POA	predoptično področje; preoptic area; mPOA – medialno
	predoptično področje; medial preoptic area
POA/AH	področje na meji med predoptičnim področjem in sprednjim
	delom hipotalamusa; preoptic area/anterior hypothalamus
POMC	proopiomelanokortin; proopiomelanocortin
PPOX	predhodnik oreksinov A in B; prepro-orexin
РҮҮ	peptid YY; peptide YY
RT-PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo; reverse
	transcription polymerase chain reaction
SCN	suprakiazmatično jedro; nucleus suprachiasmaticus;
	suprachiasmatic nucleus
SD-POA	spolno dimorfno predoptično področje; sexually dimorphic
	preoptic area

SDA, SDApc	spolno dimorfno področje, strnjeni del; sexually dimorphic area,
	pars compacta
SDN-POA	spolno dimorfno jedro v predoptičnem področju; sexually
	dimorphic nucleus of preoptic area
SF-1	prepisovalni dejavnik steroidogeni dejavnik 1; steroidogenic
	factor 1
SLR	sekretorna oblika leptinskega receptorja; soluble leptin receptor
	(Ob-Re)
sm	srednja strija talamusa; stria medullaris; stria medullaris of
	thalamus
SNB	čebulno brecilna skupina motornih nevronov; sexually dimorphic
	nucleus of bulbocavernosus
SON	supraoptično jedro; nucleus supraopticus; supraoptic nucleus
SOX9	SRY-sorodna beljakovina s homeo-zaporedjem; SRY-related
	HMG box
SRY	spol določujoče področje na kromosomu Y; sex determining
	region on Y chromosome
st	končna strija; stria terminalis; stria terminalis
TC	siva grba; <i>tuber cinereum</i> ; tuber cinereum
TGF	transformirajoči rastni dejavnik; transforming growth factor
TH	tirozin hidroksilaza; tyrosine hydroxylase
TRH	spročajoči hormon tiroksina; thyrotropin releasing hormone
TSH	tireocite stimulirajoči hormon; tireocyte stimulating hormone
VMH	ventromedialno jedro hipotalamusa; nucleus ventromedialis
	hypothalami; ventromedial nucleus of hypothalamus
VMHVL	ventromedialno jedro hipotalamusa, ventrolateralni del;
	ventromedial nucleus of hypothalamus, ventrolateral
VTA	področje ventralnega dela krova srednjih možganov, tectum
	mesencephali; ventral tegmental area

WAGR	sindrom, ki se kaže z Wilmsovim tumorjem, odsotnostjo
	šarenice, napakami urogenitalnega sistema in v umski
	zaostalosti; Wilms tumor, aniridia, genitourinay anomalies and
	mental retardation
WNT4	član družine wingless mesta vključitve MMTV; wingless type
	MMTV integration site family member 4
WT1	prepisovalni dejavnik Wilmsovega tumorja 1; Wilms tumor 1

1 UVOD

Pri organizmih, za katere sta značilna dva fenotipsko različna spola, je razvoj spola posledica sprememb osnovnega razvojnega programa. Pri sesalcih je genetski spol določen s komplementom spolnih kromosomov X in Y ob združitvi spolnih celic. Razvoj zametkov spolnih žlez v moda uravnava gen *SRY (angl.* sex determining region on Y chromosome), ki se nahaja na kromosomu Y. SRY je izražen v spolnih grebenih pred začetkom spolne diferenciacije (Koopman in sod., 1990). Prisotnost kromosoma Y je osnova za razvoj spolnih žlez v moda, ki nato izločajo antimüllerjev hormon (AMH), ki zavira razvoj zametkov za ženske spolne organe (Müllerjeve vode) in steroidni hormon testosteron, ki spodbuja razvoj moških spolnih organov in pozneje razvoj sekundarnih spolnih znakov (poraščenost, nižji glas ipd.) (Gilbert, 1994b).

Pri spolni diferenciaciji možganov imajo ključno vlogo spolni steroidni hormoni, ki se v glavnem izločajo iz spolnih žlez in stalno ali začasno vplivajo na strukturo možganov (Tobet in Fox, 1992). Izvor steroidnih hormonov, ki imajo lahko učinek na razvoj zarodka, so še: nadledvična žleza, centralni živčni sistem, sosednji zarodki in spolni hormoni iz materine krvi (Saal, 1989; London in Schlinger, 2007; Nguyen in Conley, 2008). Pri vretenčarjih se spolni hormoni izločajo iz spolnih žlez skozi vse življenje, dinamika izločanja in vrsta izločanega hormona pa sta spolno specifična (Tobet in Fox, 1992). Pri glodalcih (miš, podgana) se spolni hormon testosteron pri samcih začne izločati v prenatalnem obdobju, pri samicah pa je delovanje jajčnikov neaktivno do skotitve (Greco in Payne, 1994; Majdic in sod., 1998).

Geni na spolnih kromosomih imajo lahko neposreden vpliv na spolno diferenciacijo možganov pri sesalcih in pticah, kjer se nekatere razlike pojavijo pred razvojem primarnih steroidogenih tkiv (Dewing in sod., 2003). Miši brez gena *SF-1* se rodijo brez spolnih žlez in zaradi zgodnjega propada zametkov za spolne žleze niso nikoli izpostavljene spolnim hormonom. Zato predstavljajo model, ki omogoča proučevanje genskih in hormonskih vplivov na razvoj možganskih struktur, ločeno. Ventromedialno področje hipotalamusa je odgovorno za uravnavanje procesov ohranjanja energije in porabe energetskih zalog. Zaradi spremenjene strukture ventromedialnega področja, ki je posledica odsotnosti SF-1, pa miši

brez gena *SF-1* pomenijo tudi pomemben model za proučevanje uravnavanja energetske homeostaze.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen naših raziskav je bil ugotoviti pomen hormonskih in genetskih dejavnikov pri nastanku razlik v sestavi in delovanju možganov med samci in samicami pri miših, in sicer s posebnim poudarkom na mehanizmih uravnavanja energetske homeostaze. Pri mišjih zarodkih brez gena *SF-1* spolne žleze propadejo zelo zgodaj, zato te živali med razvojem niso izpostavljene lastnim spolnim hormonom. Zato so miši brez gena *SF-1* edinstven model za proučevanje genetsko pogojenih možganskih razlik med spoloma. Miši brez gena *SF-1* imajo specifično strukturo jedra VMH, ki je posledica pomanjkanja SF-1, zato predstavljajo tudi model za proučevanje pomena tega jedra. V naši raziskavi smo tako želeli preveriti naslednje hipoteze:

Nekatere spolne razlike v izraženosti genov v možganih miši seva C57BL/6J se razvijejo neodvisno od prisotnosti spolnih žlez.

Miši brez gena *SF-1* imajo spremenjeno uravnavanje energetske homeostaze, ki pripelje do razvoja pozne debelosti.

Razvoj pozne debelosti pri miših brez gena *SF-1* je posledica sprememb v strukturi in izraženosti beljakovin v vmesnih možganih.

Pri miših seva C57BL/6J obstajajo spolne razlike v uravnavanju energetske homeostaze, ki se razvijejo neodvisno od prisotnosti spolnih žlez.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 SPOLNA DIFERENCIACIJA ŽIVČNEGA SISTEMA

Razlike v možganih, ki jih poznamo danes, lahko uvrstimo v dve ravni, tj. raven celotnih možganov in posameznih področij v možganih (razlike v prostornini, številu celic v posameznem jedru, položaju strukturnih elementov v posameznem področju in razlike v številu gradnikov, ki izražajo določeno beljakovino ali druge biološke molekule) in celična raven (ultrastruktura elementov živčnega sistema; razlike v velikosti celičnega telesa, jedra ali jedrca, številu in v vrsti sinaptičnih povezav in morfologiji dendritov). Pri spolni diferenciaciji možganov imajo ključno vlogo spolni steroidni hormoni, ki se izločajo iz spolnih žlez in ki stalno in/ali začasno vplivajo na strukturo možganov. Pri vretenčarjih se spolni hormoni izločajo iz spolnih žlez skozi vse življenje, dinamika izločanja in vrsta izločanega hormona pa sta spolno in vrstno specifična. Vpliv spolnih hormonov na strukturo možganov je časovno omejen. Spolni hormoni pri sesalcih izrazito vplivajo na strukturo možganov v dveh obdobjih, tj. v obdobju pred rojstvom in v prvih tednih po skotitvi, ter v Spolni hormoni lahko povzročijo stalne, nepovratne spremembe v obdobju pubertete. strukturi možganov (t.i. organizacijski vpliv) ali pa so njihovi vplivi začasni in povratni, kar imenujemo aktivacijski vpliv spolnih hormonov na strukturo in delovanje možganov. Steroidni hormoni se poleg spolnih žlez izločajo tudi iz nekaterih drugih organov, kot sta skorja nadledvične žleze in centralni živčni sistem, kjer nastajajo nevrosteroidi. Skorja nadledvične žleze je pri miših sestavljena iz dveh morfološko in funkcijsko različnih con; v klobčičasti coni (Zona glomerulosa) nastajajo mineralokortikoidi, v snopičasti coni (Zona fasciculata) pod njo pa glukokortikoidi. Pri mladih miših se na meji med skorjo in sredico nadledvične žleze nahaja še t. i. cona X, ki pri samcih izgine v med puberteto, pri samicah pa med prvo brejostjo. Njena vloga še ni popolnoma znana; po nekaterih opažanjih naj bi predstavljala mesto biosinteze spolnih hormonov (Keegan in Hammer, 2002). Pri nekaterih vrstah živali v skorji nadledvične žleze nastajajo v manjših količinah tudi spolni steroidni Najpomembnejša androgena steroidna hormona nadledvične žleze sta hormoni. dehidroepiandrosteron (DHEA) in njegova sulfatirana oblika dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS), ki pa pri glodalcih nastajata samo v spolnih žlezah (van Weerden in sod., 1992). Njihova vloga še ni popolnoma znana, vendar imajo precej šibkejšo aktivnost kot testosteron. Spolni hormoni, ki vplivajo na razvoj zarodka, lahko pridejo v zarodek tudi od zunaj. Spolni steroidni hormoni iz materine krvi in hormoni iz sosednjih zarodkov v maternici lahko delno vplivajo na spolno diferenciacijo zarodka (Saal, 1989; Hurd in sod., 2008). Pri podganah lahko položaj zarodka v maternici glede na spol sosednjih zarodkov vpliva na velikost spolno specifičnega jedra SDN-POA (*angl.* sexually dimorphic nucleus of preoptic area), vendar samo pri samcih (Pei in sod., 2006). Vsak izvor spolnih hormonov ima potencialno vlogo pri končnem razvoju možganov, vendar pa so najpomembnejši spolni hormoni iz spolnih žlez, saj so v organizmu v najvišjih koncentracijah.

Na spolni razvoj možganov vpliva tudi genetski komplement, pri čemer imajo ključno vlogo spolni kromosomi. Z metodo in situ hibridizacije so ugotovili prisotnost krožnih prepisov Sry v nevronih srednjih možganov (mamilarna telesca, področje črne substance) in v skorji pri podganah in miših ter neposreden vpliv na število nevronov in izražanje tirozinske hidroksilaze (TH), ki sodeluje pri biosintezi dopamina (Dewing in sod., 2006). S pripravo genetskega mišjega modela (samci XX*Sry*, samice XY*Sry*⁻) pa so ugotovili povezavo med gostoto vlaken v stranskem pretinu (*angl.* lateral septum, LS), ki izražajo arginin vazopresin (AVP), in prisotnostjo kromosomov X ali Y (De Vries in sod., 2002).

2.1.1 SPOLNA DIFERENCIACIJA MOŽGANOV PRI SESALCIH

Pri proučevanju razlik med spoloma v možganih želimo odgovoriti na naslednja vprašanja: kateri vplivi vodijo v razvoj spolno značilnih lastnosti v strukturi možganov in kakšne so fenotipske posledice strukturnih razlik, kako spolni hormoni vplivajo na razvoj spolnih razlik v posameznem kritičnem obdobju, kdaj po začetku delovanja spolnih hormonov se pojavijo spolno odvisne značilnosti in kateri dejavniki so še udeleženi pri dokončnem izoblikovanju značilnosti posameznega spola, kateri spolni hormoni so udeleženi pri razvoju spolne značilnosti in kakšen je njihov mehanizem delovanja, ali spolni hormoni neposredno vplivajo na spolno specifičen razvoj lastnosti ali je njihova vloga posredna?

2.1.1.1 Predoptično področje in področje sprednjega hipotalamusa (POA/AH)

Predoptično področje (angl. preoptic area, POA) leži v rostralno-ventralnem delu možganov in zajema področje med sprednjo komisuro (angl. anterior commisure, ac) in optičnima živcema (angl. optic tract, OT). Na njegovem kavdalnem delu 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). Medialni del predoptičnega področja (angl. medial preoptic area, mPOA) ima pomembno vlogo pri uravnavanju spolnega obnašanja in endokrinih procesov. Pri podganjih samcih se v mPOA nahaja center za uravnavo kopulatornega obnašanja (Szechtman in sod., 1978; Arendash in Gorski, 1983), pri samicah pa to področje sodeluje pri materinskem obnašanju, pojavnosti lordoze in pri cikličnem izločanju gonadotropinov (Segovia in Guillamon, 1993; Madeira in Lieberman, 1995). Vse vzorce spolnega obnašanja uravnavajo spolni hormoni. Področje POA je močno povezano z drugimi področji možganov, ki prav tako sodelujejo pri nastanku spolnega obnašanj in uravnavi endokrinih procesov (Coolen in sod., 1998). Glavne povezave v POA prihajajo iz pretinskega področja, hipokampusa, BNST, področja mandlja in hipotalamusa. Večina eferentnih povezav iz POA pa poteka v paraventrikularno jedro hipotalamusa (Swanson in Cowan, 1979; Simerly in Swanson, 1986; Coolen in Wood, 1998). Po številu nevronov, ki izražajo eno izmed oblik estrogenskega receptorja (ESR), področje POA presega katero koli drugo področje v možganih (Herbison in Theodosis, 1992a, 1992b). Pri podganah in mongolskih puščavskih podganah (mongolski skakač, Meriones unguiculatus) imajo nevroni POA sposobnost vezave estrogenov med embrionalnim razvojem in v odraslem življenju (Maurer in Woolley, 1974; Schoonmaker in sod., 1983; Commins in Yahr, 1984, 1985; Handa in sod., 1985; Jacobson in sod., 1987), prisotnost ESR pa so ugotovili tudi v POA pri dihurjih (Holbrook in Baum, 1983). Koncentracija ESR in število vezavnih mest za estrogene v mPOA pa je pri samicah višja kot pri samcih (Brown in sod., 1992). Podobno naj bi obstajale tudi spolne razlike v vsebnosti androgenskega receptorja (AR) pri podganah, saj so Jacobson in sod. (1987) z avtoradiografsko raziskavo ugotovili nižjo količino vezanih androgenov pri samcih kot pri samicah. Spolne razlike v nevronih POA so pri dihurjih in podganah ugotovili tudi v prisotnosti aromataze, pri čemer je bila aktivnost aromataze višja pri samcih kot samicah (Tobet in sod., 1985a; Tobet in sod., 1985b).

V področju mPOA je jedro, ki se po morfoloških lastnostih (oblika, površina in prostornina) razlikuje med spoloma. Jedro leži v medialnem delu predoptičnega področja med sprednjo komisuro na dorzalni strani in križiščem optičnih živcev na bazi možganov. Pri podganah se to jedro imenuje SDN-POA (Gorski in sod., 1978), spolno različna ekvivalentna jedra pa so bila opisana tudi pri drugih vrstah, kot so: mongolska puščavska podgana (angl. sexually dimorphic area (SDA), angl. sexually dimorphic area-pars compacta (SDApc)) Commins in Yahr, 1984), morski prašiček (angl. SD-POA; Hines in sod., 1985), dihur (angl. MN-POA/AH; Tobet in sod., 1986), prepelica (Panzica in sod., 1987), makak (Ayoub in sod., 1983) in človek (angl. intersticial nucleus of anterior hypothalamus, INAH); Swaab in Fliers, 1985; Allen in sod., 1989). Površina in prostornina jedra sta večji pri samcih, pri miših pa spolnih razlik v prostornini jedra v mPOA niso odkrili (Young, 1982). Prostornina jedra je odvisna od prisotnosti spolnih hormonov in starosti pri izpostavljenosti ter vrste živali. Tretiranje odraslih podgan s spolnimi hormoni ni vplivalo na prostornino jedra (Gorski in sod., 1978), pri mongolskih puščavskih podganah pa prisotnost testosterona v odraslem obdobju poveča prostornino jedra (Commins in Yahr, 1984). Pri dihurjih je tretiranje s spolnimi hormoni povečalo velikost nevronov v MN-POA/AH, vendar se končna prostornina jedra ni spremenila (Tobet in sod., 1986). Tako je tretiranje samic podgane v času po skotitvi povzročilo povečanje prostornine jedra SDN-POA, kastracija samcev v istem obdobju pa je imela za posledico zmanjšano prostornino jedra SDN-POA, ki je bila podobna velikosti jedra pri samicah (Gorski in sod., 1978; Jacobson in sod., 1981; Handa in sod., 1985). Vendar pa spreminjanje izpostavljenosti spolnim hormonom v obdobju po rojstvu ne povzroči popolne spremembe morfoloških značilnosti jedra v odraslem obdobju. Tretiranje brejih podgan s testosteronom je povzročilo spremenjeno prostornino jedra SDN-POA pri potomcih, kar kaže, da je za normalen razvoj tega jedra pomembna tudi izpostavljenost spolnim hormonom v obdobju pred rojstvom (Ito in sod., 1986). Če so podgane izpostavili testosteronu pred rojstvom in po rojstvu, pa je to imelo za posledico popolno spremembo morfološkega fenotipa jedra. Tako so imele samice velikost jedra primerljivo z netretiranimi navadnimi samci podgan. Pri omenjenih skupinah živali je za oblikovanje jedra in njegove prostornine ključno delovanje estrogenov v embrionalnem in zgodnjem postnatalnem obdobju (Dohler in sod., 1982, 1984a; Dohler in sod., 1984b; Tobet in sod., 1986; Byne in Bleier, 1987; Hines in sod., 1987).

Pri podganah je dobro proučen tudi čas nastanka živčnih celic, ki sestavljajo jedro SDN-POA. Mesto nastanka živčnih celic v embrionalnem obdobju je delitvena cona v neposredni okolici tretje možganske kletke. Nastale živčne celice se nato pomikajo v notranjost POA s pomočjo različnih signalnih molekul in njihovih kompleksov. Spolne razlike v velikosti jedra so lahko posledica razlik v nevrogenezi, apoptozi ali potovanju živčnih celic, ki so pod uravnavo spolnih hormonov. Z avtoradiografskimi metodami za sledenje rojstva živčnih celic so ugotovili, da se živčne celice, ki sestavljajo spolno dimorfno jedro, pojavijo v mPOA pozneje kot živčne celice, ki so v okolici tega jedra (Jacobson in Gorski, 1981). Ugotovili so, da se na dan E18,0 (*angl.* embryonic day, E) v POA pojavi skupina nevronov jedra SDN-POA, ki so odgovorni za nastanek spolnih razlik v jedru SDN-POA, njihova celična delitev in potovanje pa nista uravnavana s spolnimi hormoni. Tako so spolne razlike v številu nevronov jedra SDN-POA verjetno posledica delovanja spolnih hormonov na tiste podskupine živčnih celic, ki se ne pojavijo na dan E18,0 (Jacobson in Gorski, 1981).

Z uporabo imunohistokemijskih metod so ugotovili spolne razlike v izraženosti beljakovin v Encim dekarboksilaza glutaminske kisline (angl. glutamic acid nevronih mPOA. decarboxylase, GAD67), ki sodeluje v biosintezi nevrotransmiterja gama amino-butirične kisline (angl. gamma-aminobutyric acid, GABA), je spolno specifično izražen pri mladih podganah (Flugge in sod., 1986). Razlike v izraženosti GAD67 so bile prisotne še na dan P10 (angl. postnatal, P), do P15 pa so razlike med spoloma v izraženosti GAD67 izginile (McCarthy, 1995). To potrjuje in sovpada z opažanji o splošni zmanjšani izraženosti GAD67 in prisotnosti nevrotransmiterja GABA v področju POA pri odraslih podganah in kaže na mogoč vpliv nevrotransmiterja pri spolno dimorfnem razvoju področja mPOA. Obstajajo številne študije o mogočem neposrednem vplivu nevrotransmiterja GABA na razvoj POA. Tretiranje mladih podgan z agonistom receptorjev GABA muscimolom je povzročilo zmanjšanje prostornine SDN-POA pri samcih, pri samicah pa vpliva na prostornino jedra ni imelo. Tretiranje z agonistom GABA_A receptorja muscimolom je povzročilo enak učinek, kot ga ima kastracija na jedro SDN-POA, vendar z mehanizmi, ki so neodvisni od steroidnih hormonov (Bach in sod., 1992). To kaže na pomen komunikacije med nevroni v razvijajočem se področju mPOA pri razvoju in oblikovanju jedra SDN-POA pri podganah.

Mejno področje med področjem POA in AH (POA/AH) sodeluje pri uravnavanju številnih spolno specifičnih nevroendokrinih procesov, vendar do danes ni znanega primera, kjer bi

____26

razlike v strukturi POA lahko natančno povezali z razlikami v delovanju POA oziroma obnašanju živali. Pri podganah so poškodbe v dorzalnem področju POA povzročile motnje v spolnem ciklusu, vendar so se živali sčasoma vrnile v normalen ciklus (Raisman in Field, 1971, 1973). Podobno specifične poškodbe jedra SDN-POA niso povzročile sprememb v materinskem obnašanju pri podganjih samicah (Jacobson in sod., 1980) in kopulatornem obnašanju pri samcih (Arendash in Gorski, 1983; De Jonge in sod., 1989). Funkcija jedra SDA-POA pa je bila bolj opazna pri mongolskih puščavskih podganah, pri katerih je jedro SDA-POA sestavljeno iz ločene srednje in stranske podskupine nevronov. Bilateralne poškodbe katere koli izmed podskupin nevronov so preprečile spolno obnašanje pri samcih (Yahr in Gregory, 1993), prostornina SDApc pa je bila v pozitivni povezavi s sposobnostjo označevanja ozemlja in spolnega vedenja pri samcih (Ulibarri in Yahr, 1996). Pri dihurjih so na podlagi raziskav spolnega obnašanja predpostavili, da tako kot razvoj jedra MN-POA tudi razvoj spolnega obnašanja pri samcih poteka v dveh stopnjah (Tobet in Baum, 1987). Predpostavlja se, da v embrionalnem obdobju delovanje estrogenov mogoče naredi razvijajoče se možgane dovzetnejše za delovanje testosterona v zgodnjem postnatalnem obdobju.

2.1.1.2 Spodnje jedro končne strije (BNST)

V področju BNST se končujejo eferentne povezave iz medialnega področja mandlja (*angl.* medial amygdala, MeA) in neposredno iz področja pomožnega vohalnega betiča. V BNST se končuje tudi del povezav iz sprednjega dela področja mandlja; zaradi strukturnih povezav med mandljem in BNST so BNST včasih prištevali k področju mandlja (de Olmos in Heimer, 1999). Nevroni BNST tvorijo aferentne povezave z nevroni področij POA, MeA in VMH (Segovia in Guillamon, 1993). BNST sodeluje pri endokrinem uravnavanju spolnega vedenja (iskanje partnerja, postavitev v lordozo Emery in Sachs, 1976; Lopez in Carrer, 1982).

Celotna prostornina področja BNST se ne razlikuje med spoloma, vendar so takšna opažanja lahko posledica kompenzacije v prostorninah med posameznimi jedri BNST, ki so biokemijsko in funkcijsko ločene enote, njihove prostornine pa se razlikujejo med spoloma. Pri glodalcih področje BNST razdelimo glede na anteriorno-posteriorno in medialnolateralno os na štiri jedra: medialno-posteriorni del (BNSTMP), imenovan tudi glavni ali inkapsulirani del BNST (BNSTp); lateralno-posteriorni del (BNSTLP); medialno-anteriorni del (BNSTMA) in lateralno-anteriorni del (BNSTLA) (Segovia in Guillamon, 1993).

Jedro BNSTMP je glede na velikost spolno dimorfno, pri čemer sta število nevronov (Guillamon in sod., 1988) in prostornina jedra (Hines in sod., 1992) pri samcih podgan večja kot pri samicah. Podobne spolne razlike so našli tudi pri morskih prašičkih (Hines in sod., 1985) in ljudeh (Allen in Gorski, 1990). Jedro BNSTMP je močno povezano z delom medialnega področja mandlja (*angl.* medial amygdala-posterodorsal, MePD) in drugimi področji limbičnega sistema, ki so prav tako spolno dimorfna v svoji strukturi (Ju in Swanson, 1989). Druga področja BNST se po velikosti tudi razlikujejo med spoloma, vendar je vzorec razlik nasproten kot pri jedru BNSTMP. Moški spolni hormoni vplivajo v jedru BNSTLA zaviralno na število nevronov, saj kastracija samcev v neonatalnem obdobju povzroči povečanje števila nevronov v primerjavi s kontrolnimi podganjimi samci, tretiranje samic s testosteronom v neonatalnem obdobju pa je zmanjšalo število nevronov. Podobno velja za jedro BNSTMA, kjer imajo samice več nevronov kot samci (Segovia in Guillamon, 1993).

2.1.1.3 Anteroventralni del periventrikularnega jedra (AVPV)

Anteroventralni del periventrikularnega jedra (*angl.* anteroventral periventricular nucleus, AVPV) sestavlja manjša skupina celic, ki se nahaja bilateralno na začetku razširitve tretje možganske kletke v rostralnem delu mPOA. Večina aferentnih povezav iz AVPV poteka v mPOA, peri- in paraventrikularno jedro ter prek periventrikularnega jedra v arkvatno jedro (Gu in Simerly, 1997). Spolni steroidni hormoni uravnavajo prek nevronov AVPV izločanje sproščajočega hormona gonadotropinov (*angl.* gonadotrophin releasing hormone, GnRH). Velikost jedra in gostota nevronov sta spolno specifična; samice imajo večje število celic in večji volumen jedra (Bleier in sod., 1982). Za razvoj razlik med spoloma je odgovoren testosteron v neonatalnem obdobju. Tretiranje samic s testosteronom zmanjša število celic v jedru AVPV, pri kastriranih samcih pa vsebuje večje število nevronov v primerjavi s kontrolnimi živalmi (Simerly in sod., 1985b). Skladno z razlikami v številu nevronov so tudi spolne razlike v številu nevronov, ki izražajo določene beljakovine. Samice imajo tako več

Samci podgan z okvarjenim genom za androgenski receptor (Ar^{Tfm} ; Ar KO) imajo normalen fenotip, samci z okvarjenim genom $Esr1(\alpha)$ pa so po številu nevronov, ki izražajo TH, bolj podobni samicam. To kaže, da na razvoj populacije nevronov, ki izražajo TH, vplivajo le estrogeni, neodvisno od androgenih hormonov (Simerly in sod., 1997).

Prostornina AVPV se razlikuje med spoloma tudi pri voluharicah, kjer pa razlika v velikosti jedra sovpada z vedenjem. Pri vrsti, ki je poligamna, je razlika med spoloma večja kot pri monogamni vrsti voluharic (Shapiro in sod., 1991).

2.1.1.4 Mandelj – amigdala (corpus amigdaloideum)

Mandeljasto področje se nahaja pod anteriorno-medialnim delom možganske skorje rostralno od hipokampusa. Sestavljajo ga številna jedra, ki jih razdelimo v tri funkcionalna področja. Jedra v medialni skupini tvorijo povezave s področjem vohalnega betiča in z vohalnimi področji v skorji. Področje bazolateralne skupine jeder tvori glavne povezave s temenskim in čelnim delom možganske skorje in talamusom, jedra centralnega in anteriornega področja pa tvorijo povezave s podaljšano hrbtenjačo in hipotalamusom. Mandeljasto področje tako povezuje področja v možganski skorji, kjer se procesirajo čutne zaznave (vonj, sluh, okus, bolečina, zaznave avtonomnega sistema) in področja v hipotalamusu in podaljšani hrbtenjači, ki urejajo delovanje telesa. Pri višjih sesalcih čutne zaznave dosežejo višje možganske centre, ki urejajo čustva in vedenjske vzorce (povzeto po McDonald, 1998).

Pri miših, podganah, morskih prašičkih in pri dihurjih, kjer je delovanje mandeljastega področja najbolje proučeno, sodeluje pri uravnavi spolno specifičnih nevroendokrinih procesov, kot so: izločanje gonadotropinov, prolaktina in luteinizirajočega hormona (LH) (Rajendren in Moss, 1993). Poškodbe v področju mandlja vplivajo na agresivno vedenje, spolno obnašanje pri samcih in samicah (lordoza), na igralno obnašanje in zavrejo začetek pubertete pri podganah (Meaney in McEwen, 1986; Vochteloo in Koolhaas, 1987; Pfaus in sod., 1993; Kondo in sod., 1997). Prostornina posameznih področij mandlja se razlikuje med spoloma pri podganah. Področji MeA in MePD sta večji pri samcih kot samicah (Hines in sod., 1992; Cooke in sod., 1999) in vsebujeta večja telesa nevronov (Staudt in Dorner, 1976; Cooke in sod., 1998; Morris in sod., 2008b). Nobenih razlik pa ni bilo odkritih v postero-

____29

ventralnem delu MeA (angl. medial amygdala-posteroventral, MePV). Vloga spolnih hormonov pri razvoju področja MeA ni povsem pojasnjena, kljub dokazani izraženosti beljakovine AR in prepisov $Esrl(\alpha)$ in $Esr(\beta)$ (Osterlund in sod., 1998; DonCarlos in sod., 2003). Pri podganjih samcih brez gena Ar sta prostornina MeA in velikost nevronskih telesc feminizirana, kar kaže na pomen testosterona za razvoj področja MeA (Morris in sod., 2005). Obstajajo pa tudi raziskave, ki kažejo na vlogo estrogenih hormonov pri razvoju MeA pri samcih in maskulinizaciji vedenjskih vzorcev (Nishizuka in Arai, 1981, 1982). Razlike so našli tudi na ultracelični ravni; število povezav nevronov z dendriti v MeA je pri podganah večje pri samcih kot pri samicah. Tvorbo sinaps naj bi urejali spolni hormoni v neonatalnem obdobju, čeprav se število sinaps pri samcih poveča šele po dnevu P21 (Nishizuka in Arai, 1981, 1983). Vpliv spolnih hormonov na morfologijo živčnih celic in sinaps ter na število sinaps v odraslem obdobju ni znan. Najverjetneje testosteron in estrogeni sočasno ali v različnih obdobjih vplivajo na pravilen, spolno specifičen razvoj MeA (Cooke in sod., 2003; Morris in sod., 2008a). Pri miših seva BALB/c obstajajo podobne spolne razlike v področju MePD kot pri podganah (Morris in sod., 2008b), pri miših seva C57BL/6J spolnih razlik v prostornini MeA niso odkrili (Cooke in sod., 1998). Mogoče pri miših obstajajo spolne razlike v holinergičnih povezavah s področjem mandlja, ker se je pri samcih v področju MeA vezalo več alfabungarotoksina, na kapaciteto vezave pa je vplivala kastracija samcev (Arimatsu in sod., 1981).

2.1.1.5 Ventromedialno jedro hipotalamusa (VMH)

Jedro VMH se nahaja v srednjem delu hipotalamusa na obeh straneh tretje možganske kletke. Pri miših se nevroni VMH v področju sprednjih možganov pojavijo okoli dneva E12,0, vendar se jedro VMH oblikuje šele na dan E17,0. Jedro VMH oživčujejo nevroni iz področij MeA, LS, BNSTMP, mPOA, sprednjega hipotalamusa, epitalamusa in talamusa. Nevroni VMH pa tvorijo eferentne povezave z nevroni supraoptičnega jedra (*angl.* supraoptic nucleus, SON), arkvatnega jedra, središčne štrline (mediana eminenca), mandlja, POA, jedri srednjih možganov in podaljšane hrbtenjače. Povezave med jedri so proučevali pri miših, podganah in morskih prašičkih. VMH je center za uravnavanje spolnega vedenja (materinsko obnašanje, lordoza) in energetskega stanja v telesu (Madeira in Lieberman, 1995). Ventromedialno jedro razdelimo na tri manjša področja, dorzo-medialno, centralno in ventro-lateralno področje. Posamezna področja se med seboj razlikujejo po izraženosti beljakovin, eferentnih povezavah in po funkciji (McClellan in sod., 2006).

VMH uvrščamo med tista spolno različna jedra, ki so večja pri samcih kot samicah (vsaj pri podganah), čeprav je velikost posameznih nevronov večja pri samicah (Dorner in Staudt, 1969). Kastracija na dan P1 (ne pa pozneje, npr. P7) povzroči feminizacijo, ki se kaže v zmanjšanju prostornine in povečanju velikosti nevronov pri samcih v primerjavi s kontrolnimi samci (Dorner in Staudt, 1969). Takšni samci pa ob prisotnosti estrogenov in progesterona kažejo pogostejšo lordozo. Pri samcih nevroni v ventrolateralnem delu VMH tvorijo več aksodendritskih sinaps v primerjavi s samicami, fenotip pa je odvisen od izpostavljenosti hormonom med embrionalnim razvojem. Teh razlik niso našli v dorzomedialnem delu VMH (Matsumoto in Arai, 1986). Znane so tudi spolne razlike v številu nevronov, za številne prepise strukturnih genov in beljakovine. Število nevronov, ki izražajo nevralno sintazo dušikovih oksidov (angl. neural nitric oxide, nNOS), kalbindin D-28k in ESR, je pri miših večje pri samicah (Yokosuka in sod., 1997; Ikeda in sod., 2003; Budefeld in sod., 2008), podganji samci pa imajo večje število nevronov, ki izražajo holecistokinin (angl. cholecistokinine, CCK) (Micevych in sod., 1987). Področje VMH je eno izmed tistih, kjer se vpliv razlik v spolnih hormonih med spolnim ciklom izrazito kaže na ravni izraženosti beljakovin (Luine in Hearns, 1990; Lauber in sod., 1991; Funabashi in sod., 1995).

2.1.1.6 Področje stranskega pretina (LS)

Področje LS se nahaja antero-dorzalno od predoptičnega področja ob stranski možganski kletki (*angl.* lateral ventricle, LV). Sodeluje pri nastanku neagresivnih vrst socialnega obnašanja (Gatewood in sod., 2006; Veenema in Neumann, 2008). Glede spolnih razlik je področje stranskega pretina pomembno zaradi razlik v vsebnosti AVP. Nevroni jedra BNST in mandlja, ki izražajo AVP, pošiljajo aksone v področje LS; gostota aksonov, ki vsebujejo AVP, je višja pri samcih kot samicah pri številnih vrstah (zbrano v De Vries in Panzica, 2006). Vsebnost AVP v LS je odvisna od spolnih hormonov. Po sterilizaciji imunohistokemijsko ne zaznamo prisotnosti AVP, tretiranje s testosteronom pa povrne imunoreaktivnost. Na razvoj spolnih razlik v izraženosti AVP pri miših naj bi vplivala tudi prisotnost komplementa spolnih kromosomov (De Vries in sod., 2002).

2.1.1.7 Vomeronazalni sistem

Vomeronazalni sistem sodeluje pri prenosu in odzivih na dražljaje, ki jih izzovejo feromonske molekule v vomeronazalnem organu, ki leži na dnu nosnih školjk in se procesirajo v možganskih centrih za uravnavo endokrinih, motivacijskih in motoričnih funkcij. Vomeronazalni sistem sestavljajo vomeronazalni organ in številna med seboj povezana 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 (opisano v Cooke in sod., 1998). Pri glodalcih je sestava vomeronazalnega sistema spolno dimorfna, spolne razlike pa so prisotne že v vomeronazalnem organu (Segovia in Guillamon, 1982; Herrada in Dulac, 1997). Vomeronazalni sistem naj bi sodeloval predvsem pri urejanju razmnoževanja pri glodalcih (Halpern, 1987), kar pa ni popolnoma jasno raziskano pri ljudeh in primatih (Stern in McClintock, 1998).

2.1.1.8 Hipokampus

Hipokampus uvrščamo med evolucijsko najstarejši del možganske skorje (arhepalium). Hipokampus sestavljajo naslednja področja: hipokampus (Amonov rog; *Cornu Ammonis*, CA), hipokampusova vijuga (*gyrus parahippocampalis*), nazobčana vijuga (*gyrus dentatus*), hipokampusova vlakna (*fimbria hippocampi*) in svod (*fornix*). Amonov rog in nazobčana vijuga sta sestavljena iz treh plasti nevronov, področje hipokampusove vijuge je prehodno področje med hipokampusom in evolucijsko najmlajšim delom skorje (neopalium), zato ga sestavlja od tri do šest plasti nevronov. Področje hipokampusa je odgovorno za učenje, prostorsko orientacijo in za spomin. Primerjava različnih sevov miši je pokazala, da obstojajo razlike v številu nevronov v zrnatem celičnem sloju hipokampusa med sevi. Pri sevih z večjim številom nevronov so imeli samci večje število zrnatih nevronov kot samice, pri tistih sevih, kjer je bilo število nevronov manjše pri obeh spolih, pa spolnih razlik v številu nevronov ni bilo. Gostota zrnatih celic v okviru posameznega seva pa je bila nižja pri samicah pri vseh mišjih sevih (Wimer in Wimer, 1985). Pri podganah so odkrili, da imajo samci širšo plast zrnatih celic v nazobčani vijugi (*angl.* dentate gyrus granular cell layer, DG-GCL) kot samice in da spolni hormoni vplivajo na število zrnatih celic. Samice podgan, tretirane z androgeni v obdobju ob rojstvu, so imele povečano število zrnatih celic v primerjavi s kontrolnimi živalmi. Razlika v številu zrnatih celic je bila prisotna že pred puberteto, kar pomeni da spolni hormoni med puberteto ne vplivajo na število zrnatih celic v plasti nazobčane vijuge (Roof in Havens, 1992; Roof, 1993).

Število aferentnih povezav iz komisure v nazobčano vijugo se ne razlikuje med spoloma. Pri samicah je bilo število povezav odvisno od prisotnosti spolnih hormonov. Na število povezav pri samcih kastracija ali tretiranje s spolnimi hormoni ni vplivalo, kar pomeni, da se mehanizmi, ki sodelujejo pri nastanku povezav, najverjetneje razlikujejo med spoloma (Morse in sod., 1986).

Večji del hipokampusa predstavljajo področja CA. V področju CA1 ni opisanih razlik med spoloma, področje CA3 pa se razlikuje v naslednjih značilnostih: gostota izrastkov na apikalnih dendritih je večja pri samcih, število primarnih dendritov (gre za dendrite na bazi piramidalnega nevrona) pa je večje pri samicah (Gould in sod., 1990). Vzroki in mehanizmi nastanka spolnih razlik niso znani.

Pri mongolskih puščavskih podganah so ugotovili, da ima hipokampus pri samcih večjo prostornino kot pri samicah, na velikost hipokampusa pa naj bi vplivala izpostavljenost spolnim hormonom, tudi tistim iz sosednjih zarodkov v maternici (Sherry in sod., 1996). Podobne spolne razlike v velikosti, ki naj bi samcem omogočale poligamnost, so našli tudi pri kengurujskih podganah (Jacobs in Spencer, 1994).

Hipokampus ima vlogo pri učenju in prostorski orientaciji, zato na njegovo strukturo vplivajo tudi okolje in izkušnje, ki jim je izpostavljen organizem. Število zrnatih nevronov v nazobčani vijugi je bilo pri podganah v pozitivni korelaciji z uspešno opravljeno nalogo pri testu z vodnim labirintom (test za prostorsko orientacijo in pomnjenje, Roof in Havens, 1992). Pri podganjih samicah, ki so odraščale v okolju, bogatim z različnimi predmeti, so imeli nevroni večje število dendritov kot pri podganah, ki so odraščale v praznih kletkah (Juraska, 1984). Pri podganjih samcih takšnega vpliva okolja niso dokazali. Pri vrsti kengurujske podgane, katere predstavniki shranjujejo semena na različnih mestih, je velikost hipokampusa večja kot pri vrsti, katere predstavniki shranjujejo hrano na eno mesto (Jacobs in Spencer, 1994). Pri poligamni vrsti voluharic (ameriška travniška voluharica), imajo

samci večji hipokampus kot samice, pri monogamni vrsti (ameriška smrekova voluharica) pa spolne razlike ne obstajajo (Jacobs in sod., 1990). Tako domnevajo, da velikost hipokampusa poligamnim samcem omogoča, da si zapomnijo mesta domovanja spolnih partnerjev.

Opisane so tudi spolne razlike na ravni dolgotrajnih postsinaptičnih potencialov pri nevronih hipokampusa, ki so odgovorni za kratkoročni spomin in pogojeni strah. Ugotovili so, da spolni hormoni, natančneje 17ß-estradiol in testosteron, povečajo nastajanje dolgotrajnih postsinaptičnih akcijskih potencialov (*angl.* long term potentiation, LTP) v nevronih področja CA1 (Teyler in sod., 1980; Foy in sod., 1984). Dolgotrajna postsinaptična vzdražnost nevronov nazobčane vijuge je bila spolno specifična; nevroni samcev so kazali več potencialov LTP kot enako stare samice; vzdražnost nevronov je bila v pozitivni korelaciji z aktivacijo N-metil D-aspartatnih receptorjev (Maren in sod., 1994).

2.1.1.9 Motorni nevroni hrbtenjače pri podganah

V petem in šestem ledvenem odseku hrbtenjače se nahajata dve skupini teles motornih nevronov, ki oživčujeta mišice penisa. Čebulno-brecilna skupina motornih nevronov (angl. sexually dimorphic nucleus of bulbocavernosus, SNB) oživčuje čebulno-brecilno mišico (m. bulbocavernosus) in mišico vzdigovalko zadnjika (m. levator ani), druga dorzolateralna skupina motornih nevronov (angl. dorsolateral nucleus, DLN) pa oživčuje sednično-prisilno mišico (m. ichicavernosusa) (Breedlove, 1984). Normalno se te mišice pri samicah ne razvijejo, vendar je jedro DLN prisotno, a z manj in manjšimi nevroni (Jordan in sod., 1982). Jedro SNB ni posebej očitno pri samicah in je sestavljeno iz manjšega števila nevronov, ki so po velikosti manjši kot pri samcih (Breedlove in Arnold, 1980). Homologna spolno specifična jedra najdemo tudi pri miših (Wee in Clemens, 1987), psih in pri ljudeh (Forger in Breedlove, 1986). Značilnost nevronov v SNB in DLN je, da izražajo AR. Na velikost in število nevronov v SNB in DLN v glavnem vpliva izpostavljenost testosteronu. Kastracija samcev in tretiranje sterilnih samic s testosteronom v odraslem obdobju feminizira oziroma maskulinizira morfološke značilnosti jeder, vendar popolnega obrata fenotipa števila in velikosti nevronov ni mogoče doseči (Breedlove in Arnold, 1981). Kritična za normalen razvoj jeder v smislu števila celic je izpostavljenost spolnim hormonom v prenatalnem in zgodnjem postnatalnem obdobju (Breedlove in Arnold, 1983a), za razvoj in ohranjanje velikosti celic pa je nujna stalna prisotnost testosterona (Breedlove in Arnold, 1983b). Razvoj spolnih razlik v jedru SNB je dobro proučen in poteka pri podganah v dveh fazah. Nevroni se pojavijo pred aktivnostjo spolnih žlez pred obdobjem E14,0–E15,0, zato nevrogeneza poteka pri obeh spolih enako (Breedlove in sod., 1983). Nato nevroni potujejo iz mesta nastanka iz stranskega stolpca hrbtenjače proti sredini hrbtenjače na mesto jedra SNB. Zaradi potovanja nevronov se v tem času povečuje število nevronov v SNB, vendar se pri samcih povečuje bolj kot pri samicah, kar je lahko posledica vpliva spolnih hormonov na proces potovanja (Nordeen in sod., 1985; Sengelaub in Arnold, 1986). V tem času nevroni jedra SNB tvorijo povezave s tarčnimi mesti, kar lahko vpliva na preživetje nevronov in je lahko spolno specifično (Sengelaub in Arnold, 1986). Dokončne razlike med spoloma se razvijejo v zgodnjem postnatalnem obdobju, ko se v procesu apoptoze izgubi pri samicah več celic (70 %) kot pri samcih (25 %) (Nordeen in sod., 1985). Mehanizmi, ki omogočajo preživetje nevronov ali preprečujejo izgubo nevronov, so glavni dejavnik, ki prispeva k razvoju spolnih razlik v jedru SNB.

Zaradi specifičnega izražanja AR estrogeni ne vplivajo na razvoj jedra SNB (Breedlove in sod., 1982). Kot so potrdile farmakološke raziskave z uporabo antagonistov hormonskih receptorjev (Breedlove in Arnold, 1983a) in genetski modeli (podgane Ar^{tfm} (Breedlove in Arnold, 1981)), je za pravilen razvoj jedra SNB potreben le testosteron.

Nevroni jeder SNB in DLN, ki oživčujejo mišice penisa, so odgovorni le za pravilno delovanje penisa (Sachs, 1982). Zato so podganji samci z nepravilno razvitim jedrom SNB manj učinkoviti pri razmnoževanju. Prisotnost normalno razvitega jedra SNB ne sovpada s sposobnostjo kopulatornega obnašanja pri odraslih podganah. Samci, ki nimajo normalno razvitega jedra SNB, so zmožni naskakovanja (Breedlove in Arnold, 1983a), samice z moško obliko jedra pa ne razvijejo kopulatornega obnašanja (Breedlove in Arnold, 1983b). Sposobnost kopulatornega obnašanja torej ni odvisna od razvitosti jedra SNB. Za razvoj kopulatornega obnašanja sta nujna izpostavljenost estrogenom in pravilno razvito področje POA.

2.1.1.10 Sistem podpornih celic – nevroglia

Podporne celice nevroglie po številu do desetkrat presegajo število živčnih celic. Odgovorne so za pravilno nameščanje nevronov, oskrbo nevronov s hranili in kisikom, tvorbo mielina, prenos sporočil, odstranjevanje mrtvih nevronov in predstavljajo imunske celice v živčnem sistemu. Zaradi tesne interakcije z nevroni prispevajo tudi k spolno dimorfnemu razvoju živčevja. Spolne razlike v številu nevronov v določenem območju so lahko posledica razlik v potovanju nevronov v neko območje (Dupouey in sod., 1985). Celice nevroglie predstavljajo substrat ali osnovo, po kateri se nevroni lahko premikajo, tj. v področjih, ki imajo plastno, laminarno strukturo (skorja malih možganov), in nelaminarno organiziranih področjih (hipotalamus; Levitt in Rakic, 1980). Radialna glia predstavlja eno izmed skupin nevroglie, katerih primarna vloga je pri potovanju nevronov. Celice radialne glie so prisotne v večini področij možganov le kratek čas v embrionalnem razvoju, nato pa izginejo. Nekatere se lahko spremenijo v astrocite, ponekod (mrežnica, mali možgani) pa ostanejo in spremenijo nekatere prvotne značilnosti. Z imunohistokemičnimi metodami so pokazali, da hipotalamus vsebuje več celic radialne glie pri samicah kot samcih in da je razmerje v POA na dan E19,0 nasprotno. To pomeni, da so spolne razlike v omenjenih področjih možganov deloma lahko posledica razlik v potovanju nevronov, zaradi spolno specifične zastopanosti celic radialne glie (Jacobson in sod., 1985). Druga skupina celic nevroglie, ki so lahko odgovorne za spolno različen razvoj možganov, so tanicite, ependimske celice, ki nimajo cilij in izgrajujejo steno prekatov. V možganih so prisotne vse življenje in sodelujejo pri transportu snovi med možganskim tkivom, kapilarami in možgansko tekočino (Flament-Durand in Brion, 1985). Kot sta predpostavila Akmayev in Fidelina (1976, 1981), bi bili lahko taniciti odgovorni za spolno različen razvoj, ker sta ugotovila, da je bila vsebnost beljakovin pri določenih celicah spolno specifična in uravnana s hormoni. Najštevilčnejša populacija med celicami nevroglie so astrociti. Njihova aktivnost (merjena po vsebnosti mešičkov), ki ni posledica fagocitozne aktivnosti, v arkvatnem jedru pri podganah narašča s starostjo in je delno odvisna od prisotnosti hormonov jajčnikov. Takšna aktivnost torej ni prisotna pri samcih in steriliziranih samicah (Schipper in sod., 1981). Aktivnost astrocitov poveča tudi tretiranje samic z estradiolom pred puberteto in je odvisno od prisotnosti jajčnikov (Brawer in sod., 1978; Brawer in sod., 1980).
Vlogo spolnih steroidnih hormonov na podporne celice glie dodatno potrjujejo naslednji primeri. V hipokampusu in področju bledice (bledo jedro, *globus pallidum*) je tretiranje z estrogeni povečalo količino fibrilarnega kislega proteina, specifičnega za astrocite (*angl.* glial fibrillary acidic protein, GFAP, Tranque in sod., 1987), pri pticah pa je testosteron vplival na povečano število celic nevroglie (Goldman in Nottebohm, 1983). Celice mikroglie naj bi vsebovale encim 5 α -reduktazo, ki je udeležen pri metabolizmu steroidnih hormonov (Canick in sod., 1986). Vsi primeri potrjujejo, da spolni hormoni vplivajo na podporne celice in da so te celice udeležene pri urejanju delovanja spolnih hormonov, kar delno lahko prispeva k spolno različnemu razvoju možganov.

2.1.1.11 Spolne razlike v možganih pri ljudeh

O vplivu spolnih hormonov na razvoj človeških možganov ni veliko znanega. Opisanih je bilo nekaj spolnih razlik v odraslih možganih, vendar mehanizmi razvoja teh razlik niso dobro proučeni zaradi velike plastičnosti možganov pri ljudeh. Morfološke razlike med spoloma so tako lahko posledica izpostavljenosti spolnim hormonom ali pa razlik pri izpostavljenosti različnim izkušnjam. Za proučevanje vpliva spolnih hormonov so najprimernejši možgani zarodkov ali otrok, vendar je takšnih primerov v literaturi malo. Ena izmed znanih razlik ob rojstvu je teža možganov (Pakkenberg in Gundersen, 1997), ki pa je povezana s težo novorojenčkov in je lahko posledica posrednega delovanja spolnih hormonov in ne njihovega neposrednega vpliva. Tako lahko spolni hormoni vplivajo na izločanje drugih dejavnikov, kot so rastni dejavniki, ki so odgovorni za velikost organov in telesa. Edini opisani spolni razliki v možganski strukturi pri človeških zarodkih sta oblika in velikost posameznih področij možganskega prečnika (de Lacoste in sod., 1986), vendar pa nekateri drugi raziskovalci niso uspeli potrditi vseh opažanj deLacosteja in sodelavcev (Byne in sod., 1988). O spolnih razlikah v velikosti in obliki možganskega prečnika pri odraslih možganih so opažanja različna (Bishop in Wahlsten, 1997). Najbolje opisano spolno različno področje v človeških možganih je spolno dimorfno jedro v predoptičnem področju, ki se pri ljudeh imenuje intersticialno jedro sprednjega hipotalamusa 1 (angl. interstitial nucleus of the anterior hypothalamus 1; INAH1) in pripada skupini intersticialnih jeder 2, 3 in 4 v predoptičnem področju (INAH2, 3, 4). Jedro INAH1 naj bi bilo večje in naj bi vsebovalo več živčnih celic pri moških kot pri ženskah (Swaab in Fliers, 1985). Teh razlik pa niso opazili pri otrocih, starih 6-10 let (Hofman in Swaab, 1989). Allen in sod. (1989) so odkrili spolne razlike v jedrih INAH2 in INAH3, razlik v INHA1 pa niso potrdili, kar kaže, kako težko je proučevati spolne razlike v človeških možganih. V primerjavi z jedrom INAH1 raziskav o razvoju jeder INAH2 in INAH3 med embrionalnim razvojem ni, tako da ni znano, ali obstajajo spolne razlike v teh jedrih že v obdobju pred rojstvom. Na razvoj razlik v odraslem obdobju namreč lahko prispevajo tudi zunanji vplivi. Pri ljudeh obstajata raziskavi o velikosti celotnega področja mandlja. Z uporabo volumetrične magnetne resonance so pri otrocih odkrili, da je področje mandlja pri punčkah manjše kot pri fantkih (Caviness in sod., 1996). Raziskava možganov pri ljudeh od 35 tednov starih plodov do 94 let starih ljudi, ob upoštevanju velikosti možganov in njihove starosti, pa spolnih razlik v prostornini MeA na levi ali desni strani ni pokazala (Murphy, 1986). Pri ljudeh so znane razlike v velikosti med levo in desno polovico hipokampusa (desna večja od leve), razlik med spoloma pa do zdaj niso odkrili (Fukuzako in sod., 1997; Giedd in sod., 1997). Velikost hipokampusa pa se spreminja s starostjo zaradi razlik v mentalni aktivnosti in predvsem pri ženskah zaradi zmanjšanja izločanja spolnih hormonov. Spremembe v velikosti hipokampusa se pojavljajo tudi pri nekaterih nevrodegenerativnih boleznih.

Druga možnost proučevanja vpliva spolnih hormonov na razvoj človeških možganov vključuje proučevanje vedenjskih razlik pri ljudeh z motnjami v izpostavljenosti spolnim hormonom. Zaradi prirojene hiperplazije nadledvičnih žlez (*angl.* adrenal hyperplasia congenita, AHC) so ženski zarodki s to boleznijo izpostavljeni povišani koncentraciji androgenih hormonov iz nadledvične žleze. Ženske s sindromom AHC so po vedenju bolj podobne moškim in pogosteje spolno privlačijo ženske (Ehrhardt in Meyer-Bahlburg, 1981; Berenbaum in Hines, 1992). Drugi takšen model so moški s sindromom popolne neodzivnosti na androgene zaradi okvarjenega gena za *AR*. Ob popolnem nedelovanju AR so takšni moški po videzu ženske, imajo nespuščena moda v trebušni votlini in ženske zunanje spolne organe (imajo sramnico, klitoris in slepo nožnico); kažejo intelektualne lastnosti, ki so bolj značilne za ženske (slabša prostorska predstava, boljše komunikacijske sposobnosti) (Money in sod., 1984).

Pri ljudeh je opisan primer spolne razlike, ki sovpada s spolno usmerjenostjo pri moških. Homoseksualno usmerjeni moški (13 osebkov od 16) naj bi imeli manjše, feminizirano jedro INAH3 v primerjavi s heteroseksualnimi moškimi (LeVay, 1991). Homoseksualni moški naj bi v primerjavi s heteroseksualnimi moškimi imeli tudi večje suprakiazmatično jedro (Swaab in Hofman, 1990) in večjo sprednjo komisuro (Allen in Gorski, 1991), vendar teh izsledkov ni potrdilo več neodvisnih laboratorijev. Poleg tega so bile te meritve izvedene na odraslih osebkih, ko se je spolna orientacija že izrazila, zato ne moremo trditi, da so bile razlike v strukturi možganov vzrok za spolno usmerjenost ali pa so razlike v strukturi nastale zaradi različnega obnašanja.

2.2 RAZVOJ SPOLNIH ŽLEZ IN DIFERENCIACIJA SPOLNIH ORGANOV

2.2.1 RAZVOJ SPOLNIH ŽLEZ

Razvoj spolnih žlez se razlikuje od razvoja vseh drugih tkiv v organizmu. Vsi zametki organov se lahko diferencirajo le v točno določen organ, zametek spolnih žlez pa je bipotencialen, saj se lahko razvije v modo ali jajčnik (Gilbert, 1994b).

Pri ljudeh se spolni greben pojavi v vmesnem področju mezoderma pri štirih tednih starosti in ostaja spolno nediferenciran do sedmega tedna. Spolni greben se razvije na ventralni strani mezonefrosa, primitivne ledvice zarodka, ki se pri samcih pozneje razvije v nadmodek, pri samicah pa propade. Med začetnim razvojem se celice epitelija spolnega grebena delijo in oblikujejo tanko mezenhimalno vezivno tkivo nad epitelijem. Te epitelne plasti oblikujejo spolne nitke. Zarodne celice okoli šestega tedna potujejo iz epiblasta v nastajajoče spolne žleze, v predele spolnih nitk, ki jih obdajajo. Pri obeh spolih spolne nitke ostajajo povezane s površinskim epitelijem (Gilbert, 1994b, 1994a).

Če je zarodek moškega spola, se razvoj spolnih niti nadaljuje, pri čemer se zgodi razširjanje niti v okolno vezivno tkivo. Na tej stopnji se niti spojijo v mrežo spolnih niti sredice in v najbolj oddaljenem delu od epitelija v tanko strukturo *rete testis*. Nato nastale spolne niti, ki se na tej stopnji imenujejo niti mod, izgubijo stik s površinskim epitelijem, ki oblikuje debel zunajcelični matriks, ki zdaj ločuje niti mod in se imenuje *tunica albuginea*. Med puberteto se niti razvijejo v semenske kanalčke in spolne celice se začnejo razvijati v semenčice (Gilbert, 1994b).

Celice semenskih kanalov oziroma niti mod se imenujejo Sertolijeve celice in so prve celice, ki se pojavijo v razvijajočem se modu. V odraslem modu oskrbujejo spolne celice, v modu zarodkov pa izločajo AMH, ki je odgovoren za propad Müllerjevih vodov. Nekoliko pozneje kot Sertolijeve celice se intersticialne celice mezenhima razvijejo v Leydigove celice, ki izločajo spolni hormon testosteron (Gilbert, 1994b, 1994a).

Pri zarodkih samic se zarodne celice nahajajo v bližini zunanjega predela spolne žleze. V nasprotju s samci, pri katerih se oblikovane spolne nitke razvijajo naprej, spolne niti pri samicah propadejo. Epitelij spolnih žlez kmalu začne oblikovati nove spolne niti, ki pa se ne razvijajo globoko v mezenhimu, ampak ostajajo v bližini zunanje površine organa in se zato imenujejo spolne niti skorje. Spolne niti se razdelijo v skupke in vsak skupek obdaja zarodno celico. Zarodne celice se v odraslem obdobju razvijejo v jajčne celice, skupki okolnih celic spolnih niti skorje pa se razvijejo v celice granuloze. Celice teke nastanejo iz mezenhimskih celic jajčnikov. Pri samicah se Müllerjev vod razvije v jajcevod, maternico, vrat maternice in v zgornji del nožnice. Wolffovi vodi pa zaradi pomanjkanja testosterona propadejo (Gilbert, 1994b).

2.2.2 LEYDIGOVE CELICE

Pri glodalcih obstajata dve različni populaciji Leydigovih celic, tj. Leydigove celice zarodka in odrasle Leydigove celice. Celice se ločijo po ultrastrukturi, življenjski dobi, zmožnosti tvorbe androgenov in po mehanizmih urejanja delovanja. Ena najpomembnejših razlik je večja zmožnost proizvodnje testosterona v zarodkovih Leydigovih celicah v primerjavi z odraslimi Leydigovimi celicami. Poleg tega Leydigove celice v zarodku ob daljši izpostavljenosti ne postanejo neobčutljive na LH, kar je značilno za odrasle Leydigove celice. LH, ki ga izloča hipofiza, je najpomembnejši hormon, ki spodbuja nastajanje testosterona, čeprav LH nima vloge pri začetnem razvoju Leydigovih celic, saj le-te začnejo proizvajati testosteron, preden hipofiza začne izločati LH, prav tako pa v tem času Leydigove celice še ne izražajo receptorjev za LH (George in sod., 1979; Majdic in sod., 1996; El-Gehani in sod., 1998; O'Shaughnessy in sod., 1998). Poleg LH številni rastni dejavniki spreminjajo razvoj, obnovo in zmožnost tvorbe steroidnih hormonov v Leydigovih celicah: IL-1 α (interlevkin 1 α), TGF- β (*angl.* transforming growth factor), inhibin, IGF I in II (*angl.* insuline like growth factor I, II), rastni dejavnik žilnega endotelija in relaksinu podoben rastni dejavnik. Primer različnih mehanizmov urejanja ponazarjata retinol in retinojska kislina, ki v odraslih Leydigovih celicah povečata tvorbo in izločanje testosterona, v celicah zarodka pa imata nasproten učinek. Za razvoj, delovanje in za staranje Leydigovih celic so pomembni makrofagi, ki se nahajajo v intersticialnem tkivu mod in so v neposrednem stiku z Leydigovimi celicami. Makrofagi v modih predstavljajo tudi pomemben izvor citokinov, ki urejajo apoptozo in s tem število Leydigovih celic v modih (Hales, 2002). Značilnosti staranja Leydigovih celic so vrstno specifične pri glodalcih (Haider, 2004).

2.2.3 IZVOR SPOLNIH CELIC PRI SESALCIH

Z uporabo protiteles proti membranskim beljakovinam, specifičnim za spolne celice in s histokemičnimi metodami za ugotavljanje alkalne fosfataze, ki jo vsebujejo spolne celice, so pokazali, da spolne celice pri sesalcih izvirajo pri zarodkih in se nahajajo pri zarodkih v obdobju gastrulacije v epiblastu, natančneje v področju, ki se razvije v zunajembrionalni mezoderm. Na dan E7,0-E7,25 je pri miših prisotnih okoli osem velikih celic (predhodniki spolnih celic), pozitivnih za alkalno fosfatazo (Ginsburg in sod., 1990). Če to področje odstranimo, se zarodek razvije brez spolnih celic. Ex vivo pa se iz odstranjenega področja razvije veliko število predhodnikov spolnih celic. Celice, iz katerih se razvijejo spolne celice, potujejo iz področja zunajembrionalnega mezoderma nazaj v zarodek prek alantoisa. Potem ko se celice zberejo na področju alantoisa (na dan E7,5-E8,0 pri miših), sledi potovanje v rumenjakovo vrečko. V tem času so se celice že razdelile v dve populaciji, ki bosta naselili vsaka svoj spolni greben. Celice se nato premaknejo kavdalno iz rumenjakove vrečke skozi novo oblikovano zadnje črevo in nato skozi dorzalni mezenterij v spolni greben. Večina predhodnikov zarodnih celic pri miših doseže razvijajočo se spolno žlezo do dneva E11,0. Med potovanjem se celice tudi delijo in iz populacije 10–100 celic nastane do dneva E12,0 v spolni žlezi 2.500–5.000 celic (Gilbert, 1994a).

2.2.4 SRY: OSREDNJI GEN ZA DOLOČITEV SPOLA

Gen SRY sestavlja en ekson z zapisom za homeo-zaporedje (angl. HMG-box) za vezavo na DNK, ki sodeluje pri upogibanju DNK (Pontiggia in sod., 1994). Pomembnost dela zapisa za HMG-vezavni element kažejo mutacije v tem predelu, ki imajo za posledico napačen razvoj mod ali popolno odsotnost mod (Veitia in sod., 1997). Mutacije pa so našli tudi v neprevedenih območjih gena SRY in so prav tako povezane z nepravilnim razvojem mod ali s popolno odsotnostjo mod (McElreavey in sod., 1992; McElreavey in sod., 1996). Znani so tudi primeri dedovanih mutacij v SRY, ki v redkih primerih lahko povzročijo popolno odsotnost spolnih žlez in spremembo fenotipskega spola pri potomcih (Jager in sod., 1992; Vilain in sod., 1992). V teh primerih so imeli moški z mutacijo v genu SRY, ki so imeli potomce, normalno razvita moda in so bili plodni. V primeru, ki ga je opisal Jäger in sod. (1992), aktivnost mutiranega SRY v tej družini ni bila spremenjena. O možnosti za prisotnost dveh različnih fenotipov (XY-moški, XY-ženske z nepravilno razvitimi spolnimi žlezami) med potomci iste generacije obstajajo različne hipoteze. Kot predpostavljajo Vilain in sod. (1992), bi fiziološko stanje zarodka, matere in genetsko ozadje lahko vplivali na aktivnost mutiranega gena SRY. V tej družini bi bil spol lahko uravnan tudi s katerim drugim lokusom ali pa z interakcijo med genom SRY in za spol odvisnim alelom na drugem lokusu.

Pri miših se SRY izraža v telesnih celicah spolnega grebena, ki se bodo razvile v Sertolijeve celice, tj. v času od dneva E10,5 do dneva E12,5 z največjo izraženostjo na dan E11,5 (Gubbay in sod., 1990; Hacker in sod., 1995). Pri moških se prepis SRY začne pojavljati na dan E41,0, doseže najvišjo stopnjo izražanja na dan E44,0, nato pa ostaja prisoten v nizkih koncentracijah v Sertolijevih celicah ves čas embrionalnega razvoja (Hanley in sod., 2000). Pri moških je beljakovina SRY prisotna v jedrih Sertolijevih celic v obdobju pred rojstvom in po rojstvu, kar nakazuje, da je SRY prisoten od časa razvoja mod do obdobja odraslosti (starejših moških od 32 let niso proučevali). Podoben vzorec izražanja so ugotovili tudi pri prašičih in prežvekovalcih (Payen in sod., 1996; Parma in sod., 1999). V nasprotju pa je pri glodalcih gen *Sry* izražen le krajši čas. Pri hermafroditih pri ljudeh je SRY prisoten v obeh strukturah, tj. delu mod (spolne in Sertolijeve celice) in delu jajčnikov (jedra oogonijev in folikularnih celic) (Salas-Cortes in sod., 2000). Zato nedelujoč gen *SRY* povezujejo s pojavom popolnega propada mod, vendar brez drugih razvojnih napak, kar kaže, da je edina funkcija gena *SRY* urejanje razvoja spolnih žlez.

Poleg gena *SRY* pri razvoju spolnih žlez sodelujejo še številni drugi geni; mutacije v nekaterih izmed teh genov lahko prav tako povzročijo napake v razvoju. Mutacije v genu *SRY* so namreč uspeli ugotoviti le v 20 % primerov XY-žensk, pri 80 % XY-žensk pa je bil gen *SRY* nemutiran in vzrok napak so pri teh pacientih najverjetneje mutacije v katerem izmed drugih genov, pomembnih za razvoj moda (Veitia in sod., 2001).

Vloga gena *SRY* je torej sprožiti razvoj moda iz nerazvite spolne žleze, pozneje pa razvoj uravnavajo številni drugi geni. Gen *Sry* v celicah spolnih grebenov sproži tudi izločanje kemotaktičnih dejavnikov, ki vodijo potovanje spolnih zarodnih celic iz mezonefrosa v spolne grebene (Tilmann in Capel, 1999). Te prispele celice mezonefralnega izvora spodbujajo razvoj Sertolijevih celic. Tako obstaja povezava med prisotnostjo SRY v spolnih grebenih, potovanjem celic mezonefrosa in med tvorbo niti mod. Pokazali so tudi, da so celice mezonefrosa ključne pri tvorbi spolnih niti (Skinner in sod., 1985) in da potujoče celice iz mezonefrosa povzročijo diferenciacijo celic XX v predhodniku spolnih žlez v Sertolijeve celice, ki so ključne za tvorbo niti mod (Veitia in sod., 2001).

2.2.5 DRUGI GENI, KI SODELUJEJO PRI RAZVOJU SPOLNIH ŽLEZ IN ORGANOV

Proučevanje primerov delne ali popolne odsotnosti spolnih žlez in organov, ter spremembe fenotipskega spola pri ljudeh in živalih je pripeljalo do odkritja številnih genov, ki sodelujejo pri razvoju in diferenciaciji spolnih žlez.

Gen Wilmsovega tumorja 1 (*Wt1*, *WT1*) kodira prepisovalni dejavnik, ki neposredno uravnava prepisovanje gena *Sry* (Hossain in Saunders, 2001). Gen *Wt1* se pri miših izraža v predelu mezonefrosa, nastajajočih ledvicah (metanefros) in spolnem grebenu od dne E9,0 naprej (Mundlos in sod., 1993). Miši brez gena *Wt1* kažejo ženski fenotip ne glede na kromosomalni spol (spolne žleze niso razvite) in umrejo pred rojstvom zaradi odsotnosti ledvic (Kreidberg in sod., 1993). Pri ljudeh mutacije v genu *WT1* povzročajo dva različna sindroma, in sicer sindrom Denis-Drash in sindrom Frasier. Pacienti s sindromom Denis-Drash (DDS) kažejo napake v zgodnjih začetkih oblikovanja ledvic, pri moških pacientih so prisotni tudi napačno razviti spolni organi (Pelletier in sod., 1991). Pomemben delež pacientov s sindromom Denis-Drash je heterozigotov z mutacijami v genu *WT1* (Little in

Wells, 1997). Nekatere mutacije v izoobliki gena *WT1* (+*KST*) so odgovorne tudi za Frasierjev sindrom, za katerega so značilni nerazvitost spolnih žlez in pozni, vendar progresivni pojav glomerulopatije. Pri moških se razvijejo ženski spolni organi in slabo razvite spolne žleze (Barbaux in sod., 1997). Pri otrocih, heterozigotih za mutacije v genu *WT1*, se razvije tudi maligni rak ledvic (Wilmsov tumor) (Hossain in Saunders, 2003). Mutacije v genu *WT1* so povezane tudi s sindromom WAGR (*angl.* Wilms tumor, aniridia, genitourinay anomalies and mental retardation), za katerega so med drugim značilne tudi nepravilnosti v razvoju urogenitalnega trakta, vendar pa pri sindromu WAGR gen *WT1* ni edini mutirani gen (Crolla in van Heyningen, 2002).

Gen SF-1 kodira jedrni receptor – steroidogeni dejavnik 1, ki je ključen za zgodnji razvoj spolnih in nadledvičnih žlez in delovanje primarnih steroidogenih tkiv (skorja nadledvične žleze, Leydigove celice, rumeno telo, celice teke in celice granuloze) (Lala in sod., 1995). Miši brez gena SF-1 umrejo nekaj dni po rojstvu zaradi pomanjkanja kortikosterojdov. SF-1 ima tudi vlogo pri oblikovanju spolnih grebenov. Izražanje SF-1 v spolnem grebenu se pri miših začne na dan E9,0 in se pri samicah prekine dne E12,5. Pri samcih pa SF-1 ostaja izražen v jedrih Sertolijevih in Leydigovih celic (Ikeda in sod., 1993; Majdic in Saunders, 1996). Izražanje SF-1 je ključno na treh različnih stopnjah razvoja mod. V spolnih grebenih pred začetkom razvoja spola (priprava okolja za izražanje Sry), v Sertolijevih celicah za uravnavo tvorbe AMH in pozneje v Leydigovih celicah za urejanje izraženosti encimov za tvorbo steroidnih hormonov. Pri mišjih samcih brez gena SF-1 je sprememba spola popolna; razvijejo se notranji in zunanji sekundarni spolni organi, vključno z maternico in jajcevodom (Luo in sod., 1994), pri moških heterozigotih za mutacijo v SF-1 pa je prisotna sprememba spola z delno razvitimi modi in nepravilnostmi v strukturi ledvic (Achermann in sod., 1999). Pri moških z nemutiranim genom SRY, nepopolno razvitimi spolnimi žlezami in z ženskimi zunanjimi spolnimi organi so v nekaterih primerih opazili delno podvojitev krajše roke kromosoma X v področju Xp21.3 (Zanaria in sod., 1994), ki so ga poimenovali DSS (angl. dosage sensitive sex reversal; Bardoni in sod., 1994). Kandidatni gen znotraj področja DSS so poimenovali DAX1 (angl. DSS-AHC critical region on the X), ki je član družine hormonskih jedrnih receptorjev (Zanaria in sod., 1994). V razvijajočih se spolnih žlezah pri miših je DAX1 najprej izražen v telesnih celicah spolnega grebena na dan E11,5 pri obeh spolih. Pozneje postane izražanje spolno dimorfno; zmanjšuje se pri samcih s pojavom spolnih niti in je skoraj nezaznavno na dan E12,5 (Veitia in sod., 2001). To ustreza tudi vzorcu izražanja SRY, ki mogoče deluje kot negativni urejevalec *Dax1* (Swain in sod., 1996). Prepisovalni dejavnik SF-1 pa sproži izražanje *Dax1* pri miših (Yu in sod., 1998b). Naloga DAX1 pri določanju spola je nejasna. Mutacije v genu *Dax1* imajo negativen vpliv na razvoj mod (samci brez *Dax1* so neplodni, samice pa ne kažejo sprememb v plodnosti; Yu in sod., 1998a). Delecije področja DSS pri ljudeh povzročijo AHC in hipogonadotropni hipogonadizem (Muscatelli in sod., 1994). Podvojitev področja DSS verjetno vpliva na razvoj mod, ker nastane nepravilno medsebojno delovanje podvojenega področja DSS z drugimi lokusi.

Gen SOX9 (angl. SRY-related HMG box 9) kodira prepisovalni dejavnik s homeozaporedjem za vezavo na DNK. Mutacije v SOX9 so dominantne pri ljudeh in povzročijo kampomelično displazijo (angl. campomelic dysplasia, sindrom CD) in v 75 % primerov tudi nepravilen razvoj spolnih žlez z ženskimi ali nepravilno razvitimi moškimi zunanji spolnimi organi (Houston in sod., 1983; Foster in sod., 1994). V primeru posameznikov s spremenjenim spolom, ki ne kažejo sindroma CD, pa ni znanih mutacij v SOX9 (Kwok in sod., 1996). Pri glodalcih je SOX9 izražen v velikih količinah v spolnem grebenu le pri samcih (Kent in sod., 1996). Izražanje SOX9 se začne na dan E10,5 in je največje na dan E11,5 v Sertolijevih celicah. Pojavnost najvišjih količin SOX9 sovpada z vzorcem izražanja SRY, s tem da izražanje SOX9 sledi izražanju SRY. Zato predpostavljajo posreden ali neposreden vpliv SRY na izražanje Sox9 (Morais da Silva in sod., 1996). Na dan E13,5 je SOX9 izražen v spolnih nitih in ostaja izražen med razvojem mod in v odraslem obdobju (Kent in sod., 1996). Raziskave kažejo, da ima SOX9 vlogo pri razvoju mod navzdol od SRY. To potrjuje tudi primer transgene miši, kjer je sprememba uravnalnega področja Sox9 povzročila izbris dela uravnalnega področja pred genom Sox9 in posledično izražanje Sox9 pri samicah in razvoj mod in moškega spola kljub odsotnosti gena Sry (Bishop in sod., 2000).

Nepopolne delecije v področju p na kromosomu 9 (Calvari in sod., 2000) so značilne za Alfijev sindrom (Alfi in sod., 1973) pri moških z razvitimi ženskimi zunanjimi spolnimi organi in pri moških z nepravilno razvitimi spolnimi organi (Veitia in sod., 2001). Gen *DMRT1 (angl.* doublesex and mab-3 related transcription factor like family 1) leži v bližini tega področja in je dober kandidat za razvoj fenotipa spremembe spola, ker ima področje homologno področju beljakovin, ki so vključene v razvoj spolnih organov pri vinski mušici (DM-domena DSX) in črvu *Caenorhabditis elegans* (DM-domena MAB3) (Raymond in

sod., 1998). Poleg tega je specifično izražen v spolnih žlezah genotipa XY v trenutku spolne diferenciacije pri miših in ljudeh (De Grandi in sod., 2000). Vendar gen leži v bližini kritičnega področja in pri pacientih z nepravilno razvitimi spolnimi organi niso uspeli ugotoviti mutacij v *DMRT1*, tako da ostaja le kandidatni gen za razvoj mod (Muroya in sod., 2000; Veitia in sod., 2001).

Gen *Wnt4* (*angl.* wingless type MMTV (murine mammary tumour virus) integration site family, member 4) kodira za sporočilni glikoprotein; raziskave kažejo na ključno vlogo *Wnt4* pri razvoju spola samic. Pri miših brez gena *Wnt4* se pri samicah razvije Wolffov vod (Müllerjev vod propade), pri samcih pa je fenotip normalen (Vainio in sod., 1999). Tako se zdi, da je WNT4 vključen v proces nastanka Müllerjevega voda in tudi v zaviranju nastanka Leydigovih celic v nastajajočih jajčnikih. Prekomerno izražanje WNT4 lahko povzroči spremembo fenotipskega spola. To je verjetno vzrok napak pri pacientih, ki imajo podvojeno področje 1p, ki vključuje zapis za *WNT4* (Jordan in sod., 2001). *In vitro* študije kažejo, da je WNT4 spodbujevalec gena *Dax1* in je tako sprememba spola lahko posledica posrednega delovanja WNT4 prek *Dax1* in neposrednega negativnega delovanja na oblikovanje Leydigovih celic (Veitia in sod., 2001).

WNT4 je pri miših izražen v spolnem grebenu. Med razvojem se izražanje v modih preneha, ostaja pa izražen v razvijajočih se jajčnikih. Pri samicah brez *Wnt4* se jajčniki ne razvijejo pravilno in njihove celice izražajo AMH in encime biosintetske poti testosterona. Tako predvidevajo, naj bi SRY zaviral izražanje *Wnt4* (Veitia in sod., 2001).

2.2.6 HORMONALNA URAVNAVA RAZVOJA SPOLNIH ŽLEZ

Razvoj sekundarnih spolnih organov in pomožnih spolnih žlez je vezan tudi na obdobje po oblikovanju spolnih žlez (moda, jajčniki) v stopnji sekundarne določitve spola. Ta je odvisna od spolnih hormonov, ki jih izločajo spolne žleze (Gilbert, 1994b).

Za razvoj moškega fenotipa je pomemben peptidni hormon AMH, ki ga izločajo Sertolijeve celice. AMH naj bi s svojo vezavo na celice mezenhima, ki obdajajo Müllerjev vod, povzročil izločanje dejavnika s parakrinim delovanjem, ki naj bi sprožil celično smrt v

celicah epitelija Müllerjevega voda (Gilbert, 1994b) in tako povzročil propad Müllerjevih vodov, ki se drugače pri samicah/ženskah razvijejo v jajcevod, maternico in nožnico. Steroidni hormon testosteron, ki se primarno izloča iz Leydigovih celic, je odgovoren za razvoj mezonefrosa in Wolffovega voda v nadmodek, semenovod in v pomožne spolne žleze, ter razvoj mošnje in penisa na področju izboklin urogenitalnega trakta. Testosteron kot primaren maskulinizirajoči hormon ni aktivna oblika hormona v vseh tkivih. Testosteron je odgovoren za razvoj moških spolnih organov (nadmodek, mešički, semenovod), ki se razvijejo iz Wolffovega voda. Za razvoj struktur, kot so: prostata, sečnica in zunanji spolni organi, pa je odgovorna reducirana oblika testosterona 5α -dihidrotestosteron, ki nastane v ciljnih celicah s pomočjo encima 5α -reduktaze.

Pri samicah razvoj Müllerjevih vodov v jajcevod in maternico poteka samodejno, propad Wolffovih vodov pa se zgodi zaradi odsotnosti testosterona (Gilbert, 1994b).

2.3 URAVNAVANJE ENERGETSKE HOMEOSTAZE V CENTRALNEM ŽIVČNEM SISTEMU

Hranjenje in metabolizem sta ključna procesa, ki omogočata preživetje posameznika. Glavni centri, ki uravnavajo homeostazo energije v telesu, ob sprejemanju povratnih signalov iz periferije telesa in zunanjega okolja, se nahajajo v možganih. Zato je uravnava energetskih procesov v telesu, ki so bili potrebni za preživetje vrste, predstavljala močen selekcijski dejavnik, ki je vplival na evolucijo možganov, posebej archekorteksa in neokorteksa (Gao in Horvath, 2008). O vlogi centralnega živčnega sistema pri uravnavi telesne energetske homeostaze so prispevale raziskave mehanskih in kemijskih poškodb možganskih centrov (Brobeck, 1946; Powley, 1977; Iwamoto in sod., 1999), živalski in človeški modeli s porušeno energetsko homeostazo (Coleman, 1973; Coleman in Eicher, 1990; Zhang in sod., 1994b; Klebig in sod., 1995; Haider in sod., 1999) in genetski modeli miši s prekomernim izražanjem oziroma z utišanjem genov (povzeto po Chen in Garg, 1999). Vendar so pri uravnavi energetske homeostaze v telesu pomembni tudi drugi organi in organski sistemi, ki do neke mere neodvisno, vendar skladno delujejo z glavnimi centri v centralnem živčnem sistemu (Klover in Mooney, 2004; Anghel in Wahli, 2007; Morrison in sod., 2008).

2.3.1 INFORMACIJE O ZALOGAH ENERGIJE V TELESU

Centri v centralnem živčnem sistemu morajo biti »obveščeni« o zalogah energije v telesu, da lahko uravnavajo procese za vnos hrane v organizem in procese porabe energije (Brobeck, 1946; Kennedy, 1953). Vlogo sporočilnih molekul iz periferije imajo številni hormoni in osnovni gradniki hranil. Leptin, hormon belega maščevja, uravnava količino zaužite hrane glede na celotno energetsko ravnotežje v telesu in ima glavno vlogo pri sporočanju energetskih zalog centrom v hipotalamusu (Zhang in sod., 1994b). Pri tem pa sodelujejo še drugi hormoni, kot so: inzulin (Woods in sod., 1979), drugi hormoni belega maščevja (resistin, adiponektin Henry in Clarke, 2008) in hormoni gastrointestinalnega trakta (CCK, grelin, peptid YY in drugi, povzeto po Seeley in York, 2005). Nevroni hipotalamusa zaznavajo tudi spreminjanje koncentracije glukoze v krvi, ki sproži začetek ali konec hranjenja (Anand in sod., 1964; Mayer in Thomas, 1967). Mehanizem zaznavanja vključuje uravnavanje aktivnosti encima z AMP aktivirane protein kinaze (angl. AMP-activated protein kinase, AMPK) (Hardie in Carling, 1997) ali uravnavanje glukokinaze (Yang in sod., 1999). Nevroni hipotalamusa naj bi zaznavali tudi dnevne spremembe prostih maščobnih kislin (Loftus in sod., 2000; Kumar in sod., 2002) in aminokislin (Morrison in sod., 2007) v krvi. Zaviralec encima sintaze maščobnih kislin C57 zavira hranjenje in povzroči izgubo telesne mase pri suhih in debelih miših (Loftus in sod., 2000). Na ravni aminokislin nevroni hipotalamusa zaznavajo predvsem razvejane aminokisline, kot je levcin. Tretiranje podgan z levcinom je zmanjšalo hranjenje, mehanizem delovanja naj bi potekal prek kinaze mTOR (angl. mammalian target of rapamycin kinase) in mononukleotida ATP (angl. adenosine triphosphate) v celici.

2.3.2 CENTRI ZA OHRANJANJE ENERGETSKE HOMEOSTAZE

2.3.2.1 Arkvatno jedro

Arkvatno jedro se nahaja na bazi hipotalamusa na meji s središčno štrlino in je ključno področje pri urejanju energetske homeostaze v telesu (Woods in sod., 1998; Kalra in sod., 1999; Bray, 2000; Woods in sod., 2000). Nevroni v arkvatnem jedru izražajo presnovne

hormone in njihove receptorje, oživčeni so z aksoni, ki izločajo številne nevrotransmiterje in posredno ali neposredno oživčujejo številna področja v centralnem živčevju in na periferiji (Kalra in sod., 1999; Benoit in sod., 2000; van den Pol, 2003; Seelev in sod., 2004). Nevroni v arkvatnem jedru se nahajajo tik nad mestom, kjer je možganska krvna prepreka prekinjena in, so tako v stiku s številnimi signalnimi molekulami iz periferije (Benoit in sod., 2000; Cone in sod., 2001). V arkvatnem jedru obstajata dve skupini nevronov, ki urejata hranjenje, njuno delovanje pa je antagonistično. Skupina nevronov, ki izraža proopiomelanokortin (angl. proopiomelanocortin, POMC) in CART, zavira hranjenje (Boston in sod., 1997; Cone, 2005). V teh nevronih iz predhodnika POMC nastajajo produkti adrenokortikotropni hormon (*angl.* adrenocorticotropic hormone, ACTH), melanocite stimulirajoča hormona α in β (*angl.* α and β melanocyte stimulating hormones; α -MSH, β -MSH) in β -endorfin, ki zavirajo hranjenje in povečujejo porabo energije pri miših in ljudeh (Cone, 2005). Močen anoreksigen vpliv ima predvsem a-MSH, ki deluje predvsem prek melanokortinskih recpetorjev podtipov 3 in 4 (angl. melanocortin receptor; MC3R, MC4R) na nevrone NPY v arkvatnem jedru (Mounien in sod., 2005) in tudi v drugih delih hipotalamusa, kot so paraventrikularno jedro, VMH, DMH in stranski hipotalamus (Adan in sod., 1994; Mountiov in sod., 1994; Fan in sod., 1997; Biebermann in sod., 2006). Druga skupina nevronov v arkvatnem jedru izraža sporočilne molekule, med katerimi sta najpomembnejša AgRP in NPY, ki imata oreksigene učinke; spodbujata hranjenje in zmanjšujeta porabo energije (Stanley in Leibowitz, 1984; Ollmann in sod., 1997). Nevroni, ki izražajo AgRP in NPY, oživčujejo nevrone, ki izražajo POMC in prek izločanja nevrotransmiterja GABA zavirajo njihovo aktivnost (Cowley in sod., 2001). AgRP je naravni antagonist receptorjev MC3R in MC4R, ki s svojo vezavo zmanjšuje anoreksični vpliv peptida MSH (Ollmann in sod., 1997; Quillan in sod., 1998; Rossi in sod., 1998). Pomanjkanje dokazov o oživčenosti nevronov AgRP/NPY z nevroni POMC je pripeljalo do hipoteze o enosmerni uravnavi hranjenja v arkvatnem jedru, ki s toničnim zaviranjem sporočil za preprečevanje hranjenja favorizira hranjenje, tudi ko je količina hrane v okolju v presežku (Horvath in sod., 1992; Bates in Myers, 2003; Ellacott in Cone, 2004). Miši agouti "yellow" (A^{y}/a) , ki prekomerno in ektopično izražajo beljakovino agouti (agonist melanokortinskih receptorjev) v vseh tkivih razvijejo debelost (Lu in sod., 1994; Klebig in sod., 1995). Pri podganah in miših z okvarjenim leptinskim sistemom, pri stradanju, med brejostjo in laktacijo je količina prepisov za NPY v arkvatnem jedru povišana (Sahu in sod., 1988; Sanacora in sod., 1990; Chua in sod., 1991; Wilding in sod., 1993; Garcia in sod., 2003; Oberto in sod., 2003) zaradi nižjih koncentracij leptina v obtoku. Pod temi fiziološkimi pogoji se iz perifernih organov izloča sekretorna oblika leptinskega receptorja (*angl.* obesity-receptor podtype e; Ob-Re, soluble leptin receptor, SLR), ki z vezavo leptina preprečuje njegovo delovanje, s tem pa je energetsko ravnotežje pomaknjeno v smer povečevanja oziroma ohranjanja zalog energije (Gavrilova in sod., 1997; Cohen in sod., 2005). Med brejosti je znižana tudi količina prepisov informacijske RNK (mRNK) za dolgo obliko leptinskega receptorja (Ob-Rb) v jedru VMH pri podganah (Ladyman in Grattan, 2005). Vendar genetski modeli miši z okvarjenim genom za *Agrp* ali *Npy* ali obema niso potrdili povečanega prehranjevanja pri teh miših v odraslem obdobju (Erickson in sod., 1996; Qian in sod., 2002). V kritičnih obdobjih v razvoju se zaradi plastičnosti živčnega sistema pomanjkanje AgRP in NPY v arkvatnem jedru lahko nadomesti in se pojavi reorganizacija nevronskih povezav (Bouret in sod., 2004). Model miši, pri katerih so selektivno uničili nevrone NPY z uporabo difterijskega toksina, je v odraslem obdobju povzročilo zmanjšano hranjenje, selektivno uničenje nevronov POMC pa povečano hranjenje (Gropp in sod., 2005).

Nevroni arkvatnega jedra, ki izražajo POMC in NPY, oživčujejo področja, kot so: paraventrikularno jedro in stranski hipotalamus, področje ob svodu in druga področja, ki vsebujejo receptorje podtipov MC3R in MC4R (Mountjoy in sod., 1994; Sahm in sod., 1994).

2.3.2.2 Paraventrikularno jedro

Paraventrikularno jedro je parno jedro, ki se nahaja na obeh straneh tretje možganske kletke v predelu osrednjega dela hipotalamusa. Uničenje paraventrikularnega jedra pri podganah je povzročilo povečano hranjenje in debelost (Brobeck, 1946), paraventrikularno jedro pa je skupaj z jedrom VMH odgovorno za popolno prekinitev hranjenja (Tokunaga in sod., 1986; Cox in Sims, 1988; King, 2006). Nevroni paraventrikularnega jedra oživčujejo jedra srednjega in kavdalnega dela hipotalamusa, talamusa (Conrad in Pfaff, 1976; Ferguson in sod., 1984) in hrbtenjače (Yamashita in sod., 1984). Paraventrikularno jedro močno oživčujejo nevroni arkvatnega jedra (Kiss in sod., 1984) in te povezave so pomembne pri uravnavi izražanja hormonov, ki sprožajo izločanje kortikotropina (*angl.* corticotrophin releasing factor, CRH) in tirotropina (*angl.* thyrotropin releasing hormone, TRH), oksitocina,

in uravnavi aktivnosti simpatičnega živčevja, sporočil, ki urejajo energetski metabolizem (Lechan in Fekete, 2006). Hormoni CRH, TRH in oksitocin zavirajo hranjenje (Arletti in sod., 1990; Kow in Pfaff, 1991; Glowa in sod., 1992) in še dodatno sodelujejo pri uravnavi delovanja nadledvične žleze in odziva na stres (CRH; Dallman, 1993), telesne temperature (ščitnični hormoni; Arancibia in sod., 1996) in delovanja maternice in mlečne žleze (Young in sod., 1996; Nakao in sod., 1997).

2.3.2.3 VMH - center za sitost

Kemijsko povzročene poškodbe v jedru VMH in farmakološke raziskave so potrdile prvotna opažanja, da je jedro VMH odgovorno za urejanje hranjenja, natančneje zaviranje hranjenja, povišanje metabolizma in zmanjšanje telesnih maščob (Hetherington in Ranson, 1940; Tejwani in Richard, 1986; Bagnasco in sod., 2002). Nevroni v jedru VMH izražajo dolgo obliko leptinskega receptoria (Ob-Rb) (Mercer in sod., 1996; Fei in sod., 1997), kar verjetno pomeni, da vsaj delno na delovanje tega jedra lahko vpliva leptin. Miši, pri katerih so selektivno izbili gena za leptinski receptor (Lepr) v nevronih POMC v hipotalamusu, so razvile lažje oblike debelosti, pri prehranjevanju pa niso odstopale od kontrolnih živali (Balthasar in sod., 2004). Povečano hranjenje in debelost pa sta se razvila pri miših, pri katerih so izbili gen za Lepr v nevronih jedra VMH, ki izražajo SF-1 (Dhillon in sod., 2006). Vlogo pri delovanju VMH imajo tudi druge beljakovine, kot so: steroidni jedrni receptorji, saj pri podganah nevroni VMH, ki izražajo ESR1(α), izražajo tudi leptinski receptor (Diano in sod., 1998). Miši z izbitim genom za $Esrl(\alpha)$ razvijejo sindrom debelosti zaradi zmanjšane porabe energije z značilno povečanim visceralnim maščevjem, s hiperinzulimijo in hiperglikemijo (Heine in sod., 2000; Ogawa in sod., 2003). Ta opažanja potrjuje tudi model miši in podgan (samo samice) s selektivno utišanim genom za $Esrl(\alpha)$ v VMH z uporabo adenovirusov, kar potrjuje vlogo VMH, natančneje ventrolateralnega dela pri zmanjševanju skladiščenja energije v telesu (Musatov in sod., 2007). Jedro VMH uravnava količino energije v telesu tudi na način, da povečuje aktivnost. To vlogo potrjujeta modela miši brez gena SF-1 (Majdic in sod., 2002), ki razvijejo sindrom debelosti in imajo zmanjšano fizično aktivnost na kolesih za tek, in miši brez gena Mc3r, pri katerih zmanjšana fizična aktivnost vpliva na povečano vsebnost maščobnega tkiva (Butler in sod., 2000). Nevroni VMH naj bi neposredno uravnavali aktivnost nevronov POMC. Z uporabo stimulacije z laserji so odkrili, da so povezave nevronov iz VMH v glavnem spodbujevalne in naj bi aktivirale nevrone POMC. Aktivnost nevronov VMH pa se ob stradanju zmanjša (Sternson in sod., 2005). Aktivnost jedra VMH ureja tudi arkvatno jedro. Število povezav iz arkvatnega jedra v VMH je manjše v primerjavi z nekaterimi drugimi jedri (Zaborszky in Makara, 1979), vendar VMH vsebuje aksone nevronov, ki izražajo receptorje MC4R, NPY Y1, Y2, Y5 in ki naj bi izvirali iz arkvatnega jedra (Lopez-Valpuesta in sod., 1996; Wisialowski in sod., 2000; Kishi in sod., 2003; Li in Davidowa, 2004).

2.3.2.4 Področje stranskega hipotalamusa

Glavna vloga področja stranskega hipotalamusa je vzdrževanje budnega stanja, ki ga urejata peptida hipokretin A in B, imenovana tudi oreksin (angl. orexin, OX) A in B, ki sta močno izražena v nevronih stranskega hipotalamusa. Oreksinom pripisujejo vlogo tudi pri spodbujanju hranjenja. Druga skupina nevronov v stranskem hipotalamusu, ki uravnava energetsko homeostazo, izraža melanin koncentrirajoči hormon (angl. melanin concentrating hormone, MCH), ki prav tako spodbuja hranjenje. To kaže, da ima področje stranskega hipotalamusa izrazito spodbujevalno vlogo pri urejanju hranjenja. Nevroni MCH in OX oživčujejo številna področja in urejajo vedenjske procese, kot so: učenje, spomin, čustva in motivacija, v povezavi s spremembami energetskega stanja v telesu (Broberger in sod., 1998; Ludwig in sod., 1998; Peyron in sod., 1998; Lu in sod., 2000; Saito in sod., 2001). Kljub spodbujevalnemu učinku na hranjenje pri obeh peptidih pa so tarčna mesta in celoten vpliv delovanja nevronov MCH in OX različni (Broberger in sod., 1998; Horvath in sod., 1999). Aktivnost nevronov MCH in OX je uravnana s številnimi nevrotransmiterji in hormoni, kot sta leptin in grelin (Hakansson in sod., 1998; Elias in sod., 2001; Torrealba in sod., 2003; Toshinai in sod., 2003; Sakurai in sod., 2005). V stranskem hipotalamusu pa obe skupini nevronov oživčujeta druga drugo (Guan in sod., 2002), vendar imajo nevroni OX na splošno aktivacijski vpliv (Li in sod., 2002a; van den Pol in sod., 2004), nevroni MCH pa zavirajo aktivnost sinaps (glutamat in GABA) v področju stranskega hipotalamusa pri podganah (Gao in van den Pol, 2001).

Področje stranskega hipotalamusa je oživčeno z nevroni POMC in NPY iz arkvatnega jedra in povratno nevroni OX oživčujejo nevrone NPY v arkvatnem jedru. Splošno gledano, OX

in NPY (pri nizkih koncentracijah) delujeta sinergistično pri spodbujanju hranjenja (Horvath in sod., 1999; Jain in sod., 2000; Yamanaka in sod., 2000). Stradanje poveča izraženost mRNK, predhodnika oreksinov PPOX v stranskem hipotalamusu (Sakurai in sod., 1998), aktivacijo nevronov OX in sinaptogenezo, ki pa je uravnana z leptinom (Horvath in Gao, 2005). Miši z okvarjenim genom za *Hcrt* manj jedo, vendar normalno priraščajo, kar je najverjetneje posledica sprememb v presnovi zaradi motenj pri ohranjanju budnega stanja (Willie in sod., 2001). Oreksini tako mogoče predstavljajo povezavo med presnovnim sindromom in nespečnostjo.

MCH ima lastnosti oreksigenega peptida, saj dodajanje MCH povzroči začetek hranjenja in povečan vnos hrane. Izraženost MCH je povišana pri miših brez gena za *Lep*; stradanje poviša njegovo izraženost pri miših divjega tipa in miših brez gena za *Lep* (Qu in sod., 1996). Mehanizmi stimulacije hranjenja pa so le v manjši meri odvisni od delovanja NPY in OX. Po nekaterih podatkih pa naj bi MCH deloval celo neodvisno od sistema NPY/OX (Sahu, 2002). To potrjujejo tudi opažanja, da je obseg povezav nevronov MCH v arkvatno jedro v primerjavi z nevroni OX majhen. MCH spodbuja hranjenje tudi z zaviranjem delovanja α -MSH, pri čemer prevladajo vplivi tistega peptida, ki je ob dodajanju v pribitku (Ludwig in sod., 1998). Miši brez gena *Mch* pojedo manj hrane, so suhe in imajo neprimerno visoko stopnjo osnovne presnove (Shimada in sod., 1998; Alon in Friedman, 2006). Pri miših brez gena za *Lep* pa je uničenje nevronov MCH povečalo debelost in izboljšalo občutljivost za glukozo.

2.3.2.5 Druga področja hipotalamusa

Receptorji za presnovne hormone (leptin in grelin) se nahajajo tudi v drugih področjih hipotalamusa, kot sta DMH in suprakiazmatično jedro (*angl.* suprachiasmatic nucleus, SCN) (Hakansson in sod., 1998; Zigman in sod., 2006). Jedro DMH naj bi bilo vključeno v uravnavo ohranjanja energetske homeostaze (Bellinger in Bernardis, 2002; Chou in sod., 2003; Gooley in sod., 2006). Številni nevroni v DMH izražajo glutamat in tvorijo povezave z nevroni v jedru Pa in v področju POA, ki sodelujeta pri nočno-dnevnem urejanju izločanja kortikosteroidov in telesne temperature (ter Horst in Luiten, 1986; Bellinger in Bernardis, 2002). Povezave iz DMH v stranski hipotalamus in ventrolateralni del POA so pomembne

tudi za urejanje spanja in budnosti in bi lahko urejale aktivnost živali ob omejenem dostopu do hrane (Chou in sod., 2002).

Jedro DMH sodeluje pri uravnavanju številnih procesov, kot so: uravnavanje izločanja glukokortikoidov, uravnavanje telesne temperature in budnosti ter uravnavanje dnevne aktivnosti (Bellinger in Bernardis, 2002; Chou in sod., 2003; Gooley in sod., 2006). V jedru DMH se končujejo povezave iz arkvatnega jedra in centrov za urejanje hranjenja iz podaljšane hrbtenjače. Poškodbe jedra DMH so povzročile zmanjšanje hranjenja, zmanjšano aktivnost pri iskanju hrane in preprečile povišanje telesne temperature pred začetkom hranjenja, vendar sestava telesa, zlasti maščobnega tkiva, ni bila spremenjena (Bellinger in Bernardis, 2002; Chou in sod., 2003; Gooley in sod., 2006). Jedro DMH sodeluje tudi pri uravnavanju časovnega razporeda hranjenja (Gooley in sod., 2006).

Jedro SCN je glavni urejevalec nočno-dnevnih ritmov bioloških procesov (Morin in Allen, 2006), sodelovalo pa naj bi tudi pri urejanju sestave maščobnega tkiva v različnih letnih časih in pri urejanju homeostaze glukoze (Buijs in sod., 2003; Sumova in sod., 2004). Nevroni jedra SCN oživčujejo veliko jeder v hipotalamusu, največ povezav pa poteka v paraventrikularno jedro in DMH (Morin in Allen, 2006). Arkvatno jedro oživčuje jedro SCN in tako je vpliv melanokortinskega sistema na nevrone jedra SCN mogoč (Yi in sod., 2006). Miši z mutiranim genom *Clock*, ki je eden glavnih urejevalcev dnevno-nočnih ritmov, razvijejo debelost (Turek in sod., 2005), kar kaže na vključenost jedra SCN v hipotalamusni sistem za urejanje energetske homeostaze v telesu.

2.3.2.6 Dopaminski sistem srednjih možganov

V ta sistem uvrščamo nevrone v srednjih možganih, ki tvorijo dopaminergične sinapse in ki so vključeni v uravnavanje budnega stanja, gibalne aktivnosti, razpoloženja in so del sistema za nagrajevanje. Živalski model za proučevanje tega sistema predstavljajo miši, pri katerih je nedelujoč gen za *Th*. Miši brez gena *Th* so jedle manj kot kontrolne miši (Szczypka in sod., 1999a; Szczypka in sod., 1999b). Akutno pomanjkanje glukoze v krmi in vnos oreksigenega peptida PYY ali odsotnost leptina nista spodbudila hranjenja pri teh miših (Szczypka in sod., 2000; Hnasko in sod., 2004). Dopaminski sistem naj bi povzročil občutek nagrajevanja, ki

ga ima organizem po hranjenju in ki spodbudi željo, da se občutek ponovi. Pri nastanku tega občutka naj bi sodelovali dopaminergični nevroni področja ventralnega dela krova srednjih možganov (*angl.* ventral tegmental area, VTA; *tectum mesencephali*) in priležnega jedra (*lat. nucleus accumbens*) v predoptičnem področju, ki ga ti nevroni oživčujejo (Volkow in Wise, 2005). Dopaminski sistem je povezan tudi z motivacijskimi mehanizmi, ki oblikujejo vedenjske vzorce, ki privedejo do iskanja hrane (Berridge, 1996). Presnovni peptidi, NPY, α -MSH, AgRP, OX in MCH, ki jih izločajo nevroni hipotalamusa, neposredno uravnavajo aktivnost dopaminergičnih nevronov sprednjih in srednjih možganov (Berthoud, 2002). Na nevrone v VTA pa naj bi tudi neposredno delovali nekateri periferni signali, kot so: leptin, grelin in inzulin, ki bi lahko na omejen način uravnavali aktivnost dopaminergičnega sistema (Fulton in sod., 2000; Figlewicz in sod., 2003).

2.3.2.7 Kavdalni del možganskega debla in avtonomno živčevje

V možganskem deblu se nahajajo centri za avtonomno uravnavo funkcij, ki so ključne za preživetje, kot so: dihanje, bitje srca in tudi hranjenje (faze vnosa hrane, prebave in absorbcije hrane Berthoud, 2004). Parasimpatično živčevje, ki v glavnem poteka po desetem možganskem živcu (blodnik, *nervus vagus*), uravnava avtonomne procese pri vnosu (približanje hrani, vnos hrane in tekočine v usta, žvečenje, izločanje sline) in prebavi hrane, simpatično živčevje pa je odgovorno za procese, ki se sprožijo pri izčrpanosti in porabi energije. Centri v možganskem deblu uravnavajo tudi prekinitev hranjenja, ki ga povzročijo neprimeren okus zaužite hrane ali dražljaji, ki so povezani z neužitnostjo hrane (Grill in Kaplan, 2001). Možgansko deblo uravnava tudi velikost obroka s pomočjo čutil ustne votline in prebavnega trakta, ki zaznavajo kemijske in fizikalne lastnosti zaužite hrane. Informacije iz ševilnih receptorjev se prenašajo po desetem možganskem živcu in lobanjskih živcih do jedra solitarnega trakta (angl. nucleus of the solitary tract, NTS; nu. tractus solitarius) (Travers in Norgren, 1991). Na osnovi teh opažanj lahko sklenemo, da tudi možgansko deblo deluje kot center za sitost (Grill in Norgren, 1978) in sodeluje pri uravnavi energetske homeostaze skupaj z jedri v hipotalamusu (svod in stranski hipotalamus; Grill in Kaplan, 2001). Delovanje področij v možganskem deblu uravnavajo enaki periferni signali kot v hipotalamusu. Receptorji za leptin se nahajajo po celotnem področju dorzalnega dela sistema blodnega živca in drugih področjih v kavdalnem delu možganskega debla (Grill in

sod., 2002). V možganskem deblu pa se nahajajo tudi nevroni, ki zaznavajo količino glukoze v krvi (Ritter in sod., 1981), in nevroni, ki izražajo receptorje za inzulin (Unger in sod., 1991).

2.4 MIŠI BREZ GENA SF-1

2.4.1 SF-1, PREPISOVALNI DEJAVNIK STEROIDOGENI DEJAVNIK – 1

2.4.1.1 Struktura prepisovalnega dejavnika SF-1

Glede na funkcionalna področja prepisovalni dejavnik steroidogeni dejavnik 1 (SF-1) sodi v skupino prepisovalnih dejavnikov jedrnih receptorjev. Struktura SF-1 je na beljakovinski ravni ohranjena med sesalci. Področje cinkovih prstov, področje A, področje II in področje za vezavo liganda AF-2 kažejo 100-odstotno aminokislinsko ujemanje med sesalci (Wong in sod., 1996). Najbolj variabilno je povezovalno področje (*angl.* hinge region). Ohranjeno je tudi število aminokislin, ki izgrajujejo SF-1. Mišja in podganja beljakovina SF-1 se tako razlikujeta od človeške in goveje samo za eno aminokislino (Parker in Schimmer, 1997).

Prepisovalni dejavnik SF-1 vsebuje dva cinkova prsta – heliksni strukturi – prek katerih se veže na DNK. Področje P prvega heliksa, povezovalno področje in področje D drugega heliksa so popolnoma ohranjena med vrstami. Pri receptorjih za steroidne hormone področje P omogoča prepoznavanje polovice DNK vezavnega mesta (vezavna mesta za jedrne receptorje so sestavljena iz palindromnih zaporedij in vmesnega zaporedja (*angl.* spacer)). Področje D pa sodeluje pri nastanku beljakovinskega dimera in prepoznava velikost razmika med polovičnima vezavnima mestoma (Umesono in Evans, 1989).

Dodatne baze na 5' koncu DNK-vezavnega mesta se v tej skupini jedrnih receptorjev lahko razlikujejo in njihovo specifičnost določa področje A. Ohranjena je tudi domena za vezavo liganda AF-2 na C-terminalnem delu, ki je značilna za številne jedrne receptorje. Sestavljena je iz amfipatičnega heliksa L, ki sodeluje pri aktivaciji prepisovanja (Parker in Schimmer, 1997). Po zadnjih raziskavah naj bi bil ligand iz skupine molekul inozitol fosfata (Krylova in

sod., 2005). Pri sesalskih predstavnikih obstajajo še druga evolucijsko ohranjena področja, katerih vloga pa še ni znana. Mednje sodi s prolinom bogato področje, ki leži v področju, bogatem s prolinom, in naj bi bilo odgovorno za aktivacijo prepisovanja. Drugo takšno področje je ohranjeno mesto za fosforilacijo, odvisno od cAMP (*angl.* cyclic adenosine monophosphate) odvisne proteinske kinaze in predstavlja možnost uravnavanja aktivnosti SF-1 od cAMP odvisne signalne poti (Honda in sod., 1993).

2.4.1.2 Genski zapis za SF-1

Gen za *Nr5a1* kodira tudi informacijo za beljakovine ELP (*angl.* embryonal long terminal repeat-binding protein). Beljakovino ELP so odkrili kot beljakovino, ki se veže na negativni regulatorni element v področju LTR-genoma retrovirusov (Tsukiyama in sod., 1992). Beljakovine za SF-1 in ELP (ELP1, 2, 3) nastajajo s prepisovanjem iz alternativnih promotorskih mest in z alternativnim izrezovanjem intronov v 3' mestih izrezovanja (Ikeda in sod., 1993). Mesta izražanja prepisov so različna in mogoče imajo tudi različne vloge.

Gen *Nr5a1*, ki kodira SF-1/ELP, je evolucijsko ohranjen pri nevretenčarjih (vinska mušica, sviloprejka) in vretenčarjih. Gen je zelo podoben genu *Ftz-f1 (angl.* fushi tarazu factor 1) pri vinski mušici, ki kodira jedrni receptor siroto, za katerega se predpostavlja, da uravnava izražanje gena fushi tarazu (Ueda in sod., 1990; Lavorgna in sod., 1991). Zato so tudi mišji homolog poimenovali homolog fushi tarazu. Vsi znani homologni geni *Ftz-F1* kodirajo najmanj dva prepisa (Ellinger-Ziegelbauer in sod., 1995), ki kodirajo beljakovine z različnimi funkcijami in so biološko pomembni.

Za mišji SF-1 in njegove homologe velja, da imajo visoko stopnjo homologije z drugimi jedrnimi receptorji sirotami, LRH1 (*angl.* liver receptor homolog 1) in z njegovim človeškim homologom PHR1 (*angl.* pancreas hormone receptor 1) (Becker-Andre in sod., 1993). Vzorca izražanja SF-1 in LRH se razlikujeta. Beljakovini pa na osnovi homologije uvrščamo v poddružino jedrnih receptorjev NR5A (Laudet, 1997).

2.4.2 MESTA IZRAŽANJA SF-1

2.4.2.1 Steroidogena tkiva v odraslem obdobju

Prepisovalni dejavnik SF-1 se izraža v skorji nadledvične žleze, Leydigovih celicah v modih, v celicah teke in granuloze v jajčnikih. Mesta izražanja ustrezajo mestom, kjer so našli izražene gene, ki v svojih promotorjih vsebujejo vezavna mesta za SF-1, med katerimi so tudi encimi za biosintezo steroidov (Miller, 1988). Z metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (*angl.* reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) so dokazali prepise tudi v placenti, v kateri nastajajo velike količine progesterona in v kateri poteka pretvorba androgenov v estrogene (Honda in sod., 1993). Izraženost prepisov v omenjenih tkivih pri podganah in ljudeh so potrdili z imunohistokemičnimi metodami z uporabo protiteles proti SF-1.

2.4.2.2 Steroidogena tkiva v embrionalnem obdobju

Pri mišjih zarodkih, starih 9 dni, je SF-1 izražen v urogenitalnem grebenu, ki predstavlja osnovo za razvoj skorje nadledvične žleze, spolnih žlez in metanefrosa, iz katerega se razvijejo ledvice. Mesto izražanja SF-1 v urogenitalnem grebenu se spreminja. V začetku je izražanje omejeno na enotno populacijo celic, pozneje pa celice, ki izražajo SF-1, oblikujejo več ločenih celičnih populacij (skupina celic v bližini aorte dorzalnega dela grebena, ki se razvije v skorjo nadledvične žleze, in večja skupina celic v bližini trebušnega epitelija, ki predstavlja zasnovo za spolne žleze) (Ikeda in sod., 1994).

SF-1 je v skorji nadledvične žleze izražen tudi v času E10,0–10,5, ki velja za začetek razvoja žleze kot samostojnega organa, v celicah skorje. Namreč v času od E12,5 do E13,5 zametki kromafinskih celic sredice nadledvične žleze pripotujejo v zametek nadledvične žleze in v tem času ter tudi po rojstvu izražanje SF-1 ostaja omejeno na celice skorje. V spolnih žlezah ima SF-1 vlogo tudi pri razvoju, saj se prepisi pojavijo v spolnem grebenu v času E9,0 ne glede na genetski spol zarodka, to je pred izražanjem gena *Sry*. Med razvojem modnih niti je

SF-1 izražen v intersticijskih celicah in modnih nitih, kar kaže na njegovo vlogo v razvoju spolnih žlez (Parker in Schimmer, 1997).

V zametkih jajčnikov se izražanje SF-1 po oblikovanju organa zmanjša (Ikeda in sod., 1994). Tako je razvoj jajčnikov pogojen s prekinjenim izražanjem SF-1. Količina SF-1 ostaja v jajčnikih nizka oziroma na meji detekcije do začetka razvoja jajčnih foliklov (Takayama in sod., 1995). SF-1 se začne izražati v celicah teke in granuloznih celicah v preantralni fazi. V tem času naj bi SF-1 uravnaval izražanje aromataze v celicah granuloze. Ob zorenju foliklov se izražanje SF-1 močno poveča v omenjenih skupinah celic. Količina SF-1 pa upade v fazi nastajanja rumenega telesca in pri atretičnih foliklih, kar sovpada s propadom celic teke in celic granuloze (Parker in Schimmer, 1997).

2.4.2.3 Druga mesta izražanja SF-1

SF-1 pa ni izražen samo v steroidogenih tkivih. V mišjih zarodkih je na dan E11,5 SF-1 izražen v delu možganov, in sicer v diencefalonu (Ikeda in sod., 1994). Pozneje se prepisi pojavijo v predelu razvijajočega se hipotalamusa, v razvitih možganih pa je SF-1 izražen v dorzomoedialnem in centralnem delu VMH. SF-1 je izražen tudi v razvijajoči se hipofizi v času od E13,5 naprej, kjer je njegova izraženost omejena na gonadotropne celice adenohipofize (Ingraham in sod., 1994). Pri miših je v adenohipofizi izražen prepis gena *Nr5a1* ELP3, ki kodira za enako beljakovino, kot je SF-1, vendar je prepis uravnan iz drugega promotorja. Tako je mogoče, da je izražanje prepisov gena *Nr5a1* uravnavano iz različnih promotorjev v steroidogenih in nesteroidogenih tkivih (Parker in Schimmer, 1997). Analize z RT-PCR so pokazale, da je SF-1 izražen tudi v placenti, vranici, kostnem mozgu in v prebavnem traktu (Ninomiya in sod., 1995; Sadovsky in sod., 1995)

2.4.3 GENI, KATERIH PREPISOVANJE URAVNAVA SF-1

Za SF-1 so najprej ugotovili, da celično specifično uravnava izražanje encimov za tvorbo steroidnih hormonov v celicah skorje nadledvične žleze in kot se je izkazalo pozneje, tudi v drugih steroidogenih tkivih. SF-1 sodeluje pri hormonsko uravnanem izražanju encimov za

tvorbo steroidnih hormonov, ki vključuje cAMP. Uravnavanje aktivnosti s cAMP je mogoče, ker SF-1 vsebuje ohranjeno domeno za fosforilacijo z od cAMP odvisno proteinsko kinazo. Pokazali so tudi, da katalitična domena od cAMP odvisne proteinske kinaze fosforilira SF-1 (Zhang in Mellon, 1996).

SF-1 uravnava tudi izražanje beljakovin biosintetske poti steroidov, ki ne pripadajo družini citokromov P450. Ena izmed teh je 3ß hidroksisteroid dehidrogenaza tipa II, ki je izražena samo v skorji nadledvične žleze in spolnih žlezah (Leers-Sucheta in sod., 1997). SF-1 naj bi urejal tudi izražanje beljakovine StAR (angl. steroidogenic acute regulatory protein), katere vloga je prenos holesterola z zunanje na notranjo membrano mitohondrija, kjer poteka tvorba steroidnih hormonov (Caron in sod., 1997). SF-1 naj bi uravnaval tudi izražanje receptorja za ACTH v celicah nadledvične žleze (Cammas in sod., 1997). V Sertolijevih celicah SF-1 uravnava izražanje gena za Amh in je tako urejevalec izraženosti obeh hormonov, nujno potrebnih za razvoj sekundarnih spolnih organov pri samcu (Shen in sod., 1994). Ciljni gen SF-1 v Sertolijevih celicah pred puberteto je tudi gen Cyp19a1, ki kodira aromatazo (Lynch in sod., 1993). Izraženost SF-1 v nesteroidogenih tkivih kaže na uravnavanja izraženosti genov tudi v teh tkivih. V gonadotropnih celicah adenohipofize SF-1 uravnava izražanje genov za skupno α podenoto hormonov LH (luteinizirajoči hormon) in FSH (folikel stimulirajoči hormon) (Barnhart in Mellon, 1994) ter njuni ß podenoti (Halvorson in sod., 1996) in receptoria za GnRH (Duval in sod., 1997) in s tem genov, ki so ključni za delovanje spolnih organov. Miši brez gena SF-1 imajo tudi spremenjeno strukturo jedra VMH, kar kaže na pomen SF-1 na izražanje genov v živčnih celicah tega jedra.

2.4.4 VLOGA SF-1 IN VIVO

Miši z mutiranim genom *SF-1* so poskušali pripraviti v več laboratorijih. Pri dveh skupinah (Luo in sod., 1994; Sadovsky in sod., 1995) so odstranili del tretjega eksona, ki nosi zapis za področje vezave na DNK, katerega vsebujejo vse izooblike gena *Nr5a1*. V tretji skupini (Shinoda in sod., 1995) so z enakim pristopom odstranili večje področje tretjega eksona. V enem primeru (Luo in sod., 1995) pa so inaktivirali gen s spremembo zapisa za začetno aminokislino metionin, ki jo vsebujeta le zapisa za SF-1 in ELP3. Tako so selektivno preprečili izražanje omenjenih zapisov, ne pa tudi zapisov za ELP1 in 2. V vseh omenjenih

primerih je bil vpliv mutacije v genu *Nr5a1* na razvoj in delovanje endokrinega sistema podoben, kar pomeni, da so zapisi gena *Nr5a1* odgovorni za dobljen fenotip.

2.4.4.1 Priprava transgenih miši SF-1/eGFP s transgenezo z bakterijskimi umetnimi kromosomi

Nadledvične in spolne žleze ter nekatere živčne celice VMH pri miših brez gena SF-1 propadejo v zelo zgodnjih fazah embrionalnega razvoja, zato je težko slediti spremembam v teh celicah pri miših brez gena SF-1. Zato so želeli pripraviti transgene miši, v katerih bi bila zelena fluorescenčna beljakovina (eGFP) pod uravnavo promotorja gena SF-1, za lažje sledenje celic, ki izražajo SF-1. Nekateri so uporabili 5' promotorska zaporedja iz bližine zapisa za SF-1 za uravnavo izražanja beljakovine eGFP, vendar celice, ki normalno izražajo SF-1, niso izražale zelene fluorescenčne beljakovine. To pomeni, da ta področja niso vsebovala vseh urejevalnih elementov, ki uravnavajo izražanje SF-1 in vivo, ali pa se je konstrukt vključil v področje kromatina, ki ni prepisovalno aktivno. Zato so uporabili postopek z uporabo bakterijskih umetnih kromosomov (angl. bacterial artificial chromosome, BAC). Postopek omogoča delo z velikimi odseki DNK, ki vsebujejo tudi uravnalna mesta v intronih, zato je izraženost gena, ki ga vnesemo, manj odvisna od mesta vgraditve (Heintz, 2000; Giraldo in Montoliu, 2001). Konstrukt, ki so ga vnesli v predjedro z mikroinjiciranjem, je vseboval zapis za beljakovino eGFP, ki je bila pod uravnavo 50 kb dolgega odseka, pridobljenega iz bakterijskega umetnega kromosoma, ki je vseboval medgensko področje na 5' koncu gena za SF-1 ter zapis za prvi in del drugega eksona in prvi intron gena SF-1. Tako so pridobili miši, ki izražajo eGFP na mestih, kjer se običajno izraža Izraženost eGFP je izrazita v spolnih žlezah, skorji nadledvične žleze, gen SF-1. ventromedialnem jedru hipotalamusa, v vranici in hrbtenjači. Gonadotropne celice adenohipofize pa pri teh miših ne izražajo eGFP, kar pomeni, da v omenjenem področju niso zajeti vsi urejevalni elementi, potrebni za prepisovanje SF-1 v gonadotropnih celicah (Shima in sod., 2008).

2.4.5 LASTNOSTI MIŠI BREZ GENA SF-1

Pogostost rojstva mladičev brez gena *SF-1* pri parjenju heterozigotnih staršev za *SF-1* (*SF-1*^{+/-}) je v pričakovanem deležu, kar pomeni, da prepisi gena *Nr5a1* niso potrebni za preživetje zarodkov. Ob rojstvu se mladiči brez gena *SF-1* ne ločijo od mladičev drugih genotipov. Zaradi odsotnosti spolnih žlez pa imajo vsi mladiči ženske zunanje spolne organe ne glede na genetski spol in se take mladiče lahko potrdi le z ustrezno genotipizacijo. V 12 urah po rojstvu mladiči brez gena *SF-1* začno poginjati in vsi poginejo najpozneje do osmega dne po rojstvu (Parker in Schimmer, 1997). Mladiči brez gena *SF-1* imajo znižano koncentracijo kortikosterona v krvi in povišano količino ACTH in jih lahko ohranjamo pri življenju z dodajanjem glukokortikoidov in mineralokortikoidov (Luo in sod., 1995).

2.4.5.1 Primarna steroidogena tkiva

Miši brez gena SF-1 nimajo razvitih spolnih žlez in nadledvične žleze. V začetku diferenciacije spolnega grebena se zgodi propada teh struktur. Pri zarodkih brez gena SF-1 se pojavi debeljenje mezenhima na mestu, kjer se razvije spolni greben, kar kaže, da je začetek razvoja spolnih žlez mogoč brez gena SF-1. Takoj zatem pa celice spolnega grebena, ki ne izražajo funkcionalnega SF-1, preidejo v proces celične smrti in zgodi se propad razvijajočih se nadledvičnih in spolnih žlez v spolnem grebenu. Proces celične smrti se odraža s tanjšanjem mezenhimalnega tkiva spolnega grebena. Pred propadom spolnih žlez so v spolnem grebenu prisotne tudi spolne celice, tako da SF-1 ne vpliva na potovanje le-teh v razvijajočo se spolno žlezo. S propadom spolnih žlez posledično propadejo tudi spolne celice. Propad ni pogojen s pomanjkanjem SF-1, ker ga spolne celice ne izražajo, ampak s propadom strukture spolne žleze, ki je pomembna za razvoj spolnih celic (medcelične povezave, parakrini signali). Zaradi odsotnosti mod in hormonov, ki jih moda izločajo, se miši neodvisno od genetskega spola razvijejo fenotipsko kot samice (imajo razvito maternico in zunanje ženske spolne organe). Podobno kot za spolne celice velja tudi za sredico nadledvične žleze, kjer zametki kromafinih celic ne izražajo SF-1 in propadejo med razvojem zaradi propada celic skorje nadledvične žleze (Parker in Schimmer, 1997).

V nasprotju z razvojem nadledvične žleze in spolnih žlez pri miših brez gena *SF-1* se placenta razvije normalno (normalna histološka struktura) in izraža normalno količino beljakovine CYP11A1 (*angl.* cytocrome protein 450, subfamily 11A, poypeptide 1), ki je pod uravnavo SF-1 (Sadovsky in sod., 1995). To nakazuje na drugačno kontrolo uravnavanja steroidogenih encimov v placenti (drugi promotorji, drugi elementi v promotorjih), kot je to značilno za druga primarna steroidogena tkiva (Parker in Schimmer, 1997).

2.4.5.2 Hipofiza in hipotalamus

Večina celičnih tipov adenohipofize ni prizadeta, kar potrjujejo normalno izražanje rastnega hormona, prolaktina, TSH in ACTH (Ingraham in sod., 1994). Količine POMC so bile zaradi porušene negativne urejevalne zanke s hormoni nadledvične žleze povišane do trikrat. Miši brez gena SF-1 specifično ne izražajo FSH in LH, ki ju tvorijo in izločajo gonadotropne celice, ki izražajo SF-1 (Parker in Schimmer, 1997). Pri miših brez gena SF-1 je GnRH normalno izražen v živčnih celicah osrednjega hipotalamusa in se normalno sprošča v območju središčne štrline v krvni obtok (Parker in Schimmer, 1997). Motnje v delovanju gonadotropnih celic hipofize so lahko posledica pomanjkanja SF-1 ali pa posledica vpliva sprememb v VMH. Tretiranje miši brez gena SF-1 z GnRH vzpostavi izražanje LH in FSH (Ikeda in sod., 1995), kar pomeni, da gonadotropne celice adenohipofize so prisotne in da SF-1 ni absolutno potreben za izražanje FSH in LH. Ker pa živčne celice iz VMH ne tvorijo večjih povezav z živčnimi celicami, ki proizvajajo GnRH, je manj verjetno, da živčne celice iz VMH neposredno vplivajo na sproščanje GnRH iz živčnih celic. Verjetno nepravilen razvoj VMH ni vzrok za nedelovanje gonadotropnih celice, čeprav ni izključeno, da potekajo povezave med nevroni GnRH in ventromedialnim jedrom prek katerih drugih jeder v hipotalamusus (Parker in Schimmer, 1997).

V centralnem živčnem sistemu SF-1 izražajo nekatere živčne celice v hipotalamusu. Pri miših brez gena *SF-1* je zgradba jedra VMH popolnoma spremenjena. Vpliv je najbolj viden v dorzomedialnem delu VMH, kjer je največ celic, ki izražajo SF-1, in na meji, ki omejuje VMH ter je sestavljena iz dendritov celičnih telesc VMH. Manjše spremembe so vidne tudi v jedru DMH, katerega nevroni ne izražajo SF-1, vendar tvorijo številne povezave z nevroni iz VMH. Spremembe v DMH so najverjetneje sekundarne, tj. zaradi spremenjenih povezav

ali pa zaradi odsotnosti steroidnih hormonov, ki vplivajo na potovanje živčnih celic, njihovo število in velikost živčnih telesc. S tehniko zasledovanja potovanja celičnih skupin so zasledovali potovanje živčnih celic, ki bi normalno izražale SF-1 pri miših brez gena *SF-1*, in ugotovili, da predhodniki celic SF-1 normalno potujejo v VMH vendar se izgubijo v času med E18,0 in P1 (Ikeda in sod., 1995; Shinoda in sod., 1995). Kot so pred kratkim ugotovili Tran in sod. (2003), naj bi SF-1 vplival na končno diferenciacjiio nevronov jedra VMH in ne na povečan obseg apoptoze pri miših brez gena *SF-1*.

2.4.5.3 Miši brez gena SF-1; model za študij debelosti

Raziskave možganov so pokazale na pomen jedra VMH pri uravnavanju energetske homeostaze v telesu. Poškodovanje ventromedialnega dela hipotalamusa pri podganah in pri miših povzroči povečano hranjenje, zmanjšano aktivnost in debelost (Brobeck, 1946; Powley, 1977; Iwamoto in sod., 1999), kar nakazuje, da ta predel hipotalamusa deluje kot center za sitost in porabo energije v telesu. Jedro VMH sodeluje tudi pri uravnavi drugih fizioloških procesov in uravnavi obnašanja (povzeto po McClellan in sod., 2006), vendar molekularni mehanizmi in vloga VMH niso natančno znani (Choi in Dallman, 1999). Miši brez gena *SF-1* imajo porušeno zgradbo jedra VMH in verjetno so spremenjene tudi nevronske povezave z drugimi jedri (Tran in sod., 2003). V starosti postanejo debelejše od miši divjega tipa in so model za študij debelosti v odraslem obdobju, natančneje vloge *SF-1* in področja VMH pri uravnavanju energetske homeostaze (Majdic in sod., 2002).

Telesno težo pri živalih in ljudeh urejajo mehanizmi za porabo energije in njen vnos (Kalra in sod., 1999). Eden ključnih posrednikov pri tem uravnavanju je hormon leptin, ki ga proizvajajo celice bele tolšče in pomeni glavni periferni signal, ki deluje na jedra hipotalamusa, v katerih so centri za urejanje energetske homeostaze (Zhang in sod., 1994a; Kalra in sod., 1999). Količina leptina je pri miših brez gena *SF-1* povečana in je pokazatelj spremenjenega delovanja povratne urejevalne leptinske zanke, kar je običajno pri debelosti pri ljudeh in živalih. Vzrok za to pri miših brez gena *SF-1* je lahko sekundaren in je posledica spremenjenega delovanja jedra VMH. Natančneje, miši brez gena *SF-1* imajo lahko spremenjeno izražanje genov, ki sodelujejo pri ohranjanju energetske homeostaze v nevronih jedra VMH, spremenjeno mesto nahajanja nevronov in/ali spremenjeno število

nevronov v VMH. Tako imajo miši brez gena SF-1 spremenjeno mesto nahajanja nevronov v VMH, ki izražajo gen *Tub* (Majdic in sod., 2002), ventrolateralni del jedra VMH, ki naj bi tudi bil odgovoren za uravnavo energetske homeostaze (Musatov in sod., 2007), pa pri miših brez gena SF-1 vsebuje manj nevronov (Dellovade in sod., 2000; Budefeld in sod., 2008). Debelost pri miših brez gena SF-1 ni posledica mutacij v leptinski signalni poti.

3 MATERIALI IN METODE

Agaroza (Sigma)
APES (Sigma)
Cresyl violet acetat (Sigma)
Crystal Mount TM – medij za pripravo preparatov za fluorescenčno mikroskopijo
(Sigma)
DAB (Sigma)
Etanol (Merck)
Glicin (Sigma)
Goveji serumski albumin (BSA; Sigma)
Heparin (Sigma)
Kloroform (Merck)
Kozji serum (Chemicon)
Natrijev borovhidrid (Sigma)
Natrijev dihidrogen fosfat (Sigma)
Natrijev hidrogen fosfat (Sigma)
Natrijev klorid (Sigma)
NeuroVue [®] – barvilo za anterogradno označevanje nevronov (PTI research)
Nikelj (II) – amonijeva in sulfatna sol (Ni; Sigma)
Ocetna kislina (Carlo Erba)
Paraformaldehid (Sigma)
Pertex [®] – medij za pokrivanje preparatov za mikroskopijo (Medite)
ProLong Antifade – medij za pripravo preparatov za fluorescenčno mikroskopijo
(Molecular Probes)
Proteinaza K (Sigma)
Pufer za razgradnjo tkiva (Taq DNA lysis buffer; Promega)
Rekombinantni človeški fibroblastni rastni dejavnik (FGF; Sigma)
Tris (Trizmabase [®] , (Sigma))
Triton X-100 – detergent (Sigma)
Vodikov peroksid (Merck)

3.1 SESTAVINE ZA ANASTEZIJO IN ANALGEZIJO

Acepromazin (Fort Dodge Animal Health) Butorfanol (Turbogesic; Fort Dodge Animal Health) Ketamin (Vetoquinol Biowet) Xilazin (Chanelle Pharmaceuticals Ltd.)

3.2 STEROIDNI HORMONI

Deksametazon (deksametazon 21-fosfat; D1159; Sigma) Fludrokortizon acetat (F6127; Sigma) Hidrokortizon (H4001; Sigma) Testosteron (86500; Fluka) Testosteron propionat (86540; Fluka)

3.3 ŽIVALI

Vsi poskusi so bili narejeni na miših (*Mus musculus*) seva C57BL/6J, ki smo jih gojili pod standardnimi laboratorijskimi pogoji (temperatura: 20–25 °C, vlažnost: 40–60 %, svetlo-temni cikel 11 : 13^a in 12 : 12^b) in so imele krmo (altromin 1314, altromin 1324, Lage, Nemčija^a; Harlan Tekland 2016, Velika Britanija^b) ter zakisano vodovodno vodo *ad libitum*.

Pri raziskovanju vpliva prepisovalnega dejavnika SF-1 smo uporabljali dva modela gensko spremenjenih miši. Model, kjer je bil del gena za *SF-1*, ki kodira za vezavno domeno za DNK, izrezan in preostanek prekinjen z zapisom za gen za neomicin (*SF-1-neo*) (Luo in sod., 1995), in model, kjer je bil konstrukt z zapisi za zeleno fluorescenčno beljakovino in z bližnjim promotorskim zaporedjem gena *SF-1* (*SF-1/eGFP*) vstavljen v mišji genom, v lokus, ki je neodvisen od lokusa *Nr5a1*. Zaporedje DNK pred zapisom za *eGFP* je vsebovalo del kodirajočega zaporedja gena *Gcnf* (*angl*. germ cell nuclear factor), celotno medgensko zaporedje navzgor od gena *SF-1*, prvi ekson in intron ter 32 nukleotidov drugega eksona gena *SF-1*.

Da smo dobili miši, homozigotne za izbiti gen *SF-1* (*SF-1*^{-/-}, *SF-1* KO), smo parili med seboj heterozigotne miši za izbit gen *SF-1* (*SF-1*^{+/-}). Vsi mladiči so do dneva genotipizacije (P7-P8) dobivali injekcije kortikosteroidov (400 µg/ml hidrokortizona (Sigma, Steinheim, Germany), 40 ng/ml deksametazona (Sigma) in 25 ng/ml fludrokortizon acetata (Sigma)) v koruznem olju (Bimal, Wels, Avstrija) (50 µl/dan) pod kožo (s.c.). Ker določitev genotipa ni mogoča le po fenotipskih znakih, smo mladičem odvzeli biološki material za določitev genotipa (opisano v nadaljevanju v metodah) pri dnevu od P4 do P6. Po genotipizaciji smo mladičem brez gena SF-1 presadili nadledvične žleze (Majdic in sod., 2002), s čimer smo dosegli preživetje miši brez gena SF-1 brez apliciranja kortikosteroidov. Vedno smo presajali nadledvične žleze, ki smo jih odvzeli samicam divjega tipa (WT) iz istega gnezda, kot so bile miši brez gena SF-1, le v nekaterih primerih (ko nismo imeli na voljo samic iz istih gnezd) od samic WT iz drugih gnezd, ki pa se po starosti niso razlikovale od prejemnikov več kot tri dni. Po izolaciji nadledvičnih žlez iz samic WT smo le-te prenesli v hladno sterilno raztopino rekombinantnega človeškega rastnega dejavnika fibroblastov (angl. fibroblast growth factor, FGF) (25 ng/ml; Sigma) v 0,05 M fosfatnem pufru z NaCl (pH 7,3) (angl. phosphate buffered saline, PBS) in jih nato vstavili skozi vbodno odprtino v podpazdušnem območju. Miši so bile povratno parjene že več kot 10 generacij, tako zavrnitvenih reakcij ni bilo in miši so po presaditvi do dneva odstavitve pri P21 dobile le še tri injekcije kortikosteroidov. Po dnevu P21 miši niso več prejemale kortikosteroidov. V odraslem obdobju so bile koncentracije kortikosterona v serumu pri miših brez gena SF-1 v območju vrednosti pri miših divjega tipa brez spolnih žlez (GDX/WT), kar kaže na primernost metode presajanja. Mladiče smo odstavili od samic pri P21. Miši WT iz istih gnezd ali časovno primerljivih gnezd so predstavljale kontrolne živali in so bile izpostavljene enakemu protokolu prejemanja kortikosteroidov in ravnanju kot miši brez gena SF-1. Za pripravo kontrolnih živali s podobno izpostavitvijo spolnim hormonom, kot je pri miših brez gena SF-1, smo mišim WT odstranili spolne žleze v obdobju P21-P25. Pred kirurškim posegom so bile živali anestezirane s 50 µl mešanice Ketamina (Vetoquinol Biowet, Gorzowie, Poljska, 100 µg/g telesne teže), Acepromazina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, ZDA; 2 µg/g telesne teže) in Xilazina (Chanelle Pharmaceuticals Ltd., Loughrea, Ireland; 10 µg/g telesne teže) pod kožo. Moda in nadmodek smo odstranili skozi dve stranski zarezi na vsaki strani penisa, jajčnike pa skozi enojno zarezo v trebušni votlini, potekajočo po beli liniji. Po kirurškem posegu so miši dobile dve injekciji po 50 µl anelgetika butorfanola (Turbogesic, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, ZDA; 3 mg/kg telesne teže) v razmiku štirih ur.

Pri šestih mesecih starosti smo vse miši žrtvovali. Čas žrtvovanja je bil vedno enak: od 6 do 9 ur po začetku svetle faze. Miši smo uspavali z mešanico Ketamina, Acepromazina in Xilazina ter odvzeli kri iz desnega prekata srca. Preostalo kri smo iz živali sprali s hladnim 0,05 M pufrom PBS, ki mu je sledilo učvrščevanje z raztopino 4-odstotnega paraformaldehida v 0,05 M PBS s pomočjo peristaltične črpalke (Ecoline ISM1076, Ismatec SA, Zürich, Švica) pri hitrosti pretoka tekočine 5 ml/min. Po končani fiksaciji smo živalim odvzeli možgane in jih hranili do uporabe v 0,1 M fosfatnem pufru (*angl.* phosphate buffer, PB) pri 4 °C.

V prvem poskusu so bile miši nastanjene posamezno v kletkah od P21. V tem poskusu smo mišim merili telesno težo, dnevno porabo krme v kletkah s kolesi in fizično aktivnost na kolesu za tek. Zaradi proučevanja beljakovin v možganih (kalbindin, nNOS) smo miši dnevno tretirali s 50 µl raztopine testosteron propionata v koruznem olju (2 mg/ml) sedem dni pred žrtvovanjem. Izraženost AVP smo proučevali na možganih miši, ki so bile izpostavljene testosteronu 3 mesece pred žrtvovanjem.

V drugem poskusu so bile miši skupinsko nastanjene (3 miši/kletko) v kletkah od P30 naprej. Pri teh miših smo spremljali telesno težo, aktivnost v kletkah s kolesi in spontano celotno aktivnost. V tem poskusu smo na odvzetih možganih proučevali izraženost presnovnih peptidov AgRP, CART, NPY in PPOX pod standardnimi pogoji in pogoji stradanja 24 ur ter izraženost eGFP.

3.3.1 TEHTANJE MIŠI, SPREMLJANJE HRANJENJA IN AKTIVNOSTI

Telesno težo miši smo spremljali tedensko v obdobju od odstavitve (3.–4. teden po rojstvu) do žrtvovanja pri starosti 24.–26. tedna.

Aktivnost pri miših smo spremljali na dva načina: z uporabo kletk s kolesi smo proučevali fizično aktivnost na kolesih, uporaba sistema za merjenje aktivnosti v 2D-okolju (Motor monitor, Kinder scientific, CA, ZDA) pa nam je omogočila spremljanje spontane celotne aktivnosti. Aktivnost smo spremljali med puberteto, pri 6. tednu starosti in v odraslem obdobju pri starosti šestih mesecev. Pri obeh načinih merjenja so bile miši med merjenjem izolirane. Pred začetkom merjenja fizične aktivnosti na kolesih za tek smo miši privajali na novo okolje 3–5 dni, pri merjenju spontane celotne aktivnosti pa dva dni. Med merjenjem fizične aktivnosti na kolesih za tek (7–10 dni) smo mišim merili dnevno porabo hrane s tehtanjem hrane. Po končanem testu aktivnosti so bile miši vrnjene v prvotno okolje do žrtvovanja.

3.3.2 STRADANJE

Za proučevanje mehanizmov urejanja energetske homeostaze smo ločeno skupino miši izpostavili pomanjkanju hrane pri starosti 6 mesecev. Mišim smo 24 ur pred žrtvovanjem odvzeli krmo in jih prenesli v kletke s svežim nastilom in z vodo.

3.4 JEMANJE BIOLOŠKEGA MATERIALA

3.4.1 KRI/PLAZMA

Kri smo jemali anesteziranim živalim pred fiksacijo iz levega prekata srca s heparinom (1 U/ μ l, Sigma) preprano injekcijo in iglo (0,8x 40 mm 21Gx1 9/16"). Po odvzemu smo heparinizirano kri centrifugirali (Centrifuge 5415 R, Eppendorf , Hamburg, Nemčija) pri 3000 obr/min 5 min na 4 °C in dobljeno plazmo shranili na -20 °C.

3.4.2 MOŽGANI

Po končani fiksaciji smo odvzeli možgane, ki smo jih inkubirali v raztopini 4-odstotnega paraformaldehida v 0,05 M PBS na stresalniku (50 obr/min) čez noč pri 4 °C za dodatno učvrstitev. Naslednji dan smo možgane prenesli v pufer 0,1 M PB in jih hranili do uporabe pri 4 °C.

Vsi poskusi na živalih so bili izvedeni skladno z etičnimi določili direktive EU (86/609/EEC). Poskuse na živalih je odobrila veterinarska uprava Republike Slovenije (št. dovoljenja 323-02-723/2004/2).

3.5 RAZGRADNJA TKIVA IN DOLOČANJE GENOTIPA Z METODO PCR

Tkivo prstov 4–6 dni starih mladičev smo uporabili za določitev genotipa miši z metodo verižne reakcije s polimerazo (*angl.* polymerase chain reaction, PCR). Tkivo smo razgradili

v 200 µl pufra za razgradnjo (Taq DNA lysis buffer, Promega, WI, ZDA), kateremu smo dodali 15 µl proteinaze K (15 mg/ml; Sigma) na stresalniku (400 obr/min, Thermomixer Compact, Eppendorf) pri 55 °C čez noč.

Razgrajeno tkivo smo uporabili za določitev genotipa z metodo PCR. Za določitev genotipa za SF-1 in spola miši smo uporabili naslednje oligonukleotidne začetnike, *SF-1* F 5'-ACAAGCATTACACGTGCACC-3' ter *SF-1* R 5'-TGACTAGCAACCACCTTGCC-3' za določitev alela WT in *SF-1-neo* R 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' za določitev alela SF1-KO, skupaj z začetnikoma za določitev prisotnosti gena za *Sry* (F 5'-AGGCGCCCCATGAATGCATT-3', R 5'-TCCATGAGGCTGATATTTATAG-3'). Prisotnost zapisa za *eGFP* smo potrdili z oligonukleotidnima začetnikoma; F 5'-CACCATCTTCTTCAAGGACGAC-3' in R 5'-GAATGACACCTACTCAGACAATGC-3'. Končen volumen reakcije PCR je bil 20 μl, nastajanje nespecifičnih produktov PCR pa smo zmanjšali z dodajanjem polimeraze DNK pri temperaturi 95 °C.

Za določitev genotipa SF-1 in eGFP smo uporabili naslednji protokol PCR: 95 °C 5 min, 40 ciklov; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 90 s), 72 °C 8 min (Primus 96 plus, MWG AG BIOTECH, Ebersberg, Nemčija).

Nastale PCR produkte (*Sry* ~200 bp, *SF-1* ~500 bp, *SF-1-neo* ~600 bp, *eGFP* ~650 bp) smo analizirali z gelsko elektroforezo (2-odstotni agarozni gel (Sigma), U = 130 V).

3.6 DOLOČANJE KORTIKOSTERONA IN TESTOSTERONA V SERUMU Z OBRNJENIM KOMPETETIVNIM ENCIMSKIM TESTOM

Koncentracijo kortikosterona v serumu smo določili z uporabo obratnega kolorimetričnega encimsko-imunskega testa (Active Rat Corticosterone EIA, Diagnostic System Laboratories, Webster, TX, ZDA), ki temelji na tekmovanju označenega antigena in antigena iz vzorca za prosta vezavna mesta na protitelesih. Merjenje smo izvedli po priloženem protokolu.

Koncentracijo testosterona v serumu smo določili z uporabo obratnega kolorimetričnega encimsko-imunskega testa (Testosterone EIA DSL-10-4000, Diagnostic System Laboratories, Webster, TX, ZDA, ki temelji na tekmovanju označenega antigena in antigena
iz vzorca za prosta vezavna mesta na protitelesih. Merjenje smo izvedli po priloženem protokolu.

3.7 ANALIZA MOŽGANOV

3.7.1 BARVANJE SVEŽIH REZIN MOŽGANOV Z BARVILOM CRESYL VIOLET

Mišje možgane, zalite v agarozni (5-odstotna agaroza) blok, smo z vibrotomom (Integraslice 7550 MM, Campden Instruments, Velika Britanija) narezali na prečne rezine debeline 50 μm in jih nanesli na predmetnice, prekrite s silanom (APES, Sigma). Po sušenju rezin prek noči smo vzorce inkubirali čez noč v 10-odstotni raztopini kloroforma (Merck, Dermstadt, Nemčija) in nato izvedli postopek barvanja z barvilom Cresyl violet. Vzorce smo rehidrirali v padajočih etanolih (95 %, 15 min; 70 %, 3 min; 50 %, 3 min). Nato sta sledila inkubacija v dH₂O dvakrat 3 min na stresalniku in barvanje vzorcev v barvilu Cresyl Violet 2 min. Odvečno barvilo smo sprali z inkubacijo vzorcev v dH₂O 3 min. Temu je sledila inkubacija v 50-odstotnem etanolu za 3 min in diferencialno razbarvanje vzorcev v raztopini 1 % ocetne kisline (Carlo Erba, Milano, Italija) in 70 % etanola. Nato smo vzorce inkubirali po 3 min v raztopini 95 % in 100 % etanola, čemur je sledila inkubacija v ksilenu 5 min in priprava trajnih preparatov.

3.7.2 OZNAČEVANJE MOŽGANOV Z LIPOFILNIM FLUORESCENČNIM BARVILOM

Za anterogradno označevanje nevronov smo uporabili fluorescenčno lipofilno barvilo NeuroVue[®] (PTI Research, Inc., PA, ZDA). Pri proučevanju eferentnih povezav predoptičnega področja smo barvilo vnesli v predoptično področje in možgane inkubirali v 0,1-odstotni raztopini paraformaldehida v 0,1 M PBS 8 tednov v inkubatorju pri 30 °C. Po inkubaciji smo možgane narezali na rezine debeline 100 μm, jih pokrili z vodnim medijem (Crystal Mount, Sigma) in opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom (Nikon eclipse 80i) pri vzbujevalni valovni dolžini 567 nm.

3.7.3 PROUČEVANJE IZRAŽANJA GENOV – IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE SVEŽIH, PLAVAJOČIH REZIN MOŽGANOV

Možgane smo zalili v agarozne (5-odstotna agaroza, Sigma) bloke in jih narezali na 50 µm debele prečne rezine in prenesli v hladen 0,05 M PBS . Pred blokiranjem rezin smo rezine inkubirali v raztopini 0,1 M glicina (Sigma) v 0,05 M PBS 20 min in raztopini 0,5 % natrijevega borovhidrida (Sigma) v 0,05 M PBS 15 min na stresalniku (Tehtnica) na 4 °C, s čimer smo odstranili sledi fiksativa v tkivu rezin in prekinili ob fiksaciji nastale povezave med beljakovinami v celicah. Raztopino glicina smo spirali s pufrom 0.05 M PBS trikrat po 5 min in raztopino borovhidrida štirikrat po 5 min na stresalniku na 4 °C. Tako obdelane rezine smo blokirali v raztopini 5 % normalega kozjega seruma (angl. normal goat serum, NGS, Chemicon, CA, ZDA) in 1 % H₂O₂ (Merck) v 0,05 M PBS pufru z dodanim 0,5odstotnim detergentom TritonX-100 (Sigma) od 30 min do 120 min na stresalniku na 4 °C. Nato smo rezine prenesli v ustrezne razredčine primarnih protiteles v pufru 1 % goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin, BSA, Sigma) v 0,05 M PBS pufru z dodanim 0,5-odstotnim detergentom TritonX-100 (Sigma) in inkubirali 2-3 dni na stresalniku pri 4 °C. Odvečna primarna protitelesa smo spirali z raztopino 1 % NGS/0,02 % TritonX-100 v PBS štirikrat po 15 min na stresalniku pri sobni temperaturi. Po spiranju smo dali na rezine ustrezna sekundarna protitelesa, vezana z beljakovino biotin v ustrezni razredčitvi pripravljeni v 1 % NGS/0, 5% TritonX-100 v PBS in inkubirali 2 uri na stresalniku pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje s pufrom 0,02 % TritonX-100/PBS štirikrat po 15 min na stresalniku pri sobni temperaturi in inkubacija rezin v razredčini (1/2000) peroksidaze konjugirane s streptavidinom v 0,5 % TritonX-100/0,05 M PBS, s katero smo označili vezana sekundarna protitelesa. Po enourni inkubaciji pri sobni temperaturi in stresalniku smo rezine sprali v pufru nizke ionske jakosti 0,5 M Tris/0,15 M NaCl pH 7,5 štirikrat po 15 min na stresalniku pri sobni temperaturi. Sledila je inkubacija rezin v raztopini kromogena 0,025 % DAB (diamino benzidin, Sigma)/Ni (Sigma)/0,02 % H₂O₂ v pufru nizke ionske jakosti 5 min na stresalniku pri sobni temperaturi, tj. za označitev kompleksov protiteles, vezanih na ustrezne beljakovine. Peroksidazno reakcijo smo prekinili s spiranjem rezin v pufru nizke ionske jakosti trikrat po 15 min na stresalniku pri sobni temperaturi. Po imunohistokemičnem barvanju smo rezine nanesli na predmetnice, obdelane s silanom (APES, Sigma), in jih pustili sušiti čez noč. Naslednji dan smo rezine na predmetnicah sprali z dH₂O posušili in pokrili s hidrofobnim medijem za pripravo trajnih mikroskopskih preparatov (Pertex Medite, Burgdorf, Nemčija).

Primarna protitelesa smo pripravili v ustreznih razredčinah v 1 % BSA/0,05 % TritonX-100 v 0,05 M PBS, in sicer smo uporabljali primarna protitelesa v naslednjih razredčitvah: kunčja proti Agutiju sorodni beljakovini (AgRP; 1/4.000, PhoenixPharm Inc, CA, ZDA), mišja proti beljakovini za vezavo Ca²⁺ (Kalbindin D-28K, kalbindin, CALB1 1/20.000; Sigma), kunčja proti peptidu, povezanim s kokainom in z amfetaminom (CART, 1/20.000, Chemicon), kunčja proti sintazi dušikovih oksidov specifični za živčne celice (nNOS, 1/10.000, ImunoStar, WI, ZDA), kunčja proti nevropeptidu Y (NPY, 1/10.000, DiaSorin, MN, ZDA), kunčja proti arginin vazopresinu (AVP, 1/15.000, Imunostar), kunčja protitelesa proti predhodniku oreksinov (PPOX, 1/10.000, Chemicon).

Sekundarna protitelesa (H + L ostanki IgG, Jackson Immunoresearch, PA, ZDA), vezana z biotinom, smo uporabljali v naslednjih razredčitvah: proti-mišja, narejena v oslu 1/2.500, proti-kunčja, narejena v oslu 1/500.

3.7.3.1 Imunohistokemično označevanje s fluorofori cianina (Cy)

Za fluorescenčno označevanje beljakovin smo uporabili postopek imunohistokemije, kot je opisan zgoraj z nekaterimi spremembami. Po spiranju sekundarnih protiteles smo rezine nanesli na predmetna stekla in jih pokrili z medijem, ki omogoča daljšo obstojnost fluorescenčnih barvil (ProLong Antifade, Invitrogen, CA, ZDA). Rezine smo po pregledu hranili na -20 °C.

Za označevanje nevronov eGFP s fluorofori smo uporabljali primarna kunčja protitelesa proti zeleno fluorescenčni beljakovini (eGFP, 1/1.000, Molecular Probes, OR, ZDA).

Sekundarana protikunčja protitelesa, narejena v oslu in vezana s fluoroforom Cy2 (H + L ostanki IgG vezani s fluorofori Cy2; Jackson Immunoresearch; A = 492/E = 510) smo uporabljali v redčitvi 1/100.

Za ustrezno kvalitativno in kvantitativno analizo biokemijsko označenih elementov (telesa nevronov, dendriti in aksoni, podporne celice) in analizo njihovega mesta nahajanja v rezinah možganov moramo biti pozorni na dve stvari: kot, pod katerim so možgani rezani, in na meje področja v možganih, ki ga proučujemo. Kadar primerjamo posamezne rezine možganov med seboj, je treba preveriti kot rezanja. Prerezi skozi enako jedro pod različnimi koti se lahko razlikujejo, še posebej kadar so področja oz. jedra zavitih oblik. Kadar primerjamo med seboj rezine, je treba vedno določiti nekaj referenčnih točk (najmanj dve), ki morajo biti enako umeščene glede na področje, ki ga proučujemo, med rezinami. Če se področje razlikuje glede na položaj elementov, napačna vzporeditev rezin prekrije razlike v položaju elementov v področju. Ko imamo rezine pravilno umeščene, na slike rezin lahko namestimo mrežo in vrednotimo imunoreaktivne elemente po posameznih področjih. Kadar želimo ovrednotiti neko področje glede na število ali gostoto elementov v danem preseku le na eni strani rezine in je takšno področje zaradi simetrije na enaki rezini zastopano dvakrat, je treba analizirati področje z večjim številom ali gostoto elementov. Tako zmanjšamo možnost, da z naključno izbiro povzročimo nastanek razlik. Če pa želimo analizirati področje v odnosu na njegov volumen, pa je treba takšno področje ovrednotiti na tistih zaporednih rezinah, kjer je to področje še prisotno. Pristopi so opisani in uporabljeni v (Tobet in Fox, 1992; Edelmann in sod., 2007; Budefeld in sod., 2008). Vse strukture in področja v možgnih ter oddaljenost posameznih rezin od begme, ki so uporabljeni v tej nalogi, smo določili na osnovi atlasa mišjih možganov (Paxinos in Franklin, 2001).

3.7.4.1 Anteroventralni del periventrikularnega jedra (AVPV)

Izraženost beljakovin smo proučevali na prerezu skozi rostralni del jedra v oddaljenosti 0,26 mm rostralno od bregme pod 60-kratno povečavo (priloga 1, slika 1). Izraženost nNOS smo kvantificirali kot število imunoreaktivnih nevronov ali kot celotno imunoreaktivnost (celična telesca in izrastki) v področju 512 μm lateralno od tretje možganske kletke in 767 μm dorzalno od baze možganov. Zaradi razlik med spoloma v velikosti jedra AVPV pri miših smo med seboj primerjali prisotnost imunoreaktivnih elementov po posameznih vrsticah, v katere smo razdelili proučevano področje.

3.7.4.2 Stranski pretin (LS)

Izraženost AVP in NPY v aksonih v stranskem pretinu smo proučevali na prerezu 0,26 mm rostralno od bregme pod 100-kratno povečavo (priloga 1, slika 1). Ta presek smo izbrali zaradi največjih razlik v AVP-imunoreaktivni površini med spoloma pri miših WT. Vedno smo izbrali eno polovico stranskega pretina, med sredino pretina in začetkom stranske možganske kletke. Mejo na ventralni strani je predstavljal sprednji del sprednje komisure (aca) in dorzalno mejo možganski prečnik (corpus calosum, cc). Analizirano področje pretina je zajemalo njegov dorzalni in ventralni del, kot je označeno na sliki 1 v prilogi 1.

3.7.4.3 Medialni del predoptičnega področja (mPOA)

Izraženost nNOS smo proučili v prerezu skozi medialni del predoptičnega področja 0,14 mm rostralno od bregme pod 100-kratno povečavo (priloga 1, slika 2). Področje se je raztezalo med bazo možganov in sprednjim delom sprednje komisure ter 500 μm lateralno od tretje možganske kletke in je zajemalo medialno predoptično jedro (MPO), kot je označeno na sliki 2 v prilogi 1.

3.7.4.4 Kavdalni del predoptičnega področja in področje sprednjega hipotalamusa (POA/AH)

V preseku skozi področje kavdalnega dela POA v oddaljenosti 0,1 mm od bregme (priloga 1, slika 3) smo proučevali izraženost kalbindina. Meje proučevanega področja so predstavljali baza možganov na ventralnem delu in sprednji del sprednje komisure na dorzalnem delu ter začetek tretje možganske kletke. V širino je področje merilo 650 µm in je obsegalo medialni del predoptičnega jedra ter njegov centralni del. Področje smo slikali pod 40-kratno povečavo.

3.7.4.5 Spodnje jedro končne strije (BNST)

Izraženost nNOS in kalbindina smo proučevali v posteromedialnem delu (BNSTMPM) in posterointermedialnem delu (BNSTMPI) medialnega dela BNST (BNSTM) na prerezu 0,22

mm kavdalno od bregme pod 60-kratno povečavo (priloga 1, slika 4). Meji področja sta prestavljali vezno tkivo srednje strije talamusa (stria međullaris of thalamus) in končne strije (stria terminalis). Število imunoreaktivnih nevronov smo analizirali v celotnem preseku skozi BNSTM (sliki 10, 17) in v področju, ki je obsegalo samo posteromedialni del (BNSTMPM) (slika 17, označeno področje).

3.7.4.6 Paraventrikularno jedro (Pa)

Paraventrikularno jedro se razteza skozi večji del osrednjega hipotalamusa, za analizo pa smo izbrali največji prerez skozi jedro, kar ustreza prerezu jedra v oddaljenosti 0,7 mm kavdalno od bregme (priloga 1, slika 5). Zaradi trikotne oblike jedra smo za analizo izbrali področje v velikosti 5 \times 5 enot s pomočjo merila v programu Adobe Photoshop 8.0. Izbrano področje je zajemalo celoten presek jedra Pa. Področje smo slikali pod 100-kratno povečavo.

3.7.4.7 Ventromedialno jedro hipotalamusa (VMH)

Izraženost beljakovin v jedru VMH smo proučevali na rezinah možganov, ki so bile oddaljene 1,0 mm, 1,7 mm in 1,9 mm kavdalno od bregme pod 60-kratno povečavo (priloga 1, slike 6, 9, 10). Meji področja na posameznem preseku sta predstavljali baza možganov in tretja možganska kletka. Pri možganih miši brez gena *SF-1* smo proučevali ustrezno enako področje, kljub spremenjeni arhitekturi ventromedialnega hipotalamusa.

3.7.4.8 Mandelj

Izraženost nNOS in kalbindina smo proučevali v prerezu mandlja na rezinah, oddaljenih 1,7 mm kavdalno od bregme pod 60-kratno povečavo. Meji področja sta predstavljali rob optičnega živca in rob zunanje kapsule (external capsule, ec), kot je prikazano v prilogi 1, slika 9. Izraženost NPY smo proučevali v delih mandlja v oddaljenosti 1,5 mm kavdalno od bregme pod 100-kratno povečavo (priloga 1, slika 8).

3.7.4.9 Stranski hipotalamus (LH) in področje sive grbe (TC)

Izraženost predhodnika orexinov PPOX smo proučevali v področjih sive grbe (*lat. tuber cinereum*; TC) in LH na rezinah, oddaljenih od 0,8 mm do 1,9 mm kavdalno od bregme pod 100-kratno povečavo (prioga 1, slike 5–10). Na rezinah od 1,3 mm do 1,9 mm kavdalno od bregme so se nevroni, ki izražajo PPOX, nahajali v področju stranskega hipotalamusa. Na rostralnih rezinah (-0,8 mm), kjer se pojavi področje sive grbe, smo nevrone v bližnji okolici svoda pripisali področju stranskega hipotalamusa, tiste, ki so se nahajali bazomedialno od svoda, pa področju sive grbe.

3.7.5 PRIPRAVA DIGITALNIH SLIK IN ANALIZA

Področja možganov smo slikali s pomočjo mikroskopa z vgrajeno digitalno kamero (Microphot FXA mikroskop z 3CCD-kamero (Nikon, Japonska) in mikroskop Eclipse 80i z digitalno kamero DS-Fi1 (Nikon)). Digitalne slike smo uredili s pomočjo programa Photoshop 8.0. Pri tem je šlo za urejanje osvetlitve in kontrasta slike ter spreminjanje slike v črno-beli format. S tem nismo vplivali na kakovost imunohistokemičnega barvanja na sliki. S pomočjo programa Image J v.1.34 (NIH, MD, ZDA) smo slike razdelili na ustrezne kvadrate. Imunoreaktivno področje smo analizirali s programom Surfkvad, ki ga je za nas razvil dr. Marko Kreft iz Oddelka za patofiziologijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani. Program Surfkvad razdeli črno-belo sliko v 48 kvadratov in za vsakega poda delež črnega področja v kvadratu. Tridimenzionalno rekonstrukcijo imunoreaktivnih nevronov PPOX v področjih LH in TC smo naredili s programskim paketom BIOVIS 3D na osnovi prečnih možganskih rezin debeline 50 µm. Zaporedne rezine so bile v razmiku 100 µm.

3.8 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Statistično analizo podatkov smo izvedli s statističnim programom SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ZDA). Razlike v telesni teži, aktivnosti živali, v količini zaužite krme, razlike v številu imunoreaktivnih nevronov ali v površini imunoreaktivnosti v danem področju med spoloma (XY, XX) in genotipoma (WT, SF-1^{-/-}) smo ovrednotili z dvofaktorsko analizo

variance, kjer sta spol in genotip živali predstavljala neodvisni spremenljivki. Razlike med spoloma v okviru posameznega genotipa pa smo nato določili s Fisherjevim LSD *post hoc* testom. Razlike v jedrih AVPV, VMH in mandlju po vrsticah ali stolpcih smo ovrednotili s trifaktorsko analizo variance, pri čemer smo za tretjo neodvisno spremenljivko izbrali posamezno vrstico ali stolpec. Vpliv stradanja na izraženost beljakovin v možganih pri posameznih poskusnih skupinah smo ovrednotili s trifaktorsko analizo variance, pri čemer smo za tretjo spremenljivko izbrali dostop do hrane. Razliko smo sprejeli za statistično značilno, če je bila dobljena vrednost p nižja od 0,05.

4 REZULTATI

4.1 TELESNA TEŽA PRI MIŠIH WT IN MIŠIH BREZ GENA SF-1

Telesno maso miši različnih genotipov in spolov smo spremljali tedensko. V prvi poskus so bile vključene intaktne miši WT, miši brez gena *SF-1* in kontrolne miši WT z odstranjenimi spolnimi žlezami obeh spolov (GDX/WT). Vse miši so bile hranjene s standardno krmo s 4odstotno vsebnostjo maščobe, ki je lahko vsebovala fitoestrogene. Kot prikazuje slika 1 A, so bili samci WT statistično značilno (p < 0,05) težji od samic WT od 4. tedna starosti naprej. Odstranitev spolnih žlez pred puberteto je to razmerje spremenila tako, da spolna razlika v telesni teži pri miših GDX/WT ni bila statistično značilna. Razlik v teži med spoloma pa nismo ugotovili niti pri miših brez gena *SF-1*, ki so bile po svoji teži v območju med telesno težo samic in samcev WT. Zaradi povečanega stresa, kateremu so miši izpostavljene v izolaciji in lahko vpliva na prirast, smo v drugem poskusu spremljali telesno težo miši, ki so živele združene po skupinah; povprečne telesne teže poskusnih skupin miši so predstavljene na sliki 1 B. V tem poskusu so bile vse miši hranjene s krmo brez fitoestrogenov in s 4odstotno vsebnostjo maščob. Trifaktorska analiza variance meritev ni pokazala vpliva spola na telesno težo, miši brez gena *SF-1* pa so bile statistično značilno težje (p < 0,05) od kontrolnih miši od 5. tedna starosti naprej.



Slika 1: Prikaz telesne teže poskusnih skupin miši v obdobju od 4. do 24. tedna starosti. **A]** Primerjava telesne teže med spoloma pri miših WT (WTM – samec WT, WTF – samica WT), pri miših brez spolnih žlez (GDX/WT; WT/CAS – steriliziran samec, WT/OVX – sterilizirana samica) in miših SF-1 KO (KOM – samec SF-1 KO, KOF – samica SF-1 KO) v prvem poskusu pri individualni nastanitvi v kletkah. Samci WT so statistično značilno težji od samic WT od 4. tedna starosti naprej (p < 0,05). Pri skupinah GDX/WT in SF-1 KO

nismo ugotovili spolnih razlik v telesni teži. Telesna teža miši SF-1 KO je bila v območju telesne teže miši WT.

B] Telesna teža GDX/WT miši in miši SF-1 KO v drugem poskusu pri skupinski nastanitvi v kletkah. Miši SF-1 KO so bile statistično značilno težje od miši GDX/WT od 5. tedna starosti naprej (p < 0.05). Telesna teža je predstavljena kot povprečje ± S. E. M.

4.2 PORABA HRANE PRI MIŠIH WT IN MIŠIH BREZ GENA *SF-1* V KLETKAH S KOLESI ZA TEK

Med spremljanjem fizične aktivnosti pri miših v kletkah s kolesi za tek smo spremljali tudi količino zaužite krme (slika 2). Količino krme smo tehtali dnevno, vedno pred začetkom temne faze. Pri miših v puberteti, starih 6. tednov (P42), je bila raven zaužite krme podobna med skupinami brez vpliva spola ali genotipa (WT/CAS (n = 15) 3,80 g \pm 0,10 g; WT/OVX (n = 10) 3,99 g \pm 0,18 g; SF-1KO M (n = 7) 4,25 g \pm 0,36 g; SF-1KO F (n = 8) 3,90 g \pm 0,25 g). V odraslem obdobju pri starosti 6 mesecev (P180) se je absolutna količina dnevno zaužite krme zmanjšala v primerjavi z obdobjem pred puberteto (p < 0,001). V tem času so miši brez gena *SF-1* pojedle več krme kot kontrolne miši GDX/WT (WT/CAS (n = 17) 2,30 g \pm 0,10 g; WT/OVX (n = 10) 2,50 g \pm 0,18 g; SF-1KO M (n = 7) 3,27 g \pm 0,24 g; SF-1KO F (n = 8) 2,51 g \pm 0,17 g; p < 0,05; F = 5,113), vendar je bila razlika posledica povečanega hranjenja pri samcih miši brez gena *SF-1* (interakcija genotipa in spola, p < 0,01 (F = 8,111), ki so pojedi več krme kot samice miši brez gena *SF-1* (p < 0,05).



Slika 2: Dnevna količina zaužite krme (standardna krma s 4-odstotno vsebnostjo maščob) med merjenjem fizične aktivnost miši v kletkah s kolesi za tek v obdobju 7 dni. Pri miših pri 6. tednu starosti (P42) ni bilo razlik v zaužiti krmi glede na genotip ali spol. V odraslem obdobju v starosti 24 tednov (P180) smo ugotovili vpliv genotipa in spola na količino zaužite krme (p < 0,01) zaradi povečanega krmljenja pri samcih SF-1 KO, ki so pojedli več krme (*p < 0,05) kot samice SF-1 KO in kontrolne miši GDX WT. Pri starosti P180 so miši pojedle statistično značilno manj krme (***p < 0,001) kot pri starosti P42. Rezultati so predstavljeni kot povprečje ± S. E. M.

4.3 AKTIVNOST PRI MIŠIH WT IN MIŠIH BREZ GENA SF-1

4.3.1 FIZIČNA AKTIVNOST PRI MIŠIH V KLETKAH S KOLESI ZA TEK

Fizično aktivnost na kolesih za tek smo merili mišim pri starosti 6. tednov (P42) in v odraslem obdobju v 6. mesecu starosti (P180) v obdobju 7–10 dni. Fizična aktivnost na kolesih za tek je bila večja v temni fazi (ni prikazano), kar kaže, da so imele vse miši

ohranjen dnevno-nočni ritem. V prvem poskusu, ko so bile miši izolirane in na standardni krmi s 4 % maščob, smo merili dnevno fizično aktivnost na kolesih za tek intaktnim mišim WT, mišim GDX/WT ter mišim brez gena SF-1. Pri starosti P180 (slika 3 A) so bile miši WT (intaktne + GDX) aktivnejše (p < 0.01) od miši brez gena SF-1. Pri miših brez gena SF-1 smo opazili nižjo povprečno vrednost fizične aktivnosti na kolesih za tek kot pri miših GDX/WT, vendar razlika ni bila statistično značilna (p = 0.064). Tako je statistična razlika v fizični aktivnosti na kolesih za tek med mišmi WT in mišmi brez gena SF-1 predvsem posledica povečane aktivnosti pri intaktnih miših WT. Pri intaktnih miših WT pa smo ugotovili tudi spolno razliko v fizični aktivnosti na kolesih za tek; samice WT so bile aktivnejše (p < 0.05) kot samci WT. Spolnih razlik v fizični aktivnosti na kolesih za tek pri miših GDX/WT in miših brez gena SF-1 nismo ugotovili. V poskusu 2 so bile miši ves čas življenja združene v skupinah in na hrani brez fitoestrogenov in s 4-odstotno vsebnostjo maščob. Spremljali smo dnevno fizično aktivnost na kolesih za tek miši brez gena SF-1 in njihovih kontrol GDX/WT pri starosti P42 in P180. Z dvofaktorsko analizo variance smo ugotovili, da so bile miši GDX/WT statistično značilno aktivnejše (p < 0.05) od miši brez gena SF-1 pri starosti P180 (slika 3 B). Ugotovili smo tudi vpliv spola (p < 0.05) na fizično aktivnost na kolesih za tek, pri čemer so bile samice aktivnejše od samcev, kar je bila posledica povišane aktivnosti samic GDX/WT. Interakcija genotipa in spola je bila statistično značilna (p < 0,05); s Fisherjevim LSD post hoc testom smo ugotovili, da so bile samice GDX/WT aktivnejše (p = 0,001) od samcev GDX/WT in miši brez gena SF-1 (p < 0,001) 0,001). Spolnih razlik v aktivnosti pri miših brez gena SF-1 nismo ugotovili. V drugem poskusu se je povprečna fizična aktivnost na kolesih za tek pri miših brez gena SF-1 znižala s starostjo (ni prikazano). Vendar se razmerja med skupinami v fizični aktivnosti na kolesih za tek pri starosti P42 v prvem in drugem poskusu niso razlikovala od tisih pri starosti P180. Rezultati fizične aktivnosti na kolesih za tek pri starosti P42 v prvem in drugem poskusu niso prikazani.



Slika 3: Dnevna fizična aktivnost na kolesu za tek po skupinah miši pri starosti P180 v prvem (**A**) in drugem poskusu (**B**). **A**] V prvem poskusu so bile miši izolirane in hranjene s standardno krmo. V tem poskusu so bile miši WT statistično značilno aktivnejše (**p < 0,01) kot miši SF-1 KO. Fizična aktivnost na kolesih za tek se pri miših GDX/WT ni razlikovala (p = 0,064) glede na miši SF-1 KO pri obeh spolih. Pri intaktnih miših WT smo ugotovili razliko med spoloma; samci WT so imeli nižjo fizično aktivnost na kolesu za tek

kot samice WT (*p < 0,05). **B**] V drugem poskusu so bile vse miši združene in na krmi brez fitoestrogenov s 4-odstotno vsebnostjo maščob. Z dvofaktorsko analizo variance smo ugotovili vpliv spola (p < 0,05) in genotipa (p < 0,001) na fizično aktivnost na kolesu za tek, statistično značilna je bila tudi interakcija med spolom in genotipom (p < 0,05). Miši SF-1 KO so bile statistično značilno manj aktivne (***p < 0,001) kot miši GDX/WT, pri katerih pa so bile prisotne spolne razlike; samci GDX/WT so bili statistično značilno manj aktivni (***p < 0,001) kot samice. Rezultati so predstavljeni kot povprečja ± S. E. M.

4.3.2 MERJENJE SPONTANE CELOTNE AKTIVNOSTI MIŠI S SISTEMOM ZA MERJENJE AKTIVNOSTI MOTOR MONITOR

Pri odraslih miših, starih 6 mesecev, smo njihovo spontano celotno aktivnost spremljali tudi s sistemom za merjenje aktivnosti Motor Monitor (Kinder Scientific), ki omogoča zapisovanje vseh gibov v 2D-prostoru. Pred testom so bile miši združene, nato smo miši osamili in merili njihovo spontano celotno aktivnost 6 zaporednih dni. Slika 4 A prikazuje povprečno spontano celotno aktivnost v dveurnih intervalih pri posameznih skupinah miši v obdobju šestih dni (WT/CAS n = 13; WT/OVX n = 4; SF-1 KO M n = 6; SF-1 KO F n = 10). Rezultati potrjujejo rezultate fizične aktivnosti na kolesih za tek, da so bile miši veliko aktivnejše v temni fazi kot v svetli fazi dnevnega cikla. Faza povečane spontane celotne aktivnosti je nastopila z začetkom teme in je trajala do konca temne faze. Takšen vzorec spontane celotne aktivnosti je zaslediti skozi vse dni merjenja in je podoben pri vseh skupinah miši. Zato smo za posamezne skupine miši izračunali povprečno spontano celotno aktivnost v okviru 24 ur, kot je prikazano na sliki 4 B. Slika 4 C prikazuje sponatno celotno aktivnost (število prekinjenih žarkov) po posameznih skupinah živali v obdobju šestih dni. Dvofaktorska analiza variance je pokazala na vpliv genotipa (p = 0.001) na sponatno celotno aktivnost. Miši GDX/WT so bile statistično značilno aktivnejše kot miši brez gena SF-1. Statistično značilna (p = 0,005) je bila tudi interakcija med spolom in genotipom, zato sklepamo na vlogo jedra VMH in spola pri uravnavanju spontane celotne aktivnosti. S post hoc Fisherjevim LSD-testom smo ugotovili, da so bile samice GDX/WT statistično značilno najaktivnejše (p > 0.05), samci GDX/WT pa so bili aktivnejši (p > 0.05) le od samic brez gena SF-1. Spolnih razlik v spontani celotni aktivnosti pri miših brez gena SF-1 ni bilo.



Slika 4: **A]** Prikaz povprečne spontane celotne aktivnosti pri posameznih skupinah odraslih miših v dveurnih intervalih v času 6 dni. Na sliki je razvidna povečana spontana celotna aktivnost med temno fazo (temne črte na osi x). **B]** Prikaz spontane celotne aktivnosti posameznih skupin miši v 24 urah po 1-urnih intervalih (temna faza je prikazana v intervalu prvih 12 ur). Vrednosti so predstavljene kot povprečje \pm S. E. M. **C]** Prikaz spontane celotne aktivnosti (število prekinjenih žarkov v šestih dneh) po posameznih skupinah. Miši SF-1 KO so bile statistično značilno manj aktivne od miši WT/GDX (***p = 0,001). *Post*

hoc analiza s Fisherjevim LSD-testom je pokazala, da so bile samice GDX/WT aktivnejše od samcev GDX/WT (*p > 0,05). Vrednosti so prikazane kot povprečje \pm S. E. M.

4.4 PROUČEVANJE NEVRONSKIH POVEZAV Z LIPOFILNIM BARVILOM NEUROVUE

Eden izmed načinov proučevanja nevronskih povezav je retrogradno označevanje možganskega tkiva z lipofilnimi barvili, ki se vključijo v membrane nevronov. Proučevali smo eferentne povezave iz POA v hipotalamus in področje mandlja. Na slikah 5 e in f je prikazano mesto vnosa barvila v POA. Na sliki 5 so prikazane reprezentativne slike področij potovanja barvila NeuroVue iz POA. Opazili smo, da povezave iz ene polovice POA potekajo lateralno in ipsilateralno v hipotalamus in področje mandlja. Na slikah 5 c in d je prikazan eden izmed presekov področja ob optičnem živcu, kjer prehajajo povezave iz hipotalamusa v področje mandlja. Razlik v poteku in številu teh povezav med mišmi GDX/WT in mišmi brez gena SF-1 nismo opazili. Na slikah 5 a in b je prikazan prerez skozi jedro VMH. Pri miših GDX/WT opazimo, da povezave iz POA potekajo le do nevronov na meji jedra VMH, ne pa tudi v samo jedro, zato vidimo samo jedro VMH kot temnejšo elipsasto strukturo na sliki 5 a, kamor barvilo ni pripotovalo. Pri miših brez gena SF-1 povezave iz POA prav tako potekajo do nevronov jedra VMH, vendar je zaradi spremenjene razporeditev nevronov (Dellovade in sod., 2000; Budefeld in sod., 2008) spremenjena tudi razporeditev povezav. Kot je prikazano na sliki 5 b, je celotno področje VMH enakomerno obarvano, kar kaže, da pri miših brez gena SF-1 nevronske povezave iz POA potekajo tudi v samo področje jedra VMH.



Slika 5: Prikaz živčnih povezav iz POA v kavdalna področja možganov z uporabo lipofilnega barvila NeuroVue. Barvilo je bil vneseno v POA z ventralne strani (e, f). Povezave iz POA v področje mandlja (c, d) so bile prisotne in se niso razlikovale med mišmi WT in SF-1 KO. Povezave iz POA v jedro VMH (a, b) so se razlikovale med mišmi WT in SF-1 KO. Pri miših WT je vidna izključenost obarvanih vlaken iz jedra VMH (5 a – temna lisa), pri miših SF-1 KO pa so obarvana vlakna enakomerno razporejena po področju. f – svod; I – mesto vnosa barvila; OT – optični trakt; 3V – tretja možganska kletka, merilo: 100 μm

4.5 IZRAŽENOST BELJAKOVIN V MOŽGANIH PRI MIŠIH GDX/WT IN MIŠIH BREZ GENA *SF-1*

4.5.1 IZRAŽENOST NEVRALNE SINTAZE DUŠIKOVIH OKSIDOV (nNOS) V VMESNIH MOŽGANIH

4.5.1.1 Anteroventralni del periventrikularnega jedra (AVPV)

V rostralnem delu AVPV je bila beljakovina nNOS močno izražena v telesih nevronov in njihovih izrastkih. Na sliki 6 so predstavljene slike imunohistokemičnega barvanja s protitelesi proti nNOS (a – WT/CAS; b – SF-1KO M; c – WT/OVX; d – SF-1KO F). Število nNOS-imunoreaktivnih nevronov smo ovrednotili po vrsticah v področju od baze možganov do 767 μ m dorzalno in 512 μ m lateralno od tretje možganske kletke (slika 7). Statistična analiza, pri kateri je bila kot tretja spremenljivka upoštevana razdalja od baze možganov, je pokazala vpliv spola na število imunoreaktivnih nevronov (F(1, 21) = 4,89, p < 0,05). Samci pri obeh genotipih so imeli več imunoreaktivnih nevronov v rostralnem delu AVPV. Interakcija med spolom in genotipom ni bila statistično značilna (p > 0,1), zato sklepamo, da je opažena razlika v številu imunoreaktivnih nevronov neodvisna od izpostavljenosti možganov spolnim hormonom.



Slika 6: Prikaz rostralnega dela POA z nevroni, ki izražajo nNOS. Skupina imunoreaktivnih nevronov ob tretji možganski kletki (puščica) pripada rostralnemu delu AVPV. (a – WT/CAS; b – SF-1 KO M; c – WT/OVX; d – SF-1 KO F); aca – sprednji del sprednje komisure, OT – optični trakt, 3V – tretja možganska kletka



Slika 7: Grafični prikaz števila nNOS-imunoreaktivnih nevronov po vrsticah v ventrodorzalni smeri. Statistična analiza je pokazala vpliv spola na število imunoreaktivnih nevronov po posameznih vrsticah (F(1, 21) = 4,89, p < 0,05), pri čemer so samci imeli večje število imunoreaktivnih nevronov neodvisno od genotipa. Interakcija med spolom in genotipom ni bila statistično značilna (p > 0,1). Število nevronov je prikazano kot povprečje \pm S. E. M.

4.5.1.2 Kavdalni del predoptičnega področja (POA/AH)

Beljakovina nNOS je bila prisotna v telesih in izrastkih nevronov v kavdalnem delu POA. Na sliki 8 je prikazana razporeditev imunoreaktivnih nevronov v področju POA v dveh zaporednih rezinah v razmiku 100 µm (a,b – WT/CAS; c,d – WT/OVX; e,f – SF-1 KO M; g,h – SF-1KO F). Večina imunoreaktivnih nevronov v preiskovanem področju je pripadala medialnemu predoptičnemu jedru (MPO), vendar samo pri samcih GDX/WT (sliki 8 a, b) opazimo povečano površino nNOS-imunoreaktivnih nevronov in vlaken na mestu centralnega dela medialnega predoptičnega jedra (MPOC). Statistična analiza celotne imunoreaktivne površine v področju je pokazala vpliv spola na velikost imunoreaktivne površine (F(1, 23) = 10,53, p < 0,01). Pri samcih obeh genotipov je bila površina imunoreaktivnosti večja (slika 9). Interakcija med spolom in genotipom ni bila statistično značilna (p > 0,1), zato sklepamo, da je razlika v številu nNOS-imunoreaktivnih vlaken in nevronov neodvisna od izpostavljenosti spolnim hormonom.



Slika 8: Prikaz prereza kavdalnega dela POA in postavitve nNOS-imunoreaktivnih elementov v dveh zaporednih rezinah v razmiku 100 μm (a,b – WT/CAS; c,d – WT/OVX; e,f – SF-1 KO M; g,h – SF-1 KO F). Puščica označuje povečano površino imunoreaktivnih vlaken na področju jedra MPOC, ki je značilno samo za GDX/WT samce. Oznake za oddaljenost rezin od bregme so povzete po atlasu mišjih možganov (Paxinos in Franklin, 2001). OT – optični trakt; 3V – tretja možganska kletka; merilo: 100 μm



Slika 9: Grafični prikaz nNOS-imunoreaktivnega področja v kavdalnem delu POA. Pri samcih obeh spolov smo ugotovili večjo površino imunoreaktivnosti za nNOS kot pri samicah (F(1, 23) = 10,53, **p < 0,01). Vrednosti so prikazane kot povprečje ± S. E. M

4.5.1.3 Spodnje jedro končne strije (BNST)

Izraženost nNOS v BNST smo proučevali na prečnih rezinah, oddaljenih 0,22 mm kavdalno od bregme. Na tem prerezu se med končno strijo (st) in srednjo strijo talamusa (sm; ni vidno na sliki 10 pri tej povečavi) nahajajo jedra medialnega dela BNST. Imunoreaktivni nevroni so bili porazdeljeni po vsem področju BNSTM, kot je prikazano na sliki 10. Zaradi primerjave z nevroni, ki izražajo kalbindin, smo nNOS-imunoreaktivne nevrone kvantificirali v področju 7×5 (prikazano na sliki 17) in v celotnem področju BNSTM. Število nevronov v preiskovanem področju 7×5 je bilo podobno pri vseh skupinah. Pri obeh načinih štetja interakcija med spolom in genotipom ni bila statistično značilna. Vendar je obstajal močen statističen trend (p = 0,06) k večjemu številu nevronov pri samcih pri obeh genotipih v celotnem področju BNSTM (slika 11).



Slika 10: Prikaz prereza BNSTM z nevroni, ki izražajo nNOS (a – WT/CAS; b – SF-1 KO M; c – WT/OVX; d – SF-1 KO F), st – končna strija, D3V – dorzalni del tretje možganske kletke; merilo: 100 μm



Slika 11: Grafični prikaz števila nevronov, ki izražajo nNOS v celotnem področju BNSTM, ki je prikazano na sliki 10. Ugotovili smo močan statistični trend (p = 0,06) k večjemu številu nevronov v BNSTM pri samcih obeh genotipov. Vrednosti so predstavljene kot povprečje \pm S. E. M.

4.5.1.4 Ventromedialno jedro hipotalamusa (VMH)

Struktura jedra VMH je spremenjena pri miših brez gena *SF-1*. Barvanje rezin možganov po Nisslu pokaže, da pri miših brez gena *SF-1* telesa nevronov obstajajo v področju, vendar niso združena v skupno jedro in jih ne obdaja področje z manjšo gostoto teles nevronov, kot to zasledimo pri miših WT (slika 12).

Izraženost nNOS v nevronih jedra VMH smo proučevali na prečnih rezinah, oddaljenih 1,7 mm kavdalno od bregme. Položaj nNOS-imunoreaktivnih nevronov v jedru VMH je bil spremenjen pri miših brez gena *SF-1*. Nevroni, ki so se pri miših GDX/WT nahajali pretežno v ventrolateralnem delu jedra VMH, so bili pri miših brez gena *SF-1* pomaknjeni dorzomedialno v področje VMH proti tretji možganski kletki (slika 13), njihova razporeditev pa je bila odvisna od spola in genotipa (F(9, 270) = 2,97, p < 0,01). Število nevronov v ventrolateralnem delu VMH (762 μ m–847 μ m od 3V) je bilo večje pri samicah GDX/WT kot pri samcih GDX/WT. Pri miših brez gena *SF-1* pa spolnih razlik v številu nevronov v

področju VMH ni bilo več (slika 14). Zaradi odsotnosti spolnih razlik pri miših brez gena *SF-1* spolne razlike pri miših GDX/WT razložimo kot razlike odvisne od prisotnosti spolnih žlez.



Slika 12: Prikaz področja VMH na rezinah možganov barvanih po Nisslu. Pri miših WT je na mestu jedra VMH zgoščeno področje teles nevronov, ki ga obdaja ožji pas z manjšo vsebnostjo teles nevronov. Pri miših SF-1 KO je arhitektura področja spremenjena, vendar telesa nevronov obstajajo v področju. 3V – tretja možganska kletka, Arc – arkvatno jedro; merilo: 100 μm



Slika 13: Prikaz prereza jedra VMH z nevroni, ki izražajo nNOS (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F). Pri miših SF-1 KO so nevroni pomaknjeni dorzomedialno proti tretji možganski kletki; Arc – arkvatno jedro; f – svod; VMH – ventromedialno jedro hipotalamusa; 3V – tretja možganska kletka; merilo: 100 μm



Slika 14: Grafični prikaz števila nNOS-imunoreaktivnih nevronov po področjih širokih 85 μ m v lateralni smeri od 3V. Razporeditev nNOS-imunoreaktivnih nevronov je bila specifična za genotip. Miši SF-1 KO so imel več nevronov v področju od 0 μ m do 508 μ m od 3V, miši GDX/WT pa v področju od 593 μ m do 847 μ m od 3V. Število nevronov je bilo večje pri samicah GDX/WT v področju od 762 μ m do 847 μ m od 3V, samci GDX/WT pa so imeli več nevronov v področju od 593 μ m do 678 μ m od 3V. Spolne razlike v področju VMH pri miših SF-1 KO niso bile prisotne. Število nevronov po področjih je predsatavljeno kot povprečje ± S. E. M.

4.5.1.5 Mandelj

Izraženost nNOS v področju mandlja smo proučevali na prerezu 1,7 mm kavdalno od bregme. Število nNOS-imunoreaktivnih nevronov je bilo majhno, njihova razporeditev pa je bila omejena samo na anteriorni del bazolateralnega jedra mandlja (BLA) (ni prikazano). Spolnih razlik v številu nNOS-imunoreaktivnih nevronov ni bilo (ni prikazano).

4.5.2 IZRAŽENOST BELJAKOVINE KALBINDIN D-28k (KALBINDIN) V VMESNIH MOŽGANIH

4.5.2.1 Kavdalni del predoptičnega področja (POA/AH)

V POA se je večina kalbindinskih-imunoreaktivnih nevronov nahajala v medialnem predoptičnem jedru, zato smo pri analizi upoštevali področje med OT in aca ter 600 μm lateralno od tretja možganske kletke (slika 15). Število nevronov v medialnem predoptičnem jedru se ni razlikovalo med skupinami miši (slika 16). Pri samcih GDX/WT opazimo skupek kalbindinskih-imunoreaktivnih nevronov na mestu jedra MPOC (označeno s puščico; slika 15 a), ki pri drugih genotipih ni oblikovano.

4.5.2.2 Spodnje jedro končne strije (BNST)

Večina kalbindinskih-imunoreaktivnih nevronov je pripadala posteromedialnemu delu spodnjega jedra končne strije BNSTMP, zato smo kvantificirali število nevronov v področju 7×5 kvadratov, ki je označeno na sliki 17. Število imunoreaktivnih nevronov je bilo večje pri samcih kot pri samicah GDX/WT, samice miši brez gena *SF-1* pa so imele večje število imunoreaktivnih nevronov kot samci brez gena *SF-1*. Število imunoreaktivnih nevronov je bilo podobno pri samicah obeh genotipov, samci brez gena *SF-1* pa so imeli manj kalbindinskih nevronov kot samci GDX/WT, zato je bila interakcija med genotipom in spolom statistično značilna (F(1, 21) = 4,99, p < 0,05; slika 18). Ker razlika med spoloma pri miših brez gena *SF-1* ni bila vidna pri miših GDX/WT (oziroma je bila razlika nasprotna), sklepamo, da na razlike v številu nevronov vpliva prisotnost spolnih žlez prisotnost spolnih kromosomov.



Slika 15: Prerez kavdalnega dela predoptičnega področja v rezinah, obarvanih s protitelesi proti kalbindinu (a – WT/CAS; b – SF-1 KO M; c – WT/OVX; d – SF-1 KO F). Puščica označuje skupino nevronov v področju jedra MPOC, ki je značilna samo za samce GDX/WT. aca – sprednjii del sprednje komisure, OT – optični trakt, 3V – tretja možganska kletka; merilo: 100 μm



Slika 16: Grafični prikaz števila kalbindinskih-imunoreaktivnih nevronov v kavdalnem delu POA. Število nevronov je bilo podobno med skupinami miši WT/GDX in SF-1 KO. Vrednosti so prikazane kot povprečje \pm S. E. M.

4.5.2.3 Ventromedialno jedro hipotalamusa (VMH)

Izraženost kalbindina v nevronih jedra VMH smo proučevali na prečnih rezinah oddaljenih 1,7 mm kavdalno od bregme. Položaj kalbindinskih-imunoreaktivnih nevronov v jedru VMH je bil spremenjen pri miših brez gena *SF-1*. Nevroni, ki so se pri miših GDX/WT nahajali pretežno v ventrolateralnem delu jedra VMH, so bili pri miših brez gena *SF-1* pomaknjeni dorzomedialno v področje VMH proti tretji možganski kletki (slika 19). Kvantitativna analiza je pokazala statistično značilno interakcijo med spolom in genotipom in oddaljenostjo od tretje možganske kletke (F(9, 270) = 6,53, p < 0,001). Število imunoreaktivnih nevronov v ventrolateralnem delu VMH je bilo pri samicah GDX/WT večje kot pri samcih GDX/WT. Spolne razlike so se ohranile pri miši brez gena *SF-1*, kljub spremenjenemu položaju imunoreaktivnih nevronov. Število imunoreaktivnih nevronov v celotnem področju je bilo tako manjše pri samcih brez gena *SF-1* kot pri samicah brez gena *SF-1* in kontrolnih miših, ugotovljene razlike pomenijo primer spolne diferenciacije v odsotnosti spolnih žlez.



Slika 17: Prikaz prereza medialnega dela BNST. Večina kalbindinskih-imunoreaktivnih nevronov se je nahajala v področju BNSTMP. Okvir označuje področje 7×5 kvadratov na mreži, v katerem smo prešteli nevrone (a – WT/CAS; b – SF-1 KO M; c – WT/OVX; d – SF-1 KO F); st – stria terminalis; D3V – dorzalni del tretje možganske kletke; merilo: 100 μ m



Slika 18: Grafični prikaz števila kalbindinskih-imunoreaktivnih nevronov v področju 7 × 5 v BNSTM. Spolne razlike v številu imunoreaktivnih nevronov so bile prisotne pri GDX/WT miših, kjer so samci imeli več imunoreaktivnih nevronov. Razmerje je bilo obrnjeno pri miših SF-1 KO, zato je bila interakcija med spolom in genotipom statistično značilna (F(1, 21) = 4,99, p < 0,05). Vrednosti so predstavljene kot povprečje ± S. E. M.; a – spolne razlike med mišmi GDX/WT (p < 0,05); b – spolne razlike med mišmi SF-1 KO (p < 0,05).



Slika 19: Prikaz prereza jedra VMH z nevroni, ki izražajo kalbindin (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F). Pri miših SF-1 KO so nevroni pomaknjeni dorzomedialno proti tretji možganski kletki; Arc – arkvtano jedro; f – svod; VMH – ventromedialno jedro hipotalamusa; 3V – tretja možganska kletka; merilo: 100 μm



Slika 20: Grafični prikaz števila kalbindinskih-imunoreaktivnih nevronov po področjih širokih 85 μ m v lateralni smeri od tretje možganske kletke. Spolne razlike v številu imunoreaktivnih nevronov v ventrolateralnem delu VMH (678 μ m – 847 μ m) pri GDX/WT miših so bile prisotne tudi pri miših SF-1 KO, vendar v vsem področju (F(9, 270) = 6,53, p < 0,001). Število imunoreaktivnih nevronov po stolpcih je predstavljeno kot povprečje ± S. E. M.

4.5.2.4 Mandelj

Izraženost kalbindina v področju mandlja smo proučevali na prerezu 1,7 mm kavdalno od bregme. Nevroni, ki so vsebovali kalbindin, so bili prisotni po vsem področju mandlja, kot prikazuje slika 21. Po nekaterih podatkih iz literature obstajajo razlike v številu nevronov med levim in desnim mandljem, zato smo za kvantifikacijo nevronov vedno izbrali stran z večjim številom nevronov. Celotno število nevronov (ni prikazano) in število nevronov po posameznih področjih mandlja (slika 22) se med skupinami miši ni razlikovalo (p > 0,05). Največ nevronov je bilo v predelu od 635 µm do 889 µm v dorzolateralni smeri od optičnega trakta (p < 0,001), kar ustreza anteriornemu delu bazolateralnega jedra mandlja (BLA) in posteriornemu delu bazomedialnega jedra mandlja (BMP).



Slika 21: Prikaz kalbindinskih-imunoreaktivnih nevronov v prerezu mandlja 1,7 mm kavdalno od bregme. A – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F; anteriorni (BLA), posteriorni (BLP), ventralni (BLV) del bazolateralnega jedra mandlja; posteriorni (BMP) in anteriorni (BMA) del bazomedialnega jedra mandlja; kapsularni (CeC), lateralni (CeL) del centralnega jedra mandlja; ec – zunanja kapsula; posterodorzalni del (MePD), posteroventralni (MePV) del medialnega jedra mandlja, st – končna strija; merilo: 100 μm



Slika 22: Grafični prikaz števila kalbindinskih-imunoreaktivnih nevronov v področju mandlja na prerezu 1,7 mm kavdalno od bregme. Razlik v številu nevronov med skupinami miši ni bilo (p > 0,05). Največ nevronov je bilo v področju od 635 μ m do 889 μ m od OT, ki ustreza delu BLA (slika 21). Število nevronov po stolpcih je predstavljeno kot povprečje ± S. E. M.

4.5.3 IZRAŽENOST PEPTIDA ARGININ VAZOPRESINA (AVP) V VMESNIH MOŽGANIH

4.5.3.1 Področje stranskega pretina (LS)

V področju LS se končujejo aksoni nevronov, ki izražajo AVP in katerih telesa se v glavnem nahajajo v jedru BNST in področju mandlja. Na sliki 23 so predstavljene slike imunohistokemičnega barvanja s protitelesi proti AVP (a – WT M; b – WT F; c – WT/CAS; d – WT/OVX; e – SF-1 KO M; f – SF-1 KO F) v preiskovanem področju LS na prečnem prerezu oddaljenim 0,26 mm rostralno od bregme. Največjo površino imunoreaktivnih vlaken na tem prerezu smo ugotovili v ventralnem delu LS (*angl.* lateral septum, ventral, LSV). Miši GDX/WT in miši brez gena *SF-1* so bile tretirane s testosteronom 3 mesece pred
žrvovanjem, intaktne miši WT v neodvisnem poskusu pa niso bile tretirane. Statistična analiza AVP-imunoreaktivne površine aksonov je pokazala na prisotnost spolnih razlik pri intaktnih miših WT. Miši GDX/WT in miši brez gena *SF-1* se niso razlikovale po velikosti imunoreaktivne površine, njihove vrednosti pa so bile v območju vrednosti pri intaktnih samcih WT (slika 24). Pri samcih GDX/WT smo ugotovili močan trend (p = 0,08) k večji imnoreaktivni površini AVP v primerjavi s samci miši brez gena *SF-1*.

4.5.3.2 Struktura ventromedialnega hipotalamusa in njegove neposredne okolice

V okolici rostralnega dela VMH v prečnem prerezu opazimo aksone nevronov sistema paraventrikularnaga jedra in supraoptičnega jedra, ki močno izražajo AVP in potekajo do središčne štrline. Gre za področje od 1,0 mm do 1,7 mm kavdalno od bregme, kjer omenjeni aksoni obdajajo jedro VMH na njegovi rostralni, dorzalni in ventrolateralni strani (slika 25). Pri miših brez gena *SF-1* je potek teh aksonov spremenjen. Kot je prikazano na sliki 25 b, aksoni v področju TC, ki se nahaja na rostralni strani VMH, potekajo do središčne štrline bolj navpično kot pri miših GDX/WT (slika 25 a). V stranski okolici jedra VMH pa so aksoni pomaknjeni bolj v sredino proti tretji možganski kletki (sliki 25 d, f) v primerjavi z aksoni pri miših GDX/WT (sliki 25 c, e). Razpršenost teh aksonov je večja pri miših brez gena *SF-1*, vendar ni znano, ali je spremenjeno tudi njihovo število. Na prečnih rezinah 1,7 mm kavdalno od bregme najdemo tudi razlike v položaju aksonov v periventrikularnem jedru. Pri miših GDX/WT je večina teh omejena na periventrikularno jedro, pri miših brez gena *SF-1* pa je imunoreaktivno področje veliko večje in obsega tudi del dorzomedialnega jedra in področja VMH (slika 25 f, označeno s puščico).



Slika 23: Prikaz AVP-imunoreaktivnih vlaken na prerezu LS 0,26 mm rostralno od bregme. Največ imunoreaktivnih vlaken je pripadalo ventralnemu delu LS pri vseh skupinah miši. a – WT M; b – WT F; c – WT/CAS; d – WT/OVX; e – SF-1 KO M; f – SF-1 KO F; LV – stranska možganska kletka; merilo 100 μ m



Slika 24: Grafični prikaz AVP-imunoreaktivne površine v področju LS. Intaktne samice WT (WTF) so imeli statistično značilno manjšo (**p < 0,01) AVP-imunoreaktivno površino v primerjavi s samci WT (WTM), mišmi GDX/WT in mišmi SF-1 KO. Vrednosti so prikazane kot povprečje ± S. E. M.



Slika 25: Prikaz AVP-imunoreaktivnih vlaken pri miših WT/GDX in SF-1 KO v rostralni okolici jedra VMH (a,c – WT; b,d – SF-1 KO) in v dorzalni ter stranski okolici področja VMH (e, f) na prečnih rezinah oddaljenih 0,9 mm (a, b), 1,2 mm (b, d) in 1,7 mm (e, f) kavdalno od bregme. Prikazana vlakna izhajajo iz jeder Pe, Pa, SON in področja stranskega hipotalamusa, prehajajo področje TC in bazo možganov ter se končujejo v nevrohipofizi. Pri miših SF-1 KO so vlakna nameščena bolj pravokotno na bazo možganov v področje TC (b, d – puščica), v bolj kavdalnih področjih VMH so vlakna pomaknjena v področje VMH, bližje

tretji možganski kletki (f). Puščica na sliki f označuje imunoreaktivno področje periventrikularnega jedra, ki je pri miših SF-1 KO širše. f – svod; OT – optični trakt; Pa – paraventrikularno jedro; TC – siva grba; 3V – tretja možganska kletka, merilo: 100 μm

4.6 IZRAŽENOST PEPTIDOV, KI SODELUJEJO PRI UREJANJU ENERGETSKE HOMEOSTAZE

Pri miših brez gena *SF-1* in kontrolnih miših smo ugotavljali izraženost peptidov AgRP, NPY, PPOX in CART v nekaterih jedrih hipotalamusa z namenom ugotoviti spolne razlike v izraženosti peptidov in vpliv pomanjkanja SF-1 na spremembe v izraženosti teh peptidov.

4.6.1 IZRAŽENOST NPY IN AgRP V PARAVENTRIKULARNEM JEDRU

Izraženost AgRP in NPY v paraventrikulrnem jedru smo proučevali v največjem preseku skozi to jedro na rezinah oddaljenih 0,82 mm kavdalno od bregme. Periventrikularno jedro, ki leži ob meji tretje možganske kletke, v analizo ni bilo vključeno. Na slikah 26 in 28 je prikazan presek skozi paraventrikularno jedro. Značilna razporeditev imunoreaktivnosti kaže na prisotnost peptidov AgRP in NPY v aksonih nevronov paraventrikularnega jedra in aksonih, ki izhajajo iz jeder VMH, Arc in področja POA in oživčujejo nevrone v tem jedru. Velikost imunoreaktivnega področja peptidov AgRP (slika 27) in NPY (slika 29) v paraventrikularnem jedru se ni razlikovala med spoloma ali genotipoma.



Slika 26: Prikaz obarvanja s protitelesi proti AgRP v prerezu jedra Pa v rezinah oddaljenih 0,82 mm kavdalno od bregme. Izraženost AgRP je bila omejen le na aksone v jedru Pa (puščica). (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F); f – svod; 3V – tretja možganska kletka; merilo: 100 μm



Slika 27: Grafični prikaz imunoraktivne površine AgRP v prerezu jedra Pa. Velikost imunoreaktivne površine AgRP je bila podobna med vsemi skupinami miši. Vrednosti so prikazane kot povprečje \pm S. E. M.



Slika 28: Prikaz obarvanja s protitelesi proti NPY v prerezu jedra Pa v rezinah oddaljenih 0,82 mm kavdalno od bregme. Izraženost NPY je bila omejen le na aksone v jedru Pa (puščica). (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F); f – svod; 3V – tretja možganska kletka; merilo: 100 μ m



Slika 29: Grafični prikaz imunoreaktivne površine NPY v prerezu jedra Pa. Velikost imunoreaktivne površine je bila podobna med vsemi skupinami miši. Vrednosti so prikazane kot povprečje \pm S. E. M.

4.6.2 IZRAŽENOST AgRP, CART IN NPY V SREDNJEM IN STRANSKEM HIPOTALAMUSU

Izraženost peptidov AgRP, NPY in CART smo proučili v področju VMH na treh rezinah, oddaljenih 1,0 mm (slike 30, 35, 38), 1,7 mm (slike 31, 36, 39) in 1,9 mm (slike 32, 37, 40) kavdalno od bregme. Tako smo v analizo zajeli rostralni, srednji in kavdalni del področja VMH in njegove okolice. Imunoreaktivni elementi AgRP in NPY pri miših GDX/WT so bili izključeni iz področja jedra VMH. Izraženost je bila omejena na aksone v arkvatnem jedru, periventrikularnem in paraventrikularnem jedru, jedru DMH, v področju stranskega hipotalamusa in v okolici področja ventrolateralnega dela jedra VMH. V arkvatnem jedru smo ugotovili izraženost AgRP in NPY tudi v telesih nevronov. Pri miših brez gena SF-1 obeh spolov so bila mesta izraženosti AgRP in NPY podobna kot pri miših GDX/WT, vendar je bila imunoreaktivna površina v področju VMH večja. Tako smo pri miših brez gena SF-1 opazili povečanje imunoreaktivnosti v področju jedra VMH iz vseh smeri. Na preseku 1,0 mm kavdalno od bregme smo opazili premik imunoreaktivnega barvanja v dorzo-lateralni smeri iz arkvatnega jedra (AgRP - slika 30, NPY - slika 35). V preseku 1,7 mm kavdalno od bregme je bila pri miših brez gena SF-1 povečana površina imunoreaktivnosti na mestu jedra VMH (sliki 31 in 36). Analiza površine imunoreaktivnosti na področju VMH (slika 33) je pokazala, da imajo miši brez gena SF-1 statistično značilno večjo (p < 0.001) AgRP (slika 34) in NPY (ni prikazano) imunoreaktivno površino kot miši GDX/WT. Podoben položaj imunoreaktivnih vlaken živčnih celic na mestu jedra VMH je bil viden tudi na kavdalnem delu jedra VMH (AgRP – slika 32, NPY – slika 37).

Prisotnost anoreksigenega peptida CART pri GDX/WT miših smo ugotovili v telesih nevronov v arkvatnem jedru, neposredni okolici jedra VMH in v področju stranskega hipotlamusa ter v nevronskih vlaknih v arkvatnem jedru na vseh treh prerezih skozi ventromedialno področje hipotalamusa (slike 38–40). Pri miših brez gena *SF-1* so bila mesta imunoreaktivnih elementov podobna, vendar je bil položaj CART-imunoreaktivnih nevronov spremenjen. Položaj nevronov ni bil več omejen na arkvatno jedro in okolico jedra VMH na rezinah 1,7 mm (slika 39) in 1,9 mm kavdalno od bregme (slika 40). Analiza imunoreaktivnih nevronov v področju jedra VMH na razinah 1,7 mm kavdalno od bregme je pokazala, da je bilo pri miših brez gena *SF-1* na področju, ki ustreza jedru VMH (416–728 µm dorzalno od baze) število CART-imunoreaktivnih nevronov večje (p < 0,05) kot pri miši

GDX/WT (slika 41). Celotno število imunoreaktivnih nevronov se v tem področju ni razlikovalo med skupinami miši (ni prikazano). Pri miših brez gena *SF-1* zasledimo tudi spremembe v razporeditvi nevronskih vlaken, ki vsebujejo CART. Le-ta niso bila omejena na arkvatno jedro, kot je bilo to značilno za miši GDX/WT in je prikazano na slikah 38–40.



Slika 30: Prikaz razporeditve AgRP-imunoreaktivnih vlaken na prerezu 1,0 mm kavdalno od bregme. Vlakna so vidna v jedru Pa in Pe ter Arc. Pri miših SF-1 KO je površina vlaken večja na ventralnem delu rezine, kjer so vlakna pomaknjena dorzolateralno v področje VMH. (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F), 3V – tretja možganska kletka; Arc – arkvatno jedro; f – svod; Pa – paraventrikularno jedro; Pe – periventrikularno jedro; LH – stranski hipotalamus; merilo: 100 μm



Slika 31: Prikaz razporeditve AgRP-imunoreaktivnih vlaken na prerezu 1,7 mm kavdalno od bregme. Vlakna so pri miših GDX/WT vidna v jedru Pe in Arc, področju LH ter na meji VMH. Pri miših SF-1 KO je površina vlaken na mestu VMH povečana. (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F), 3V – tretja možganska kletka, Arc – arkvatno jedro; DMH – dorzomedialno jedro hipotalamusa; f – svod; LH – stranski hipotalamus; Pe – periventrikularno jedro; VMH – ventromedialno jedro hipotalamusa; merilo: 100 μm



Slika 32: Prikaz razporeditve AgRP-imunoreaktivnih vlaken na prerezu 1,9 mm kavdalno od bregme. Vlakna so pri miših GDX/WT vidna v jedru Pe, DMH, Arc, področju LH in na meji VMH. Pri miših SF-1 KO je površina vlaken na mestu VMH povečana. (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F), 3V – tretja možganska kletka, Arc – arkvatno jedro; DMH – dorzomedialno jedro hipotalamusa; f – svod; LH – stranski hipotalamus; Pe – periventrikularno jedro; VMH – ventromedialno jedro hipotalamusa; merilo: 100 μm



Slika 33: Prikaz položaja AgRP-imunoreaktivnih elementov (temno) v preseku skozi jedro VMH, oddaljenim 1,7 mm kavdalno od bregme pri miših GDX/WT in SF-1 KO. Pravokotniki na slikah označujejo področje analize imunoreaktivne površine peptida AgRP. a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F; Arc – arkvatno jedro; merilo: 100 μm



Slika 34: Grafični prikaz imunoreaktivne površine AgRP v območju VMH, ki je prikazan na sliki 33 pri miših GDX/WT in SF-1 KO. V označenem področju, ki obsega področje VMH, imajo miši SF-1 KO statistično značilno večjo (***p < 0,001) AgRP-imunoreaktivno površino kot miši GDX/WT. Razlik med spoloma v imunoreaktivni površini ni prisotnih. Vrednosti so predstavljene kot povprečje \pm S. E. M.



Slika 35: Prikaz razporeditve NPY-imunoreaktivnih vlaken na prerezu 1,0 mm kavdalno od bregme. Vlakna so vidna v jedru Pa in Pe ter Arc. Pri miših SF-1 KO je površina vlaken večja na mestu rostralnega dela področje VMH. (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F), 3V – tretja možganska kletka; Arc – arkvatno jedro; f – svod; Pa – paraventrikularno jedro; Pe – periventrikularno jedro; LH – stranski hipotalamus; merilo: 100 µm



Slika 36: Prikaz razporeditve NPY-imunoreaktivnih vlaken na prerezu 1,7 mm kavdalno od bregme. Vlakna so pri miših GDX/WT vidna v jedru Pe in Arc, v področju LH ter na meji VMH. Pri miših SF-1 KO je površina vlaken na mestu VMH povečana. (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F), 3V – tretja možganska kletka, Arc – arkvatno jedro; DMH – dorzomedialno jedro hipotalamusa; f – svod; LH – stranski hipotalamus; Pe – periventrikularno jedro; VMH – ventromedialno jedro hipotalamusa; merilo: 100 μm



Slika 37: Prikaz razporeditve NPY-imunoreaktivnih vlaken na prerezu 1,9 mm kavdalno od bregme. Vlakna so pri miših GDX/WT vidna v jedru Pe, DMH, v področju LH in na meji VMH. Pri miših SF-1 KO je površina vlaken na mestu VMH povečana. (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F), 3V – tretja možganska kletka, Arc – arkvatno jedro; DMH – dorzomedialno jedro hipotalamusa; f – svod; LH – stranski hipotalamus; Pe – periventrikularno jedro; VMH – ventromedialno jedro hipotalamusa; merilo: 100 μm



Slika: 38: Prikaz razporeditve CART-imunoreaktivnih nevronov v rostralnem delu VMH. Imunoreaktivni nevroni se nahajajo v rostralnem delu področja stranskega hipotalamusa in arkvatnem jedru. (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F), 3V – tretja možganska kletka; Arc – arkvatno jedro; f – svod; Pa – paraventrikularno jedro; Pe – periventrikularno jedro; LH – stranski hipotalamus: 100 μm



Slika: 39: Prikaz razporeditve CART-imunoreaktivnih nevronov na prerezu VMH 1,7 mm kavdalno od bregme. Pri miših GDX/WT se nevroni nahajajo v predelu stranskega hipotalamusa, na dorzomedialnem robu VMH in v arkvatnem jedru. Pri miših SF-1 KO je položaj nevronov spremenjen, nevroni so pomaknjeni v sredino in proti bazi možganov v področje VMH. (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1KO M; d – SF-1KO F), 3V – tretja možganska kletka, Arc – arkvatno jedro; DMH – dorzomedialno jedro hipotlamusa; f – svod; LH – stranski hipotalamus; Pe – periventrikularno jedro; VMH – ventromedialno jedro hipotalamusa; merilo: 100 μm



Slika 40: Prikaz razporeditve CART-imunoreaktivnih nevronov na prerezu VMH 1,9 mm kavdalno od bregme. Pri miših GDX/WT miših se nevroni nahajajo v predelu stranskega hipotalamusa, na dorzomedialnem robu VMH in v arkvatnem jedru. Pri miših SF-1 KO je položaj nevronov spremenjen, nevroni so pomaknjeni v sredino in proti bazi možganov v področje VMH. (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1KO M; d – SF-1KO F), 3V – tretja možganska kletka, Arc – arkvatno jedro; DMH – dorzomedialno jedro hipotlamusa; f – svod; LH – stranski hipotalamus; Pe – periventrikularno jedro; VMH – ventromedialno jedro hipotalamusa; merilo: 100 μm



Slika 41: Prikaz števila CART-imunoreaktivnih nevronov po vrsticah v dorzalni smeri od baze možganov na preseku VMH 1,7 mm kavdalno od bregme (slika 39). Število nevronov je bilo značilno višje pri miših GDX/WT v področju od 104 μ m do 208 μ m in 728 μ m do 832 μ m dorzalno od baze možganov. Pri miši SF-1 KO je bilo značilno višje število nevronov v predelu področja VMH od 416 μ m do 728 μ m dorzalno od baze možganov. Vrednosti so predstavljene kot povprečje ± S. E. M.; a-p < 0,01, statistično značilno večje število nevronov pri miših GDX/WT; b-p < 0,05, statistično značilno večje število nevronov pri miših SF-1 KO.

4.6.3 IZRAŽENOST NPY V PODROČJU MANDLJA

Nevropeptid NPY je bil močno izražen v vlaknih in telesih nevronov v medialnem delu področja mandlja (MePD, MePV) kot prikazuje slika 42. Dvofaktorska analiza variance je pokazala na statistično značilno (p < 0,05) večje število nevronov pri samcih miši GDX/WT in samcih brez gena *SF-1*, čeprav je bilo število nevronov pri samcih brez gena *SF-1* v območju vrednosti samic GDX/WT (slika 43). Interakcija med spolom in genotipom ni bila statistično značilna (p > 0,5), zato sklepamo, da je prisotnost spolnih razlik posledica od spolnih žlez neodvisne spolne diferenciacije.



Slika 42: Prikaz nevronov, ki izražajo NPY v medialnem delu področja mandlja na prerezu 1,7 mm kavdalno od bregme. (a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F); OT – optični trakt; merilo: 100 μm



Slika 43: Grafični prikaz števila NPY-imunoreaktivnih nevronov v medialnem delu področja mandlja na prerezu 1,7 mm kavdalno od bregme. Število nevronov je bilo večje (*p < 0,05) pri samcih miši GDX/WT in SF-1 KO kot pri samicah obeh genotipov. Vrednosti so predstavljene kot povprečje ± S. E. M.

4.6.4 PODROČJE STRANSKEGA PRETINA – NPY

Peptid NPY je bil prisoten v aksonih v ventralnem predelu stranskega pretina (LSV). Imunoreaktivno površino smo analizirali v preseku 0,26 mm rostralno od bregme (slika 44) in ugotovili statistično značilen vpliv spola (p < 0,01) na velikost imunoreaktivne površine. Samci miši GDX/WT in miši brez gena *SF-1* so imeli večjo imunoreaktivno površino kot samice (slika 45). Interakcija med spolom in genotipom ni bila statistično značilna (p > 0,5). Zaradi prisotnosti spolne razlike pri miših brez gena *SF-1* lahko sklepamo, da je nastanek razlik v imunoreaktivni površini NPY neodvisen od prisotnosti spolnih žlez.



Slika 44: Prikaz NPY-imunoreaktivnih vlaken v področju LS in jedru BNST na preseku 0,26 mm rostralno od bregme. NPY-imunoreaktivna vlakna so bila omejena na ventralni (LSV) in dorzalni (LSD) del področje LS. a – WT/CAS; b – WT/OVX; c – SF-1 KO M; d – SF-1 KO F; aca – sprednji del sprednje komisure; BNSTMA – medialni del spodnjega jedra končne strije, sprednji del, LV – stranska možganska kletka; merilo: 100 μm.



Slika 45: Grafični prikaz imunoreaktivne površine NPY v področju stranskega pretina pri miših GDX/WT in SF-1 KO. Samci v obeh skupinah miši so imeli statistično značilno (**p < 0,01) večjo imunoreaktivno površino kot samice, kot je pokazala dvofaktorska analiza variance. Vrednosti so prikazane kot povprečje \pm S. E. M.

4.6.5 IZRAŽENOST PREDHODNIKA OREKSINOV V STRANSKEM HIPOTALAMUSU

Predhodnik oreksinov A in B je bil v hipotalamusu omejen na skupino nevronov stranskega hipotalamusa, okolice VMH na rostralnem delu in v področju sive grbe pri vseh skupinah miši (slika 46). Skupno število nevronov v vseh posameznih rezinah od 0,8 mm do 1,9 mm kavdalno od bregme je bilo višje pri miših brez gena *SF-1* v primerjavi z mišmi WT/GDX (p < 0,01; slika 48 A). Interakcija med spolom in genotipom ni bila statistično značilna (p = 0,068) zato so razlike najverjetneje posledica pomanjkanja SF-1. S trifaktorsko analizo smo ugotovili, da so razlike v skupnem številu imunoreaktivnih nevronov predvsem posledica razlik v rezinah od 0,8 do 1,15 mm kavdalno od bregme, kjer je bilo število imunoreaktivnih nevronov večje (p < 0,05) pri miših brez gena *SF-1* v primerjavi z mišmi GDX/WT obeh spolov (slika 48 B). Natančnejša analiza imunoreaktivnih nevronov v rostralnem delu VMH pa je pokazala tudi na spremenjen položaj nevronov. Pri miših brez gena *SF-1* so se imunoreaktivni nevroni nahajali bolj ventromedialno v področju sive grbe kot pa nevroni pri miših GDX/WT (sliki 47, 49).





Slika 46: Prikaz imunoreaktivnih nevronov PPOX v stranskem hipotalamusu in sivi grbi v področju od 0,8 mm do 1,9 mm kavdalno od bregme pri miših GDX/WT in SF-1 KO. 3V - tretja možganska kletka; f – svod; OT – optični trakt; TC – siva grba; merilo: 100 μ m



Slika 47: Prikaz imunoreaktivnih nevronov PPOX na rezini 1,0 mm kavdalno od bregme. Število nevronov je bilo v rostralni okolici področja VMH statistično značilno višje (p < 0,05) pri miših SF-1 KO kot pri miših GDX/WT (slika 48 B), spremenjen pa je bilo tudi njihov položaj. Pri miših SF-1 KO so se nevroni nahajali bazomedialno v področju TC. 3V – tretja možganska kletka; f – svod; TC – siva grba; merilo: 100 µm



Slika 48: **A]** Skupno število PPOX-imunoraktivnih nevronov v področju od 0,8 mm do 1,9 mm kavdalno od bregme je bilo večje (**p < 0,01) pri miših SF-1 KO, pri čemer so imele samice SF-1 KO statistično značilno višje število nevronov kot miši GDX/WT obeh spolov. Spolnih razlik v številu imunoreaktivnih nevronov ni bilo. Dobljene razlike med genotipoma v skupnem številu nevronov so posledica razlik (p < 0,05) v številu nevronov predvsem v rostralnih področjih stranskega hipotalamusa (*od 0,8 mm do 1,15 mm kavdalno od bregme), kot je prikazano na sliki **B**], kjer smo določili celotno število nevronov po posameznih

prečnih rezinah. Samice SF-1 KO so imele povišano število nevronov glede na preostale skupine miši tudi v kavdalnih področjih stranskega hipotalamusa, vendar razlike niso bile statistično značilne. merilo: 100 μ m; vrednosti so predstavljene kot povprečje ± S. E. M.



Slika 49: Prikaz rekonstrukcije imunoreaktivnih nevronov PPOX v področju LH pri miših GDX/WT (modra) in miših SF-1 KO (rdeča) s programskim paketom BIOVIS 3D. Miši SF-1 KO imajo večje število nevronov v sprednjem delu LH in področju TC, 3V – tretja možganska kletkat; merilo: 100 μm

4.7 IZRAŽENOST PRESNOVNIH PEPTIDOV V HIPOTALAMUSU PO ŠTIRIINDVAJSETURNEM STRADANJU

Pri miših GDX/WT in miših brez gena *SF-1* smo preverili vpliv 24-urnega stradanja na izraženost ključnih presnovnih peptidov v področju hipotalamusa.

4.7.1 PARAVENTRIKULARNO JEDRO – AgRP, NPY

Vlakna nevronov v paraventrikularnem jedru vsebujejo presnovne peptide, kot sta AgRP in NPY. S trifaktorsko analizo variance smo ugotovili, da se po 24-urnem stradanju imunoreaktivno področje peptida AgRP (slika 50) in NPY (slika 51) v preseku paraventrikularnega jedra ni bistveno spremenilo v primerjavi z mišmi z dostopom do krme (kontrolne miši). Pri imunoreaktivni površini NPY smo opazili trend (p = 0,069) k zmanšanju imunoreaktivne površine v preseku paraventrikularnega jedra po stradanju (slika 51).



Slika 50: Prikaz vrednosti AgRP-imunoreaktivnega področja v prerezu jedru Pa na preseku 0,82 mm kavdalno od bregme (kot je prikazano na sliki 26) pri kontrolnih in stradanih miših. Imunoreaktivno področje je bilo podobno med kontrolnimi skupinami. Po 24-urnem stradanju se izraženost peptida AgRP ni spremenila v primerjavi z izraženostjo pri kontrolnih skupinah. Vrednosti so predstavljene kot povprečje \pm S. E. M.



Slika 51: Prikaz vrednosti NPY-imunoreaktivnega področja v jedru Pa na preseku 0,82 mm kavdalno od bregme (kot je prikazano na sliki 28) pri kontrolnih in stradanih miših. Imunoreaktivno področje je bilo podobno med kontrolnimi skupinami miši. Pri vplivu 24urnega stradanja smo ugotovili trend (p = 0,069) k zmanjšanju NPY-imunoreaktivnega področja. Vrednosti so predstavljene kot povprečje \pm S. E. M.

4.7.2 SREDNJE IN STRANSKO PODROČJE HIPOTALAMUSA – AgRP, NPY, CART

V področju ventromedialnega hipotalamusa je bila vsebnost peptidov AgRP in NPY prisotna v izrastkih nevronov arkvatnega, periventrikularnega jedra in paraventrikularnega jedra, jedra VMH in njegovi neposredni okolici ter na področju stranskega hipotalamusa. Položaj imunoreaktivnih elementov AgRP je bil v področju jedra VMH pri stradanih miših brez gena *SF-1* podoben kot pri kontrolnih miših brez gena *SF-1*. Primerjava AgRP in NPY-imunoreaktivnosti v področju VMH ni pokazala razlik med mišmi GDX/WT v kontrolni in stradani skupini (ni prikazano).

Nevropeptid CART je bil pri miših GDX/WT prisoten v telesih nevronov v arkvatnem jedru in v neposredni okolici jedra VMH na rezinah oddaljenih 1,7 mm kavdalno od bregme.

Število imunoreaktivnih nevronov CART se v celotnem področju VMH (slika 52, črni pravokotnik) ni razlikovalo med kontrolnimi in stradanimi mišmi GDX/WT in mišmi brez gena *SF-1* (ni prikazano). Pri miših GDX/WT se število imunoraktivnih nevronov CART ni spremenilo s stradanjem. Pri miših brez gena *SF-1* pri obeh spolih je stradanje povzročilo specifično povečanje (p < 0,05) števila imunoreaktivnih nevronov CART v področju od 520 μ m do 624 μ m dorzalno od baze možganov, ki ustreza centralnemu delu jedra VMH pri miših WT (slika 52, rdeče označeno področje, in slika 53).



Slika 52: Prikaz imunoreaktivnih nevronov CART v področju VMH na preseku 1,7 mm kavdalno od bregme pri miših GDX/WT in SF-1 KO. Število imunoreaktivnih nevronov CART se v področju jedra VMH (črn okvir) ni razlikovalo med kontrolnimi in stradanimi mišmi WT/GDX in SF-1 KO. Z rdečim okvirjem je označeno področje v predelu jedra VMH, kjer se je pri stradanih miših SF-1 KO število CART-imunoreaktivnih nevronov povečalo v primerjavi s kontrolnimi mišmi SF-1 KO; merilo: 100 μm



Slika 53: Grafični prikaz števila CART-imunoreaktivnih nevronov po vrsticah v dorzalni smeri v jedru VMH na preseku 1,7 mm kavdalno od bregme pri kontrolnih in stradanih miših. Pri stradanih miših GDX/WT sta bili razporeditev in število nevronov primerljivi s

tistimi pri kontrolnih miših GDX/WT. V področju jedra VMH, oddaljenim od 520 μ m do 624 μ m dorzalno od baze možganov, je bilo število nevronov statistično značilno višje pri stradanih kot kontrolnih miših SF-1 KO; f – stradani, vrednosti so predstavljene kot povprečje ± S. E. M.

4.7.3 PODROČJE STRANSKEGA HIPOTALAMUSA – PPOX

Proučili smo tudi vpliv stradanja na število nevronov, ki izražajo PPOX v področju LH in rostralni okolici jedra VMH (slika 46). Stradanje ni povzročilo sprememb v številu PPOX-imunoreaktivnih nevronov v področju LH in TC. Razlike v skupnem številu nevronov v področju LH in po posameznih rezinah so se po stradanju ohranile med mišmi WT/GDX in mišmi brez gena *SF-1*. Po stradanju je bilo povprečno število PPOX-imunoreaktivih nevronov pri miših brez gena *SF-1* statistično značilno višje kot pri miših GDX/WT na prerezu 1,0 mm (20 ± 4 (CAS, n = 6); 15 ± 4 (OVX, n = 5); 37 ± 11 (SF-1 KO samec, n = 3); 41 ± 9 (SF-1 KO samica, n = 6); p = 0,001) in 1,15 mm (78 ± 11 (CAS, n = 6); 60 ± 6 (OVX, n = 5); 111 ± 12 (SF-1 KO samec, n = 3); 115 ± 13 (SF-1 KO samica, n = 6); p < 0,001) kavdalno od bregme.

4.8 MIŠI BREZ GENA *SF-1* Z VSTAVLJENIM SPOROČILNIM GENOM ZA *eGFP* (SF-1 KO/eGFP)

Za proučevanju vloge SF-1 v jedru VMH in dohodnih ter odhodnih nevronskih povezav jedra VMH pri miših brez gena *SF-1* smo uporabljali model miši z vstavljenim genom za sporočilno zeleno fluorescenčno beljakovino *eGFP*, ki je pod uravnavo promotorskega območja gena *SF-1* na enem izmed avtosomalnih kromosomov. Ustrezno promotorsko področje ureja izražanje eGFP v tistih nevronih, ki izražajo SF-1 in omogoča sledenje teh nevronov pri miših brez gena *SF-1*. Pri miših eGFP smo ugotavljali, ali obstajajo podobna razmerja med spoli in genotipi v telesni masi, količini zaužite krme in aktivnosti kot pri miših brez beljakovine eGFP. S tem smo želeli dodatno potrditi primerljivost modela eGFP miši.

Miši SF-1 KO/eGFP se po telesni teži in dinamiki priraščanja niso razlikovale od miši brez gena *SF-1* (ni prikazano). Količina dnevno zaužite krme pri miših SF-1 KO/eGFP v kletkah s kolesi je bila primerljiva z mišmi brez gena *SF-1* pri obeh starostih (ni prikazano). Fizična aktivnost na kolesih za tek pri miših SF-1 KO/eGFP miših je bila zmanjšana v primerjavi z mišmi WT/eGFP, vendar primerljiva s fizično aktivnostjo na kolesih za tek pri miših brez gena *SF-1* pri starosti P42 in v odraslem obdobju (ni prikazano).

4.8.1 IZRAŽENOST BELJAKOVINE eGFP V NEVRONIIH JEDRA VMH

Beljakovino eGFP, ki je pod uravnavo promotorja gena *SF-1*, je mogoče imunohistokemično ugotavljati v nevronih in celicah, ki izražajo SF-1 (Stallings in sod., 2002) (slika 54). Nevroni eGFP se pri miših WT nahajajo v dorzomedialnem delu jedra VMH, tako kot nevroni SF-1. Razlik v številu nevronov eGFP med spoloma pri miših WT/eGFP nismo našli, kar sovpada z opažanji o številu nevronov SF-1 pri miših WT. Zato lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da označevanje eGFP omogoča ustrezno sledenje nevronov, ki izražajo SF-1. V našem poskusu smo ugotovili, da je bilo število nevronov imunoreaktivnih za eGFP pri miših SF-1 KO/eGFP manjše kot pri miših WT/eGFP in da se je njihovo število manjšalo s starostjo v obdobju od P0 do P180 (slike 54 b, d, f). Število nevronov eGFP pri miših WT/eGFP pa se ni spreminjalo s starostjo od P0 do P180 (slike 54 a, c, e). Pri miših SF-1 KO/eGFP je bil spremenjen tudi položaj nevronov eGFP, kar sovpada s prejšnjimi rezultati (Dellovade in sod., 2000) in je vidno pri starosti P0. Nevroni eGFP so bili bolj razpršeni v področju VMH in pomaknjeni dorzolateralno od tretje možganske kletke (slika 54 b, označeno s puščico). Vzorec izražanja beljakovine eGFP se ni razlikoval med spoloma pri miših SF-1 KO/eGFP.



Slika 54: Prikaz nevronov imunoreaktivnih za eGFP v jedru VMH pri različnih starostih pri miših WT/eGFP in SF-1 KO/eGFP. Za imunohistokemično označevanje beljakovine eGFP smo uporabili sekundarna protitelesa označena s fluorokromom Cy2. V levem stolpcu so prikazane rezine možganov miši WT/eGFP pri starostih P0 (a), P12 (c) in P180 (e). Število nevronov eGFP pri miših SF1 KO/eGFP je bilo zmanjšano pri vseh starostih (P0 (b), P12 (d), P180 (f)) v primerjavi s številom nevronov pri miših WT/eGFP. Pri miših SF-1 KO/eGFP opazimo tudi spremenjen položaj nevronov eGFP v VMH (puščica), ki so pomaknjeni dorzolateralno od tretje možganske kletke. 3V – tretja možganska kletka; merilo: 100μm

Tabela 1: Izraženost beljakovin po posameznih področjih v predoptičnem področju in hipotalamusu pri miših WT in miših brez gena *SF-1*. Predstavljene so spolne razlike, razlike med genotipoma in vpliv 24-urnega stradanja.

	AgRP	AVP	CALB1	CART	nNOS	NPY	PPOX	eGFP
AVPV	ni podatka	ni podatka	ni razlik	ni podatka	CAS>OVX KOM>KOF	ni podatka		
LS	ni podatka	WTM>WTF ^h CAS=OVX KOM=KOF	ni razlik	ni podatka	ni razlik	CAS>OVX KOM>KOF		
POA	ni podatka	ni podatka	ni razlik	ni podatka	CAS>OVX KOM>KOF	ni podatka		
MPOC	ni podatka	ni podatka	ni razlik ^a	ni podatka	a	ni podatka		
BNST	ni podatka	ni podatka	CAS>OVX KOM <kof< th=""><th>ni podatka</th><th>ni razlik</th><th>ni podatka</th><th></th><th></th></kof<>	ni podatka	ni razlik	ni podatka		
Pa	ni razlik ⁱ	ni podatka	ni razlik	ni podatka	ni razlik	ni razlik ⁱ	ni podatka	
TC	WT <ko< th=""><th>f</th><th>ni podatka</th><th>ni razlik</th><th>ni podatka</th><th>WT<ko< th=""><th>WT<ko<sup>g, i</ko<sup></th><th></th></ko<></th></ko<>	f	ni podatka	ni razlik	ni podatka	WT <ko< th=""><th>WT<ko<sup>g, i</ko<sup></th><th></th></ko<>	WT <ko<sup>g, i</ko<sup>	
mandelj	ni podatka	ni podatka	ni razlik	ni podatka	ni razlik	CAS>OVX KOM>KOF		
VMH	WT <ko<sup>d, i</ko<sup>	ni podatka	CAS=OVX= KOF>KOM ^b	WT <ko<sup>e, j</ko<sup>	ni razlik ^b	WT <ko<sup>d, i</ko<sup>		С
Arc	ni podatka	ni podatka	ni razlik	ni razlik ⁱ	ni razlik	ni podatka		
LH	ni podatka	ni podatka	ni podatka	ni podatka	ni razlik	ni podatka	WT <ko<sup>g, i</ko<sup>	

-- ni izražanja

a) skupina nevronov samo pri CAS

b) miši SF-1 KO več nevronov v VMHDL in manj v VMHVL, CAS < OVX v VMHVL

c) spremenjeno mesto nevronov pri miši SF-1 KO, zmanjševanje števila GFP imunoreaktivnih nevronov s starostjo pri miših SF-1 KO

d) ni razlik med spoloma

e) ni razlik v širšem področju VMH

f) spremenjen potek AVP-imunoreaktivnih vlaken

g) ni razlik med spoloma, miši SF-1 KO več nevronov samo v rostralnem delu LH

h) miši WT brez tretiranja

i) ni vpliva stradanja

j povišanje števila CART-imunoreaktivnih nevronov po 24-urnem stradanju samo pri miših SF-1 KO
5 RAZPRAVA

Po oploditvi jajčne celice se sproži vrsta celičnih in medceličnih procesov, ki vodijo v razvoj plodu. Pri vretenčarjih so dogodki v začetnih fazah razvoja plodu podobni, kar se odraža v homogenem razvoju in položaju struktur in razvijajočih se organov v plodu. Tej začetni homogeni fazi v razvoju sledita razvoj struktur, specifičnih za posamezno vrsto in faza spolne diferenciacije plodu, za katero je značilno izražanje genov na spolnih kromosomih, ki so specifični za posamezen spol (sesalci (XX, XY) in ptice (ZW, ZZ)) in sprožijo nastanek spolnih žlez in organov.

Pri miših (*Mus musculus*) so faze razvoja plodu dobro znane in spolna diferenciacija plodu se začne na dan E9,5. V tem času se pri plodu s komplementom spolnih kromosomov XY pojavijo prepisi gena *Sry*, ki se nahaja na kromosomu Y, v omejeni populaciji celic spolnega grebena, ki je do te faze homogena pri obeh spolih. Beljakovina SRY, ki je prepisovalni dejavnik, sproži vrsto celičnih in medceličnih dogodkov, ki v končni fazi vodijo v nastanek moda, medtem pa se pri samicah spolni greben v odsotnosti beljakovine SRY razvije v jajčnik. Spolne žleze so med embrionalnim razvojem (in pozneje) glavno mesto biosinteze spolnih steroidnih hormonov. Pri samcih so androgeni hormoni glavni spolni steroidni hormoni, pri samicah pa jajčniki izločajo estrogene hormone in progestine. Med spoloma obstajajo tudi razlike v primarnih steroidogenih tkivih, v dinamiki izločanja spolnih steroidnih hormonov in občutljivosti na spolne steroidne hormone. Omenjene spolno specifične lastnosti so odgovorne za nadaljnji sekundarni spolni razvoj organizma, kamor sodi razvoj sekundarnih spolnih organov in spolna diferenciacija nekaterih drugih organskih sistemov (možgani, maščobno tkivo) in tudi razvoj sekundarnih spolnih znakov (poraščenost, nizek glas pri moških itd).

Centralni živčni sistem, še posebej možgani in ledveni predel hrbtenjače, so občutljivi na delovanje spolnih steroidnih hormonov. Spolni hormoni imajo močen vpliv na organizacijo struktur v hipotalamusu, predoptičnem področju in hipokampusu, ki urejajo rast, energetsko homeostazo, vrsto vedenjskih vzorcev (agresivnost, vedenje pri razmnoževanju, strah), nočno-dnevne ritme, izločanje hipotalamusnih hormonov, spomin in prostorsko orientacijo.

Vsi omenjeni procesi se razlikujejo med spoloma pri glodavcih in ljudeh (Tobet in Fox, 1989; Cooke in sod., 1998; Becker in sod., 2008).

Vpliv spolnih steroidnih hormonov na razvoj organizma, še posebej centralnega živčnega sistema, je dobro znan. V zadnjih letih pa odkrivamo tudi pomen spolnih kromosomov pri spolno specifičnemu razvoju centralnega živčnega sistema (Arnold in Chen, 2009). Pri samcih miši in podgan ter moških so odkrili prisotnost krožnih prepisov gena *Sry* v živčnih celicah hipotalamusa, srednjih možganov in možganske skorje (Lahr in sod., 1995; Mayer in sod., 1998; Dewing in sod., 2006). Prisotnost prepisov Sry naj bi tako imela neposreden vpliv na število nevronov, ki izražajo tirozinsko hidroksilazo, v jedru črne substance (*substantia nigra*). Samci podgan so imeli več nevronov z izraženo beljakovino kot samice, kar se je odražalo v kakovosti gibanja (motorno-senzorna aktivacija okončin) (Dewing in sod., 2006), saj je znano, da je dopamin v jedru črne substance odgovoren za način uporabe okončin pri gibanju (Whishaw in sod., 1997).

Pomen gena *Sry* pri izraženosti AVP v stranskem pretinu opisuje raziskava modela transgenih miši, pri katerih so z gensko manipulacijo gen *Sry* odstranili s kromosoma Y ali pa ga prenesli na kromosom X. Ker je gen *Sry* nujno potreben in zadosten za sprožitev razvoja moda pri samcih, so tako dobili miši s kromosomoma XY, ki so bile fenotipsko ženskega spola in so imele jajčnike, ter miši s kromosomoma XX, ki so bile zaradi prenesenega gena *Sry* moškega spola in so imele moda. Miši, ki so imele gen za *Sry* prisoten neodvisno od komplementa spolnih kromosomov (XY, XX*Sry*), so imele maskuliniziran vzorec izraženosti AVP. Pri miših brez funkcionalnega gena *Sry* (XY*Sry*⁻, XX) pa je bil fenotip izraženosti AVP feminiziran. Razlike v vzorcu izraženosti AVP pa so ugotovili tudi med samicami XX in XY*Sry*⁻, kar kaže tudi na neposredno vlogo spolnih kromosomov pri uravnavi izraženosti AVP v stranskem pretinu (De Vries in sod., 2002; Gatewood in sod., 2006).

5.1 MIŠI BREZ GENA *SF-1*; MODEL ZA ŠTUDIJ RAZVOJA CENTRALNEGA ŽIVČNEGA SISTEMA IN DEBELOSTI V ODRASLEM OBDOBJU

Miši brez gena *SF-1* predstavljajo edinstven model za proučevanje razvoja in delovanja centralnega živčnega sistema. Med embrionalnim in neonatalnim razvojem, v prvi fazi

izpostavitve plodu spolnim steroidnim hormonom, ki imajo na možgane predvsem organizacijske učinke, miši brez gena *SF-1* niso izpostavljene lastnim spolnim steroidnim hormonom. Zato pri miših brez gena *SF-1* lahko preučujemo ločene vplive genetskega komplementa in vplive spolnih hormonov pri spolni diferenciaciji. Vendar obstajajo možnosti za vpliv steroidnih spolnih hormonov na razvoj miši brez gena *SF-1*. Miši brez gena *SF-1* so lahko izpostavljene spolnim steroidnim hormonom od matere in sosednjih plodov (povzeto po Ryan in Vandenbergh, 2002), ki prehajajo skozi posteljico. Tudi možgani predstavljajo pomemben izvor posebnih, živčnih steroidnih hormonov (Corpechot in sod., 1981; Corpechot in sod., 1983; Robel in Baulieu, 1994). Vendar je delovanje živčnih steroidnih hormonov zelo specifično zaradi njihove zgradbe in naj ne bi imeli pomembnejše vloge pri spolni diferenciaciji živčevja pri sesalcih (Baulieu, 1991; Plassart-Schiess in Baulieu, 2001), medtem ko je pri pticah mogoča pretvorba živčnih steroidov v testosteron (Soma in sod., 2004) in vpliv na razvoj možganskega sistema, ki ureja petje (London in Schlinger, 2007).

Zaradi vloge beljakovine SF-1 pri razvoju jedra VMH, miši brez gena *SF-1* predstavljajo tudi model za proučevanje razvoja in funkcije tega jedra. Med funkcije jedra VMH sodi tudi uravnavanje energetske homeostaze, ki je porušena pri miših brez gena *SF-1*, zato postanejo miši brez gena *SF-1* v odraslem življenju debele (Majdic in sod., 2002).

5.2 AKTIVNOST, HRANJENJE IN TELESNA TEŽA PRI MIŠIH BREZ GENA SF-1

Pri miših brez gena *SF-1* in njihovih kontrolah GDX/WT smo spremljali nekatere fenotipske značilnosti, povezane z uravnavo energetske homeostaze.

Telesno težo pri miših smo spremljali v dveh neodvisnih poskusih. V prvem poskusu, ko so bile miši izolirane od dneva P21 naprej in na standardni krmi, smo opazili spolne razlike v telesni teži samo pri miših WT. Samci WT so bili težji od samic WT že od časa po odstavitvi, k razliki v telesni teži v odraslem obdobju pa je prispevala tudi različna dinamika prirasta (slika 1 A). Pri kontrolnih miših WT brez spolnih žlez (GDX/WT) in miših brez gena *SF-1* pa spolnih razlik v telesni teži ni bilo in samo nekatere miši brez gena *SF-1* so razvile tudi pozno debelost. Dinamika prirasta in telesne teže sta se razlikovali med mišmi v

prvem in drugem poskusu. V drugem poskusu so bile miši brez gena SF-1 težje od miši GDX/WT in razlike so se pojavile v 5. tednu (slika 1 B), kar sovpada s prejšnjimi opažanji, vendar razlike v telesni teži niso bile tako očitne kot v predhodnih raziskavah (Majdic in sod., 2002). Telesna teža pa se ni razlikovala med spoloma pri posameznem genotipu. Izenačenje telesne teže pri miših GDX/WT v drugem poskusu je bila posledica odstranitev spolnih žlez pred puberteto, ki je povzročila povečanja telesne teže samo pri samicah WT. Dinamika prirasta in povečana telesna teža sta bili podobni pri obeh spolih pri miših brez gena SF-1, kar je v neki meri posledica spremenjene strukture jedra VMH, saj poškodbe jedra VMH povzročijo debelost (Brobeck, 1946). Kljub primerljivi zmanjšani fizični aktivnosti na kolesu za tek so se miših brez gena SF-1 v prvem in drugem poskusu razlikovale v dinamiki prirasta in doseženi končni telesni teži. Dobljene razlike so lahko posledica vplivov fitoestrogenov v krmi, katerih količina se je lahko spreminjala v krmi v daljšem obdobju pri miših v prvem poskusu, saj v tem delu poskusa nismo imeli na voljo krme brez fitoestrogenov. Fitoestrogeni namreč lahko delujejo prek steroidnih receptorjev in/ali drugih signalnih poti ter izzovejo vrsto učinkov, kot je spremenjena količina ščitničnega hormona v telesu pri ljudeh na spolno specifičen način (Hampl in sod., 2008), ter vplivajo na pojav debelosti pri ljudeh. S tem povezujejo nižjo prisotnost presnovnega sindroma v državah na območju Azije, kjer se v večji meri prehranjujejo s hrano, bogato s fitoestrogeni iz soje (Orgaard in Jensen, 2008). Različno priraščanje miši je lahko tudi posledica stresa, saj izolacija v zgodnjem obdobju pred puberteto lahko predstavlja zadosten stresni dejavnik, ki vpliva na vedenjske in prehrambene navade pri miših. Pri tem pa se lahko še posebej izrazijo razlike med posameznimi živalmi znotraj skupine, kar poveča variabilnost rezultatov.

Skladno s telesno težo miši v prvem poskusu je bila tudi količina dnevno zaužite krme. Kot je prikazano na sliki 2, pri starosti P42 nismo opazili razlik v količini zaužite krme med genotipi. V odraslem obdobju pa so samci brez gena SF-1 zaužili več krme kot miši drugih genotipov, kar pa se ni odražalo v višji telesni teži ali spremenjeni fizični aktivnosti na kolesu za tek. Kot že omenjeno smo zaužito krmo merili samo eni skupini miši, zato ne vemo ali so spolne razlike v zaužiti krme značilnost miši brez gena SF-1. V predhodnih rezultatih je bila količina zaužite krme primerljiva med skupinami miši (Majdic in sod., 2002). Kakšna je bila količina zaužite krme pri miših brez gena SF-1 v drugem poskusu ne vemo. Pri miših v odraslem obdobju se je absolutna količina zaužite krme zmanjšala v primerjavi z obdobjem

pred puberteto. Mišim pred puberteto se je telesna teža povečevala v kletkah s kolesi, v odraslem obdobju pa se telesna teža miši ni spreminjala. Mogoče so razlike v količini zaužite krme pred puberteto in v odraslem obdobju posledica intenzivnejše rasti pri mladičih ali posledica mehanizmov, ki urejajo aktivnost.

Pomemben dejavnik, ki vpliva na telesno težo, je tudi aktivnost. Fizična aktivnost na kolesu za tek v temni fazi je predstavljala več kot 99 % celotne fizične aktivnosti na kolesu za tek pri miših. V prvem poskusu so bile v odraslem obdobju najaktivnejše miši WT. Odstranitev spolnih žlez pred puberteto je znižala fizično aktivnost na kolesu za tek v odraslem obdobju pri miših WT. Naši rezultati so potrdili prejšnja opažanja, da imajo miši brez gena *SF-1* znižano fizično aktivnost na kolesu za tek (Majdic in sod., 2002). Pri starosti P42 je bila fizična aktivnost na kolesu za tek pri miših brez gena *SF-1* znižana v primerjavi z mišmi WT in je bila v rangu miši GDX/WT (ni prikazano). Miši brez gena *SF-1* so imele znižano fizično aktivnost na kolesu za tek tudi v drugem poskusu, pri miših GDX/WT pa so bile samice aktivnejše kot samci.

Rezultati potrjujejo opažanja, da so spolni hormoni in jedro VMH pomembni pri uravnavanju fizične aktivnosti na kolesu za tek (Colvin in Sawyer, 1969; Broida in Svare, 1984). Naši rezultati delno kažejo, da že izločanje testosterona pri samcih v embrionalnem obdobju povzroči takšne dolgotrajne spremembe v strukturi živčevja, ki ob poznejši izpostavitvi spolnim hormonom v puberteti določajo spolno specifične spremembe v fizični aktivnosti na kolesu za tek. Na molekularni ravni so spolne razlike v fizični aktivnosti na kolesu za tek pri miših GDX/WT lahko posledica razlik v številu ali aktivnosti nekaterih hipotalamusnih nevronov in vpliva spolnih hormonov na izražanje beljakovin v nevronih jedra VMH (Tobet in Fox, 1992; Budefeld in sod., 2008), področja subtalamusnega jedra in področij, ki sestavljajo sistem za nagrajevanje (dopaminski mezolimbični sistem; Werme in sod., 2000; Lett in sod., 2002; Vargas-Perez in sod., 2004).

Naše rezultate potrjujejo opažanja na miših, ki so imele gen *SF-1* specifično izbiti samo v VMH in so bile prav tako manj aktivne na kolesih (Zhao in sod., 2008). Pri miših s selektivno izbitim genom *SF-1* je v jedru VMH manj nevronov, ki izražajo receptor za vezavo snovi iz družine kanaboidov (CB1R) (Kim in sod., 2008), ki je odgovoren za urejanje aktivnosti (Zimmer in sod., 1999) in mogoče predstavlja molekularno razlago za nižjo fizično aktivnost na kolesu za tek pri miših brez gena SF-1. Vendar modela miši nista neposredno primerljiva, saj so miši s selektivno izbitim genom SF-1 izpostavljene spolnim hormonom v embrionalnem obdobju (imajo normalno razvite spolne žleze). Znižana fizično aktivnost na kolesu za tek pri miših brez gena SF-1 je lahko posledica spremenjenega izražanja drugih beljakovin in mednevronskih povezav. Pri podganah naj bi bili nevroni v jedru VMH, ki izražajo tip receptorja NMDA za vezavo kainične kisline, odgovorni za urejanje dnevne aktivnosti v stresnih situacijah in pri iskanju hrane (Iwamoto in sod., 1999). Zaradi spremenjene strukture jedra VMH pri miših brez gena SF-1 obstaja možnost, da takšni nevroni manjkajo oziroma je njihovo število zmanjšano ali pa je spremenjeno njihovo delovanje, kar bi lahko imelo za posledico zmanjšano aktivnost. Nevrotransmiter GABA zavira aktivnost nevronov, ki so odgovorni za povečanje aktivnosti v jedru VMH (Yokawa in sod., 1990). Nevronska vlakna, ki vsebujejo GAD, so pri miših brez gena SF-1 pri starosti P0 razporejena po vsem področju VMH v primerjavi z mišmi WT, kjer so vlakna izključena iz področja VMH in se nahajajo na meji jedra (Dellovade in sod., 2000). Pri miših brez gena SF-1 je tako stik vlaken z nevroni jedra VMH verjetno večji oziroma je v področju vsebnost nevrotransmiterja GABA povečana zaradi spremenjene strukture in morda odgovorna za konstitutivno zaviranje aktivnosti nevronov, ki so odgovorni za povečano aktivnost. Podobno velja tudi za peptida AgRP in NPY, katerih imunoreaktivna površina je povečana v območju VMH pri miših brez gena SF-1, ki zavirata aktivnost nevronov jedra VMH (Nishimura in sod., 1996; Li in Davidowa, 2004). Za zmanjšano fizično aktivnost na kolesu za tek pri miših brez gena SF-1 so lahko odgovorne tudi spremenjene povezave med jedrom VMH in drugimi področji, ki urejajo aktivnost. Kot so ugotovili Ikeda in sod. (1995), so povezave med jedroma VMH in DMH spremenjene. Pri podganah imajo ključno vlogo pri urejanju aktivnosti področje subtalamusnega jedra in vrinjeni coni (cona incerta) (Narita in sod., 2002). Aktivnost pa urejajo tudi področja, ki sestavljajo sistem za nagrajevanje (Wise in Bozarth, 1985; Horger in sod., 1999; Jerlhag in sod., 2007), vendar v naši raziskavi nismo ugotavljali prisotnosti teh povezav pri miših brez gena SF-1, tako da za zdaj ne vemo, ali zares obstajajo takšne nepravilnosti, ki bi lahko vodile v zmanjšano aktivnost teh miši.

Aktivnost miši smo preverili tudi z merjenjem spontane celotne aktivnosti v 2D-prostoru. Dnevno-nočni ritem spontane celotne aktivnosti (število prekinitev IR-žarkov na časovno enoto) v obdobju šestih dni (sliki 4 A, 4 B) se ni razlikoval med skupinami miši v odraslem obdobju. Najvišja spontana celotna aktivnost je bila med temnim ciklusom. Rezultati spontane celotne aktivnosti v kletkah delno potrjujejo rezultate fizične aktivnosti na kolesih za tek in kažejo na vpliv jedra VMH in spolnih hormonov na urejanje aktivnosti. Vendar gre za merjenje dveh različnih vrst aktivnosti. Fizična aktivnost na kolesu za tek zahteva motivacijo in znano je, da prisotnost kolesa vpliva na obnašanje pri miših (de Visser in sod., 2005). Če primerjamo telesno težo med mišmi brez gena *SF-1* in mišmi GDX/WT, razlik v telesni teži ne moramo razložiti samo z vzorcem aktivnosti, saj so je bila spontana celotna aktivnost pri samcih GDXWT in samcih brez gena *SF-1* izenačena, kar verjetno pomeni, da pri razvoju debelosti pri miših brez gena *SF-1* sodelujejo tudi drugi mehanizmi, kot so delovanje avtonomnega živčnega sistema z urejanjem hranjenja in termogeneze (Perkins in sod., 1981; Bray, 1984; Narita in sod., 1994; Elmquist, 2001), ki pa jih v našem poskusu nismo spremljali.

Dobljeni rezultati so pokazali, da je fizična aktivnost na kolesu za tek pri miših odvisna od vplivov spolnih hormonov v embrionalnem obdobju, aktivacijskega vpliva spolnih hormonov v postanatalnem obdobju in v določeni meri tudi od delovanja jedra VMH.

5.3 STRUKTURA IN IZRAŽENOST BELJAKOVIN V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ GENA *SF-1*

Fenotipske lastnosti miši smo poskusili razložiti tudi na biokemijski ravni nevronov in ravni mednevronskih povezav. Področji v možganih, na kateri smo se osredotočili, sta bili področje hipotalamusa in predoptično področje, ki ju uvrščamo v predel vmesnih možganov, kjer so glavni centri za urejanje endokrinih procesov v telesu pri sesalcih. V teh področjih je bilo do zdaj opisanih največ morfoloških razlik med spoloma, ta področja pa vsebujejo največ nevronov, ki izražajo receptorje za steroidne hormone (Simerly in sod., 1990; Mitra in sod., 2003; Sato in sod., 2005) prek katerih steroidni hormoni kot najpomembnejši dejavnik vplivajo na razvoj in delovanje področja vmesnih možganov.

Vplive pomanjkanja SF-1 in spolnih hormonov na nevronske povezave med hipotalamusom in POA smo proučevali z lipofilnimi barvilom Neurovue. Eferentne povezave iz POA v področje mandlja (sliki 5 C, D) so bile prisotne pri vseh genotipih, razporeditev povezav v področju ventromedialnega hipotalamusa pa se je razlikovala med mišmi GDX/WT in mišmi

brez gena *SF-1* (sliki 5 A, B). V naših raziskavah z označevanjem povezav iz področja POA nismo ugotovili spolnih razlik v teh povezavah pri miših GDX/WT in miših brez gena *SF-1*. V vmesnih možganih smo proučevali izraženost beljakovin AVP, kalbindin in nNOS z namenom ugotoviti spolne razlike v njihovi izraženosti, tudi v tistih jedrih, za katere so spolne razlike že bile opisane. Predhodni poskusi so pokazali večjo izraženost beljakovin kalbindina in nNOS v nevronih ob prisotnosti testosterona (Tobet in Fox, 1992), izražanje AVP v stranskem pretinu pa je popolnoma odvisna od testosterona, zato so bile vse miši, pri katerih smo ugotavljali izraženost teh treh beljakovin, pred žrtvovanjem tretirane s testosteronom. Rezultat imunoreaktivnosti za vsako posamezno področje smo razvrstili v eno izmed treh predpostavljenih kategorij: 1) od spolnih žlez odvisno spolno diferenciacijo, če spolne razlike najdemo samo pri miših GDX/WT; 2) od spolnih žlez neodvisno spolno diferenciacijo, če so podobne spolne razlike prisotne pri miših GDX/WT in miših brez gena *SF-1* ali če so spolne razlike značilne le za miši brez gena *SF-1*; 3) vpliv spremenjenega jedra VMH, če je fenotip pri miših brez gena *SF-1* pri obeh spolih različen od fenotipa pri miših GDX/WT.

Spolna razlika v številu vlaken v stranskem pretinu, ki izražajo AVP, je ena izmed najbolj proučenih spolnih razlik v možganih sesalcev (De Vries in Panzica, 2006). Samci imajo več vlaken, ki izražajo AVP, vendar pa je izraženost AVP popolnoma odvisna od spolnih hormonov, saj beljakovine imunohistokemično ne moremo dokazati pri miših brez spolnih žlez. Večina telesc nevronov AVP, ki oživčujejo stranski pretin, se nahaja v jedru BNST, del pa tudi v mandlju (De Vries in Panzica, 2006). Število nevronov, ki izražajo AVP v BNST, je spolno različno pri podganah, za maskulinizacijo sistema pa je odgovoren predvsem testosteron v prvem tednu po rojstvu (Wang in sod., 1993). Najverjetnejši vzrok za nastanek spolnih razlik v stranskem pretinu je fenotipska diferenciacija nevronov v BNST, saj so bili mehanizmi, kot so razlike v potovanju nevronov in razlike v programirani celični smrti, izključeni. Študija na miših, ki prekomerno izražajo anti-apoptotični gen Bcl2 oziroma na miših brez gena Bcl2 je na primer pokazala, da apoptoza oziroma njeno zavrtje ne vplivata na spolne razlike v številu AVP-imunoreaktivnih nevronov v BNST in številu AVPimunoreaktivnih vlaken v stranskem pretinu (de Vries in sod., 2008), prav tako pa za nastanek spolnih razlik ne more biti odgovorna razlika v rojstvu nevronov, saj se nevroni v BNST pojavijo zgodaj med embrionalnim razvojem, vsaj en teden, preden spolni hormoni sprožijo njihovo spolno diferenciacijo (al-Shamma in De Vries, 1996; Han in De Vries, 2003). Naši rezultati kažejo, da so za nastanek spolnih razlik pri miših primarno odgovorni spolni steroidni hormoni, saj spolne razlike v izraženosti AVP pri miših brez gena SF-1 nismo dokazali (slika 24). Tretiranje miši s testosteronom je povzročilo izraženost AVP pri vseh skupinah miši ter izenačilo velikost imunoreaktivnega področja pri miših GDX/WT in miših brez gena SF-1 (slika 24). Tretiranje s testosteronom ima podobne aktivacijske učinke kot testosteron med puberteto in v odraslem obdobju, pri čemer lahko uravnava prisotnost AVP v stranskem pretinu na različnih ravneh: bazalna izraženost AVP, transport in diferenciacija nevronov (število ali podaljšanje izrastkov), kar predpostavljajo tudi v že omenjeni študiji (de Vries in sod., 2008). Pri samcih GDX/WT smo ugotovili trend (p = 0,08) k večji imunoreaktivni površini v primerjavi s samci brez gena SF-1, kar dodatno kaže na mogoč vpliv spolnih hormonov med embrionalnim obdobjem na maskulinizacijo sistema AVP v stranskem pretinu. Vendar mehanizmi delovanja testosterona še niso povsem znani. Med embrionalnim razvojem lahko testosteron vpliva na število vlaken, ki imajo potencial za vsebnost AVP. Kot navajajo De Vries in sod. (2002), pa je večja izraženost AVP v stranskem pretinu delno odvisna tudi od prisotnosti spolnih kromosomov, saj so ugotovili razlike v izraženosti AVP v stranskem pretinu tudi med samicami XYSry⁻ in samicami XX, pri čemer so imele samice s spolnima kromosomoma X in Y (vendar brez gena Sry) višjo izraženost AVP.

Rostralni del jedra AVPV je volumsko večji pri samicah kot samcih miši (Bleier in sod., 1982) in znane so spolne razlike v številu nevronov, ki izražajo določene beljakovine. Število nevronov, ki izražajo beljakovine dopamin β-hidroksilaza, tirozin hidroksilaza, kisspeptin, ESR1(α) in ESRβ, je večje pri samicah kot samcih (Simerly in sod., 1985a; Simerly in sod., 1985b; De Vries in sod., 2002; Orikasa in sod., 2002; Kauffman in sod., 2007). Nasproten vzorec izražanja beljakovin velja za CCK, galanin, substanco P in za progesteronski receptor (Quadros in sod., 2002; Polston in Simerly, 2003). V naši raziskavi smo ugotovili izraženost beljakovine kalbindin samo v nekaterih nevronih rostralnega dela jedra AVPV (ni prikazano), beljakovina nNOS pa je bila izražena v telescih nevronov in podaljških živčnih celic (slika 6). Ugotovili smo, da so samci pri obeh genotipih imeli večje število nevronov, ki izražajo nNOS, kar kaže na vpliv genetskega komplementa na izraženost nNOS v rostralnem delu AVPV. Vendar je bila spolna razlika bolj očitna pri miših GDX/WT, kar kaže tudi na vpliv spolnih hormonov na izraženost nNOS v tem področju (Budefeld in sod., 2008). Podoben skupen vpliv spolnih kromosomov in spolnih hormonov

so našli tudi pri izražanju tirozin hidriksilaze v AVPV (De Vries in sod., 2002) ter pri nevronih, ki izražajo dopamin v mezencefalonu mišjih zarodkov na dan E14,5 (Carruth in sod., 2002).

Kavdalni del predoptičnega področja in sprednji del področja hipotalamusa (POA/AH) je eno izmed najbolje opisanih spolno specifičnih področij pri vretenčarjih (Tobet in Fox, 1992) in številni nevroni vsebujejo estrogenske receptorje α in β in androgenske receptorje. Tako sta razvoj in delovanje področja močno uravnana s spolnimi hormoni. V naši raziskavi smo ugotovili, da so v preseku področja POA/AH (slika 15) nevroni, ki izražajo kalbindin večinoma omejeni na medialno predoptično jedro (MPO), samo pri samcih GDX/WT pa so bili ti nevroni združeni v centralni del medialnega predoptičnega jedra (MPOC), ki ustreza spolno dimorfnemu jedru SDN pri podganah (Hall in sod., 2000; Edelmann in sod., 2007; Patisaul in sod., 2007). Skupina nevronov ni bila prisotna pri GDX/WT samicah in pri obeh spolih miši brez gena SF-1, kar kaže, da so spolni hormoni v embrionalnem obdobju odgovorni za razvoj spolne razlike, kot je bilo opisano pri podganah (Sickel in McCarthy, 2000). Celotno število nevronov v področju, ki izražajo kalbindin, pa se v naši raziskavi ni razlikovalo med skupinami miši, kar kaže, da so spolni hormoni v tem primeru odgovorni za pravilno postavitev nevronov (Tobet in Fox, 1989; Orikasa in sod., 2002; Wolfe in sod., 2005; Budefeld in sod., 2008), ne pa tudi za njihovo število v celotnem področju (Budefeld in sod., 2008). Nevroni za svoje premikanje uporabljajo podlago, ki jo tvorijo izrastki celic radialne glie. Steroidni hormoni vplivajo na potovanje nevronov tako, da uravnavajo smer (Henderson in sod., 1999) ali hitrost (Knoll in sod., 2007) njihovega potovanja, kot to velja za nevrone v področju POA/AH pri miših. Mehanizem delovanja spolnih hormonov na potovanje je najverjetneje posreden in zajema sisteme nevrotransmiterjev (Flugge in sod., 1986; McCarthy, 1995; Wolfe in sod., 2005) ali majhne signalne molekule (Haase in Bicker, 2003). Spolni hormoni (estradiol) pa tudi z neposrednimi vplivi na citoskelet vplivajo na potovanje celic (Azios in Dharmawardhane, 2005).

V nevronih predoptičnega področja je bila beljakovina nNOS prisotna v telescih in njihovih izrastkih. Ob rojstvu je bila izraženost nNOS v POA/AH spolno specifična pri miših in je sovpadala z izraženostjo kalbindina (Edelmann in sod., 2007). V naših raziskavah na odraslih miših smo ugotovili, da porazdelitev nNOS-imunoreaktivnih nevronov v odraslem obdobju ni bila odvisna od spolnih hormonov med embrionalnim obdobjem (slika 8), kot je

to bilo značilno za kalbindin. Vendar so samci obeh genotipov imeli večje nNOSimunoreaktivno področje kot samice (slika 9), kar kaže na mogoč razvoj razlike neodvisno od spolnih žlez (Budefeld in sod., 2008).

Spodnje jedro končne strije (BNST) je anatomsko zelo zapleten sistem področij, ki se razlikujejo med seboj po sestavi in funkciji (Segovia in Guillamon, 1993). Znanih je veliko spolnih razlik, tj. v prostornini področij in številu živčnih celic (Hines in sod., 1992). V naši raziskavi smo analizirali število nevronov, ki izražajo kalbindin (slika 17) in nNOS (slika 10) v preseku področja medialnega dela BNST (BNSTM). Prisotnost števila nevronov, ki izražajo kalbindin je bila odvisna od spola in genotipa (slika 18). Dobljene razlike potrjujejo vlogo spolnih hormonov pri spolni diferenciaciji omenjenega področja (Forger in sod., 2004; De Vries, 2005), vendar pa kažejo tudi na določen vpliv spolnih kromosomov (Budefeld in sod., 2008). Pri analizi nNOS-imunoreaktivnosti smo ugotovili, da se število nevronov, ki izražajo nNOS v BNSTM ni statistično razlikovalo med spoli ali genotipi (slika 11). Ugotovili pa smo močen trend (p = 0,06) k večjemu številu nevronov, ki izražajo nNOS pri samcih GDX/WT in samcih brez gena *SF-1*, kar kaže na vpliv spolnih kromosomov (Budefeld in sod., 2008).

Jedro BNST je z mednevronskimi povezavami tesno povezano s številnimi jedri, ki sestavljajo strukturo mandljastega telesa, zato smo analizirali izraženost kalbindina in nNOS tudi v tem področju. Na prerezu 1,7 mm kavdalno od bregme se število kalbindinimunoreaktivnih nevronov (slika 22) in nNOS-imunoreaktivnih nevronov (ni prikazano) ni razlikovalo po spolu ali genotipu.

Ventromedialno jedro (VMH) sodeluje pri uravnavanju energetske homeostaze (Powley, 1977; Iwamoto in sod., 1999; Majdic in sod., 2002), vključeno pa naj bi bilo tudi v uravnavo spolnega obnašanja (Yahr in Greene, 1992; Matsumoto in Yamanouchi, 2000; Flanagan-Cato in sod., 2006), starševskega obnašanja (Harding in McGinnis, 2005), anksioznosti (Zhao in sod., 2008) in drugih procesov (Hosoi in sod., 1999; Iwamoto in sod., 1999). Področje VMH se v številnih morfoloških in fenotipskih lastnostih na ravni nevronov in morfologije razlikuje med spoloma (Matsumoto in Arai, 1983, 1986; Romano in sod., 1990; Coirini in sod., 1992; Madeira in sod., 2001; Sa in Madeira, 2005). SF-1 je specifično izražen v nevronih dorzomedialnega in centralnega dela jedra VMH, pri miših pa se začne izražati

okoli dneva E9,5 v diencefalonu, ko struktura jedra še ni oblikovana (Ikeda in sod., 2001). SF-1 naj bi imel vlogo pri oblikovanju jedra in diferenciaciji nekaterih nevronov, zato imajo miši brez gena SF-1 spremenjeno strukturo VMH (Ikeda in sod., 1995; Shinoda in sod., 1995; Dellovade in sod., 2000; Tran in sod., 2003; Davis in sod., 2004). Procesa nevrogeneze in apoptoze nevronov jedra VMH pri miših brez gena SF-1 naj ne bi bila spremenjena (Tran in sod., 2003; Davis in sod., 2004), pomanjkanje SF-1 naj bi vplivalo predvsem na dejavnike, ki urejajo smer in hitrost potovanja nevronov v jedru VMH (Tobet in sod., 1999; Davis in sod., 2004). Naši rezultati so pokazali, da je bila porazdelitev nevronov, ki izražajo kalbindin in nNOS, spremenjena pri miših brez gena SF-1. Nevroni, ki izražajo kalbindin, so bili bolj dorzomedialno v bližini tretje možganske kletke, v primerjavi z mišmi GDX/WT, pri katerih so se kalbindin-imunoreaktivni nevroni nahajali v ventrolateralnem delu VMH (sliki 19, 20). Celotno število kalbindin-imunoreaktivnih nevronov se ni razlikovalo med spoloma pri miših GDX/WT (ni prikazano), vendar pa so imele samice večje število kalbindin-imunoreaktivnih nevronov v ventrolateralnem delu jedra VMH. Razlika v številu kalbindin-imunoreaktivnih nevronov se je ohranila tudi pri miših brez gena SF-1 skozi celotno področje VMH (slika 19), kar kaže na močen vpliv spolnih kromosomov na to spolno razliko (Budefeld in sod., 2008). Razlik v imunoreaktivni površini posameznih nevronov, ki izražajo kalbindin, nismo ugotovili.

Tudi za nevrone, ki izražajo nNOS smo ugotovili, da je bil njihov položaj pri miših brez gena *SF-1* spremenjen v primerjavi s kontrolnimi mišmi GDX/WT (sliki 13, 14). Pri miših GDX/WT so se nNOS-imunoreaktivni nevroni večinoma nahajali v ventrolateralnem delu VMH, kjer so imele samice statistično značilno večje število nevronov nNOS kot samci, čeprav se celotno število nevronov v področju ni razlikovalo med spoloma. V primerjavi z rezultati za kalbindin pri miših brez gena *SF-1* nismo našli nobenih spolnih razlik v številu nNOS-imunoreaktivnih nevronov po posameznih delih jedra VMH (slika 14) in tudi celotno število nNOS-imunoreaktivnih nevronov je bilo primerljivo z mišmi GDX/WT, kaže na vpliv spolnih hormonov na nastanek spolnih razlik v številu nNOS-imunoreaktivnih nevronov v ventrolateralnem delu jedra VMH (Budefeld in sod., 2008).

Pri miših brez gena *SF-1* naj bi bilo arkvatno jedro normalno razvito. Nasprotno pa naj bi bile povezave s paraventrikulernim jedrom (Tran in sod., 2003) in jedrom DMH (Ikeda in sod., 1995) spremenjene. V retrokiazmatičnem področju in področju sive grbe, rostralno od

jedra VMH, potekajo vlakna, ki vsebujejo AVP, iz supraoptičnega jedra ob optičnem traktu proti bazi možganov. Kot smo ugotovili in je prikazano na sliki 25, ta vlakna pri miših brez gena SF-1 prihajajo na bazo možganov bolj pravokotno, ne tvorijo tako kompaktne strukture snopa in so pomaknjena bolj dorzomedialno proti tretji možganski kletki. V sprednjem delu jedra VMH, pa AVP-imunoreaktivna vlakna potekajo ob ventrolateralnem delu jedra VMH pri miših WT (slika 24 E), medtem ko so pri miših brez gena SF-1 vlakna pomaknjena bolj v sredino v področje VMH (slika 24 F). Pri miših brez gena SF-1 v področju 1,7 mm kavdalno od bregme pa je površina AVP-imunoreaktivnih vlaken v periventrikularnem jedru veliko širša v dorzalnem področju od jedra VMH kot pri miših GDX/WT. Na spremenjeno strukturo okolice jedra VMH kažejo tudi nevroni v področju sive grbe, ki vsebujejo beljakovino preprooreksin (slika 43) in nNOS (ni prikazano) ter vlakna, ki vsebujejo beljakovini AgRP (slika 30) in NPY (slika 35), kar je natančneje opisano v naslednjem poglavju. Naši rezultati kažejo, da ima pomanjkanje SF-1 tudi neposreden vpliv na pravilen razvoj okolice jedra VMH in opažene razlike pri miših brez gena SF-1 najverjetneje niso posledica pomanjkanja spolnih steroidnih hormonov. Kdaj v razvoju vmesnih možganov se pojavijo razlike in kateri mehanizmi sodelujejo pri tem ter kakšen je vpliv SF-1, pa ne vemo in zahteva nadaljnje proučevanje.

5.4 IZRAŽENOST PRESNOVNIH PEPTIDOV V VMESNIH MOŽGANIH PRI MIŠIH BREZ GENA *SF-1* V OBDOBJU DEBELOSTI IN PRI AKUTNEM ODZIVU NA POMANJKANJE KRME

Centralni živčni sistem je glavni urejevalec ohranjanja energetske homeostaze, ki jo ureja s spreminjanjem aktivnosti nevronov in njihovega profila izraženosti presnovnih beljakovin. Sporočila o presežku energetskih snovi v telesu vplivajo na aktivnost nevronov v ključnih jedrih hipotalamusa, arkvatnem, paraventrikularnem in ventromedialnem jedru ter stranskem hipotalamusu. Eden glavnih sporočevalcev stanja energijskih zalog v telesu, hormon leptin, ki ga izloča belo maščobno tkivo, tako neposredno vpliva na izraženost različnih beljakovin v arkvatnem jedru. Leptin spodbudi izraženost beljakovin CART in POMC, zavira pa izraženost beljakovin NPY in AgRP. Sporočila iz arkvatnega jedra nato potujejo v druge dele hipotalamusa, kot so: paraventrikularno jedro, ventromedialno jedro in stranski hipotalamus, ki se ustrezno odzovejo in vplivajo na druge dele možganov, ti pa nato poskrbijo za celoten odziv organizma v obliki povečanega vnosa hrane, zmanjšanega vnosa hrane ali spreminjanja telesne aktivnosti in osnovne presnove (povzeto po Hillebrand in sod., 2002; Stanley in sod., 2005).

V sklopu proučevanja presnovnih peptidov pri miših brez gena *SF-1* nas je zanimala izraženost peptidov AgRP, CART, NPY in PPOX v področjih stranskega pretina, paraventrikularnega jedra, jedra VMH, področja stranskega hipotalamusa in mandlja, za katere je znano, da sodelujejo pri uravnavanju energetske homeostaze v telesu pri glodalcih, primatih in ljudeh (Elias in sod., 2001; Hara in sod., 2001; Korner in sod., 2001; Li in sod., 2002b; Grove in Smith, 2003; Van Vugt in sod., 2006).

Paraventrikularno jedro deluje kot center za sitost (Bartness in sod., 1985; Sims in Lorden, 1986; Cowley in sod., 1999) in je skupaj z jedrom VMH odgovorno za popoln odziv sitosti (Tokunaga in sod., 1986; Cox in Sims, 1988). Kot so ugotovili Tran in sod. (2003), naj bi bile povezave iz jedra VMH v paraventrikularno jedro spremenjene oziroma odsotne pri miših brez gena SF-1, kar bi se lahko odražalo v spremenjeni vsebnosti peptidov v tem jedru. V naši raziskavi nismo ugotovili razlik v izraženosti beljakovin AgRP (slika 27) in NPY (slika 29) na največjem prerezu skozi paraventrikularno jedro in 24-urno stradanje ni spremenilo imunoreaktivne površine AgRP (slika 49) in NPY (slika 50) v paraventrikularnem jedru, kar je deloma v nasprotju z do zdaj objavljenimi rezultati o pomenu teh dveh peptidov (Dube in sod., 1992; Grove in sod., 2003). Vzrok za nekoliko nepričakovane rezultate v naši raziskavi bi lahko bil prekratek čas stradanja, saj so v nekaterih drugih raziskavah ugotavljali povečano izraženost nevropeptidov šele po dvo- ali trodnevnem stradanju. Mogoče pa je tudi, da je v naši raziskavi nastala povečana proizvodnje nevropeptida Y, vendar se je hkrati povečalo tudi njegovo izločanje, česar pa z metodo imunohistokemije ne moremo zaznati, saj lahko dokažemo le peptid, ki je med žrtvovanjem prisoten v nevronih. Proučili smo tudi vpliv pomanjkanja SF-1 na organizacijo elementov živčevja, ki izražajo presnovne peptide v področju VMH in njegovi neposredni okolici. Peptida AgRP in NPY sta se nahajala v področju VMH in v arkvatnem jedru izključno v izrastkih nevronov, peptid CART pa je se je nahajal v telesih in izrastkih. V neposredni okolici sprednjega dela jedra VMH je bila vsebnost AgRP in NPY imunoraktivnih elementov pri miših brez gena SF-1 povišana (sliki 30 in 35). Imunoreaktivna vlakna najverjetneje izvirajo iz arkvatnega jedra, sprednjega dela jedra VMH

ali stranskega hipotalamusa. Organizacija vlaken v jedru VMH, ki so vsebovala AgRP in NPY, je bila pri miših brez gena SF-1 spremenjena in podobna kot pri vlaknih, ki so vsebovala encim GAD67 (Dellovade in sod., 2000). Ali vlakna, ki izražajo encim GAD67, izražajo tudi AgRP in NPY ni znano, vendar je organizacija AgRP in NPY-imunoreaktivnih vlaken pri miših brez gena SF-1 najverjetneje posledica izgube SF-1, ki vpliva na organizacijo elementov, ki uravnavajo oblikovanje jedra VMH (Dellovade in sod., 2000; Dellovade in sod., 2001). Skladno s tem so imele miši brez gena SF-1 večjo vsebnost AgRP (slike 31, 32 in 34) in NPY (sliki 36 in 37) imunoreaktivnih vlaken v področju jedra VMH na rezinah 1,00 mm do 2,01 mm kavdalno od bregme. V tem področju je bila spremenjena tudi organizacija AgRP in NPY-imunoreaktivnih vlaken v arkvatnem jedru pri miših brez gena SF-1. Vlakna niso bila omejena samo na arkvatno jedro, ampak so bila prisotna tudi na mestu brezceličnega področja med arkvatnim jedrom in jedrom VMH. Skupna površina vlaken v področju arkvatnega jedra in jedra VMH na prerezu 1,7 mm kavdalno od bregme se ni razlikovala med skupinama, kar kaže na spremenjeno organizacijo vlaken. S stradanjem se poveča količina peptidov AgRP in NPY v arkvatnem jedru, ki posredno ali neposredno zavirajo aktivnost nevronov jedra VMH (Nishimura in sod., 1996; Li in Davidowa, 2004), katerih aktivacija vodi v zmanjšanje vnosa hrane in povečano porabo energije. Če upoštevamo razporeditev vlaken skozi vse jedro VMH, ugotovimo, da je količina imunoreaktivnih vlaken AgRP in NPY v področju VMH in njegovi okolici povišana pri miših brez gena SF-1 pri obeh spolih, kar bi lahko bil vzrok za opažene razlike v telesni teži med mišmi brez gena SF-1 in kontrolnimi mišmi. Naši rezultati kažejo, da stradanje ni povzročilo sprememb v izraženosti AgRP in NPY v jedru VMH pri miših brez gena SF-1.

Pri miših GDX/WT so se nevroni, ki izražajo CART, v večjem številu nahajali na meji jedra VMH in v njegovi neposredni okolici (slike 38, 39, 40). Pri miših brez gena *SF-1* je bilo število nevronov CART višje v območju jedra VMH (slike 39, 40, 41), čeprav se celotno število nevronov v področju ni razlikovalo med skupinami. Ti rezultati potrjujejo predhodna opažanja o razporeditvi elementov jedra VMH pri miših brez gena *SF-1* in so skladni s hipotezo o nastanku jedra VMH (Dellovade in sod., 2000; Dellovade in sod., 2001; Davis in sod., 2004; Tran in sod., 2006).

Nevropeptid CART zavira hranjenje in njegova vsebnost se v nevronih prvega reda (nevroni arkvatnega jedra) s stradanjem zniža (Kristensen in sod., 1998; Li in sod., 2002a). Nasprotno

159

pa nekatere raziskave potrjujejo oreksigeno vlogo peptida CART v paraventrikularnem jedru (Smith in sod., 2008). Vloga peptida CART v jedru VMH ni povsem raziskana. V naši raziskavi 24-urno stradanje ni povzročilo sprememb v številu imunoreaktivnih nevronov CART v jedru VMH pri miših GDX/WT (slika 53). Imunoreaktivni nevroni CART v jedru VMH pripadajo drugemu redu nevronov pri uravnavi energetske homeostaze in mogoče ne sodelujejo pri uravnavi homeostaze pod pogoji akutnega pomanjkanja hrane. Pri stradanih miših brez gena SF-1 se je število imunoreaktivnih nevronov CART povečalo v delu, ki ustreza dorzomedialnemu delu jedra VMH, v primerjavi z nestradanimi mišmi brez gena SF-1 (slika 53). Podobnega povišanja števila imunoreaktivnih nevronov v ustreznih področjih jedra VMH in njegovi okolici nismo zaznali pri miših GDX/WT, kar pomeni, da je stradanje povzročilo izraženost CART v nevronih, ki pri miših WT ne izražajo CART in kaže na odzivnost nevronov jedra VMH na akutno pomanjkanje hrane pri miših brez gena SF-1. Prisotnost peptida CART v teh nevronih po stradanju je mogoče posledica njihovega spremenjenega položaja ter končne diferenciacije (npr. prisotnost receptorjev za leptin). Na povečanje izraženosti peptida CART bi lahko vplivali tudi spremenjene mednevronske povezave in povečana vsebnost nevrotransmiterja GABA (Dellovade in sod., 2000) in glutamata (Collin in sod., 2003) v področju jedra VMH (povzeto po van den Pol, 2003). Izraženost peptida CART v nevronih arkvatnega jedra je močno uravnana z leptinom (Kristensen in sod., 1998). Zaradi debelosti pri miših brez gena SF-1 (v poskusu 2 in v predhodni raziskavi; Majdic in sod., 2002) bi bila tako lahko uravnava izražanja CART z leptinom drugačna kot pri miših GDX/WT, saj so predhodne raziskave pokazale, da imajo miši brez gena SF-1 povišano koncentracijo leptina, ki ustreza njihovi povečani telesni teži (Majdic in sod., 2002).

Glavna vloga oreksinov pri sesalcih je ohranjanje budnega stanja, sodelujejo pa tudi pri spodbujanju hranjenja (Yamanaka in sod., 2003), aktivnosti (Hagan in sod., 1999; Surendran in sod., 2003) in so del sistema za razvoj odvisnosti (Georgescu in sod., 2003). Spolne razlike v številu nevronov, ki izražajo oreksin, niso opisane, zmanjšano število nevronov pa je značilno za ljudi in živali z motnjami v spanju (Bassetti in Aldrich, 1996; Chemelli in sod., 1999; Ripley in sod., 2001). Imunoreaktivni nevroni PPOX so bili v naši raziskavi prisotni pri vseh skupinah miši v področju sive grbe in v stranskem hipotalamusu. Analiza celotnega števila nevronov PPOX je pokazala višje število nevronov pri miših brez gena *SF-1* (slika 48 A). Natančnejša analiza je pokazala, da so miši brez gena *SF-1* imele višje število nevronov

v področju sive grbe in v rostralnem delu stranskega hipotalamusa (slika 48 B), kjer so bile prisotne tudi razlike v položaju nevronov (sliki 47, 49). Pri miših brez gena SF-1 so bili nevroni pomaknjeni bazomedialno iz področja stranskega hipotalamusa v področje sive grbe. Kavdalni del področja stranskega hipotalamusa pa se ni razlikoval v številu in položaju nevronov (slika 48 B). Mehanizmi, ki prispevajo k povečanju števila imunoreaktivnih nevronov PPOX pri miših brez gena SF-1, niso znani. V teh področjih imajo miši brez gena SF-1 spremenjeno strukturo jedra VMH in tudi povečano število nevronov, ki izražajo kalbindin in nNOS, kar kaže na vpliv pomanjkanja SF-1. Miši brez gena SF-1 so imele primerljiv vzorec dnevne spontane celotne aktivnosti s kontrolnimi mišmi (slika 4 B), kar kaže, da uravnavanje nočno-dnevnega ciklusa spontane celotne aktivnosti pri njih ni bilo spremenjeno. Stradanje povzroči povečanje prepisov za oreksin v možganih pri glodalcih in pri človeku podobnih opicah (Sakurai in sod., 1998; Diano in sod., 2003; Horvath in Gao, 2005). V naših raziskavah 24-urno stradanje ni povzročilo statistično značilnega povečanja števila imunoreaktivnih nevronov PPOX, vendar se je razlika v številu nevronov med mišmi GDX/WT in mišmi brez gena SF-1 ohranila. O nespremenjeni izraženosti oreksina v stranskem hipotalamusu ob stradanju poročajo tudi druge raziskave (Swart in sod., 2001; Tritos in sod., 2001; Bertile in sod., 2003). Podobno kot nevroni paraventrikulrnega jedra tudi aktivnost nevronov stranskega hipotalamusa uravnavajo sporočila iz arkvatnega jedra. Zato predpostavljamo, da 24-urno stradanje ni zadosten signal, ki bi preprečil z leptinom povzročeno zaviranje povečanja izraženosti oreksinov po stradanju (Lopez in sod., 2000). Vpliv povečanega števila nevronov, ki izražajo PPOX pri miših brez gena SF-1, na uravnavanje energetske homeostaze pa za zdaj ni znan.

Manj omenjeno področje pri urejanju energetske homeostaze je stranski pretin. Pri podganah so ugotovili odzivnost peptida NPY v področju stranskega pretina na pomanjkanje krme pri samicah (Kovacs in sod., 2007). Naši rezultati kažejo, da je imunoreaktivna površina NPY v rostralnem delu področja stranskega pretina pri miših spolno dimorfna, pri čemer so imeli samci GDX/WT večjo površino kot samice. Podobno razmerje smo ugotovili tudi pri miših brez gena *SF-1*, kar kaže na mogoč vpliv genetskega komplementa na razvoj spolnih razlik (slika 45). Izvor vlaken, ki vsebujejo NPY bi lahko predstavljali nevroni v medialnem delu spodnjega jedra končne strije ali nevroni mandlja, kot je to pri vlaknih, ki vsebujejo AVP (De Vries in Panzica, 2006), saj je NPY izražen v obeh področjih. Vendar ni znano, ali sta oba peptida NPY in AVP prisotna v istih vlaknih. Za razlike v imunoreaktivni površini NPY bi

bile lahko delno odgovorne razlike v številu nevronov v bazomedialnem delu mandlja, kjer so imeli samci pri obeh genotipih statistično značilno višje število imunoraktivnih nevronov NPY kot samice (slika 43). Vloga NPY v stranskem pretinu pri uravnavi energetske homeostaze pri miših ostaja neznana. Področje stranskega pretina in področje mandlja imata ključno vlogo pri uravnavi socialnega obnašanja (Bielsky in sod., 2005; Veenema in Neumann, 2008) in mogoče NPY ureja vzorce socialnega obnašanja, ki so vezani na iskanje in pomanjkanje hrane (Lukaszewska in sod., 1984).

5.5 TRANSGENE MIŠI Z VSTAVLJENIM ZAPISOM ZA POROČEVALSKO ZELENO FLUORESCENČNO BELJAKOVINO (eGFP)

Eden izmed načinov za proučevanje nevronov, ki izražajo SF-1, pri miših brez gena *SF-1*, je uporaba transgenih miši, kjer je poročevalska beljakovina pod uravnavo promotorja gena *SF-1*. Takšne miši imajo izraženo beljakovino eGFP v vseh tkivih, kjer je običajno izražena beljakovina SF-1 in so dober model za proučevanje vloge SF-1 v organizmu (Stallings in sod., 2002).

Beljakovina eGFP je bila izražena v nevronih jedra VMH pri miših WT in miših brez gena SF-1. Pri starosti P0 je bilo število nevronov primerljivo med mišmi GDX/WT in mišmi brez gena SF-1, pri katerih so bili nekateri imunoreaktivni nevroni eGFP pomaknjeni dorzolateralno iz področja VMH (slika 54 b), kar je skladno z dozdajšnjimi opažanji o nastanku in strukturi jedra VMH pri miših brez gena SF-1 (Davis in sod., 2004). S starostjo se je število eGFP-imunoreaktivnih nevronov pri miših brez gena SF-1 zmanjšalo v primerjavi z mišmi GDX/WT. Zmanjšanje števila eGFP-imunoreaktivnih nevronov je lahko posledica genetskih dejavnikov (mesto vključitve zapisa za eGFP, točkovne mutacije v promotorskem zaporedju gena eGFP, izguba funkcije SF-1; izguba urejevalnih mest navzdol od mesta prepisovanja eGFP, spremenjen zapis na lokusu Nr5al pri miših SF-1 KO) ali vpliva steroidnih hormonov (krma brez fitoestrogenov). Analiza promotorskega zaporedja pred zapisom eGFP s programom za iskanje mest prepisovalnih dejavnikov Matinspector (Quandt in sod., 1995) je pokazala na prisotnost vezavnega mesta SF-1. Zato bi nefunkcionalnost prepisovalnega dejavnika SF-1 lahko vplivala na nižjo izraženost eGFP. Podobno zmanjšanje izraženosti so namreč ugotovili tudi za spremenjen zapis SF-1 (SF-1*neo*) in beljakovino BDNF pri miših brez gena SF-1 (Tran in sod., 2003; Tran in sod., 2006) in receptor CRHR2 pri miših s selektivno izbitim genom SF-1 v VMH (Zhao in sod., 2008) v nevronih dorzomedialnega in centralnega dela jedra VMH, kjer je izražen SF-1. Naši rezultati na transgenih miših eGFP potrjujejo hipotezo, da je končna diferenciacija nevronov, ki izražajo SF-1, spremenjena pri miših brez gena SF-1 (Tran in sod., 2003). Pomen apoptoze na zmanjšanje nevronov v jedru VMH pri odraslih miši brez gena SF-1 pa ni raziskan.

5.6 ZAKLJUČEK

Naši rezultati kažejo na širši vpliv komplementa spolnih kromosomov pri spolno specifičnem razvoju vmesnih možganov pri miših. Steroidni spolni hormoni so pomemben dejavnik pri spolni diferenciaciji možganov, vendar - kot kažejo naši rezultati - je dokončna struktura možganskih področij za določen spol delno odvisna tudi od genskih vplivov. Z metodo imunohistokemije smo pri miših brez gena SF-1 ugotovili spremenjen položaj živčnih celic in izrastkov na mestu jedra VMH in tudi v njegovi neposredni okolici, kar kaže vlogo SF-1 pri pravilnem razvoju širšega področja srednjega hipotalamusa. Z metodo imunohistokemije smo dokazali tudi nekatere spolne razlike v izraženosti posameznih peptidov, ki so bile prisotne pri kontrolnih miših in miših brez gena SF-1 in kažejo na vpliv spolnih kromosomov na razvoj razlik med spoloma. Miši brez gena SF-1 so neodvisno od spola razvile debelost v odraslem obdobju, zato smo preverili nekatere mehanizme in izraženost presnovnih peptidov, ki urejajo energetsko ravnotežje, v hipotalamusu. Naši rezultati so potrdili prejšnja opažanja, da imajo miši brez gena SF-1 znižano fizično aktivnost na kolesu za tek. Ugotovili pa smo tudi znižano spontano celotno aktivnost v kletki. Vzorec izraženosti presnovnih peptidov je bil v področju ventromedialnega in stranskega hipotalamusa pri miših brez gena SF-1 spremenjen v primerjavi z mišmi WT, kar bi bil lahko vzrok za premik energetskega ravnotežja v smer zmanjšane porabe energije in povečanega vnosa hrane. Pri ugotavljanju delovanja mehanizmov za uravnavo energetskega ravnotežja pri stradanju z metodo imunohistokemije nismo ugotovili vpliva 24-urnega stradanja na izraženost presnovnih peptidov v nekaterih jedrih hipotalamusa in bo predmet nadaljnjih raziskav.

6 POVZETEK

Pri organizmih, za katere sta značilna dva fenotipsko različna spola, je razvoj spola posledica sprememb osnovnega razvojnega programa. Pri sesalcih je genetski spol določen s komplementom spolnih kromosomov X in Y ob združitvi spolnih celic. Prisotnost kromosoma Y je osnova za razvoj spolnih žlez v moda. Moda nato izločajo antimüllerjev hormon, ki zavira razvoj zametkov za ženske spolne organe (Müllerjeve vode), in steroidni hormon testosteron, ki spodbuja razvoj moških spolnih organov, razvoj sekundarnih spolnih znakov in vpliva na razvoj drugih organskih sistemov. Pri vretenčarjih se spolni hormoni izločajo iz spolnih žlez skozi vse življenje, dinamika izločanja in vrsta izločanega hormona pa sta spolno specifična. Pri glodalcih (miš, podgana) se spolni hormon testosteron pri samcih začne izločati v prenatalnem obdobju, pri samicah pa so jajčniki neaktivni oziroma slabo aktivni vse do konca pubertete.

Pri spolni diferenciaciji možganov imajo ključno vlogo spolni steroidni hormoni, ki se v največji meri izločajo iz spolnih žlez in stalno ali začasno vplivajo na strukturo možganov. Kot kažejo zadnje raziskave, pa na spolno diferenciacijo možganov pri sesalcih in pticah lahko neposredno vplivajo geni na spolnih kromosomih.

Miši brez gena *SF-1* se rodijo brez spolnih žlez in zaradi zgodnjega propada zametkov za spolne žleze niso nikoli izpostavljene lastnim spolnim hormonom ter se fenotipsko razvijejo kot samice, neodvisno od genetskega spola. Zato predstavljajo model, ki omogoča proučevanje genskih in hormonskih vplivov na razvoj možganskih struktur ločeno. Zaradi spremenjene strukture ventromedialnega področja, ki je posledica odsotnosti SF-1, pa miši brez gena *SF-1* pomenijo tudi pomemben model za proučevanje razvoja in delovanja jedra VMH.

Namen naših raziskav je bil ugotoviti pomen hormonskih in genetskih dejavnikov pri nastanku razlik v sestavi in delovanju možganov med samci in samicami pri miših s posebnim poudarkom na mehanizmih uravnavanja energetske homeostaze.

Steroidni spolni hormoni so pomemben dejavnik pri spolni diferenciaciji možganov, vendar – kot kažejo naši rezultati – je izraženosti beljakovin v živčnih celicah za določen spol delno

odvisna tudi od genetskih vplivov. Zaradi odsotnosti spolnih hormonov iz lastnih spolnih žlez so vse razlike med spoloma v možganih pri miših brez gena SF-1 posledica od spolnih žlez neodvisne spolne diferenciacije. Pri miših brez gena SF-1 smo odkrili spolne razlike v izraženosti encima nNOS v predoptičnem področju, beljakovine kalbindin v jedru VMH in peptida NPY v področju stranskega pretina in v področju medialnega dela mandlja, kar kaže na verjeten vpliv genov na spolnih kromosomih na razvoj omenjenih spolnih razlik. Z uporabo miši brez gena SF-1 smo ugotovili, da je za pravilno oblikovanje spolno dimorfnega jedra v predoptičem področju in mogoče spolne razlike v njegovi prostornini odgovoren testosteron med embrionalnim obdobjem. Vpliv testosterona smo potrdili tudi pri izraženosti peptida vazopresina v področju stranskega pretina, kjer so bile razlike v imunoreaktivnem področju vazopresina najverjetneje posledica vplivov testosterona na ravni količine peptida in ne v številu aksonov, ki se končujejo v stranskem pretinu, saj je dodajanje testosterona dvignilo izraženost vazopresina v tem področju. Spolne razlike v izraženosti beljakovine kalbindin v medialnem delu spodnjega jedra končne strije so bile obrnjene pri miših WT v primerjavi z mišmi brez gena SF-1, kar verjetno kaže tako na vpliv spolnih hormonov kot spolnih kromosomov na izraženost kalbindina v tem področju. Z metodo imunohistokemije in anterogradnim označevanjem živčnih povezav smo pri miših brez gena SF-1 potrdili spremenjeno strukturo jedra VMH. Živčne celice, ki izražajo beljakovino kalbindin, encim nNOS in peptid CART, so bile v jedru VMH pomaknjene v sredino proti tretji možganski kletki, število nevronov, ki izražajo eGFP v dorzomedilanem delu jedra VMH, pa je bilo manjše pri miših brez gena SF-1 v primerjavi z mišmi WT. Podobno so bila vlakna v srednjem hipotalamusu, ki vsebujejo peptid vazopresin pomaknjena v sredino proti tretji možganski kletki. Spremenjen položaj živčnih celic, ki izražajo encim nNOS in presnovni peptid PPOX, ter spremenjen položaj živčnih izrastkov, ki vsebujejo presnovna peptida AgRP in NPY, smo odkrili v okolici na rostralnem in kavdalnem delu jedra VMH, kar kaže na vlogo SF-1 pri pravilnem razvoju širšega področja srednjega hipotalamusa. Miši brez gena SF-1 so neodvisno od spola razvile debelost v odraslem obdobju, zato smo preverili nekatere mehanizme in izraženost presnovnih peptidov v hipotalamusu, ki urejajo energetsko ravnotežje. Naši rezultati so potrdili prejšnja opažanja, da imajo miši brez gena SF-1 znižano fizično aktivnost na kolesu za tek. Ugotovili pa smo tudi znižano sponatno celotno aktivnost v kletki, vendar nočno-dnevni cikel spontane celotne aktivnosti ni bil spremenjen pri miših brez gena SF-1. Pri miših brez gena SF-1 smo odkrili povečano število živčnih vlaken in celic, ki vsebujejo presnovne peptide AgRP, NPY in CART v področju jedra VMH in povečano vsebnost predhodnika oreksigenega peptida oreksina v področju stranskega hipotalamusa in sive grbe. Takšen vzorec izraženosti presnovnih peptidov, ki je bil specifičen za miši brez gena *SF-1* v področju ventromedialnega in stranskega hipotalamusa, bi lahko bil vzrok za premik energetskega ravnotežja v smer zmanjšane porabe energije in povečanega vnosa hrane.

Pri ugotavljanju delovanja mehanizmov za uravnavo energetskega ravnotežja pri stradanju smo miši izpostavili stradnju 24 ur in z metodo imunohistokemije preverili izraženost nekaterih presnovnih peptidov v hipotalamusu. S stradanjem se je pri miši brez gena *SF-1* povečalo število CART-imunoreaktivnih živčnih celic na mestu jedra VMH, ohranila pa se je tudi povečana vsebnost peptidov AgRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov AgRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH. Izraženost presnovnih peptidov agRP in NPY na mestu jedra VMH.

Model miši brez gena *SF-1* se je izkazal kot uporaben model za študij razvoja in delovanja vmesnih možganov. Predstavljeni rezultati dodatno pojasnjujejo vlogo spolnih kromosomov in spolnih steroidnih hormonov pri spolni diferenciaciji predoptičnega področja in hipotalamusa pri miših. Z metodo imunohistokemije smo proučili izraženost nekaterih presnovnih peptidov v vmesnih možganih pri odraslih miših brez gena *SF-1* s povečano telesno težo in na podlagi teh dobljenih rezultatov lahko bolj usmerjeno zastavimo nadaljnje proučevanje. Natančnejša proučitev uravnave energetske homeostaze pri miših brez gena *SF-1* ostaja predmet nadaljnjih raziskav, ki bodo vključevale ugotavljanje novih markerjev, ter proučevanje aktivnosti nevronov in vpliva antagonistov in agonistov presnovnih peptidov pod vplivom dejavnikov, ki motijo energetsko homeostazo v telesu.

7 SUMMARY

In mammals, chromosomal sex is determined by combination of X and Y sex chromosomes, with chromosome Y being crucial for testes development and consequently a male phenotype (XY). In the absence of chromosome Y XX embryos develop into female. Developing testes are producing AMH, which causes regression of Müllerian ducts, and testosterone, which is responsible for masculinization of urogenital tract and other organ systems in males. Gonadal steroid hormones are secreted throughout life in all verterbrates, but differences among species exist in the type of steroid hormone secreted and timing of secretion. In mice and rats, testes start to produce testosterone during fetal development soon after they are formed, while ovaries remain biosynthetically inactive until the begining of puberty. This sex difference in testosterone production is responsible for sexually dimorphic development of fetus and in particular sexually dimorphic development of central nervous system since many neurons contain steroid receptorsand could thus be influenced by steroid hormones. However, recent studies have also implicated genes on sex chromosomes as potential contributors to the sexually dimorphic brain development.

In mice lacking transcription factor SF-1 (SF-1 KO), genital ridges regress before onset of steroid hormone production. Thus, SF-1 KO mice are never exposed to endogenous gonadal hormones and are therefore unique model for studying hormone independent brain sexual differentiation in mice. Expression of transcription factor SF-1 is regionally specific, restricted to neurons of ventromedial nucleus of hypothalamus (VMH). In SF-1 knockout mice, cytoarchitecture of VMH is changed, and therefore these mice are also a model for studying development and function of VMH.

In our studies we have examined development and function of hypothalamic nuclei in mice from the perspective of sex differences and energy homeostasis using SF-1 KO mice. Our results showed that genetic factors may also affect brain sexual differentiation and that brain structure and function of adult brain is a result of synergistic actions of genetic factors and gonadal steroid hormones. We hypothesize that all sex differences, found in the brain of SF-1 KO mice, develop independently of gonadal secretions as a consequence of actions of genes on sex chromosomes. In SF-1 KO mice we found sex differences in nNOS expresion in the preoptic area, calbindin expression in the VMH and NPY expression in the lateral septum and medial amygdala, suggesting gonadal independent sexual differentiation of these structures. Our results showed that proper development of sexually dimorphic nucleus of preoptic area in mice is dependent upon exposure to gonadal hormones during embryonic development, and that testosterone is responsible for sex differences in vasopressin imunoreactivity in the lateral septum. Testosterone probably affects vasopressin content in the axons rather than density of projections that contain vasopressin since treatment with testosterone induced vasopressin expression in this region. Sex differences in number of neurons containing calbindin in medial part of bed nucleus of stria terminalis were opposite between WT and SF-1 KO mice, suggesting that both genetic factors as well as gonadal hormones contribute to proper structure of this region.

Using immunocytochemistry and anterograde axon labeling technique we confirmed previous results that SF-1 KO mice have disrupted VMH cytoarchitecture. We found that calbindin and nNOS immunoreactive neurons, normally found in the ventrolateral part of the VMH, were positioned more dorso-medially in SF-1 KO mice, and that number of eGFP containing neurons in the dorsomedial part of the VMH was decreased. The mechanism causing this loss of eGFP neurons remains unknown. Similarly, axons containing vasopressin in the medial part of the hypothalamus were positioned more medially toward the third ventricle. We also found changed positions of nNOS and PPOX imunoreactive neurons and AgRP/NPY imunoreactive axons in proximal regions in rostral and caudal aspects of the VMH, suggesting that losing SF-1 affects broader medial hypothalamic area.

SF-1 KO mice developed obesity in adulthood with no differences between sexes. By measuring activity, we confirmed previous results that SF-1 KO mice have decreased activity on running wheels. Additionally, we also found that home cage activity of SF-1 KO mice, measured throughout the 24 hour period in activity cages, was decreased. However, circadian rhythms in activity were intact also in SF-1 KO mice. SF-1 KO mice had increased AgRP/NPY/CART immunoreactivity in the VMH region and increased number of orexigenic PPOX immunoreactive neurons in rostral aspects of lateral hypothalamus and tuber cinereum. The exact role of elevated levels of orexigenic peptides in the ventromedial and lateral hypothalamus remains unknown, but this could be a trigger changing energy homeostasis that leads to obesity in SF-1 KO mice.

We also examined whether 24 hour fasting affects expression of some metabolic peptides in the hypothalamus. Using immunocytochemistry, we found increased number of CART immunoreactive neurons in fasted SF-1 KO mice in comparison to control SF-1 KO mice fed *ad libitum* while this change was not detected in WT mice. After 24 hour fast AgRP and NPY imunoractivity in the VMH and paraventricular nucleus and PPOX imunoreactivity in the lateral hypothalamus remained unchanged in comparison to control mice. Despite the negative energy balance, SF-1 KO mice had increased AgRP and NPY content in the VMH and PPOX immunoareactive neurons in comparison to WT mice what requires further investigation.

SF-1 KO mice have proved to be a valuable model for studying brain sexual differentiation and function. Our results showed that sex chromosomes and gonadal steroid hormones are both responsible for sexual dimorphic development of preoptic area and hypothalamus in mice. Using immunocytochemistry we also examined the expression of some metabolic peptides in diencephalon in adult, obese SF-1 KO mice with the aim to understand mechanisms involved in the body weight regulation. Our results will therefore help us design future experiments directed toward more detailed studies of energy homeostasis in SF-1 KO mice using other approaches like microarray technology, and more detailed physiological and pharmacological studies.

8 ZAHVALA

Moja raziskovalna pot se je od septembra 2003 nadaljevala pod mentorstvom prof. dr. Gregor Majdiča. V tem času sem pridobil nova znanja in izkušnje. Cenim njegovo pravičnost, profesionalen pristop in pomoč ter se mu iskreno zahvaljujem. Bilo mi je v čast.

V tem času sem imel možnost sodelovati še z enim raziskovalcem svetovnega kova prof. dr. Stuartom Tobetom iz Univerze v Koloradu v Ameriki. Na tem mestu se mu zahvaljujem za vse, kar je storil za mene in naš center.

Vsa hvala sodelovkam Katerini Kovačević, poročeni Čeh, Neži Grgurevič in Tanji Španić iz Centra in dr. Moniki Ceciliji Žužek (zaposelni na inšt. za fiziologijo, VF in trenutno na BICu), da ste me prenašale in mi krajšale čas.

Želel bi se zahvaliti prof dr. Gregorju Fazarincu in doc. dr. Malan Šterbenc za pomoč pri izdelavi tega izdelka in Jasni Šporar za pomoč v laboratoriju na inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo.

Zahvaljujem se prof. dr. Robertu Frangežu iz VF za pomoč pri konfokalni mikroskopiji.

Zahvaljujem se prof. dr. Marku Kreftu iz MF za računalniški program za analizo digitalnih slik.

Zahvaljujem se članom komisije za zagovor doktorske naloge prof. dr. Jelki Zabavnik Piano iz VF, prof. dr. Simonu Horvatu iz BF in akademiku prof. dr. Janez Sketlju iz inštituta za patofiziologijo na MF za strokoven in kritičen pregled dela.

Zahvaljujem se tudi družini za podporo pri mojih odločitvah in pomoč ter prijateljem.

9 LITERATURA

Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL (1999). A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. Nat Genet 22: 125-6.

Adan RA, Cone RD, Burbach JP, Gispen WH (1994). Differential effects of melanocortin peptides on neural melanocortin receptors. Mol Pharmacol 46: 1182-90.

Akmayev IG, Fidelina OV (1976). Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VI. The tanycytes: their relation to the sexual differentiation of the hypothalamus: An enzyme-histochemical study. Cell Tissue Res 173: 407-16.

Akmayev IG, Fidelina OV (1981). Tanycytes and their relation to the hypophyseal gonadotrophic function. Brain Res 210: 253-60.

al-Shamma HA, De Vries GJ (1996). Neurogenesis of the sexually dimorphic vasopressin cells of the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala of rats. J Neurobiol 29: 91-8.

Alfi O, Donnell GN, Crandall BF, Derencsenyi A, Menon R (1973). Deletion of the short arm of chromosome no.9 (46,9p-): a new deletion syndrome. Ann Genet 16: 17-22.

Allen LS, Hines M, Shryne JE, Gorski RA (1989). Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. J Neurosci 9: 497-506.

Allen LS, Gorski RA (1990). Sex difference in the bed nucleus of the stria terminalis of the human brain. J Comp Neurol 302: 697-706.

Allen LS, Gorski RA (1991). Sexual dimorphism of the anterior commissure and massa intermedia of the human brain. J Comp Neurol 312: 97-104.

Alon T, Friedman JM (2006). Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. J Neurosci 26: 389-97.

Anand BK, Chhina GS, Sharma KN, Dua S, Singh B (1964). Activity Of Single Neurons In The Hypothalamic Feeding Centers: Effect Of Glucose. Am J Physiol 207: 1146-54.

Anghel SI, Wahli W (2007). Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma. Cell Res 17: 486-511.

Arancibia S, Rage F, Astier H, Tapia-Arancibia L (1996). Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. Neuroendocrinology 64: 257-67.

Arendash GW, Gorski RA (1983). 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 10: 147-54.

Arimatsu Y, Seto A, Amano T (1981). Sexual dimorphism in alpha-bungarotoxin binding capacity in the mouse amygdala. Brain Res 213: 432-7.

Arletti R, Benelli A, Bertolini A (1990). Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. Physiol Behav 48: 825-30.

Arnold AP, Chen X (2009). What does the "four core genotypes" mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? Front Neuroendocrinol 30: 1-9.

Ayoub DM, Greenough WT, Juraska JM (1983). Sex differences in dendritic structure in the preoptic area of the juvenile macaque monkey brain. Science 219: 197-8.

Azios NG, Dharmawardhane SF (2005). Resveratrol and estradiol exert disparate effects on cell migration, cell surface actin structures, and focal adhesion assembly in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Neoplasia 7: 128-40.

Bach F, Flugge G, Wuttke W (1992). GABAergic influence on the development of the sexually dimorphic nucleus of male and female rats. Brain Res 573: 341-4.

Bagnasco M, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP (2002). Evidence for the existence of distinct central appetite, energy expenditure, and ghrelin stimulation pathways as revealed by hypothalamic site-specific leptin gene therapy. Endocrinology 143: 4409-21.

Balthasar N, Coppari R, McMinn J et al. (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. Neuron 42: 983-91.

Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC et al. (1997). Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. Nat Genet 17: 467-70.

Bardoni B, Zanaria E, Guioli S et al. (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. Nat Genet 7: 497-501.

Barnhart KM, Mellon PL (1994). The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in pituitary gonadotropes. Mol Endocrinol 8: 878-85.

Bartness TJ, Bittman EL, Wade GN (1985). Paraventricular nucleus lesions exaggerate dietary obesity but block photoperiod-induced weight gains and suspension of estrous cyclicity in Syrian hamsters. Brain Res Bull 14: 427-30.

Bassetti C, Aldrich MS (1996). Narcolepsy. Neurol Clin 14: 545-71.

Bates SH, Myers MG, Jr. (2003). The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. Trends Endocrinol Metab 14: 447-52.

Baulieu EE (1991). Neurosteroids: a new function in the brain. Biol Cell 71: 3-10.

Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter JF (1993). Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. Biochem Biophys Res Commun 194: 1371-9.

Becker JB, Berkley KJ, Geary N, Hampson E, Herman JP, Young EA (2008). Sex differences in the brain: From genes to behavior. New York: Oxford University press.

Bellinger LL, Bernardis LL (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. Physiol Behav 76: 431-42.

Benoit S, Schwartz M, Baskin D, Woods SC, Seeley RJ (2000). CNS melanocortin system involvement in the regulation of food intake. Horm Behav 37: 299-305.

Berenbaum SA, Hines M (1992). Early androgens are related to childhood sex-typed toy preferences. Physiol Science 3: 203-06.

Berridge KC (1996). Food reward: brain substrates of wanting and liking. Neurosci Biobehav Rev 20: 1-25.

Berthoud HR (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. Neurosci Biobehav Rev 26: 393-428.

Berthoud HR (2004). Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. Physiol Behav 81: 781-93.

Bertile F, Oudart H, Criscuolo F, Maho YL, Raclot T (2003). Hypothalamic gene expression in long-term fasted rats: relationship with body fat. Biochem Biophys Res Commun 303: 1106-13.

Biebermann H, Castaneda TR, van Landeghem F et al. (2006). A role for beta-melanocytestimulating hormone in human body-weight regulation. Cell Metab 3: 141-6.

Bielsky IF, Hu SB, Ren X, Terwilliger EF, Young LJ (2005). The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study. Neuron 47: 503-13.

Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y et al. (2000). A transgenic insertion upstream of sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. Nat Genet 26: 490-4.

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

Bleier R, Byne W, Siggelkow I (1982). Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamic areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse. J Comp Neurol 212: 118-30.

Boston BA, Blaydon KM, Varnerin J, Cone RD (1997). Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. Science 278: 1641-4.

Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. Science 304: 108-10.

Brawer JR, Naftolin F, Martin J, Sonnenschein C (1978). Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. Endocrinology 103: 501-12.

Brawer JR, Schipper H, Naftolin F (1980). Ovary-dependent degeneration in the hypothalamic arcuate nucleus. Endocrinology 107: 274-9.

Bray GA (1984). Hypothalamic and genetic obesity: an appraisal of the autonomic hypothesis and the endocrine hypothesis. Int J Obes 8 Suppl 1: 119-37.

Bray GA (2000). Afferent signals regulating food intake. Proc Nutr Soc 59: 373-84.

Breedlove SM, Arnold AP (1980). Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord. Science 210: 564-6.

Breedlove SM, Arnold AP (1981). Sexually dimorphic motor nucleus in the rat lumbar spinal cord: response to adult hormone manipulation, absence in androgen-insensitive rats. Brain Res 225: 297-307.

Breedlove SM, Jacobson CD, Gorski RA, Arnold AP (1982). Masculinization of the female rat spinal cord following a single neonatal injection of testosterone propionate but not estradiol benzoate. Brain Res 237: 173-81.

Breedlove SM, Arnold AP (1983a). Hormonal control of a developing neuromuscular system. I. Complete Demasculinization of the male rat spinal nucleus of the bulbocavernosus using the anti-androgen flutamide. J Neurosci 3: 417-23.

Breedlove SM, Arnold AP (1983b). Hormonal control of a developing neuromuscular system. II. Sensitive periods for the androgen-induced masculinization of the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. J Neurosci 3: 424-32.

Breedlove SM, Jordan CL, Arnold AP (1983). Neurogenesis of motoneurons in the sexually dimorphic spinal nucleus of the bulbocavernosus in rats. Brain Res 285: 39-43.

Breedlove SM (1984). Steroid influences on the development and function of a neuromuscular system. Prog Brain Res 61: 147-70.

Brobeck JR (1946). Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. Physiol Rev 26: 541-59.

Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T (1998). Hypocretin/orexin- and melaninconcentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. J Comp Neurol 402: 460-74. Broida J, Svare B (1984). Sex differences in the activity of mice: modulation by postnatal gonadal hormones. Horm Behav 18: 65-78.

Brown TJ, Naftolin F, Maclusky NJ (1992). Sex differences in estrogen receptor binding in the rat hypothalamus: effects of subsaturating pulses of estradiol. Brain Res 578: 129-34.

Budefeld T, Grgurevic N, Tobet SA, Majdic G (2008). Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. Dev Neurobiol 68: 981-95.

Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A (2003). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. J Endocrinol 177: 17-26.

Butler AA, Kesterson RA, Khong K et al. (2000). A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. Endocrinology 141: 3518-21.

Byne W, Bleier R (1987). Medial preoptic sexual dimorphisms in the guinea pig. I. An investigation of their hormonal dependence. J Neurosci 7: 2688-96.

Byne W, Bleier R, Houston L (1988). Variations in human corpus callosum do not predict gender: a study using magnetic resonance imaging. Behav Neurosci 102: 222-7.

Calvari V, Bertini V, De Grandi A et al. (2000). A new submicroscopic deletion that refines the 9p region for sex reversal. Genomics 65: 203-12.

Cammas FM, Pullinger GD, Barker S, Clark AJ (1997). The mouse adrenocorticotropin receptor gene: cloning and characterization of its promoter and evidence for a role for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1. Mol Endocrinol 11: 867-76.

Canick JA, Vaccaro DE, Livingston EM, Leeman SE, Ryan KJ, Fox TO (1986). Localization of aromatase and 5 alpha-reductase to neuronal and non-neuronal cells in the fetal rat hypothalamus. Brain Res 372: 277-82.

Caron KM, Ikeda Y, Soo SC, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ (1997). Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein. Mol Endocrinol 11: 138-47.

Carruth LL, Reisert I, Arnold AP (2002). Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation. Nat Neurosci 5: 933-4.

Caviness VS, Jr., Kennedy DN, Richelme C, Rademacher J, Filipek PA (1996). The human brain age 7-11 years: a volumetric analysis based on magnetic resonance images. Cereb Cortex 6: 726-36.

Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM et al. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. Cell 98: 437-51.

Chen D, Garg A (1999). Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. J Lipid Res 40: 1735-46.

Choi S, Dallman MF (1999). Hypothalamic obesity: multiple routes mediated by loss of function in medial cell groups. Endocrinology 140: 4081-8.

Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB (2002). Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. J Neurosci 22: 977-90.

Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J (2003). Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. J Neurosci 23: 10691-702.

Chua SC, Jr., Leibel RL, Hirsch J (1991). Food deprivation and age modulate neuropeptide gene expression in the murine hypothalamus and adrenal gland. Brain Res Mol Brain Res 9: 95-101.

Cohen P, Yang G, Yu X et al. (2005). Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation. J Biol Chem 280: 10034-9.

Coirini H, Johnson AE, Schumacher M, McEwen BS (1992). Sex differences in the regulation of oxytocin receptors by ovarian steroids in the ventromedial hypothalamus of the rat. Neuroendocrinology 55: 269-75.

Coleman DL (1973). Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. Diabetologia 9: 294-8.

Coleman DL, Eicher EM (1990). Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. J Hered 81: 424-7.

Collin M, Backberg M, Ovesjo ML et al. (2003). Plasma membrane and vesicular glutamate transporter mRNAs/proteins in hypothalamic neurons that regulate body weight. Eur J Neurosci 18: 1265-78.

Colvin GB, Sawyer CH (1969). Induction of running activity by intracerebral implants of estrogen in overiectomized rats. Neuroendocrinology 4: 309-20.

Commins D, Yahr P (1984). Adult testosterone levels influence the morphology of a sexually dimorphic area in the Mongolian gerbil brain. J Comp Neurol 224: 132-40.

Commins D, Yahr P (1985). Autoradiographic localization of estrogen and androgen receptors in the sexually dimorphic area and other regions of the gerbil brain. J Comp Neurol 231: 473-89.

Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. Int J Obes Relat Metab Disord 25(Suppl 5): S63-7.

Cone RD (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. Nat Neurosci 8: 571-8.

Conrad LC, Pfaff DW (1976). Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. J Comp Neurol 169: 221-61.

Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM (1998). Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. Front Neuroendocrinol 19: 323-62.

Cooke BM, Tabibnia G, Breedlove SM (1999). A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 7538-40.

Cooke BM, Breedlove SM, Jordan CL (2003). Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. Horm Behav 43: 336-46.

Coolen LM, Peters HJ, Veening JG (1998). Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: a combined fos and tract-tracing study. J Comp Neurol 397: 421-35.

Coolen LM, Wood RI (1998). Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster brain: simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. J Comp Neurol 399: 189-209.

Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjovall J, Baulieu EE (1981). Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A 78: 4704-7.

Corpechot C, Synguelakis M, Talha S et al. (1983). Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. Brain Res 270: 119-25.

Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. Neuron 24: 155-63.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M et al. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. Nature 411: 480-4.

Cox JE, Sims JS (1988). Ventromedial hypothalamic and paraventricular nucleus lesions damage a common system to produce hyperphagia. Behav Brain Res 28: 297-308.

Crolla JA, van Heyningen V (2002). Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. Am J Hum Genet 71: 1138-49.

Dallman MF (1993). Stress update Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. Trends Endocrinol Metab 4: 62-9.

Davis AM, Seney ML, Stallings NR, Zhao L, Parker KL, Tobet SA (2004). Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. J Neurobiol 60: 424-36.

De Grandi A, Calvari V, Bertini V et al. (2000). The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. Mech Dev 90: 323-6.

De Jonge FH, Louwerse AL, Ooms MP, Evers P, Endert E, van de Poll NE (1989). Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male Wistar rats. Brain Res Bull 23: 483-92.

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

de Olmos JS, Heimer L (1999). The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. Ann N Y Acad Sci 877: 1-32.

de Visser L, van den Bos R, Spruijt BM (2005). Automated home cage observations as a tool to measure the effects of wheel running on cage floor locomotion. Behav Brain Res 160: 382-8.

De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB et al. (2002). A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. J Neurosci 22: 9005-14.

De Vries GJ (2005). Sex Steroids and Sex Chromosomes at Odds? Endocrinology 146: 3277-79.

De Vries GJ, Panzica GC (2006). Sexual differentiation of central vasopressin and vasotocin systems in vertebrates: different mechanisms, similar endpoints. Neuroscience 138: 947-55.

de Vries GJ, Jardon M, Reza M, Rosen GJ, Immerman E, Forger NG (2008). Sexual differentiation of vasopressin innervation of the brain: cell death versus phenotypic differentiation. Endocrinology 149: 4632-7.

Dellovade TL, Young M, Ross EP et al. (2000). Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. J Comp Neurol 423: 579-89.

Dellovade TL, Davis AM, Ferguson C, Sieghart W, Homanics GE, Tobet SA (2001). GABA influences the development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. J Neurobiol 49: 264-76.

Dewing P, Shi T, Horvath S, Vilain E (2003). Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. Brain Res Mol Brain Res 118: 82-90.

Dewing P, Chiang CW, Sinchak K et al. (2006). Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. Curr Biol 16: 415-20.

Dhillon H, Zigman JM, Ye C et al. (2006). Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. Neuron 49: 191-203.

Diano S, Kalra SP, Sakamoto H, Horvath TL (1998). Leptin receptors in estrogen receptorcontaining neurons of the female rat hypothalamus. Brain Res 812: 256-9.

Diano S, Horvath B, Urbanski HF, Sotonyi P, Horvath TL (2003). Fasting activates the nonhuman primate hypocretin (orexin) system and its postsynaptic targets. Endocrinology 144: 3774-8.

Dohler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, Gorski RA (1982). Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is determined by the perinatal hormone environment. Neurosci Lett 33: 295-8.

Dohler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, Gorski RA (1984a). 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 302: 291-5.

Dohler KD, Srivastava SS, Shryne JE, Jarzab B, Sipos A, Gorski RA (1984b). Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. Neuroendocrinology 38: 297-301.

DonCarlos LL, Garcia-Ovejero D, Sarkey S, Garcia-Segura LM, Azcoitia I (2003). Androgen receptor immunoreactivity in forebrain axons and dendrites in the rat. Endocrinology 144: 3632-8.

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

Dube MG, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP (1992). Neuropeptide Y release is elevated from the microdissected paraventricular nucleus of food-deprived rats: an in vitro study. Endocrinology 131: 684-8.

Dupouey P, Benjelloun S, Gomes D (1985). Immunohistochemical demonstration of an organized cytoarchitecture of the radial glia in the CNS of the embryonic mouse. Dev Neurosci 7: 81-93.

Duval DL, Nelson SE, Clay CM (1997). A binding site for steroidogenic factor-1 is part of a complex enhancer that mediates expression of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene. Biol Reprod 56: 160-8.

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

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

El-Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, Rannikko A, Huhtaniemi I (1998). Gonadotropinindependent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. Biol Reprod 58: 116-23. Elias CF, Lee CE, Kelly JF et al. (2001). Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. J Comp Neurol 432: 1-19.

Ellacott KL, Cone RD (2004). The central melanocortin system and the integration of shortand long-term regulators of energy homeostasis. Recent Prog Horm Res 59: 395-408.

Ellinger-Ziegelbauer H, Glaser B, Dreyer C (1995). A naturally occurring short variant of the FTZ-F1-related nuclear orphan receptor xFF1rA and interactions between domains of xFF1rA. Mol Endocrinol 9: 872-86.

Elmquist JK (2001). Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. Physiol Behav 74: 703-8.

Emery DE, Sachs BD (1976). Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. Physiol Behav 17: 803-6.

Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD (1996). Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-7.

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. Nature 385: 165-8.

Fei H, Okano HJ, Li C et al. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 7001-5.

Ferguson AV, Day TA, Renaud LP (1984). Connections of hypothalamic paraventricular neurons with the dorsal medial thalamus and neurohypophysis: an electrophysiological study in the rat. Brain Res 299: 376-9.

Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG (2003). Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. Brain Res 964: 107-15.

Flament-Durand J, Brion JP (1985). Tanycytes: morphology and functions: a review. Int Rev Cytol 96: 121-55.

Flanagan-Cato LM, Lee BJ, Calizo LH (2006). Co-localization of midbrain projections, progestin receptors, and mating-induced fos in the hypothalamic ventromedial nucleus of the female rat. Horm Behav 50: 52-60.

Flugge G, Wuttke W, Fuchs E (1986). Postnatal development of transmitter systems: sexual differentiation of the GABAergic system and effects of muscimol. Int J Dev Neurosci 4: 319-26.

Forger NG, Breedlove SM (1986). Sexual dimorphism in human and canine spinal cord: role of early androgen. Proc Natl Acad Sci U S A 83: 7527-31.
Forger NG, Rosen GJ, Waters EM, Jacob D, Simerly RB, de Vries GJ (2004). Deletion of Bax eliminates sex differences in the mouse forebrain. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 13666-71.

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S et al. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. Nature 372: 525-30.

Foy MR, Chiaia NL, Teyler TJ (1984). Reversal of hippocampal sexual dimorphism by gonadal steroid manipulation. Brain Res 321: 311-4.

Fukuzako H, Yamada K, Kodama S et al. (1997). Hippocampal volume asymmetry and age at illness onset in males with schizophrenia. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 247: 248-51.

Fulton S, Woodside B, Shizgal P (2000). Modulation of brain reward circuitry by leptin. Science 287: 125-8.

Funabashi T, Brooks PJ, Kleopoulos SP, Grandison L, Mobbs CV, Pfaff DW (1995). Changes in preproenkephalin messenger RNA level in the rat ventromedial hypothalamus during the estrous cycle. Brain Res Mol Brain Res 28: 129-34.

Gao Q, Horvath TL (2008). Neuronal control of energy homeostasis. FEBS Lett 582: 132-41.

Gao XB, van den Pol AN (2001). Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. J Physiol 533: 237-52.

Garcia MC, Lopez M, Gualillo O, Seoane LM, Dieguez C, Senaris RM (2003). Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin. Faseb J 17: 1392-400.

Gatewood JD, Wills A, Shetty S et al. (2006). Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. J Neurosci 26: 2335-42.

Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B, Reitman M (1997). Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. J Biol Chem 272: 30546-51.

George FW, Simpson ER, Milewich L, Wilson JD (1979). Studies on the regulation of the onset of steroid hormone biosynthesis in fetal rabbit gonads. Endocrinology 105: 1100-6.

Georgescu D, Zachariou V, Barrot M et al. (2003). Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. J Neurosci 23: 3106-11.

Giedd JN, Castellanos FX, Rajapakse JC, Vaituzis AC, Rapoport JL (1997). Sexual dimorphism of the developing human brain. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 21: 1185-201.

Gilbert SF (1994a). Saga of the germline. In: Developmental biology. 4th ed. Sunderland, Massachussetts: Sinauer Associates, 788-822.

Gilbert SF (1994b). Sex determination. In: Developmental biology. 4th ed. Sunderland, Massachussetts: Sinauer Associates, 754-83.

Ginsburg M, Snow MH, McLaren A (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. Development 110: 521-8.

Giraldo P, Montoliu L (2001). Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. Transgenic Res 10: 83-103.

Glowa JR, Barrett JE, Russell J, Gold PW (1992). Effects of corticotropin releasing hormone on appetitive behaviors. Peptides 13: 609-21.

Goldman SA, Nottebohm F (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. Proc Natl Acad Sci U S A 80: 2390-4.

Gooley JJ, Schomer A, Saper CB (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. Nat Neurosci 9: 398-407.

Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM (1978). Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. Brain Res 148: 333-46.

Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. J Neurosci 10: 1286-91.

Greco TL, Payne AH (1994). 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 135: 262-8.

Grill HJ, Norgren R (1978). Chronically decerebrate rats demonstrate satiation but not bait shyness. Science 201: 267-9.

Grill HJ, Kaplan JM (2001). Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. Int J Obes Relat Metab Disord 25(Suppl 5): S73-7.

Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, Foxhall JS, Breininger J, Baskin DG (2002). Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. Endocrinology 143: 239-46.

Gropp E, Shanabrough M, Borok E et al. (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. Nat Neurosci 8: 1289-91.

Grove KL, Chen P, Koegler FH, Schiffmaker A, Susan Smith M, Cameron JL (2003). Fasting activates neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus and the paraventricular nucleus in the rhesus macaque. Brain Res Mol Brain Res 113: 133-8.

Grove KL, Smith MS (2003). Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. Physiol Behav 79: 47-63.

Gu GB, Simerly RB (1997). Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. J Comp Neurol 384: 142-64.

Guan JL, Uehara K, Lu S et al. (2002). Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. Int J Obes Relat Metab Disord 26: 1523-32.

Gubbay J, Collignon J, Koopman P et al. (1990). 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 346: 245-50.

Guillamon A, Segovia S, del Abril A (1988). 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 44: 281-90.

Haase A, Bicker G (2003). Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo. Development 130: 3977-87.

Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. Development 121: 1603-14.

Hagan JJ, Leslie RA, Patel S et al. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 10911-6.

Haider NB, Searby C, Galperin E et al. (1999). Evaluation and molecular characterization of EHD1, a candidate gene for Bardet-Biedl syndrome 1 (BBS1). Gene 240: 227-32.

Haider SG (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. Int Rev Cytol 233: 181-241.

Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B (1998). Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. J Neurosci 18: 559-72.

Hales DB (2002). Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. J Reprod Immunol 57: 3-18.

Hall JH, Dellovade TH, Rissman EF, Tobet SA (2000), Hormone receptor dependence of calbindin expression in the murine preoptic area/anterior hypothalamus. In: 30th Meeteing of Society for Neuroscience, New Orleans, LA.

http://www.sfn.org/index.cfm?pagename=abstracts_ampublications <2009>

Halpern M (1987). The organization and function of the vomeronasal system. Annu Rev Neurosci 10: 325-62.

Halvorson LM, Kaiser UB, Chin WW (1996). Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1. J Biol Chem 271: 6645-50.

Hampl R, Ostatnikova D, Celec P, Putz Z, Lapcik O, Matucha P (2008). Short-term effect of soy consumption on thyroid hormone levels and correlation with phytoestrogen level in healthy subjects. Endocr Regul 42: 53-61.

Han TM, De Vries GJ (2003). Organizational effects of testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone on vasopressin mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis. J Neurobiol 54: 502-10.

Handa RJ, Corbier P, Shryne JE, Schoonmaker JN, Gorski RA (1985). Differential effects of the perinatal steroid environment on three sexually dimorphic parameters of the rat brain. Biol Reprod 32: 855-64.

Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M et al. (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. Mech Dev 91: 403-7.

Hara J, Beuckmann CT, Nambu T et al. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. Neuron 30: 345-54.

Hardie DG, Carling D (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? Eur J Biochem 246: 259-73.

Harding SM, McGinnis MY (2005). Microlesions of the ventromedial nucleus of the hypothalamus: effects on sociosexual behaviors in male rats. Behav Neurosci 119: 1227-34.

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 12729-34.

Heintz N (2000). Analysis of mammalian central nervous system gene expression and function using bacterial artificial chromosome-mediated transgenesis. Hum Mol Genet 9: 937-43.

Henderson RG, Brown AE, Tobet SA (1999). Sex differences in cell migration in the preoptic area/anterior hypothalamus of mice. J Neurobiol 41: 252-66.

Henry BA, Clarke IJ (2008). Adipose tissue hormones and the regulation of food intake. J Neuroendocrinol 20: 842-9.

Herbison AE, Theodosis DT (1992a). Immunocytochemical identification of oestrogen receptors in preoptic neurones containing calcitonin gene-related peptide in the male and female rat. Neuroendocrinology 56: 761-4.

Herbison AE, Theodosis DT (1992b). Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. Neuroscience 50: 283-98.

Herrada G, Dulac C (1997). A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. Cell 90: 763-73.

Hetherington AW, Ranson SW (1940). Hypothalamic lesions and adipocity in the rat. Anat Rec 78: 149-72.

Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. Peptides 23: 2283-306.

Hines M, Davis FC, Coquelin A, Goy RW, Gorski RA (1985). 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 5: 40-7.

Hines M, Alsum P, Roy M, Gorski RA, Goy RW (1987). Estrogenic contributions to sexual differentiation in the female guinea pig: influences of diethylstilbestrol and tamoxifen on neural, behavioral, and ovarian development. Horm Behav 21: 402-17.

Hines M, Allen LS, Gorski RA (1992). Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. Brain Res 579: 321-6.

Hnasko TS, Szczypka MS, Alaynick WA, During MJ, Palmiter RD (2004). A role for dopamine in feeding responses produced by orexigenic agents. Brain Res 1023: 309-18.

Hofman MA, Swaab DF (1989). The sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the human brain: a comparative morphometric study. J Anat 164: 55-72.

Holbrook PG, Baum MJ (1983). Characterization of estradiol receptors in brain cytosols from perinatal ferrets. Brain Res 283: 1-8.

Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T (1993). Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. J Biol Chem 268: 7494-502.

Horger BA, Iyasere CA, Berhow MT, Messer CJ, Nestler EJ, Taylor JR (1999). Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. J Neurosci 19: 4110-22.

Horvath TL, Naftolin F, Kalra SP, Leranth C (1992). Neuropeptide-Y innervation of betaendorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. Endocrinology 131: 2461-7.

Horvath TL, Diano S, van den Pol AN (1999). Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. J Neurosci 19: 1072-87.

Horvath TL, Gao XB (2005). Input organization and plasticity of hypocretin neurons: possible clues to obesity's association with insomnia. Cell Metab 1: 279-86.

Hosoi M, Oka T, Abe M et al. (1999). Prostaglandin E(2) has antinociceptive effect through EP(1) receptor in the ventromedial hypothalamus in rats. Pain 83: 221-7.

Hossain A, Saunders GF (2001). The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. J Biol Chem 276: 16817-23.

Hossain A, Saunders GF (2003). Role of Wilms tumor 1 (WT1) in the transcriptional regulation of the Mullerian-inhibiting substance promoter. Biol Reprod 69: 1808-14.

Houston CS, Opitz JM, Spranger JW et al. (1983). The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. Am J Med Genet 15: 3-28.

Hurd PL, Bailey AA, Gongal PA, Yan RH, Greer JJ, Pagliardini S (2008). Intrauterine position effects on anogenital distance and digit ratio in male and female mice. Arch Sex Behav 37: 9-18.

Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP, Parker KL (1993). Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. Mol Endocrinol 7: 852-60.

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

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

Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S, Morohashi KI (2001). Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. Dev Dyn 220: 363-76.

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

Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y et al. (1994). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. Genes Dev 8: 2302-12.

Ito S, Murakami S, Yamanouchi K, Arai Y (1986). Prenatal androgen exposure, preoptic area and reproductive functions in the female rat. Brain Dev 8: 463-8.

Iwamoto Y, Nishihara M, Takahashi M (1999). VMH lesions reduce excessive running under the activity-stress paradigm in the rat. Physiol Behav 66: 803-8.

Jacobs LF, Gaulin SJ, Sherry DF, Hoffman GE (1990). Evolution of spatial cognition: sexspecific patterns of spatial behavior predict hippocampal size. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6349-52.

Jacobs LF, Spencer WD (1994). Natural space-use patterns and hippocampal size in kangaroo rats. Brain Behav Evol 44: 125-32.

Jacobson CD, Terkel J, Gorski RA, Sawyer CH (1980). Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: retrieving and nest building in the rat. Brain Res 194: 471-8.

Jacobson CD, Csernus VJ, Shryne JE, Gorski RA (1981). 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 1: 1142-7.

Jacobson CD, Gorski RA (1981). Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. J Comp Neurol 196: 519-29.

Jacobson CD, Davis FC, Gorski RA (1985). Formation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area: neuronal growth, migration and changes in cell number. Brain Res 353: 7-18.

Jacobson CD, Arnold AP, Gorski RA (1987). Steroid autoradiography of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. Brain Res 414: 349-56.

Jager RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G (1992). A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. Hum Genet 90: 350-5.

Jain MR, Horvath TL, Kalra PS, Kalra SP (2000). Evidence that NPY Y1 receptors are involved in stimulation of feeding by orexins (hypocretins) in sated rats. Regul Pept 87: 19-24.

Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Douhan A, Svensson L, Engel JA (2007). Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. Addict Biol 12: 6-16.

Jordan BK, Mohammed M, Ching ST et al. (2001). Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. Am J Hum Genet 68: 1102-9.

Jordan CL, Breedlove SM, Arnold AP (1982). Sexual dimorphism and the influence of neonatal androgen in the dorsolateral motor nucleus of the rat lumbar spinal cord. Brain Res 249: 309-14.

Ju G, Swanson LW (1989). Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: I. Cytoarchitecture. J Comp Neurol 280: 587-602.

Juraska JM (1984). Sex differences in developmental plasticity in the visual cortex and hippocampal dentate gyrus. Prog Brain Res 61: 205-14.

Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. Endocr Rev 20: 68-100.

Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J et al. (2007). Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. Endocrinology 148: 1774-83.

Keegan CE, Hammer GD (2002). Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. Trends Endocrinol Metab 13: 200-8.

Kennedy GC (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. Proc R Soc Lond B Biol Sci 140: 578-96.

Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. Development 122: 2813-22.

Kim KW, Jo YH, Zhao L, Stallings NR, Chua SC, Jr., Parker KL (2008). Steroidogenic factor 1 regulates expression of the cannabinoid receptor 1 in the ventromedial hypothalamic nucleus. Mol Endocrinol 22: 1950-61.

King BM (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. Physiol Behav 87: 221-44.

Kishi T, Aschkenasi CJ, Lee CE, Mountjoy KG, Saper CB, Elmquist JK (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. J Comp Neurol 457: 213-35.

Kiss JZ, Cassell MD, Palkovits M (1984). Analysis of the ACTH/beta-End/alpha-MSHimmunoreactive afferent input to the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. Brain Res 324: 91-9.

Klebig ML, Wilkinson JE, Geisler JG, Woychik RP (1995). Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 4728-32.

Klover PJ, Mooney RA (2004). Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. Int J Biochem Cell Biol 36: 753-8.

Knoll JG, Wolfe CA, Tobet SA (2007). Estrogen modulates neuronal movements within the developing preoptic area-anterior hypothalamus. Eur J Neurosci 26: 1091-9.

Kondo Y, Sachs BD, Sakuma Y (1997). Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous females. Behav Brain Res 88: 153-60.

Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. Nature 348: 450-2.

Korner J, Savontaus E, Chua SC, Jr., Leibel RL, Wardlaw SL (2001). Leptin regulation of Agrp and Npy mRNA in the rat hypothalamus. J Neuroendocrinol 13: 959-66.

Kovacs EG, Szalay F, Racz B, Halasy K (2007). Chronic fasting-induced changes of neuropeptide Y immunoreactivity in the lateral septum of intact and ovariectomized female rats. Brain Res 1153: 103-10.

Kow LM, Pfaff DW (1991). The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. Pharmacol Biochem Behav 38: 359-64.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM et al. (1993). WT-1 is required for early kidney development. Cell 74: 679-91.

Kristensen P, Judge ME, Thim L et al. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. Nature 393: 72-6.

Krylova IN, Sablin EP, Moore J et al. (2005). Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. Cell 120: 343-55.

Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, Lane MD (2002). Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 1921-5.

Kwok C, Goodfellow PN, Hawkins JR (1996). Evidence to exclude SOX9 as a candidate gene for XY sex reversal without skeletal malformation. J Med Genet 33: 800-1.

Ladyman SR, Grattan DR (2005). Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. Endocrinology 146: 3868-74.

Lahr G, Maxson SC, Mayer A, Just W, Pilgrim C, Reisert I (1995). Transcription of the Y chromosomal gene, Sry, in adult mouse brain. Brain Res Mol Brain Res 33: 179-82.

Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Baity LA, Meade JC, Parker KL (1995). A cell-specific nuclear receptor regulates the steroid hydroxylases. Steroids 60: 10-4.

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

Laudet V (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. J Mol Endocrinol 19: 207-26.

Lavorgna G, Ueda H, Clos J, Wu C (1991). FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. Science 252: 848-51.

Lechan RM, Fekete C (2006). The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. Prog Brain Res 153: 209-35.

Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JI, Melner MH (1997). Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. J Biol Chem 272: 7960-7.

Lett BT, Grant VL, Koh MT, Flynn G (2002). Prior experience with wheel running produces cross-tolerance to the rewarding effect of morphine. Pharmacol Biochem Behav 72: 101-5.

LeVay S (1991). A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men. Science 253: 1034-7.

Levitt P, Rakic P (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. J Comp Neurol 193: 815-40.

Li HY, Hwang HW, Hu YH (2002a). Functional characterizations of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. Neurosci Lett 323: 203-6.

Li Y, Gao XB, Sakurai T, van den Pol AN (2002b). Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. Neuron 36: 1169-81.

Li YZ, Davidowa H (2004). Food deprivation decreases responsiveness of ventromedial hypothalamic neurons to melanocortins. J Neurosci Res 77: 596-602.

Little M, Wells C (1997). A clinical overview of WT1 gene mutations. Hum Mutat 9: 209-25.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL et al. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. Science 288: 2379-81.

London SE, Schlinger BA (2007). Steroidogenic enzymes along the ventricular proliferative zone in the developing songbird brain. J Comp Neurol 502: 507-21.

Lopez-Valpuesta FJ, Nyce JW, Griffin-Biggs TA, Ice JC, Myers RD (1996). Antisense to NPY-Y1 demonstrates that Y1 receptors in the hypothalamus underlie NPY hypothermia and feeding in rats. Proc Biol Sci 263: 881-6.

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

Lopez M, Seoane L, Garcia MC et al. (2000). Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. Biochem Biophys Res Commun 269: 41-5.

Lu D, Willard D, Patel IR et al. (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocytestimulating-hormone receptor. Nature 371: 799-802.

Lu XY, Bagnol D, Burke S, Akil H, Watson SJ (2000). Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. Horm Behav 37: 335-44.

Ludwig DS, Mountjoy KG, Tatro JB et al. (1998). Melanin-concentrating hormone: a functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. Am J Physiol 274: E627-33.

Luine V, Hearns M (1990). Relationship of gonadal hormone administration, sex, reproductive status and age to monoamine oxidase activity within the hypothalamus. J Neuroendocrinol 2: 423-8.

Lukaszewska I, Korczynski R, Kostarczyk E, Fonberg E (1984). Food-motivated behavior in rats with cortico-basomedial amygdala damage. Behav Neurosci 98: 441-51.

Luo X, Ikeda Y, Parker KL (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. Cell 77: 481-90.

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

Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL, White BA (1993). Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. Mol Endocrinol 7: 776-86.

Madeira MD, Lieberman AR (1995). Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. Prog Neurobiol 45: 275-333.

Madeira MD, Ferreira-Silva L, Paula-Barbosa MM (2001). Influence of sex and estrus cycle on the sexual dimorphisms of the hypothalamic ventromedial nucleus: stereological evaluation and Golgi study. J Comp Neurol 432: 329-45.

Majdic G, Saunders PT (1996). Differential patterns of expression of DAX-1 and steroidogenic factor-1 (SF-1) in the fetal rat testis. Endocrinology 137: 3586-9.

Majdic G, Sharpe RM, O'Shaughnessy PJ, Saunders PT (1996). Expression of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in the fetal rat testis is reduced by maternal exposure to exogenous estrogens. Endocrinology 137: 1063-70.

Majdic G, Saunders PT, Teerds KJ (1998). Immunoexpression 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 58: 520-5.

Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E et al. (2002). Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. Endocrinology 143: 607-14.

Maren S, De Oca B, Fanselow MS (1994). Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. Brain Res 661: 25-34.

Matsumoto A, Arai Y (1983). Sex difference in volume of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. Endocrinol Jpn 30: 277-80.

Matsumoto A, Arai Y (1986). Male-female difference in synaptic organization of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. Neuroendocrinology 42: 232-6.

Matsumoto T, Yamanouchi K (2000). Acceleration of mounting behaviors in female rats by ibotenic acid lesions in the ventromedial hypothalamic nucleus. Neurosci Lett 291: 143-6.

Maurer RA, Woolley DE (1974). Demonstration of nuclear 3H-estradiol binding in hypothalamus and amygdala of female, androgenized-female, and male rats. Neuroendocrinology 16: 137-47.

Mayer A, Lahr G, Swaab DF, Pilgrim C, Reisert I (1998). The Y-chromosomal genes SRY and ZFY are transcribed in adult human brain. Neurogenetics 1: 281-8.

Mayer J, Thomas DW (1967). Regulation of food intake and obesity. Science 156: 328-37.

McCarthy MM (1995). Frank A. Beach Award. Functional significance of steroid modulation of GABAergic neurotransmission: analysis at the behavioral, cellular, and molecular levels. Horm Behav 29: 131-40.

McClellan KM, Parker KL, Tobet S (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. Front Neuroendocrinol 27: 193-209.

McDonald AJ (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. Prog Neurobiol 55: 257-332.

McElreavey K, Vilain E, Barbaux S et al. (1996). Loss of sequences 3' to the testisdetermining gene, SRY, including the Y pseudoautosomal boundary associated with partial testicular determination. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 8590-4.

McElreavey KD, Vilain E, Boucekkine C et al. (1992). XY sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. Genomics 13: 838-40.

Meaney MJ, McEwen BS (1986). Testosterone implants into the amygdala during the neonatal period masculinize the social play of juvenile female rats. Brain Res 398: 324-8.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. FEBS Lett 387: 113-6.

Micevych PE, Park SS, Akesson TR, Elde R (1987). Distribution of cholecystokininimmunoreactive cell bodies in the male and female rat: I. Hypothalamus. J Comp Neurol 255: 124-36.

Miller WL (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocr Rev 9: 295-318.

Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J et al. (2003). Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. Endocrinology 144: 2055-67.

Money J, Schwartz M, Lewis VG (1984). Adult erotosexual status and fetal hormonal masculinization and demasculinization: 46,XX congenital virilizing adrenal hyperplasia and 46,XY androgen-insensitivity syndrome compared. Psychoneuroendocrinology 9: 405-14.

Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. Nat Genet 14: 62-8.

Morin LP, Allen CN (2006). The circadian visual system, 2005. Brain Res Rev 51: 1-60.

Morris JA, Jordan CL, Dugger BN, Breedlove SM (2005). Partial demasculinization of several brain regions in adult male (XY) rats with a dysfunctional androgen receptor gene. J Comp Neurol 487: 217-26.

Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM (2008a). Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. J Comp Neurol 506: 851-9.

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

Morrison CD, Xi X, White CL, Ye J, Martin RJ (2007). Amino acids inhibit Agrp gene expression via an mTOR-dependent mechanism. Am J Physiol Endocrinol Metab 293: E165-71.

Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ (2008). Central control of thermogenesis in mammals. Exp Physiol 93: 773-97.

Morse JK, Scheff SW, DeKosky ST (1986). Gonadal steroids influence axon sprouting in the hippocampal dentate gyrus: a sexually dimorphic response. Exp Neurol 94: 649-58.

Mounien L, Bizet P, Boutelet I, Vaudry H, Jegou S (2005). Expression of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. Neuroendocrinology 82: 164-70.

Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. Mol Endocrinol 8: 1298-308.

Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B (1993). Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. Development 119: 1329-41.

Muroya K, Okuyama T, Goishi K et al. (2000). Sex-determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases. J Clin Endocrinol Metab 85: 3094-100.

Murphy GM, Jr. (1986). The human medial amygdaloid nucleus: no evidence for sex difference in volume. Brain Res 365: 321-4.

Musatov S, Chen W, Pfaff DW et al. (2007). Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 2501-6.

Muscatelli F, Strom TM, Walker AP et al. (1994). Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. Nature 372: 672-6.

Nakao K, Inoue Y, Okabe K, Kawarabayashi T, Kitamura K (1997). Oxytocin enhances action potentials in pregnant human myometrium--a study with microelectrodes. Am J Obstet Gynecol 177: 222-8.

Narita K, Nishihara M, Takahashi M (1994). Concomitant regulation of running activity and metabolic change by the ventromedial nucleus of the hypothalamus. Brain Res 642: 290-6.

Narita K, Murata T, Honda K, Nishihara M, Takahashi M, Higuchi T (2002). Subthalamic locomotor region is involved in running activity originating in the rat ventromedial hypothalamus. Behav Brain Res 134: 275-81.

Nguyen AD, Conley AJ (2008). Adrenal androgens in humans and nonhuman primates: production, zonation and regulation. Endocr Dev 13: 33-54.

Ninomiya Y, Okada M, Kotomura N, Suzuki K, Tsukiyama T, Niwa O (1995). Genomic organization and isoforms of the mouse ELP gene. J Biochem (Tokyo) 118: 380-9.

Nishimura F, Nishihara M, Torii K, Takahashi M (1996). Changes in responsiveness to serotonin on rat ventromedial hypothalamic neurons after food deprivation. Physiol Behav 60: 7-12.

Nishizuka M, Arai Y (1981). Organizational action of estrogen on synaptic pattern in the amygdala: implications for sexual differentiation of the brain. Brain Res 213: 422-6.

Nishizuka M, Arai Y (1982). Synapse formation in response to estrogen in the medial amygdala developing in the eye. Proc Natl Acad Sci U S A 79: 7024-6.

Nishizuka M, Arai Y (1983). Regional difference in sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. Exp Brain Res 49: 462-5.

Nordeen EJ, Nordeen KW, Sengelaub DR, Arnold AP (1985). Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. Science 229: 671-3.

O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM, Huhtaniemi I (1998). Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. Endocrinology 139: 1141-6.

Oberto A, Mele P, Zammaretti F, Panzica G, Eva C (2003). Evidence of altered neuropeptide Y content and neuropeptide Y1 receptor gene expression in the hypothalamus of pregnant transgenic mice. Endocrinology 144: 4826-30.

Ogawa S, Chan J, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW (2003). Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity. Endocrinology 144: 230-9.

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK et al. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. Science 278: 135-8.

Orgaard A, Jensen L (2008). The effects of soy isoflavones on obesity. Exp Biol Med (Maywood) 233: 1066-80.

Orikasa C, Kondo Y, Hayashi S, McEwen BS, Sakuma Y (2002). Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 3306-11.

Osterlund M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Hurd YL (1998). Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. Brain Res Mol Brain Res 54: 175-80.

Pakkenberg B, Gundersen HJ (1997). Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. J Comp Neurol 384: 312-20.

Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Calacagni M, Anselmetti GC, Schumacher M, Balthazart J (1987). Sexual differentiation and hormonal control of the sexually dimorphic medial preoptic nucleus in the quail. Brain Res 416: 59-68.

Parker KL, Schimmer BP (1997). Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. Endocr Rev 18: 361-77.

Parma P, Pailhoux E, Cotinot C (1999). Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of genes involved in gonadal differentiation in pigs. Biol Reprod 61: 741-8.

Patisaul HB, Fortino AE, Polston EK (2007). Differential disruption of nuclear volume and neuronal phenotype in the preoptic area by neonatal exposure to genistein and bisphenol-A. Neurotoxicology 28: 1-12.

Paxinos G, Franklin KBJ (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. San Diego: Academic Press.

Payen E, Pailhoux E, Abou Merhi R et al. (1996). Characterization of ovine SRY transcript and developmental expression of genes involved in sexual differentiation. Int J Dev Biol 40: 567-75.

Pei M, Matsuda K, Sakamoto H, Kawata M (2006). Intrauterine proximity to male fetuses affects the morphology of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the adult rat brain. Eur J Neurosci 23: 1234-40.

Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE et al. (1991). Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. Cell 67: 437-47.

Perkins MN, Rothwell NJ, Stock MJ, Stone TW (1981). Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. Nature 289: 401-2.

Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN et al. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. J Neurosci 18: 9996-10015.

Pfaus JG, Kleopoulos SP, Mobbs CV, Gibbs RB, Pfaff DW (1993). Sexual stimulation activates c-fos within estrogen-concentrating regions of the female rat forebrain. Brain Res 624: 253-67.

Plassart-Schiess E, Baulieu EE (2001). Neurosteroids: recent findings. Brain Res Brain Res Rev 37: 133-40.

Polston EK, Simerly RB (2003). Sex-specific patterns of galanin, cholecystokinin, and substance P expression in neurons of the principal bed nucleus of the stria terminalis are differentially reflected within three efferent preoptic pathways in the juvenile rat. J Comp Neurol 465: 551-9.

Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME (1994). Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. EMBO J 13: 6115-24.

Powley TL (1977). The ventromedial hypothalamic syndrome, satiety, and a cephalic phase hypothesis. Psychol Rev 84: 89-126.

Qian S, Chen H, Weingarth D et al. (2002). Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. Mol Cell Biol 22: 5027-35.

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S et al. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. Nature 380: 243-7.

Quadros PS, Pfau JL, Goldstein AY, De Vries GJ, Wagner CK (2002). Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. Endocrinology 143: 3727-39.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucleic Acids Res 23: 4878-84.

Quillan JM, Sadee W, Wei ET, Jimenez C, Ji L, Chang JK (1998). A synthetic human Agouti-related protein-(83-132)-NH2 fragment is a potent inhibitor of melanocortin receptor function. FEBS Lett 428: 59-62.

Raisman G, Field PM (1971). Sexual dimorphism in the preoptic area of the rat. Science 173: 731-3.

Raisman G, Field PM (1973). Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. Brain Res 54: 1-29.

Rajendren G, Moss RL (1993). The role of the medial nucleus of amygdala in the matinginduced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormonereleasing hormone neuronal system. Brain Res 617: 81-6. Raymond CS, Shamu CE, Shen MM et al. (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. Nature 391: 691-5.

Ripley B, Fujiki N, Okura M, Mignot E, Nishino S (2001). Hypocretin levels in sporadic and familial cases of canine narcolepsy. Neurobiol Dis 8: 525-34.

Ritter RC, Slusser PG, Stone S (1981). Glucoreceptors controlling feeding and blood glucose: location in the hindbrain. Science 213: 451-2.

Robel P, Baulieu EE (1994). Neurosteroids Biosynthesis and function. Trends Endocrinol Metab 5: 1-8.

Romano GJ, Mobbs CV, Lauber A, Howells RD, Pfaff DW (1990). Differential regulation of proenkephalin gene expression by estrogen in the ventromedial hypothalamus of male and female rats: implications for the molecular basis of a sexually differentiated behavior. Brain Res 536: 63-8.

Roof RL, Havens MD (1992). Testosterone improves maze performance and induces development of a male hippocampus in females. Brain Res 572: 310-3.

Roof RL (1993). The dentate gyrus is sexually dimorphic in prepubescent rats: testosterone plays a significant role. Brain Res 610: 148-51.

Rossi M, Kim MS, Morgan DG et al. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. Endocrinology 139: 4428-31.

Ryan BC, Vandenbergh JG (2002). Intrauterine position effects. Neurosci Biobehav Rev 26: 665-78.

Sa SI, Madeira MD (2005). Estrogen modulates the sexually dimorphic synaptic connectivity of the ventromedial nucleus. J Comp Neurol 484: 68-79.

Saal v (1989). Sexual differentiation in litter-bearing mammals: influence of sex of adjacent fetuses in utero. Journal of Animal Science 67: 1824-40.

Sachs BD (1982). Role of striated penile muscles in penile reflexes, copulation, and induction of pregnancy in the rat. J Reprod Fertil 66: 433-43.

Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG et al. (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 10939-43.

Sahm UG, Qarawi MA, Olivier GW et al. (1994). The melanocortin (MC3) receptor from rat hypothalamus: photoaffinity labelling and binding of alanine-substituted alpha-MSH analogues. FEBS Lett 350: 29-32.

Sahu A, Kalra PS, Kalra SP (1988). Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. Peptides 9: 83-6.

Sahu A (2002). Interactions of neuropeptide Y, hypocretin-I (orexin A) and melaninconcentrating hormone on feeding in rats. Brain Res 944: 232-8.

Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O (2001). Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. J Comp Neurol 435: 26-40.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell 92: 573-85.

Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A et al. (2005). Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. Neuron 46: 297-308.

Salas-Cortes L, Jaubert F, Nihoul-Fekete C, Brauner R, Rosemblatt M, Fellous M (2000). SRY protein is expressed in ovotestis and streak gonads from human sex-reversal. Cytogenet Cell Genet 91: 212-6.

Sanacora G, Kershaw M, Finkelstein JA, White JD (1990). Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. Endocrinology 127: 730-7.

Sato S, Braham CS, Putnam SK, Hull EM (2005). 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 1043: 205-13.

Schipper H, Brawer JR, Nelson JF, Felicio LS, Finch CE (1981). Role of the gonads in the histologic aging of the hypothalamic arcuate nucleus. Biol Reprod 25: 413-9.

Schoonmaker JN, Breedlove SM, Arnold AP, Gorski RA (1983), Accomulation of steroid in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the neonatal rat hypothalamus. In: Society for neuroscience abstracts 9: 1094

Seeley RJ, Drazen DL, Clegg DJ (2004). The critical role of the melanocortin system in the control of energy balance. Annu Rev Nutr 24: 133-49.

Seeley RJ, York DA (2005). Fuel sensing and the central nervous system (CNS): implications for the regulation of energy balance and the treatment for obesity. Obes Rev 6: 259-65.

Segovia S, Guillamon A (1982). Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. Brain Res 281: 209-12.

Segovia S, Guillamon A (1993). Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. Brain Res Brain Res Rev 18: 51-74.

Sengelaub DR, Arnold AP (1986). Development and loss of early projections in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. J Neurosci 6: 1613-20.

Shapiro LE, Leonard CM, Sessions CE, Dewsbury DA, Insel TR (1991). Comparative neuroanatomy of the sexually dimorphic hypothalamus in monogamous and polygamous voles. Brain Res 541: 232-40.

Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA (1994). Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. Cell 77: 651-61.

Sherry DF, Galef BG, Jr., Clark MM (1996). Sex and intrauterine position influence the size of the gerbil hippocampus. Physiol Behav 60: 1491-4.

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

Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E (1998). Mice lacking melaninconcentrating hormone are hypophagic and lean. Nature 396: 670-4.

Shinoda K, Lei H, Yoshii H et al. (1995). Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. Dev Dyn 204: 22-9.

Sickel MJ, McCarthy MM (2000). 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 12: 397-402.

Simerly RB, Swanson LW, Gorski RA (1985a). The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism. Brain Res 330: 55-64.

Simerly RB, Swanson LW, Handa RJ, Gorski RA (1985b). 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 40: 501-10.

Simerly RB, Swanson LW (1986). The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. J Comp Neurol 246: 312-42.

Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. J Comp Neurol 294: 76-95.

Simerly RB, Zee MC, Pendleton JW, Lubahn DB, Korach KS (1997). Estrogen receptordependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 14077-82. Sims JS, Lorden JF (1986). Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. Behav Brain Res 22: 265-81.

Skinner MK, Tung PS, Fritz IB (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. J Cell Biol 100: 1941-7.

Smith KL, Gardiner JV, Ward HL et al. (2008). Overexpression of CART in the PVN increases food intake and weight gain in rats. Obesity (Silver Spring) 16: 2239-44.

Soma KK, Alday NA, Hau M, Schlinger BA (2004). Dehydroepiandrosterone metabolism by 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase in adult zebra finch brain: sex difference and rapid effect of stress. Endocrinology 145: 1668-77.

Stallings NR, Hanley NA, Majdic G, Zhao L, Bakke M, Parker KL (2002). Development of a transgenic green fluorescent protein lineage marker for steroidogenic factor 1. Mol Endocrinol 16: 2360-70.

Stanley BG, Leibowitz SF (1984). Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. Life Sci 35: 2635-42.

Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S (2005). Hormonal regulation of food intake. Physiol Rev 85: 1131-58.

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

Stern K, McClintock MK (1998). Regulation of ovulation by human pheromones. Nature 392: 177-9.

Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM (2005). Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. Nat Neurosci 8: 1356-63.

Sumova A, Bendova Z, Sladek M, Kovacikova Z, Illnerova H (2004). Seasonal molecular timekeeping within the rat circadian clock. Physiol Res 53(Suppl 1): S167-76.

Surendran S, Campbell GA, Tyring SK, Matalon K, McDonald JD, Matalon R (2003). High levels of orexin A in the brain of the mouse model for phenylketonuria: possible role of orexin A in hyperactivity seen in children with PKU. Neurochem Res 28: 1891-4.

Swaab DF, Fliers E (1985). A sexually dimorphic nucleus in the human brain. Science 228: 1112-5.

Swaab DF, Hofman MA (1990). An enlarged suprachiasmatic nucleus in homosexual men. Brain Res 537: 141-8.

Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G (1996). Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. Nat Genet 12: 404-9.

Swanson LW, Cowan WM (1979). The connections of the septal region in the rat. J Comp Neurol 186: 621-55.

Swart I, Overton JM, Houpt TA (2001). The effect of food deprivation and experimental diabetes on orexin and NPY mRNA levels. Peptides 22: 2175-9.

Szczypka MS, Mandel RJ, Donahue BA, Snyder RO, Leff SE, Palmiter RD (1999a). Viral gene delivery selectively restores feeding and prevents lethality of dopamine-deficient mice. Neuron 22: 167-78.

Szczypka MS, Rainey MA, Kim DS et al. (1999b). Feeding behavior in dopamine-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 12138-43.

Szczypka MS, Rainey MA, Palmiter RD (2000). Dopamine is required for hyperphagia in Lep(ob/ob) mice. Nat Genet 25: 102-4.

Szechtman H, Caggiula AR, Wulkan D (1978). Preoptic knife cuts and sexual behavior in male rats. Brain Res 150: 569-95.

Takayama K, Sasano H, Fukaya T et al. (1995). Immunohistochemical localization of Ad4binding protein with correlation to steroidogenic enzyme expression in cycling human ovaries and sex cord stromal tumors. J Clin Endocrinol Metab 80: 2815-21.

Tejwani GA, Richard CW, 3rd (1986). Effect of electrolytic and chemical ventromedial hypothalamic lesions on food intake, body weight, analgesia and the CNS opioid peptides in rats and mice. NIDA Res Monogr 75: 497-500.

ter Horst GJ, Luiten PG (1986). The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. Brain Res Bull 16: 231-48.

Teyler TJ, Vardaris RM, Lewis D, Rawitch AB (1980). Gonadal steroids: effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. Science 209: 1017-8.

Tilmann C, Capel B (1999). Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. Development 126: 2883-90.

Tobet SA, Baum MJ, Tang HB, Shim JH, Canick JA (1985a). Aromatase activity in the perinatal rat forebrain: effects of age, sex and intrauterine position. Brain Res 355: 171-8.

Tobet SA, Shim JH, Osiecki ST, Baum MJ, Canick JA (1985b). Androgen aromatization and 5 alpha-reduction in ferret brain during perinatal development: effects of sex and testosterone manipulation. Endocrinology 116: 1869-77.

Tobet SA, Zahniser DJ, Baum MJ (1986). Sexual dimorphism in the preoptic/anterior hypothalamic area of ferrets: effects of adult exposure to sex steroids. Brain Res 364: 249-57.

Tobet SA, Baum MJ (1987). Role for prenatal estrogen in the development of masculine sexual behavior in the male ferret. Horm Behav 21: 419-29.

Tobet SA, Fox TO (1989). Sex- and hormone-dependent antigen immunoreactivity in developing rat hypothalamus. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 382-6.

Tobet SA, Fox TO (1992). Sex differences in neural morphology influenced hormonally throughout life. In: In Gerall, A.A. et al (eds), Sexual differentiation: A lifespan approached. New York: Plenum Press, Handbook of Behavioral Neurobiology, 41-83

Tobet SA, Henderson RG, Whiting PJ, Sieghart W (1999). Special relationship of gammaaminobutyric acid to the ventromedial nucleus of the hypothalamus during embryonic development. J Comp Neurol 405: 88-98.

Tokunaga K, Fukushima M, Kemnitz JW, Bray GA (1986). Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. Am J Physiol 251: R1221-7.

Torrealba F, Yanagisawa M, Saper CB (2003). Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. Neuroscience 119: 1033-44.

Toshinai K, Date Y, Murakami N et al. (2003). Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. Endocrinology 144: 1506-12.

Tran PV, Lee MB, Marin O et al. (2003). Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. Mol Cell Neurosci 22: 441-53.

Tran PV, Akana SF, Malkovska I, Dallman MF, Parada LF, Ingraham HA (2006). Diminished hypothalamic bdnf expression and impaired VMH function are associated with reduced SF-1 gene dosage. J Comp Neurol 498: 637-48.

Tranque PA, Suarez I, Olmos G, Fernandez B, Garcia-Segura LM (1987). Estradiol--induced redistribution of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat brain. Brain Res 406: 348-51.

Travers SP, Norgren R (1991). Coding the sweet taste in the nucleus of the solitary tract: differential roles for anterior tongue and nasoincisor duct gustatory receptors in the rat. J Neurophysiol 65: 1372-80.

Tritos NA, Mastaitis JW, Kokkotou E, Maratos-Flier E (2001). Characterization of melanin concentrating hormone and preproorexin expression in the murine hypothalamus. Brain Res 895: 160-6.

Tsukiyama T, Ueda H, Hirose S, Niwa O (1992). Embryonal long terminal repeat-binding protein is a murine homolog of FTZ-F1, a member of the steroid receptor superfamily. Mol Cell Biol 12: 1286-91.

Turek FW, Joshu C, Kohsaka A et al. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. Science 308: 1043-5.

Ueda H, Sonoda S, Brown JL, Scott MP, Wu C (1990). A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression. Genes Dev 4: 624-35.

Ulibarri C, Yahr P (1996). Effects of androgens and estrogens on sexual differentiation of sex behavior, scent marking, and the sexually dimorphic area of the gerbil hypothalamus. Horm Behav 30: 107-30.

Umesono K, Evans RM (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. Cell 57: 1139-46.

Unger JW, Moss AM, Livingston JN (1991). Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat. Neuroscience 42: 853-61.

Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. Nature 397: 405-9.

van den Pol AN (2003). Weighing the role of hypothalamic feeding neurotransmitters. Neuron 40: 1059-61.

van den Pol AN, Acuna-Goycolea C, Clark KR, Ghosh PK (2004). Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. Neuron 42: 635-52.

Van Vugt DA, Lujan ME, Froats M, Krzemien A, Couceyro PR, Reid RL (2006). Effect of fasting on cocaine-amphetamine-regulated transcript, neuropeptide Y, and leptin receptor expression in the non-human primate hypothalamus. Neuroendocrinology 84: 83-93.

van Weerden WM, Bierings HG, van Steenbrugge GJ, de Jong FH, Schroder FH (1992). Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. Life Sci 50: 857-61.

Vargas-Perez H, Borrelli E, Diaz JL (2004). Wheel running use in dopamine D2L receptor knockout mice. Neurosci Lett 366: 172-5.

Veenema AH, Neumann ID (2008). Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours. Prog Brain Res 170: 261-76.

Veitia R, Ion A, Barbaux S et al. (1997). Mutations and sequence variants in the testisdetermining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. Hum Genet 99: 648-52.

Veitia RA, Salas-Cortes L, Ottolenghi C, Pailhoux E, Cotinot C, Fellous M (2001). Testis determination in mammals: more questions than answers. Mol Cell Endocrinol 179: 3-16.

Vilain E, McElreavey K, Jaubert F, Raymond JP, Richaud F, Fellous M (1992). Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes. Am J Hum Genet 50: 1008-11.

Vochteloo JD, Koolhaas JM (1987). Medial amygdala lesions in male rats reduce aggressive behavior: interference with experience. Physiol Behav 41: 99-102.

Volkow ND, Wise RA (2005). How can drug addiction help us understand obesity? Nat Neurosci 8: 555-60.

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

Wee BE, Clemens LG (1987). Characteristics of the spinal nucleus of the bulbocavernosus are influenced by genotype in the house mouse. Brain Res 424: 305-10.

Werme M, Thoren P, Olson L, Brene S (2000). Running and cocaine both upregulate dynorphin mRNA in medial caudate putamen. Eur J Neurosci 12: 2967-74.

Whishaw IQ, Woodward NC, Miklyaeva E, Pellis SM (1997). Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies. Behav Brain Res 89: 167-77.

Wilding JP, Gilbey SG, Bailey CJ et al. (1993). Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. Endocrinology 132: 1939-44.

Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. Annu Rev Neurosci 24: 429-58.

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

Wise RA, Bozarth MA (1985). Brain mechanisms of drug reward and euphoria. Psychiatr Med 3: 445-60.

Wisialowski T, Parker R, Preston E et al. (2000). Adrenalectomy reduces neuropeptide Yinduced insulin release and NPY receptor expression in the rat ventromedial hypothalamus. J Clin Invest 105: 1253-9.

Wolfe CA, Van Doren M, Walker HJ, Seney ML, McClellan KM, Tobet SA (2005). Sex differences in the location of immunochemically defined cell populations in the mouse preoptic area/anterior hypothalamus. Brain Res Dev Brain Res 157: 34-41.

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

Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. Nature 282: 503-5.

Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr., Schwartz MW (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. Science 280: 1378-83.

Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ (2000). Food intake and the regulation of body weight. Annu Rev Psychol 51: 255-77.

Yahr P, Greene SB (1992). Effects of unilateral hypothalamic manipulations on the sexual behaviors of rats. Behav Neurosci 106: 698-709.

Yahr P, Gregory JE (1993). The medial and lateral cell groups of the sexually dimorphic area of the gerbil hypothalamus are essential for male sex behavior and act via separate pathways. Brain Res 631: 287-96.

Yamanaka A, Kunii K, Nambu T et al. (2000). Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. Brain Res 859: 404-9.

Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT et al. (2003). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. Neuron 38: 701-13.

Yamashita H, Inenaga K, Koizumi K (1984). Possible projections from regions of paraventricular and supraoptic nuclei to the spinal cord: electrophysiological studies. Brain Res 296: 373-8.

Yang XJ, Kow LM, Funabashi T, Mobbs CV (1999). Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. Diabetes 48: 1763-72.

Yi CX, van der Vliet J, Dai J, Yin G, Ru L, Buijs RM (2006). Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. Endocrinology 147: 283-94.

Yokawa T, Shiota K, Takahashi M (1990). Hyper-running activity originating from the hypothalamus is blocked by GABA. Physiol Behav 47: 1261-4.

Yokosuka M, Okamura H, Hayashi S (1997). 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 389: 81-93.

Young JK (1982). A comparison of hypothalami of rats and mice: lack of gross sexual dimorphism in the mouse. Brain Res 239: 233-9.

Young WS, 3rd, Shepard E, Amico J et al. (1996). Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. J Neuroendocrinol 8: 847-53.

Yu RN, Achermann JC, Ito M, Jameson JL (1998a). The Role of DAX-1 in Reproduction. Trends Endocrinol Metab 9: 169-75.

Yu RN, Ito M, Jameson JL (1998b). 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 12: 1010-22. Zaborszky L, Makara GB (1979). Intrahypothalamic connections: an electron microscopic study in the rat. Exp Brain Res 34: 201-15.

Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B et al. (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. Nature 372: 635-41.

Zhang P, Mellon SH (1996). The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 regulates the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated transcriptional activation of rat cytochrome P450c17 (17 alpha-hydroxylase/c17-20 lyase). Mol Endocrinol 10: 147-58.

Zhang WM, Kuchar S, Mozes S (1994a). Body fat and RNA content of the VMH cells in rats neonatally treated with monosodium glutamate. Brain Res Bull 35: 383-5.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994b). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425-32.

Zhao L, Kim KW, Ikeda Y et al. (2008). Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior. Mol Endocrinol 22: 1403-15.

Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK (2006). Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. J Comp Neurol 494: 528-48.

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 5780-5.

10 PRILOGA



Priloga 1: Proučevana področja po posameznih prečnih rezinah možganov (vir slik Paxinos in Franklin, 2001)

Slika 1: Oris področja stranskega pretina (LS) – zgornji okvir, oris rostralnega dela jedra AVPV (AVPe) – spodnji okvir



Slika 2: Oris medialnega predoptičnega jedra (MPO)



Slika 3: Oris področja kavdalnega dela POA na meji s sprednjim delom hipotalamusa (POA/AH)



Slika 4: Oris skupine jeder medialnega dela spodnjega jedra končne strije (BNSTM)







Slika 6: Oris področja stranskega hipotalamusa (LH) in področja sive grbe (TC) – večji okvir, oris področja sprednjega dela VMH – manjši okvir



Slika 7: Oris področja stranskega hipotalamusa (LH) in področja sive grbe (TC)



Slika 8: Oris področja skupine jeder mandlja – okvir na desni, oris področja stranskega hipotalamusa (LH) – okvir na levi.



Slika 9: Oris področja jedra ventromedialnega hipotalamus (VMH) in arkvatnega jedra (Arc) – spodnji okvir, oris skupine jeder mandlja – okvir na desni, oris področja stranskega hipotalamusa (LH) – okvir na levi



Slika 10: Oris področja jedra ventromedialnega hipotalamus (VMH) in arkvatnega jedra (Arc) – okvir na desni, oris področja stranskega hipotalamusa (LH) – okvir na levi