

## Plasental Steroidogeneziste Kilit Enzim: 3 $\beta$ -Hidroksisteroid Dehidrogenaz/ $\Delta^{5-4}$ İzomeraz (3 $\beta$ -HSD)'ın Ökaryon Vektörde Klonlanmış Prob'larla Belirlenmesi

Gözde R.ÖZALP<sup>1</sup> Gerhard SCHULER<sup>2</sup>

Geliş Tarihi: 18.05.2010

Kabul Tarihi: 24.06.2010

**Özet:** 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz/ $\Delta^{5-4}$  izomeraz (3 $\beta$ -HSD) plasental steroidogenesis'te kilit enzim olarak kabul edilir. Steroid hormonların oluşumu için, pregnenolon  $\Delta^5$  ve  $\Delta^4$  sentez yollarında kullanılan 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz/ $\Delta^{5-4}$  izomeraz (3 $\beta$ -HSD)'a ihtiyaç duyar. Çalışmanın amacı, hedef genin, bir ökaryon vektor üzerinde klonlanmasıyla prob elde edilmesi ve in situ hibridizasyonda kullanılabilirliğinin gösterilmesidir. Bu amaçla total RNA izolasyonundan sonra RT-PCR yapıldı. DNA bantları agaroz jelden ayrılarak saflaştırıldı. 3 $\beta$ HSD-DNA'ların *E.coli* suşuna transformasyonu tamamlandıktan sonra 3 $\beta$ HSD insert içeren vektörden *NcoI* ve *NotI* restriksiyon enzimleriyle kesildi. DIG-işaretli cRNA'ların transkripsiyonu sonrasında in situ hibridizasyon yapıldı. Spesifik boyanmalar tek nükleuslu trofoblast hücrelerinde gözlenirken negatif kontrol grubunda boyanma gözlenmedi. Sonuç olarak bir ökaryon vector üzerinde, hedef gen klonlanarak steroidogenik enzimlerin belirlenmesinde kullanılmak üzere, in situ hibridizasyon tekniği için oldukça spesifik prob'lar elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** 3 $\beta$ -HSD, plasenta, in situ hibridizasyon.

### A Key Enzyme in Placental Steroidogenesis: Detection of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$ Isomerase (3 $\beta$ -HSD)'in With Cloned Probes on Eukaryotic Vector

**Abstract:** 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$  isomerase (3 $\beta$ -HSD) is a key enzyme in placental steroidogenesis. To form steroid hormones, pregnenolone requires enzymes 3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$  isomerase (3 $\beta$ -HSD), which belongs to the  $\Delta^5$  and  $\Delta^4$  steroidogenic pathways. The created probes will help to identify the molecular basis of enzymes which play a role in steroidogenesis. Therefore, the objective of this study was to develop probes with cloning the target gene on a eukaryotic vector. Total RNA was isolated and RT-PCR was performed. DNA bands were extracted from agarose gel and purified. 3 $\beta$ HSD-DNAs were transformed on *E.coli* strain. Vector containing 3 $\beta$ HSD insert were digested with the restriction enzymes *NcoI* and *NotI*. In vitro transcription of the DIG-labelled cRNA was carried out by using DIG-RNA labelling mix. In situ hybridization was carried out with the probes. Specific staining was observed in uninucleated trophoblast cells where as negative control was negative. In conclusion, specific probes were generated with cloning the target gene on a eukaryote vector, which are suitable for detection of steroidogenic enzymes with in situ hybridization.

**Key Words:** 3 $\beta$ -HSD, placenta, in situ hybridization.

<sup>1</sup> Yrd.Doç.Dr., Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü/BURSA, gozde.r.ozalp@gmail.com

<sup>2</sup> Prof.Dr., Justus-Liebig-Universität-Giessen Veteriner Fakültesi Doğum, Jinekoloji ve Androloji Kliniği GIESSEN.

## Giriş

3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz/ $\Delta$ <sup>5-4</sup> izomeraz (3 $\beta$ -HSD) steroid hormon sentezinde kilit enzim olarak kabul edilir ve <sup>3,6,7,8</sup> dişilerde reproduktif fonksiyonları kontrol eden, cinsiyet karakterini belirleyen progesteron ve östrojen gibi hormonların sentezinde çok önemli rol üstlenmektedir <sup>1,9</sup>.

Steroid hormon sentezi, kolesterolün sitoplazmada P450scc'in (P450 side chain cleavage enzyme) enzim reaksiyonuyla başlar ve prekürsör madde olarak açığa çıkan pregnenolon, endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerin reaksiyonlarıyla steroid hormonlara dönüşür<sup>4,5,10</sup>.  $\Delta$ 4 sentez yolunda pregnenolon 3 $\beta$ -HSD enzimiyle progesterona çevrilir. Diğer taraftan  $\Delta$ 5 sentez yolunda ise P450c17 $\alpha$  (17 $\alpha$ -Hydroxylase C17/20 lyase) pregnenolone'u dehydroepiandrosteron (DHEA)' çevirirken, 3 $\beta$ -HSD ise DHEA'u androstenedion'a çevirir.

İnek plasentasında yapılan çalışmalara göre 3 $\beta$ -HSD enzim aktivitesi karunkel'e göre kotiledonlarda daha yüksek bulunmuştur. Kotiledonda gebeliğin 7. ayında yapılan aktivite ölçümü 150,6  $\pm$  5,8 pmol /mg<sup>-1</sup> yken, 8. gebelik ayında aniden düşmektedir<sup>11</sup>.

Steroidogeneziste önemli rol oynayan enzimlerin hücrel lokalizasyonları ve steroid hormonların nasıl kontrol edildiğine ait bilgi edinmek önemlidir<sup>2</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalarda antikor üretimine önem verilse de, doku spesifik antikorların üretilmesi, çalışmalar için yetmemektedir. Doku bazında ilgili RNA'ların belirlenmesi için ticari hazırlanan bazı prob'lar sonuç vermemektedir.

Bu çalışmada, rekombinant gen teknolojisi kullanarak hedef gen bölgelerinin bir bakteri suşunda çoğaltılması ile hazırlanan 3 $\beta$ -HSD RNA prob'larının üretilebilmesi ve in situ hibridizasyon çalışmalarında kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metod

### Doku örneklerinin toplanması ve saklanması

Plasentolar sağlıklı 3 inekten sezaryen operasyonu sırasında çıkartıldı. Karunkel ve kotiledon manuel olarak ayrıldı ve total RNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere sıvı azotta şok dondurma yapıldıktan sonra -80°C'de saklandı. In situ hibridizasyon çalışması için dokunun kalan kısmı % 4 paraformaldehitte fikse edilerek saklandı.

### Total mRNA İzolasyonu

-80°C'de saklanan doku parçaları azot içinde doku tozu haline getirildi. Total mRNA, Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Almanya) içinde ile Ultra Turrax T25 (IKA-Werke GmbH and Co KG, Staufen i. Br., Almanya) ile homojenize edilen dokulardan elde edildi. 200 $\mu$ l kloroform eklenerek, 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Toplanan supernatant izopropanol ile karıştırılarak -20°C'de 30 dakika bekletildi ve 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan pelet 500 $\mu$ l 70%'lik etanol ile yıkanarak 140000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pelet 37°C'de 30 dakika kurutuldu. 50 $\mu$ l otoklavlanmış distile su eklenerek 70°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletildi. 1.25 $\mu$ l RNaz-Inhibitor (Fermentas) eklenerek spektrofotometrik ölçümle RNA konsantrasyonu hesaplandı.

### RT-PCR

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda 10 ng total RNA ve 8.5  $\mu$ l RT-solüsyonu hazırlanarak cDNA-sentezi yapıldı (GeneAmp RNA PCR Kit Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). Tek basamaklı reverz transkriptaz program kullanıldı (8 dakika 21°C'de, 15 dakika 42°C'de, 5 dakika 99°C'de, ve 5 dakika 5 °C'de). Sonraki aşamada 10  $\mu$ l cDNA ve 40- $\mu$ l reaksiyon solüsyonu kullanılarak PCR yapıldı. Reaksiyon solüsyonu 1  $\mu$ l primer-mix (forward ve reverse; her biri 15 pmol/ $\mu$ l), 0.25  $\mu$ l Amplitaq Gold DNA polimeraz (5 U/ $\mu$ l), 2 lI MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 4  $\mu$ l 10x PCR-buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl) ve 32.75 ml otoklavlanmış distile su kullanılarak hazırlandı. Başlangıç denaturasyon için 95 °C'de 10 dakika ve takibinde 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 62 °C'de 1 dakika primer bağlanması, 72 °C'de 1 dakika uzama için 39 döngü olacak şekilde PCR programlandı. Son uzama için 72 °C'de 10 dakika rekasiyonu ile PCR tamamlandı. 3 $\beta$ -HSD için spesifik bantlar ethidium bromid'le boyanmış 1.5%'lik jel elektroforezden sonra UV altında görüntülendi. Kullanılan spesifik oligonukleotid primerleri Tablo 1'de verilmektedir.

### Agaroz Jel Ekstraksiyonu

DNA bantları jelden UV ışık altında kesilerek ayrıldı ve QIAEX II @ Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kiti kullanılarak saflaştırıldı. Agarozdan arındırılan DNA'lar pGEM-T vector (Promega, Heidelberg, Almanya) ile ligasyon yapıldı.

**Tablo 1. RT-PCR’da kullanılan ve 3β-HSD için spesifik primer listesi (EUROGENTEC S.A.), Belçika**

**Table 1. Primers used in RT-PCR for detection of mRNA specific for 3β-HSD (EUROGENTEC S.A.), Belgium**

5' ..... CTT-GCT-GTA-TGG-GTA-TGG-AG.....3' (3 β -HSD rev)

5'.....CTG-CTG-GGA-GGA-GAC-ATT-C.....3' (3 β -HSD for)

### Ekspresyon Vektöre 3βHSD cDNA’nın Transformasyonu

100µl XL1-Blue *Escherichia coli* suşuna 1.7µl β-Merkaptoethanol eklenerek 10 dakika buzda inkübe edildi. 10µl DNA XL1-Blue *Escherichia coli* suşuna transforme edilerek (Stratagene, Amsterdam, Hollanda) 30 dakika buzda, 45 saniye 42°C’de ve tekrar 2 dakika buzda inkübe edildi. 0.9 ml LB-Medium karışımına eklendi ve 37°C’de 1 saat bekletildi. 100 µl transformasyon solüsyonu LB-ampicilin agar plaklarına ekildi. Her bir plak 40µl IPTG ve 40µ X-gal içerecek şekilde hazırlandı ve plaklar 37°C’de 1 gece inkübe edildi. Transforme edilen plazmidler beyaz koloni olarak toplandı ve 45 ml LB-Medium içinde bir gece boyunca 37°C’de inkübe edildi. Plazmidlerin saflaştırılmasında Promega PureYield™ kiti kullanıldı (Promega GmbH Mannheim, Almanya).

3β-HSD içeren vektörler restriksiyon enzimleri *NcoI* (antisense cRNA) ve *NotI* (sense cRNA) (New England Biolabs, Frankfurt, Almanya) ile kesildi. DIG-RNA işaretli karışım (Boehringer Mannheim) RNA-polimerazları T7 ve SP6 kullanılarak DIG-işaretli cRNA’nın in vitro transkripsiyonu ile tamamlandı. T7 RNA-polimeraz bağlı proplar negatif kontrol grubu olarak, SP6 RNA-polimeraz bağlı proplar ise pozitif kontrol grubu değerlendirilmesinde kullanıldı.

### In Situ Hybridization

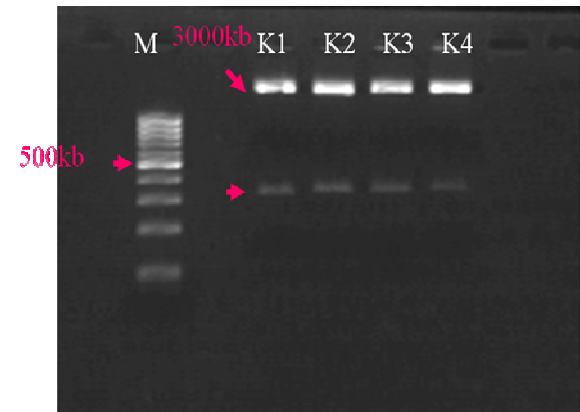
5 µm kesitler (Menzel Glaeser, Braunschweig, Almanya) 10 dakika ksilen ve dereceli alkol serisinden geçirilerek parafinden temizlendi. Dokular proteinaz K (20 µg/ml) ile 30 dakika 37°C’de inkübe edildikten sonra, 4% paraformaldehide içinde 10 dakika post-fiksasyon yapıldı. 20%’lik glycerol içinde 30 dakika boyunca pre-hibridizasyon yapıldı. Kesitler DIG-işaretli sense (T7) ve antisense (SP6) cRNA propları ile inkübe edildi. Her ikisi

de 1:100 oranında olacak şekilde, 50% deionize formamid, 10% dekstran sulfat, 2× SSC, 1× Denhardt’s solüsyonu, 10 µg/ml salmon sperm DNA and 10 µg/ml yeast t-RNA hibridizasyon solüsyonu içinde hazırlandı. Hibridizasyon 37°C’de bir gece boyunca yapıldı. Post-hibridizasyon yıkamalarından sonra doku örnekleri bir gece boyunca 4°C’de alkalın fosfat ile konjuge anti-DIG Fab-antikör (Boehringer Mannheim, Mannheim, Almanya) ile inkübe edildi. Boyama NBT/BCIP (KPL, MD, USA) ile tamamlandı.

### Bulgular

Çalışmada kullanılan 294 kb büyüklüğündeki primer’lar RT-PCR ile başarılı bir şekilde elde edilmiş ve agaroz jelde görüntülenmiştir. Kullanılan yöntem ile 3β-HSD DNA’sı E.Coli suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiş ve oluşan kolonilerden restriksiyon enzimler aracılığıyla hedef DNA başarıyla kesilerek 3β-HSD prob RNA’lar üretilmiştir (Şekil 1).

In situ hibridizasyon’da kullanılan bu prob’larla plasentada tek nukleuslu trofoblast hücrelerinde spesifik boyanmalar gözlenirken (Şekil 2), T7 RNA-polimeraz bağlı proplarla yapılan negatif kontrol gruplarında ise boyanma gözlemlenmemiştir.

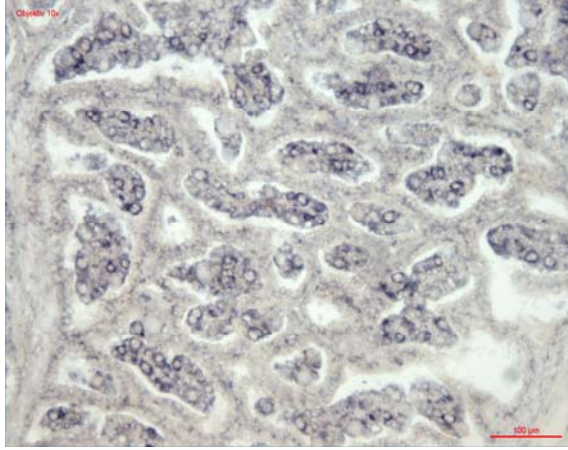


Şekil 1:

*E.Coli* suşundan restriksiyon enzimleriyle kesilen hedef genin agaroz jelde görüntüsü

Fig 1:

Visualisation of the target gene on agarose gel after digestion of restriction enzymes from *E.Coli* strain



Şekil 2:  
İnek plasentasında 3βHSD'nin in situ  
hibridizasyonla boyanma alanları  
Fig 2:  
Stained cells with 3βHSD after in situ  
hybridization on bovine placenta

## Tartışma ve Sonuç

3β-HSD için spesifik RNA prob'ları başarıyla üretilmiştir. Ökaryon bir vektörde hedef gen bölgesinin klonlanması esasına dayanan teknik, steroidogenesis mekanizmasında önemli bir enzim olan 3β-HSD'nin belirlenmesinde oldukça güvenilir bir metot olacağı düşünülmektedir.

## Kaynaklar

1. Chaffin, C.L., Dissen, G.A., Stouffer, R.L., 2006. Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the periovulatory interval in monkeys. *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 11–18.
2. Chih-Hsien, C., Hen-Wei, Wei., Leang-Shin, W., 2008. Generation and Utilization of P450 Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme and 3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Antibodies for Universal Detection. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*. 29, 152–160.
3. Conley, A.J., Bird, I.M., 1997. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod* 56, 789–799.
4. Hall, P.F., 1984. Cellular organization for steroidogenesis. *Int Rev Cytol.* 86, 53-95.
5. Herrmann, M., Scholmerich, J., Straub, R.H., 2002. Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann N Y Acad Sci.* 966, 166-186.
6. Labrie, F., Simard, J., Luu-The, V., Pelletier, G., Belghmi, K., Belanger, A. 1994. Structure, regulation and role of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase enzymes in the formation of sex steroids in classical and peripheral intracrine tissues. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 8, 451–474.
7. Mason, J.I., 1993. The 3β-hydroxysteroid dehydrogenase gene family of enzymes. *Trends Endocrinol Metab.* 4, 199–203.
8. Penning, T.M., 1997. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev.* 18, 281–305.
9. Rodway, M.R., Swan, C.L., Crellin, N.K., Gillio-Meina, C., Chedrese, P.J., 1999. Steroid regulation of progesterone synthesis in a stable porcine granulosa cell line: a role for progestins. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 68, 173–180.
10. Sugawara, T., Fujimoto, S., 2004. The potential function of steroid sulphatase activity in steroid production and steroidogenic acute regulatory protein expression. *Biochem J.* 380, 153-160.
11. Tsumagari, S., Kamata, J., Takagi, K., Tanemura, K., Yosai, A., Takeishi, M., 1994. 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase activity and gestagen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *J Reprod Fertil* 102, 35-39.