



### Gelişmekte Olan Fare Fetüs Beyninde Aromataz, Östrojen Reseptör Alfa ve Progesteron Reseptörünün Birbirleriyle Olan İlişkileri

Interrelation of Aromatase, Estrogen Receptor Alpha and Progesterone Receptor in the Developing Mouse Fetal Brain

Mehmet Bertan Yılmaz<sup>1</sup>, M. Ali Erkoç<sup>1</sup>, Sabriye Kocatürk Sel<sup>1</sup>, Erdal Tunç<sup>1</sup>, Lütüye Özpak<sup>1</sup>, Ayfer Pazarbaşı<sup>1</sup>, Ali İrfan Güzel<sup>2</sup>, Davut Alptekin<sup>1</sup>, H. Ümit Lüleyap<sup>1</sup>, Osman Demirhan<sup>1</sup>, Mülkiye Kasap<sup>1</sup>, Halil Kasap<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, ADANA

<sup>2</sup> Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, RİZE

*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi (Cukurova Medical Journal) 2013; 38 (2):. 174-180.*

#### ABSTRACT

**Purpose:** Aromatase (Cyp19a1) is crucial for the sexually dimorphic development of the fetal brain, regulation of gonadotropin secretion and sexual interest in adults. Our goal is to determine the developmental mRNA expression patterns of aromatase, estrogen receptor alpha (Esr1) and progesterone receptor (Pgr) in the fetal mouse brain at different times of gestation.

**Material and Methods:** Female mice were mated with fertile males and checked for vaginal plug the next day to confirm successful mating (vaginal plug=day 1 of pregnancy). At gestational days 9-12-15-17-19-21 pregnant mice were sacrificed and fetal brains were removed and mRNAs were isolated and reverse transcribed into cDNAs. In order to evaluate mRNA expression levels, real time PCR was performed employing primers for Cyp19a1, Esr1 and Pgr genes.

**Results:** In our studies, Esr1 and Pgr mRNA expression levels peaked at day 9 and returned to normal adult levels at around day 17-18. Cyp19a1 mRNA expression peaked at day 14-16 along with a drastic decrease in Esr1 and Pgr mRNA expression levels and then returned to normal adult levels around the time of delivery.

**Conclusion:** Cyp19a1 expression in the fetal brain launches around gestational day 11-12 and peaks around gestational day 14-16 and fall back to normal adult levels at around gestational day 19-20. It has been recently reported that Esr1 and Pgr both mediate Cyp19a1 mRNA expression in the mouse brain. Together with these previous reports, our findings may imply that both Esr1 and Pgr possibly play a role in the developmental regulation of aromatase in the fetal mouse brain.

**Key Words:** Aromatase, brain, estrogen receptor alpha, fetal, mouse, progesterone receptor.

#### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmadaki amacımız, gonodotropin salgılanması, cinsel dimorfik fetal beyin gelişimi ve yetişkinlerdeki cinsel tercih için çok önemli olan, aromatazin ve östrojen reseptör alfa (Esr1) ve progesteron reseptörlerinin (Pgr) gebeliğin farklı dönemlerindeki mRNA ekspresyon profillerinin eş zamanlı olarak belirlenmesidir.

**Materyal ve Metod:** Dişi fareler, üreme potansiyeli olan erkek farelerle çiftleştirildi ve başarılı çiftleşme, bir gün sonra oluşan vajinal plak kontrol edilerek doğrulandı (vajinal plak=gebeliğin birinci günü). Gebeliğin 9-12-15-17-19-21.

günlerinde gebe farelerin yaşamları sonlandırıldı ve fetüslere ait beyinler çıkarılarak mRNA izole edildi ve cDNA haline çevrildi. mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi Cyp19a1, Esr1 ve Pgr genlerine özgün primerler ile real time PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

**Bulgular:** Çalışmalarımızda; Esr1 ve Pgr mRNA ekspresyon düzeyleri 9. günde tepe noktaya ulaştı, 17-18. günlerde ise normal yetişkin düzeylerine döndü. Cyp19a1 mRNA ekspresyonu, Esr1 ve Pgr mRNA düzeylerindeki ciddi bir azalmayla beraber, 15-16. günde tepe noktaya ulaştı ve takriben doğumun olacağı dönemlerde normal erişkin seviyelerine indi.

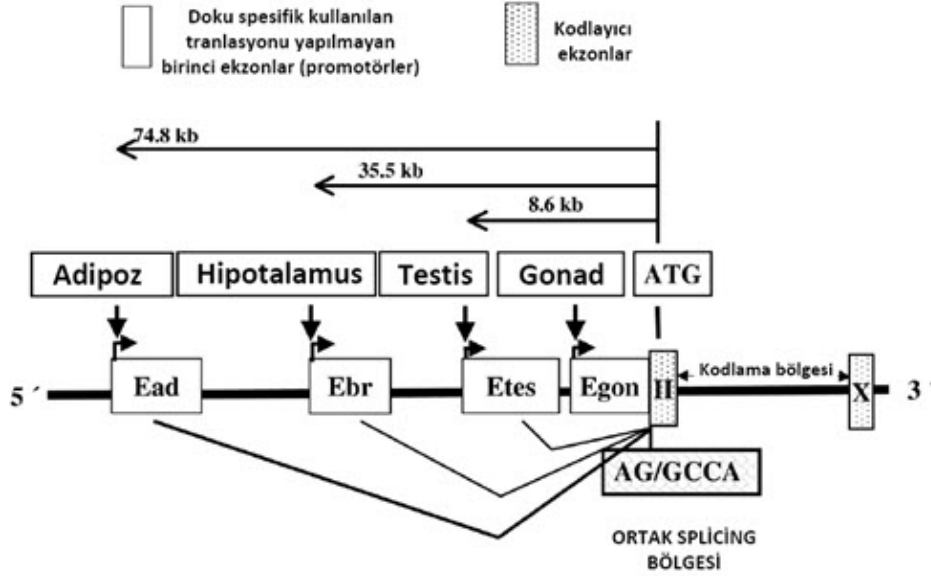
**Sonuç:** Fetal beyinde Cyp19a1 ekspresyonu gebeliğin 11-12. günü civarında başlar ve 15-16. günlerinde tepe noktasına ulaşır. Bunu takiben 19-20. günlerinde de normal yetişkin seviyelerine iner. Son zamanlarda rapor edilen çalışmalarda, Esr1 ve Pgr'nin fare beyinde Cyp19a1 mRNA ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir. Bu çalışmalar ışığında bizim bulgularımız, Esr1 ve Pgr'nin fetal fare beyinde aromataz ekspresyonunu düzenlenmesinde rol oynadığını düşündürülebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Aromataz, beyin, fare, fetus, östrojen reseptör alfa, progesteron reseptörü.

## GİRİŞ

Seks steroidleri hücrel organizasyon ve memeli gelişimini birçok yönden etkilemekle beraber özellikle nöral fonksiyonların ve üreme davranışlarının şekillenmesinde aktif rol oynarlar<sup>1,2</sup>. Seks steroidlerinin sentez mekanizması kolesterolün mitokondri içine girişi ile başlar ve altı temel enzimatik adım neticesinde östrojen, progesteron ve testosteron oluşumu sağlanır. Bu seks steroidlerinin özellikle progesteron ve östrojenin beyin dahil pek çok organı içeren geniş bir yelpazede işlevseldir. Progesteron ve östrojen eşey organları, adrenal korteks ve lokal olarak da beyin gibi çeşitli dokular ve organlar tarafından sentezlenebilir<sup>2,3</sup>. Seks steroid sentez aşamalarından en önemlisi; C19 steroidlerinin biyolojik olarak aktif östrojen olan, östradiol (E<sub>2</sub>) dönüşümünü katalizleyen anahtar

enzim olan aromataz tarafından gerçekleştirilmektedir<sup>4</sup>. Aromataz, hem insan hem de farede tek kopya bir gen olan Cyp19a1 tarafından kodlanır ve bu genin inhibisyonu tüm vücuttaki östrojen üretimini ortadan kaldırır<sup>4,5</sup>. Fare Cyp19a1 geni 9. kromozomun uzun kolunda yer almakta olup 30 kb kodlama bölgesi ve 75 kb promotör bölgesi ile toplam 105 kb uzunluğundadır. Aromataz protein oluşumunu gerçekleştiren kodlama bölgesi dokuz ekzonundan (II-X) oluşurken, ekzon II'nin 5' tarafında farklı birincil ekzonların da bulunduğu bölgede bu ekzonların doku spesifik alternatif transkripsiyonunu yönlendiren çok sayıda farklı promotör bulunur, bu durum birbirlerinden farklı 5'-untranslated region (Translasyonu yapılmayan bölge, 5'-UTR) içeren aromataz mRNA'larının oluşumuna neden olur, fakat bunlar aromataz protein yapısına katılmadığından bu mRNA'ların translasyonu ile oluşan protein ürünü tüm doku tiplerinde aynıdır<sup>5,6</sup> (Şekil 1).



Şekil 1. Aromataz (Cyp19a1) gen bölgesinin yapısı

Aromataz omurgalı beyinde, evrimsel olarak korunmuş promotör I.f vasıtasıyla başlıca hipotalamus, hipokampus ve amigdala tarafından sentez edilir. Aromatazın fizyolojik rolü aromataz geni tahrip edilmiş (ArKO) farelerle ve aromataz geninin inaktivasyonuna sebep olan mutasyonlara sahip erkeklerde yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır<sup>7-9</sup>. Her iki durumda da, aromataz eksikliği artan testosteron ve gonadotropin seviyesi ile ilişkilendirilmiş olup, aromataz ve östrojenin gonadotropin salgılanmasının düzenlenmesinde etkin olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca, aromataz geni kusurlu erkek farelerde libido anlamlı derecede düşük olup ancak östrojen tedavisiyle normal hale döndürülmüştür. Bu durum aromataz ve östrojenin aynı zamanda seksüel davranışların düzenlenmesinde de temel rol oynadığını ortaya çıkarmıştır<sup>10,11</sup>. Beyin-spesifik aromataz promotörünün regülasyonunu sağlayan moleküler mekanizmalar henüz çok iyi anlaşılmamakla beraber çeşitli araştırmacılar protein kinaz A ve C,

ile cAMP'nin beyin aromataz ekspresyonu ve enzim aktivitesini fosforilasyon mekanizmaları ile düzenlediğini göstermişlerdir<sup>12,13</sup>. Daha da önemlisi yakın zamanda östrojenin ve progesteronun in vivo ve in vitro koşullarda altında östrojen ve progesteron reseptörleri aracılığıyla hipotalamik aromataz mRNA ve enzim aktivitesini artan veya azalan yönde düzenleyebildiği gösterilmiştir<sup>14,15</sup>.

Aromataz ekspresyonu ve enzim aktivitesi farede ve insanda fetal gelişimin sürecinin ortalarında artmaya başlayarak farede 14-16. günlerde en yüksek düzeye ulaşır, sonrasında doğuma kadar geçen süre zarfında ise azalmakta ve nihayetinde erişkinlerde görülen seviyelere inmektedir<sup>16,17</sup>. Buradaki çalışmamızda fare beyinde aromatazın ekspresyonun ve enzim aktivitesinin kontrolünde rol oynadığı belirtilen östrojen reseptör alfa (Esr1) ve progesteron reseptörlerinin (Pgr) mRNA ekspresyon profillerinin gebeliğin farklı dönemlerinde eş zamanlı olarak belirlenmesi ve aromataz ekspresyonuyla olan ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

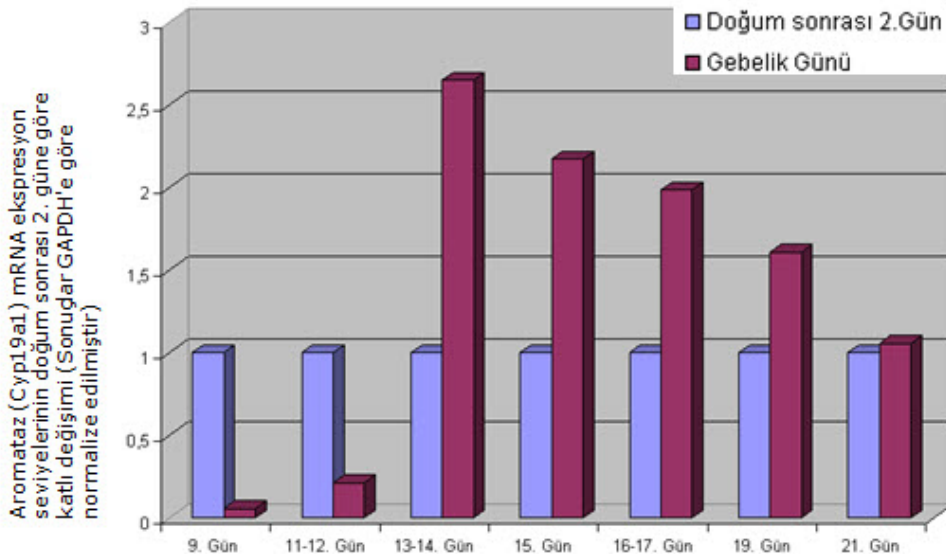
### MATERYAL ve METOD

Dişi fareler, üreme potansiyeli olan erkek farelerle çiftleştirildi. Başarılı çiftleşme bir gün sonra oluşan vajinal plug kontrol edilerek doğrulandı (vajinal plug oluşumu =Gebeliğin 1. Günü). Gebeliğin 9, 11-12, 13-14, 15, 16-17, 19, 21. günlerinde ve doğum sonrası 2. günde gebe farelerin yaşamları sonlandırıldı ve her iki cinse ait fetüs beyinleri çıkarıldı. Bu beyinlerden trizol (İnvitrogen) kullanılmak suretiyle mRNA'lar izole edildi ( İzole edilen mRNA'nın bütünlüğü ve sağlamlığı 5 µg RNA'nın %1'lik formaldehit jelde yürütülmesiyle doğrulandı). Sonrasında Super

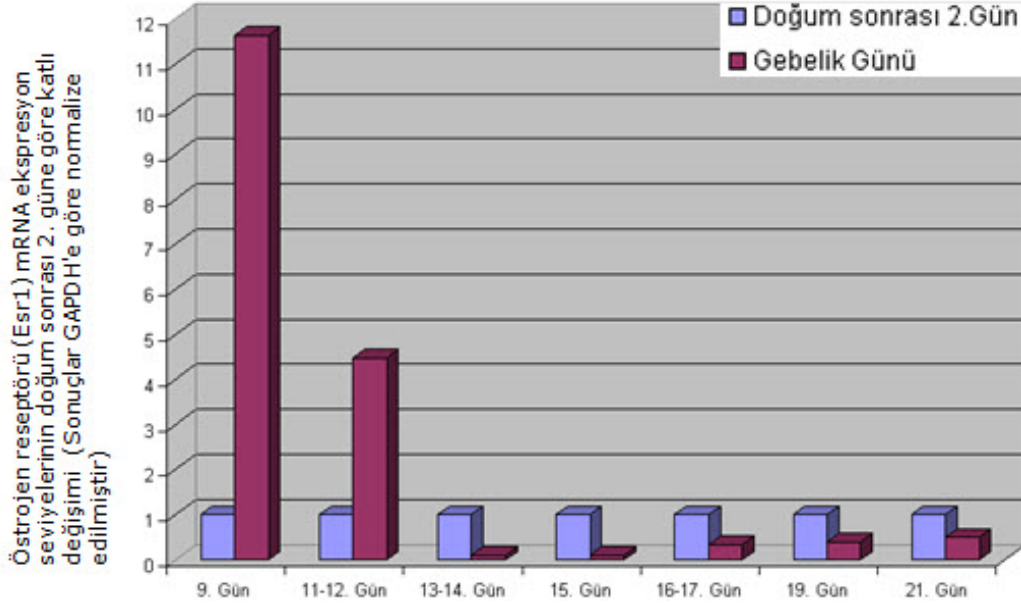
Script III (Reverse transkriptaz) kiti (İnvitrogen) ile bu mRNA'lar cDNA haline çevrildi. Cyp19a1, Esr1 ve Pgr genlerine özgü primer çiftleri (Primer dizileri tablo-1'de verilmektedir.) ve SYBR-green (Applied Biosystems) PCR karışımı kullanılarak real time PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon hacmi 25 µl, reaksiyon koşulları ise 50 °C 2 dakika, 95 °C 10 dakika, sonrasında 40 döngü 95 °C 15 saniye - 60 °C 1 dakika olarak uygulandı. Tüm RNA örneklerine ait ekspresyon düzeyleri endojen kontrol olarak kullanılan Gliseraldehid-3-fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) amplifikasyonu ile normalize edildi.

**Tablo 1. Real Time PCR'da kullanılan primer dizileri**

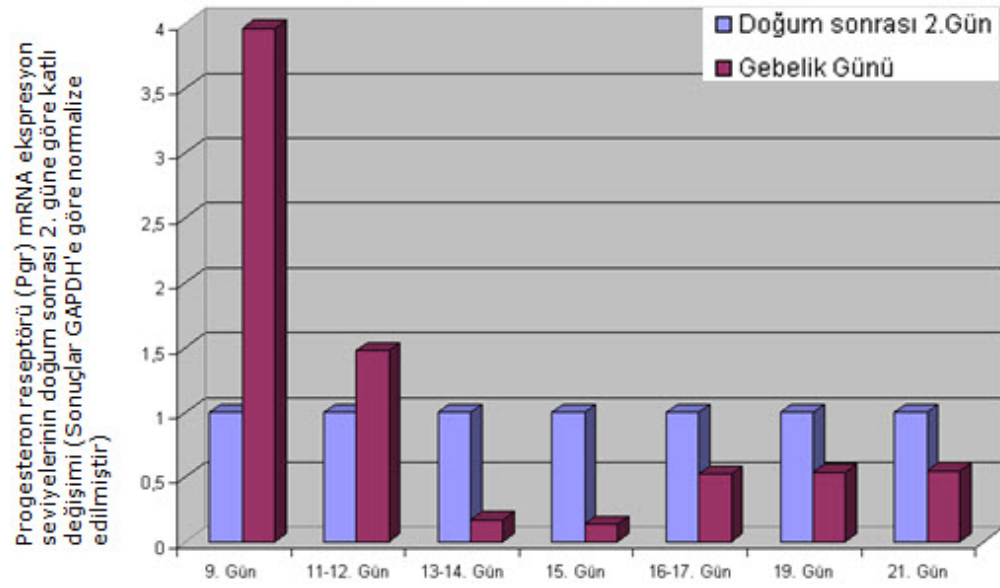
Cyp19a1 fare forward:	5'-CTGCAGACACTACTACTACA-3'
Cyp19a1 fare reverse:	5'-ATCCGAGTCACTGCTCTC AG-3'
Pgr-ABC fare forward:	5'-GACACTGGCTGTGGAATTTC-3'
Pgr-ABC fare reverse:	5'-CCAGGATCTTGGGCAACTG-3'
Esr1 fare forward:	5'-ATGAAAGGCGGCATACGGAAAG-3'
Esr1 fare reverse:	5'-CACCCATTTTCATTTGGCCTTC-3'
GAPDH fare forward:	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'
GAPDH fare reverse:	5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'



**Şekil 2. Fetal Fare Beyninde Aromataz (Cyp19a1) mRNA'sının Gebelik Sürecindeki Ekspresyon Profili**



Şekil 3. Fetal Fare Beyninde Östrojen Reseptörü (Esr1) mRNA'sının Gebelik Sürecindeki Ekspresyon Profili



Şekil 4. Fetal Fare Beyninde Progesteron Reseptörü (Pgr) mRNA'sının Gebelik Sürecindeki Ekspresyon Profili

## TARTIŞMA

Steroid hormonlar birçok fizyolojik fonksiyonu kontrol ettiği gibi gelişim, farklılaşma ve

homeostatik kontrolü de kapsayan çeşitli yaşamsal özellikler açısından da önemlidir. Androjen ve östrojeni içeren seks steroid hormonları, omurgalı üreme süreçlerinde özellikle de merkezi sinir

sisteminin seksüel farklılaşmasında ve seksüel davranışların şekillenmesinde anahtar rol oynar. Daha önce yapılan çeşitli çalışmalar, beyinde aromataz ekspresyon seviyelerinin gelişimin farklı aşamalarında çeşitlilik gösterdiğine ve prenatal periyotta ekspresyonun geçici olarak tepe noktasına ulaştığına işaret etmektedir<sup>17,18</sup>. Fare fetüs beyinde Cyp19a1 ekspresyonu gebeliğin 9. günü civarında başlar ve 14-16. günlerinde tepe noktasına ulaşır. Bunu takip eden 19-20. günlerinde ise normal yetişkin seviyelerine iner<sup>16</sup>. Son zamanlarda rapor edilen çalışmalarda, Esr1 ve Pgr'nin beyinde Cyp19a1 mRNA ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir<sup>14-15</sup>.

Gebeliğin farklı günlerinde hazırlanan fare fetal beyni in vitro hipotalamik hücre kültürleri incelendiğinde Cyp19a1 mRNA ekspresyonu 13

günlük fetal hipotalamus kültürlerinde in vivo da gözleendiği üzere artış eğilimindeyken 10-11 veya daha önceki günlerde hazırlanan kültürlerde mRNA ekspresyon düzeylerinin artmadığı ve düşük seviyelerde kaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular Cyp19a1 mRNA ekspresyonunu tam olarak 13.günden önce ortaya çıkan bazı faktörlerin tetiklediğini ve bunların yokluğunda Cyp19a1 mRNA ekspresyonunda artış gözlenmediği ifade edilmiştir<sup>16</sup>.

Bizim bulgularımız Esr1 ve Pgr mRNA ekspresyon düzeylerinin 9.günden itibaren 13-14. güne kadar azalma eğiliminde olduğunu ve 13-14.günde normal yetişkin seviyelerinin de altına indiğini göstermiştir. Bu bağlamda, Esr1 ve Pgr mRNA ekspresyon düzeylerinin Cyp19a1 mRNA ekspresyon seviyeleri ile ters bir şekilde korele olduğu ve bu düşüşün çeşitli sinyal yollarını indükleyerek veya bazı transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek Cyp19a1 mRNA ekspresyonunu etkileyebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca fetal gelişim sürecinde dolaşımdaki ve beyindeki lokal östrojen ve progesteron seviyelerinin de yetişkinlerde olduğu gibi aromatazın ekspresyonunu etkileyebileceği de akıld

tutulmalıdır. Bu bağlamda, çalışmalarımız neticesinde Esr1 ve Pgr'nin embriyonik dönemde nöronların ve beyin gelişiminde özellikle üremeye yönelik davranış yapı ve fonksiyonların ortaya çıkmasında rol oynadıkları düşünülebilir.

## KAYNAKLAR

1. Turgeon JL, Carr MC, Maki PM, Mendelsohn ME, and Wise PM. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies. *Endocr Rev.* 2006; 27:575-605.
2. Wrobel B and Karasek M. Human sexuality and sex steroids. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008; 29:3-10.
3. Bernardi F, Pluchino N, Stomati M, Pieri M, and Genazzani AR. CNS: sex steroids and SERMs. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 997:378-88.
4. Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Langoi D, and Deb S. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev.* 2005; 57:359-83.
5. Zhao H, Innes J, Brooks DC, Reierstad S, Yilmaz MB, Lin Z, and Bulun SE. A novel promoter controls Cyp19a1 gene expression in mouse adipose tissue. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7:37.
6. Golovine K, Schwerin M, and Vanselow J. Three different promoters control expression of the aromatase cytochrome p450 gene (*cyp19*) in mouse gonads and brain. *Biol Reprod.* 2003; 68:978-84.
7. Jones ME, Boon WC, Proietto J, and Simpson ER. Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. *Trends Endocrinol Metab.* 2006; 17:55-64.
8. Murata Y, Robertson KM, Jones ME, and Simpson ER. Effect of estrogen deficiency in the male: the ArKO mouse model. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 193:7-12.
9. Zirilli L, Rochira V, Diazi C, Caffagni G, and Carani C. Human models of aromatase deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008; 109:212-8.
10. Belgorosky A, Guercio G, Pepe C, Saraco N, and Rivarola MA. Genetic and clinical spectrum of aromatase deficiency in infancy, childhood and adolescence. *Horm Res.* 2009; 72:321-30.
11. Simpson ER and Jones ME. Of mice and men: the many guises of estrogens. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2006; 45-67.
12. Balthazart J, Baillien M, and Ball GF. Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001; 79:261-77.

13. Balthazart J, Baillien M, and Ball GF. Interactions between kinases and phosphatases in the rapid control of brain aromatase. *J Neuroendocrinol.* 2005; 17:553-9.
14. Yılmaz MB, Wolfe A, Cheng YH, Glidewell-Kenney C, Jameson JL, and Bulun SE. Aromatase promoter I.f is regulated by estrogen receptor alpha (ESR1) in mouse hypothalamic neuronal cell lines. *Biol Reprod.* 2009; 81:956-65.
15. Yılmaz MB, Wolfe A, Zhao H, Brooks DC, and Bulun SE. Aromatase promoter I.f is regulated by progesterone receptor in mouse hypothalamic neuronal cell lines. *J Mol Endocrinol.* 2011; 47:69-80.
16. Abe-Dohmae S, Tanaka R, Takagi Y, and Harada N. In vitro increase of aromatase mRNA in diencephalic neurons. *Neuroendocrinology.* 1996; 63:46-52.
17. Hutchison JB, Beyer C, Hutchison RE, and Wozniak A. Sexual dimorphism in the developmental regulation of brain aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995; 53:307-13.

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:**

Dr. Mehmet Bertan Yılmaz  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
ADANA  
Tel: 0322 3386060/3498

e-mail: mehmetbertanyilmaz@gmailo.com

geliş tarihi/received :09.08.2012

kabul tarihi/accepted:05.10.2012