

# Čimbenici koji utječu na određivanje spola u kornjača

---

Špoljar, Mirjana

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:958836>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA ODREĐIVANJE SPOLA U  
KORNJAČA**

**SEX DETERMINATION FACTORS IN TURTLES**

**SEMINARSKI RAD**

Mirjana Špoljar

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Zagreb, 2009.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	3
2. RAZVOJ GONADA U CRVENOUHE KORNJAČE.....	6
3. SIGNALNI SUSTAV STEROIDNIH HORMONA TIJEKOM RAZVOJA JAJNIKA.....	8
3.1. DOKAZI KOJI POTKREPLJUJU OVAJ MODEL.....	8
4. PROMJENA SPOLA POD UTJECAJEM TEMPERATURE I ESTROGENA.....	12
4. 1. UTJECAJ TEMPERATURE NA STEROIDNE HORMONE.....	12
4. 2. UČINCI UTJECAJA EGZOGENO DODANOG ESTROGENA.....	14
5. GENI ODGOVORNI ZA DETERMINACIJU SPOLA MORSKIH KORNJAČA.....	15
6. KAKO TEMPERATURNO-OVISNA DETERMINACIJA SPOLA FUNKCIONIRA U PRIRODI?.....	15
7. ZAKLJUČAK.....	16
8. LITERATURA.....	17
9. POPIS KRATICA.....	18
10. SAŽETAK.....	19
11. SUMMARY.....	19

## 1. UVOD

Među kralješnjacima postoji mnoštvo različitih čimbenika koji mogu biti presudni za određivanje spola, od genotipa do okolišnih utjecaja. Gmazovi su kao skupina posebno zanimljivi, kod njih su zabilježeni primjeri za sve oblike determinacije spola. Mnoge kornjače, među njima svih sedam vrsta morskih kornjača (*Chelonia mydas*-zelena želva, *Eretmochelys imbricata*-karetna želva, *Natator depressus*-australska zelena želva, *Caretta caretta*-glavata želva, *Lepidochelys kempii*-kempijeva želva, *L. olivacea*-paciifička želva, *Dermochelys coriacea*-sedmopruga usminjača ) prikazanih na Slici 1., neki gušteri i svi krokodili pokazuju sustav u kojem je spol gonada određen temperaturom embrija, tzv. temperaturno-ovisna determinacija spola (TDS). Potpuni mehanizam kojim temperatura određuje razvoj testisa ili jajnika u embriju nije poznat, ali je utvrđeno da su gonade osjetljive na temperaturu samo tijekom određenog razdoblja u embrionalnom razvitku, tzv. temperaturno-osjetljivo razdoblje (TOR). To razdoblje poklapa se i sa osjetljivošću na steroidne hormone. Najbolje proučena vrsta u tom pogledu je crvenouha kornjača (*Trachemys scripta*), a najbolje proučen steroidni hormon uključen u ovakvu determinaciju spola je estrogen te enzimski kompleks aromataza koji androgene prevodi u estrogen (Ramsey i Crews, 2008). Aktivnost aromataze je regulirana na genskoj razini. Zasad poznat mehanizam determinacije spola na staničnoj razini objasnila sam na primjeru ove slatkovodne vrste. Naime, sve morske vrste kornjača su ugrožene, pa su količina i način njihovog istraživanja ograničeni etički i zakonima. Detaljnija istraživanja provedena su na zelenoj i glavatoj želvi, te sedmoprugoj usminjači, među ostalim vrstama bolje su proučene karetna i kempijeva želva, dok su paciifička i australska zelena želva najmanje istražene. Neinvazivna fiziološka i biokemijska istraživanja su rijetka, tako da se uglavnom provode na neugroženim, slatkovodnim ili brakičnim vrstama (npr. *Trachemys scripta*, *Chrysemys picta*, *Malaclemys terrapin*, *Chelydra serpentina*), te se zatim rezultati uzimaju u obzir i kada su morske vrste u pitanju (Davenport, 1997).



*Chelonia mydas*-zelená želva



*Eretmochelys imbricata*-karetná želva



*Natator depressus*-australská zelená želva



*Caretta caretta*-glavatá želva



*Lepidochelys kempii*-kempijeva želva



*L. olivacea*-pacifičká želva



*Dermochelys coriacea*-sedmopruga usminjača

**Slika 1.** Danas živi sedam vrsta morskih kornjača

Estrogen je neophodan za razvoj jajnika u svih skupina kralješnjaka osim placentalnih sisavaca, iako je jasno da čak i u sisavaca sudjeluju modificirani estrogenski receptori na

zasad nepoznat način. Egzogeno dodan estrogen tijekom razvoja postupno uzrokuje promjenu spola kod ptica, a trenutačnu kod gmazova, vodozemaca i riba. U crvenouhe kornjače primjena egzogenog estradiola ( $E_2$ ) na jaja inkubirana na temperaturi pri kojoj nastaju mužjaci, kao i egzogena primjena inhibitora aromataze (AI), koji sprječava proizvodnju estrogena, na jaja inkubirana na temperaturi pri kojoj nastaju ženke, nadvladat će utjecaj temperature i preokrenuti spolnu sudbinu embrija. Značajno je da povišena temperatura i estrogen djeluju sinergistički - za preobrazbu spola embrija inkubiranog na prijelaznoj temperaturi potrebno je manje estrogena nego za preobrazbu spola embrija inkubiranog na temperaturi pri kojoj nastaju mužjaci. Zbog sposobnosti da nadvlada utjecaj temperature, pretpostavlja se da je proizvodnja estrogena ključni mehanizam kojeg aktivira temperatura.

Steroidni hormoni su prisutni u embrijima kojima je determinacija spola temperaturno ovisna, bilo da je embrionalnog ili majčinog (žumanjčanog) podrijetla. Poznato je da razina steroida u žumanjku varira i sezonski i unutar legla, te može utjecati na spol mladunaca ako su jaja inkubirana na prijelaznoj temperaturi (temperatura koja rezultira omjerom spolova 50:50, PT). Ovo variranje koncentracije hormona u žumanjku jaja možda ima ulogu u temperaturno-ovisnoj determinaciji spola iako neka istraživanja na nasrtljivim kornjačama (*Chelydra serpentina*) i nekim gušterima pokazuju da ne postoji veza između spola mladunaca i razine hormona u žumanjcu.

Osim estrogena i ostali hormoni iz žumanjca ili embrionalnog podrijetla imaju ulogu u određivanju spola kod gmazova s TDS-om. Npr. primjena egzogeno dodanih nearomatiziranih androgena na jaja crvenouhe kornjače inkubirana na prijelaznoj temperaturi rezultira 100% mužjacima, ali ne može nadvladati utjecaj temperatura koje rezultiraju ženkama. Inhibicija reduktaze, enzima koji prevodi testosteron u nearomatizirani dihidroksitestosteron (DHT), također preobražava embrije u ženke na temperaturi pri kojoj bi trebali nastati mužjaci. Zanimljivo je primjetiti da kombinacija tretmana sa DHT i  $E_2$  na PT kao i tretiranje sa visokim koncentracijama testosterona na temperaturi pri kojoj nastaju ženke rezultira jedinkama sa ovotestisima.

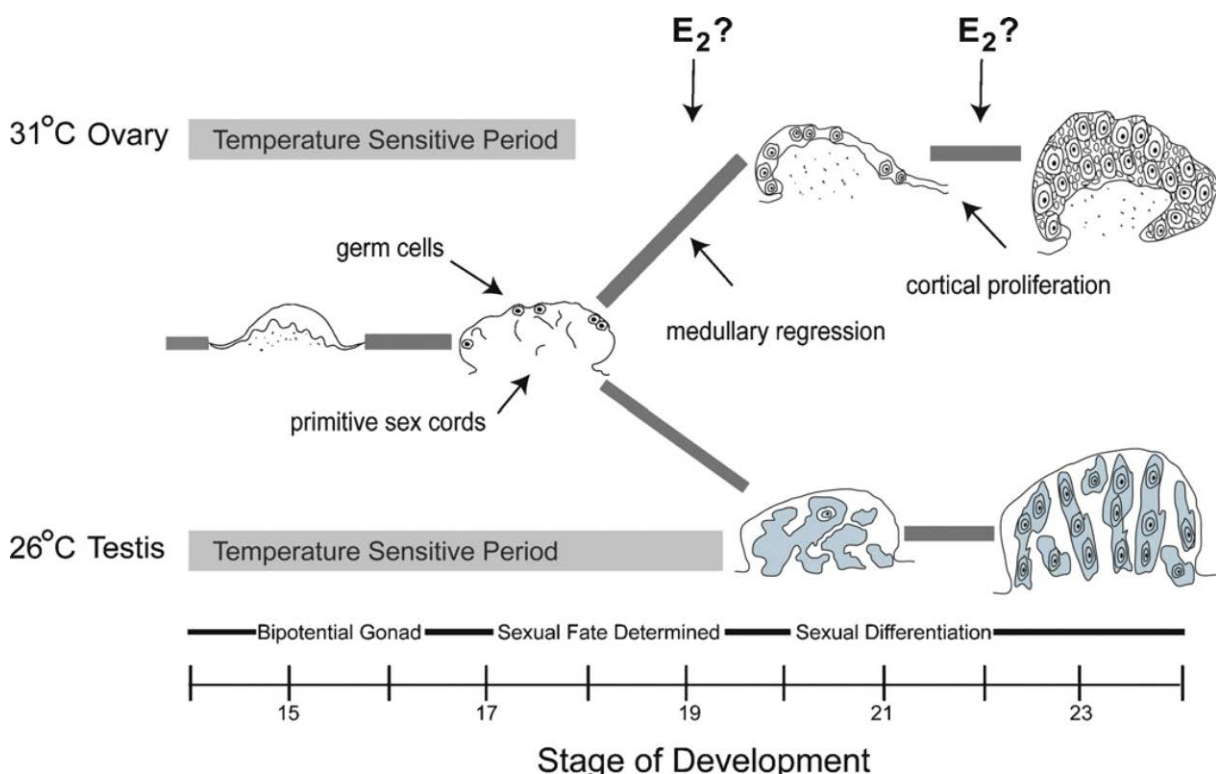
U crvenouhe kornjače interakcija između temperature i steroidnih hormona može aktivirati ili suzbiti gene koji određuju spol. Među različitim skupinama kralješnjaka okidači koji aktiviraju gene zaslužne za determinaciju spola su različiti ali geni koji direktno ili indirektno odgovaraju na te okidače, iako ne nužno istim ekspresijskim obrascem ili u istom razvojnom stadiju, su konzervirani. Homolozi genima koji su prvo pronađeni kod sisavaca kao što su *Dmrt1*, *Sox9*, *Mis*, *Sf1*, *Dax1*, *WT1*, *Wnt4*, *FoxL2* i *Rspo1* pronađeni su i kod riba, vodozemaca, ptica i gmazova.

Ako se isti geni i njihovi produkti koriste u razvoju gonada kroz sve skupine kralješnjaka, moguće je da im odgovor na različite okidače omogućuje različito vrijeme aktiviranja i različit način regulacije gena kod različitih skupina. Zanimljiv primjer ovog fenomena je razdoblje osjetljivosti na estrogen tijekom razvoja jajnika. Kod sisavaca estrogen ima važniju ulogu u razvoju sekundarnih spolnih obilježja nego u samom razvoju jajnika.

Namjera mi je u ovom seminarskom radu objasniti interakciju povišene temperature i estrogena sa spolno-određujućim genima koja rano u embrionalnom razvoju određuje razvoj jajnika te način na koji steroidni signalni put odgovara na temperaturu i hormone.

## 2. RAZVOJ GONADA OPISAN NA PRIMJERU CRVENOUHE KORNJAČE

Početak i trajanje temperaturne i hormonske osjetljivosti tijekom spolne determinacije kod crvenouhe kornjače i shematski prikaz razvoja njenih gonada prikazan je na Slici 1.



**Slika 1.** Put razvoja gonada u crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta*). Temperaturno osjetljivo razdoblje je obojano sivo. Bipotentne gonade sadrže primitivne spolne pruge u središnjem dijelu, a matične stanice u vanjskom epitelu. Na temperaturi pri kojoj nastaju ženke primitivne spolne pruge

degeneriraju, dok matične i somatske stanice u kortikalnom dijelu proliferiraju. Na temperaturi pri kojoj nastaju mužjaci matične stanice migriraju u središnji dio gdje ih ograđuju sjemeni kanalići. Strelice pokazuju dva razdoblja u kojima estrogen djeluje na razvoj jajnika - tijekom regresije sržnog dijela i tijekom kortikalne proliferacije.

$E_2 = 17\beta$ -estradiol.

Gonade se razvijaju kao dio nadbubrežno-bubrežno-gonadnog (NBG) kompleksa. Urogenitalni most se formira oko razvojnog Stadija 13, a izlijeganje se događa u Stadiju 26. Razvoj gonada obuhvaća tri glavne faze - bipotentnu (Stadij 14-16), spolno determinirajuću (Stadiji 16.5/17-19/21) i spolno diferencirajuću (Stadij 20/21 - do izlijeganja). Spolna diferencijacija je programirana kaskada genetskih i hormonskih događaja koja bipotentnu gonadu razvija u jajnik ili testis, dok je spolna determinacija događaj/i koji dovode do pokretanja te kaskade (Lance, 1997). Kod ove vrste temperaturno-osjetljivo razdoblje uključuje bipotentnu i spolno determinirajuću fazu i javlja se oko srednje trećine embrionalnog razvoja. Trajanje temperaturno-osjetljivog razdoblja varira ovisno o temperaturi. Pri temperaturi na kojoj se razvijaju ženke (31°C) temperaturno-osjetljivo razdoblje proteže se od Stadija 14 do 18/19, dok se pri temperaturi na kojoj nastaju mužjaci (26°C) proteže od Stadija 14 do 20/21.

Kako se gonade razvijaju iz genitalne brazde javljaju se dva odijeljena dijela - unutarnja srž i vanjska kora. Primitivne spolne pruge pronađene su u središnjem, sržnom dijelu bipotentne gonade neovisno o temperaturi. Prilikom razvoja jajnika primitivne pruge degeneriraju (oko Stadija 18-20) dok se u testisima razvijaju u sjemene kanaliće (počevši od stadija 18, vrlo su očiti u stadiju 20). Zanimljivo je da se pruge u testisu razvijaju dok je spol još uvijek labilan, čineći proces reverzibilnim sve do stadija 20/21. Matične stanice su prvotno smještene u vanjskom, matičnom epitelu gonade. U jajniku ostaju u kortikalnoj regiji gdje proliferiraju zajedno sa granulosa stanicama sa kojima tvore folikule. U testisu matične stanice migriraju u srž počevši od Stadija 18 gdje ih obavijaju sjemeni kanalići.

Dva ključna događaja označavaju razvoj jajnika: regresija srži i proliferacija kore. Regresija sržnih spolnih pruga započinje oko stadija 18/19 - tada zasigurno nije slučajno i kraj TP-a pri temperaturi na kojoj nastaju ženke. Proliferacija kore započinje oko Stadija 21 pa je time dio diferencijacije jajnika ali ne i spolne determinacije.



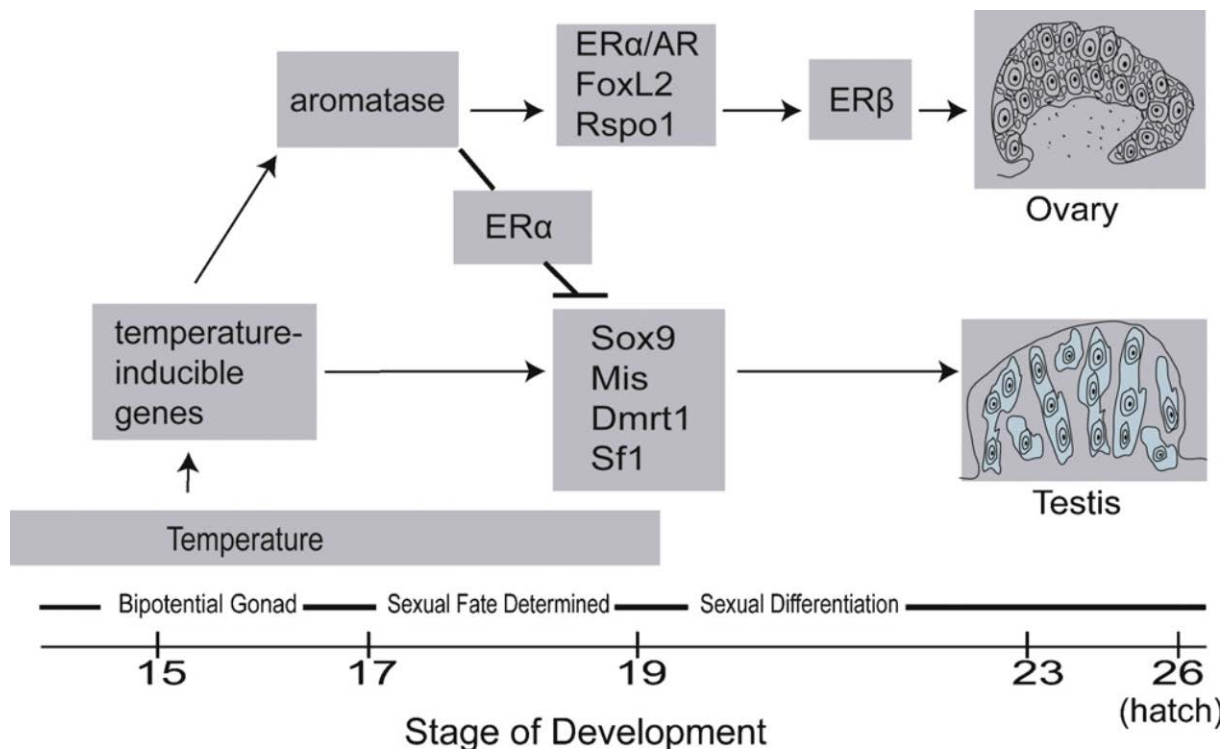
### **3. SIGNALNI SUSTAV STEROIDNIH HORMONA TIJEKOM RAZVOJA JAJNIKA**

Steroidni receptori kao što su androgenski receptor (AR), ER $\alpha$  i ER $\beta$  kao i aromataza eksprimirani su u odraslim i embrionalnim reproduktivnim tkivima kod svih skupina kralješnjaka. Isti slučaj je i sa steroidnim faktorom 1 (*Sfl*) koji ima višestruku ulogu tijekom spolnog razvoja, uključujući i regulaciju aromataze. *Sfl* je ključni regulator gena za steroidne enzime-taj jezgreni protein se veže na promotorsku regiju svih steroidnih enzima te djeluje kao transkripcijski aktivator (Lance, 1997). U crvenouhe kornjače *Sfl* je odgovoran za promjenu spola putem temperature – količina mu se povećava nakon promjene temperature koja rezultira ženjkama u temperaturu koja rezultira mužjacima (TRŽ $\rightarrow$ TRM), a smanjuje u obrnutom slučaju (TRM $\rightarrow$ TRŽ). *Sfl* je također odgovoran za promjenu spola putem hormonske manipulacije – količina mu se povećava nakon tretmana sa AI, a smanjuje nakon tretmana estrogenom.

U radu *Steroid signaling and temperature-dependent sex determination—Reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles* (Ramsey i Crews, 2008) je napravljen integrirani pristup o ulozi steroidnih hormona tijekom spolne determinacije i diferencijacije crvenouhe kornjače. Ekspresijski obrasci AR-a, ER $\alpha$  i ER $\beta$  su uzeti kao kritični markeri aktivnosti steroidnih hormona. Ekspresija aromataze ukazuje na moguću embrijsku proizvodnju estrogena, a *Sfl* je marker diferencijacije testisa ali i glavni steroidni regulator. Proučavanje ekspresije tih pet gena tijekom embrionalnog razvoja poslužilo je za bolje shvaćanje interakcije između temperature i steroidnih hormona. Prema modelu iz dotičnog rada (Slika 2) povišena temperatura direktno ili indirektno inducira povećanje ekspresije aromataze u gonadama što u kombinaciji sa povećanjem ekspresije steroidnih receptora dovodi od razvoja jajnika. Nadalje, *Sfl* možda ima glavnu ulogu u determinaciji testisa.

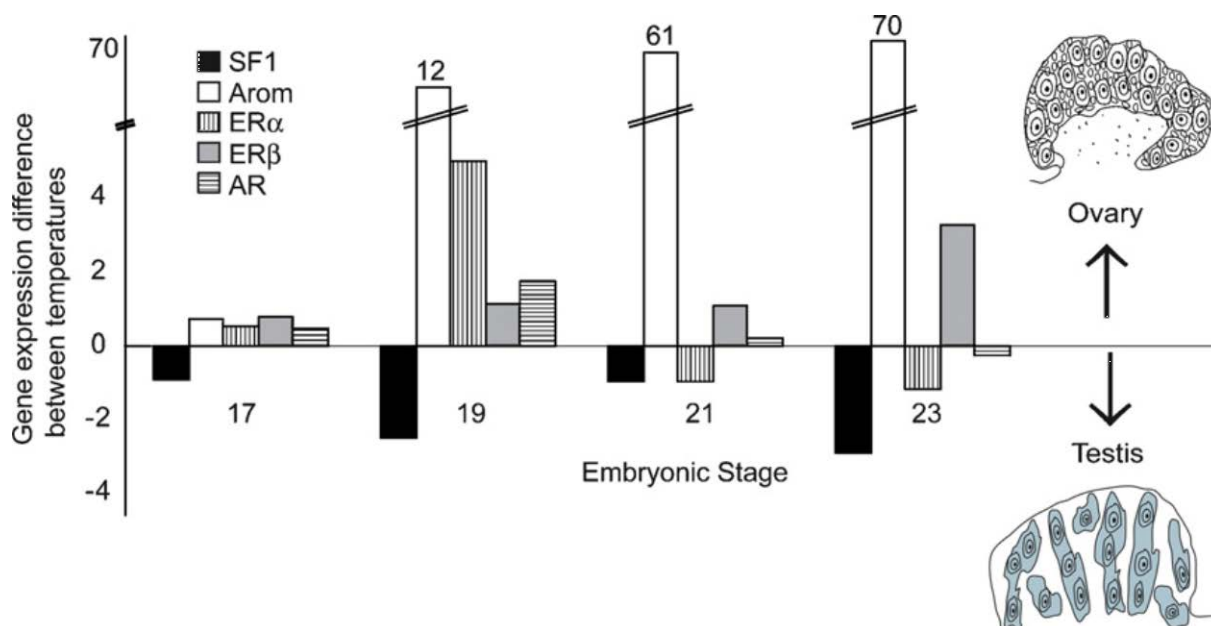
#### **3.1. DOKAZI KOJI POTKREPLJUJU OVAJ MODEL**

Transkripti gena za *Sfl*, aromatazu, ER $\alpha$ , ER $\beta$  i AR su konstantno prisutni za vrijeme razvoja gonada, ali su različito eksprimirani pri različitim temperaturama (Slika 3).



**Slika 2.** Model djelovanja temperature i hormona tijekom temperaturno-ovisne determinacije spola kod crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta*). Temperatura direktno ili indirektno uzrokuje povećanu ekspresiju aromataze na temperaturi koja rezultira ženjkama, koja zajedno sa povećanom ekspresijom ER $\alpha$  i AR te ostalih gena specifičnih za ženski spol (*FoxL2*, *Rspo1*), vodi k razvoju jajnika. Povećanje razine estrogena u kombinaciji sa ekspresijom ER $\alpha$  inhibira ekspresiju gena specifičnih za muški spol. Ekspresija ER $\beta$  povećava se kasnije tijekom razvoja jajnika, povezana je sa njihovom diferencijacijom. Nasuprot tome, na temperaturi koja rezultira mužjacima ekspresija aromataze se ne povećava pa ne dolazi ni do, sa njom povezane, inhibicije estrogenom. Determinacija testisa je povezana sa povećanom ekspresijom gena specifičnih za muški spol kao što su *Sox9*, *Mis*, *Dmrt1* i *Sf1*.

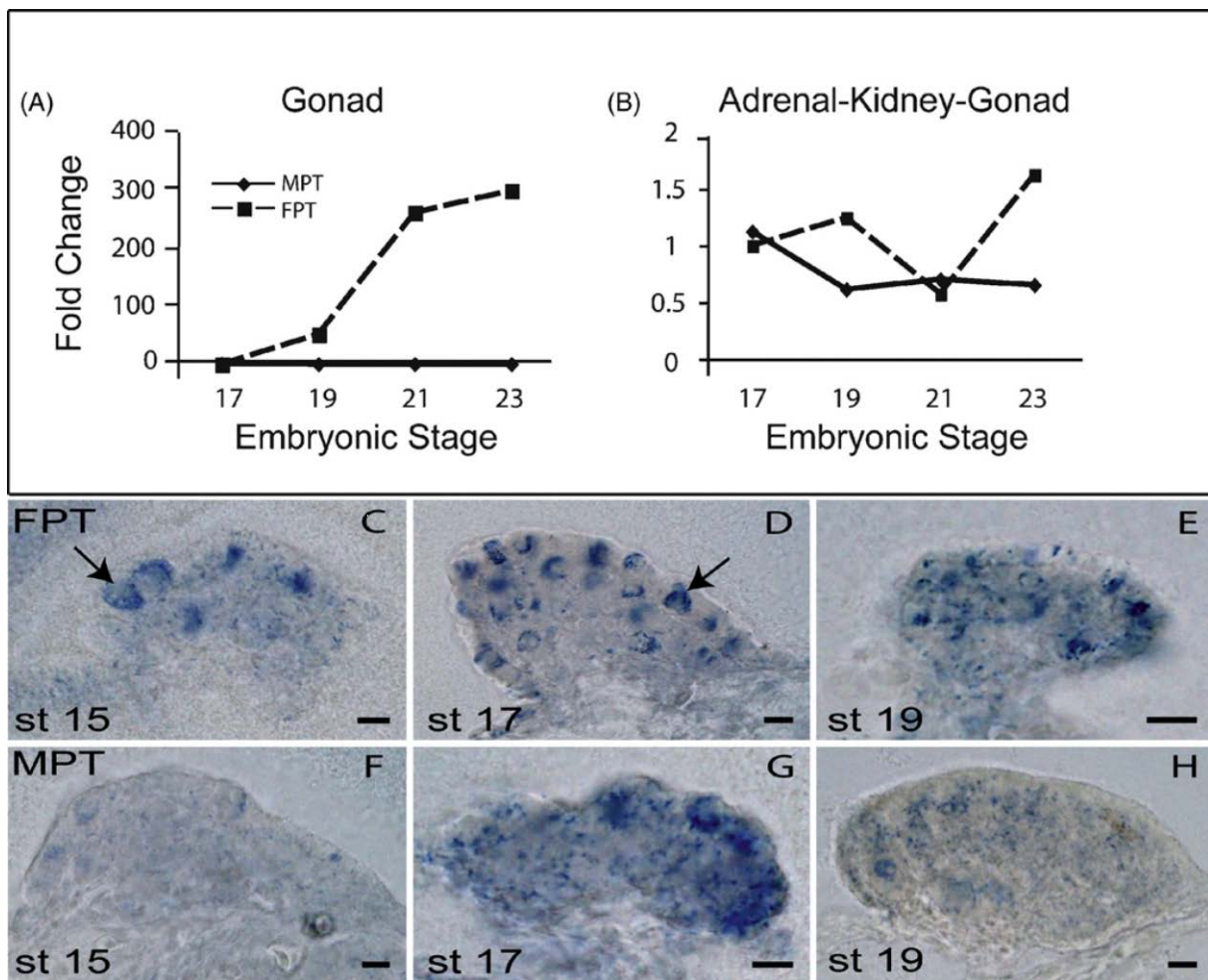
Kvantitativni PCR (qPCR) pokazuje da je aromataza u gonadama jače eksprimirana na temperaturi koja rezultira ženjkama. Za pokus je bolje upotrijebiti izolirane gonade nego cijeli AKG kompleks (Slika 4A i B) - jasnije je vidljivo da se količina aromataze povećava tijekom TOR-a. To navodi na zaključak da učinak temperature postaje presudan vrlo rano tijekom embrionalnog razvoja, prije nego što započne diferencijacija jajnika, te potvrđuje ranu ulogu estrogena u determinaciji jajnika. Još je više upadljiva različita lokalizacija aromataze pri različitim temperaturama rano u TOR-u (Slika 4C-H). Aromataza je pri TRŽ organizirana



**Slika 3.** Ekspresija komponenta steroidne signalne mreže tijekom razvoja gonada kod crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta*) različita je pri različitim temperaturama. Razina ekspresije steroidnog faktora 1 (*Sf1*), aromataze, estrogenskih receptora ( $ER\alpha$  i  $ER\beta$ ) i androgenskog receptora (AR) u gonadama mjerena je qPCR-om u realnom vremenu, a normalne vrijednosti ekspresije za TRM (26°C) su oduzete od vrijednosti dobivenih pri TRŽ (31°C). Za svaki gen kalibracija je izvršena prema ekspresiji gena u Stadiju 17 pri TRŽ, a ekspresijske razine dobivene pri TRM oduzete su od pripadajućih vrijednosti u svakom stadiju. Razine ekspresije više pri TRŽ tako su ispale pozitivne vrijednosti, dok su vrijednosti više pri TRM ispale negativne. Ekspresija aromataze je puno veća od ekspresije ostalih gena pa je y-os prilagođena njoj.

u krugove (vjerojatno okružuje matične stanice) već u vrlo ranom stadiju razvoja (Stadij 15) u kojem su gonade morfološki još uvijek bipotentne. U tom stadiju još su eksprimirani i  $ER\alpha$  i  $ER\beta$ , ali samo pri TRŽ su prisutni u kombinaciji sa specifičnom i organiziranom produkcijom estrogena. Ovi rezultati odražavaju najranije razlike u steroidnom mikrookolišu oko matičnih stanica i folikula u razvoju i vjerojatno prikazuju najraniji korak koji vodi k determinaciji jajnika.

Kako se razvoj gonada nastavlja razine  $ER\alpha$  i AR-a su ekvivalentne na obje temperature sve do samog kraja TOR-a kada im se razina povećava u razvijajućem testisu. Značajno je zamjetiti da se pik u TRŽ javlja zajedno sa velikim povećanjem ekspresije aromataze, dakle korelira s vremenom spolne determinacije jajnika. Povećana ekspresija AR-a je u skladu s ostalim istraživanjima što ukazuje da AR ima ulogu u diferencijaciji jajnika kod vrsta kod kojih aromataza ima ključnu ulogu u razvoju jajnika. U crvenouhe kornjače ekspresija AR-a se mijenja zajedno s inhibicijom aromataze, prije nego se promjene



**Slika 4** .Ekspresija aromataze tijekom TOR-a kod crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta*). (A,B) Ekspresijski obrasci aromataze uspoređeni su između tkiva iz izolirane gonade i AKG kompleksa. (C-H) Ekspresijski obrasci aromataze također su mjereni in situ hibridizacijom. Slike C, D i E prikazuju ekspresiju aromataze u stadijima 15, 17 i 21 pri TRŽ, dok je ekspresija u istim stadijima pri TRM vidljiva na slikama F, G i H. FPT = female-producing temperature (31 °C)=TRŽ, MPT=male-producing temperature (26 °C)=TRM

razine ER $\alpha$  i ER $\beta$  što znači da je ekspresija AR-a osjetljiva na promjene u prisutnosti estrogena. Kod nasrtljivih kornjača ekspresija AR-a je također ovisna o temperaturi, razina mu se značajno poveća četiri dana nakon promjene temperature iz TRM u TRŽ.

ER $\beta$  pokazuje jedinstveni obrazac ekspresije, osobito ako se uspoređi sa ER $\alpha$ . Razina mu je nepromjenjena pri objema temperaturama kroz cijelo TOR, povećava se samo tijekom kasnije diferencijacije jajnika, u vrijeme proliferacije stanica kore jajnika. Različiti obrasci ekspresije ER $\alpha$  i ER $\beta$  sugeriraju da imaju i različite uloge u razvoju jajnika - ER $\alpha$  sudjeluje u

samom početku determinacije jajnika (regresiji sržnog dijela), a ER $\beta$  ima ulogu u raspodijeli estrogena prilikom kortikalne proliferacije u kasnijoj fazi razvoja jajnika.

Suprotno od eksprimiranosti aromataze, ER $\alpha$ , ER $\beta$  i AR-a, *Sfl* je tijekom TOR-a jače eksprimiran pri TRM. Njegova količina i raspored ne čine se povezani s aromatazom, ali to ne isključuje mogućnost zajedničke regulacije tih dvaju gena.

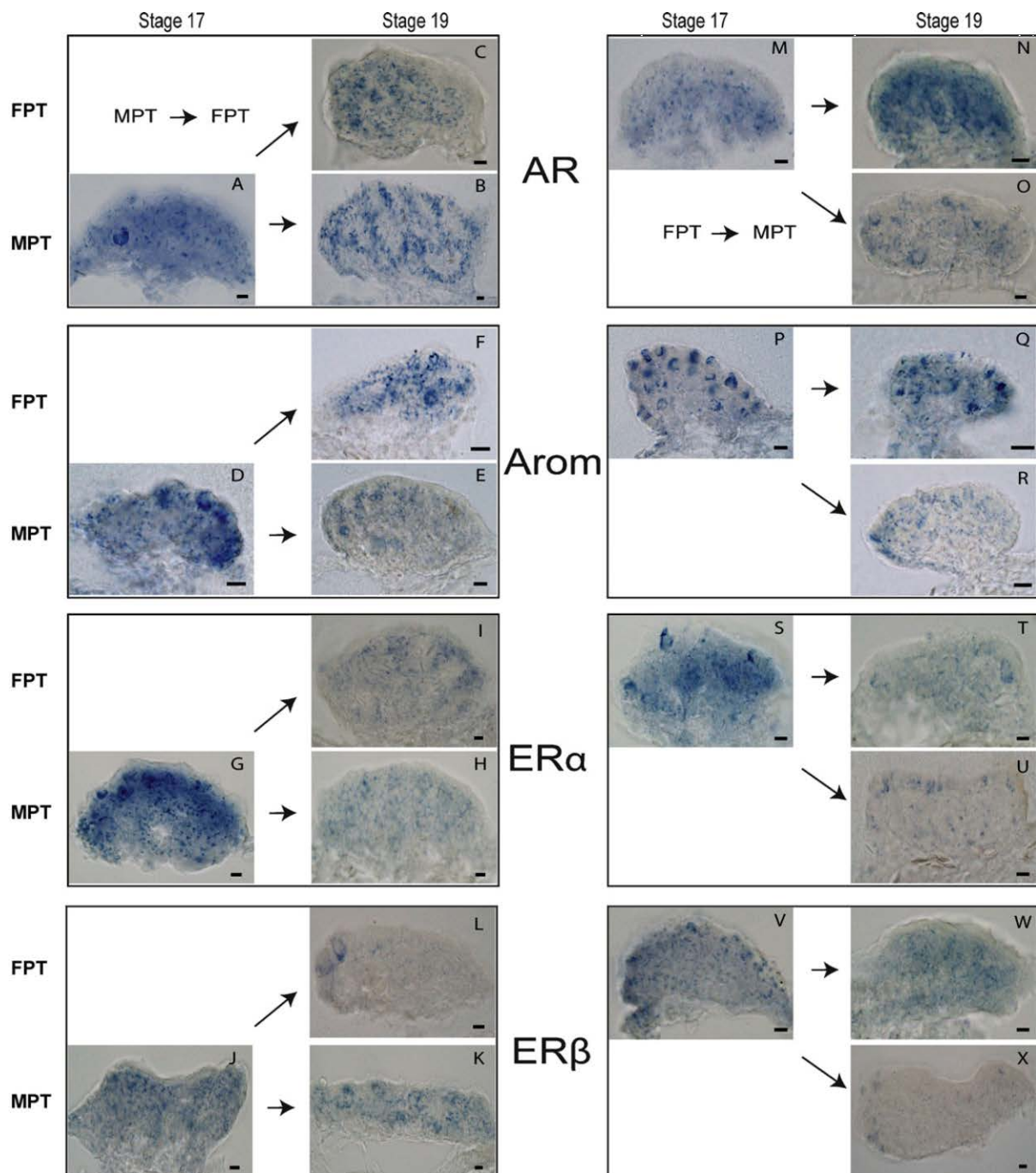
## **4. PROMJENA SPOLA POD UTJECAJEM TEMPERATURE I ESTROGENA**

Jasno je da interakcija inkubacijske temperature, steroidnih hormona i gena određuje spolnu determinaciju gonada kod crvenouhe kornjače. Utjecaji temperature i hormona mogu se razlučiti jedni od drugih praćenjem promjena u ekspresiji gena prilikom promjena temperaturnih vrijednosti ili prevladavanjem utjecaja temperature velikim koncentracijama hormona. Manipuliranje temperaturom ili nadvladavanje njenog utjecaja u slučaju promjene spola npr. iz muškog u ženski uključuje zaustavljanje razvoja u smjeru testisa ali i aktivaciju razvoja jajnika. Promjena steroidnih signalnih komponenti mora pridonijeti obima procesima.

### **4. 1. UTJECAJ TEMPERATURE NA STEROIDNE HORMONE**

Nakon promjene temperature iz TRM u TRŽ (Slika 5A-K), AR, aromataza i ER $\alpha$  pokazuju organiziranu ekspresiju oko degenerirajućih spolnih pruga u srži (Slika 5C,F,I), dok je ekspresijski obrazac *Sfl* mnogo difuzniji od onog viđenog na nepromjenjenom kontrolnom primjerku (nije prikazano na slici). Ekspresija ER $\beta$  se nakon promjene smanjuje (Slika 5L), što podupire ideju da ER $\beta$  ima ulogu tek kasnije prilikom diferencijacije jajnika. Aromataza i ER $\alpha$  možda posreduju u djelovanju estrogena u sržnom dijelu jer im se razina povećava pri TRŽ, no stvarna uloga AR-a u razvoju jajnika je još uvijek nejasna.

Obrnuta promjena temperature iz TRŽ u TRM rezultira razvojem testisa (Slika 5M-X). Ekspresija aromataze, ER $\alpha$  i ER $\beta$  se reducira (Slika 5R, U, X). Pojava ekspresije AR-a oko sjemenih kanalića tipična za razvoj testisa izostaje (Slika 5B, O) nagovještajući da AR, poput ER $\beta$  u jajniku, ima veću ulogu u kasnijoj diferencijaciji testisa nego u njihovoj determinaciji. Suprotno njemu, ekspresija *Sfl* naglo se mijenja nakon promjene temperature što upućuje na zaključak da *Sfl* ima primarnu ulogu u razvoju testisa.

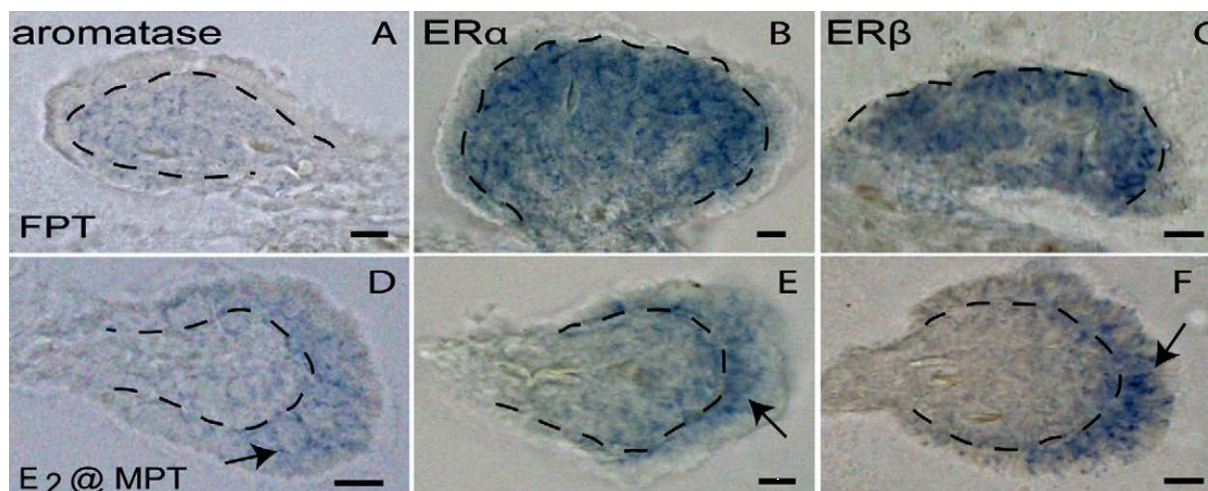


**Slika 5.** Ekspresija sastavnica steroidnog signalnog puta uz promjenu temperature u crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta*). Lijevi stupac prikazuje uzorak gena pri promjeni temperature iz TRM u TRŽ za AR (A, B, C), aromatazu (D, E, F), ER $\alpha$  (G, H, I) i ER $\beta$  (J, K, L). Dessni stupac prikazuje isto za suprotan pomak temperature, dakle iz TRŽ u TRM za AR (M, N, O), aromatazu (P, Q, R), ER $\alpha$  (S, T, U) i ER $\beta$  (V, W, X). Temperatura je izmjenjena u Stadiju 17, a promjene su zabilježene u Stadiju 19. Vodoravne strelice označavaju nastavak inkubacije pri jednakoj temperaturi, a kose ukazuju na promjenu temperature.

## 4. 2. UČINCI UTJECAJA EGZOGENO DODANOG ESTROGENA

Egzogeno dodani estrogen ima drugačiji utjecaj na estrogensku signalnu mrežu od promjene temperature. Primjena E<sub>2</sub> uzrokuje manju ekspresiju ER $\alpha$  i ER $\beta$  u sržnom dijelu, a ne utječe na ekspresiju aromataze. Posebno se smanjuje razina ekspresije ER $\alpha$ , smanjenje je jasno uočljivo već u idućem razvojnom stadiju nakon dodatka E<sub>2</sub>, što upućuje na spregu između razine estrogena i ekspresije ER $\alpha$ .

U jajnicima potpuno diferenciranim pri TRŽ aromataza, ER $\alpha$  i ER $\beta$  su lokalizirani u sržnom dijelu jajnika (Slika 6A, B, C). Suprotno tome, u jajnicima nastalima pod utjecajem egzogenog E<sub>2</sub> inkubiranim na TRM sva tri gena lokalizirana su u kortikalnom dijelu jajnika. (Slika 6D, E, F). Ovakva promjena položaja nije zamjećena kod *Sfl* ni kod AR. Izmjenjeni ekspresijski obrasci u estrogenskoj signalnoj mreži vode k intrigantnoj hipotezi da je za razvoj jajnika na TRM pod utjecajem E<sub>2</sub> potrebna sinteza estrogena u kortikalnoj regiji, te da pod normalnim uvjetima pri TRM u kojima su koncentracije estrogena niske, temperatura zapravo djeluje antagonistički prema razvoju kortikalne regije.



**Slika 6.** Diferencijacija jajnika pri TRŽ i diferencijacija jajnika pri TRM pod utjecajem egzogenog E<sub>2</sub> u crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta*). TRŽ i estrogen nisu jednaki signali za komponente estrogenskog signalnog puta tijekom diferencijacije jajnika (Stadij 23). Aromataza (A, D), ER $\alpha$  (B, E) i ER $\beta$  (C, F) prikazani su u jajnicima nastalima na konstantnoj TRŽ i na jajnicima inkubiranim na TRM ali uz dodatak estradiola (E<sub>2</sub>) na jaja u Stadiju 17. Isprekidane crte označavaju bazalnu membranu koja razdvaja kortikalnu regiju od srži. Strelice na slikama D, E, F upućuju na pomak prema kortikalnoj regiji.

## **5. GENI ODGOVORNI ZA DETERMINACIJU SPOLA MORSKIH KORNJAČA**

U placentalnih sisavaca spol je određen prisustvom ili odsustvom gena *SRY* na Y kromosomu. U prisustvu *SRY*-a razvijaju se testisi, u odsustvu jajnici. Gen *SRY* pronađen je i kod tobočara, međutim nije prisutan kod sisavaca koji se razmnožavaju jajima kao ni kod ptica i gmazova. Nastojanja da se kod njih pronađe gen *SRY* dovela su do otkrića cijele obitelji gena nazvanih *SOX* geni. Obitelj uključuje dvadesetak gena eksprimiranih u različitim tkivima tijekom embrionalnog razvitka. Gen *SOX9* eksprimiran je u tkivu gonade embrija kornjača, kao i u tkivima gonada svih ostalih amniota (Lance, 1997). Kod vrste *L. olivacea* TOR se javlja između stadija 21 i 26. Ekspresija gena *SOX9* kod ove vrste je regulirana temperaturom: u stadijima 21-25 *SOX9* je eksprimiran i pri TRM i pri TRŽ, dok je pri TRŽ eksprimiranost od stadija 26 nadalje sve slabija. Dakle, *SOX9* nije primarno reguliran temperaturom, razina mu se mijenja tek nakon TOR-a. Ovom genu uzvodno prethodi neki drugi gen.

Gen *DAX1*, koji je također uključen u razvoj gonada, je član superobitelji jezgrinih hormonskih receptora. *DAX1* je tijekom TOR-a kod *L. olivacea* eksprimiran pri TRM i pri TRŽ. Razlike u eksprimiranosti javljaju se tek nakon stadija 27, što upućuje na zaključak da *DAX1* nije uključen u determinaciju spola kod ove vrste.

*Dmrt1* je gen koji kodira za transkripcijski faktor koji je različito eksprimiran kod mužjaka i ženki svih vrsta kralješnjaka. Kao i kod *T. scripta* razina ekspresije ovog gena kod *L. olivacea* je niža pri TRŽ i za vrijeme i nakon TOR-a. Viša razina ekspresije *Dmrt1* pri TRM tijekom TOR-a podupire ideju da upravo ovaj gen prethodi povećanoj ekspresiji gena *SOX9* pri TRM nakon TOR-a. Nadalje, korelacija između determinacije jajnika, smanjene ekspresije gena *SOX9* i niske razine eksprimiranosti gena *Dmrt1* sugerira da su ova dva gena aktivno regulirana pri TRŽ kako bi bio omogućen razvoj jajnika (Maldonado i sur., 2002).

## **6. KAKO TEMPERATURNO-OVISNA DETERMINACIJA SPOLA FUNKCIONIRA U PRIRODI?**

Temperatura okoliša varira na dnevnoj i sezonskoj razini. Mladunci dolaze na svijet u različitim razdobljima unutar sezone parenja na različitim mjestima tako da temperature gnijezda variraju kao što se i odnos spolova razlikuje. Također, jaja u gnijezdu su gusto



pakirana tako da je značajan faktor koji određuje spol zasigurno i metabolička toplina koja je sve veća kako se TOR bliži kraju. Zato ne iznenađuje što su variranja u omjeru spolova u pojedinim sezonama zaista i zabilježena. Temperature na kojoj se inkubiraju jaja ovisi o najmanje pet čimbenika: (1) vremenskim prilikama tijekom sezone gniježđenja (kiša snižava temperaturu gnijezda), (2) visini plime, (3) vegetacijskom pokrovu plaže, (4) boji pijeska te (5) samom ponašanju kornjača tijekom gniježđenja (dubini polaganja jaja) (Houghton i sur., 2007). Svi ovi čimbenici su sasvim nasumično promjenjivi – za same kornjače još nije dokazano da svjesno odabiru toplije ili hladnije mjesto za gniježđenje (Godley i sur., 2000). Omjer spolova kod genetičke determinacije spola određen je unaprijed – 50:50, situacija je kod TDS-a nešto drugačija jer je riječ o aktivnom, a ne pasivnom određivanju spola. Dominacija jednog spola nad drugim, u ovom slučaju riječ je o ženskom spolu, smatra se evolucijskom prilagodbom. Naime, mladuncima muškog spola potrebna je duže inkubacija jer se inkubiraju na nižoj temperaturi. To znači da su duže izloženi predatorima i saprofitskim gljivama. Nadalje, tijekom hladnijih godina izliježe se više mužjaka, no sezona gniježđenja je kraća što zajedno rezultira manjim brojem potomstva. U toplijim godinama izliježe se više ženki koje ionako imaju veći garanciju opstanka (Davenport, 1997).

## **7. ZAKLJUČAK**

Povišena temperatura direktno ili indirektno uzrokuje povećanje proizvodnje estrogena u nedefiniranim gonadama što ih usmjerava k razvoju jajnika, dok istodobno koči ekspresiju gena specifičnih za muški spol. Kako se razvoj nastavlja u smjeru jajnika, povišena razina estrogena posreduje u procesima specifičnim za razvoj jajnika-regresija srži te proliferacija kortikalne regije. Pri TRM lokalizirana proizvodnja estrogena u gonadama je inhibirana, a u odsutnosti aromataze aktivni su geni specifični za testise kao što su *Dmrt1*, *Sox9* i *Mis* što naposljetku dovodi do determinacije i razvoja testisa.

## 8. LITERATURA

Davenport (1997): Temperature and the life-history strategies of sea turtles. *J.therm. Biol.* Vol. 22. No 6., str. 479-488

Godley, Broderick, Downie, Glen, Houghton, Kirkwood, Reece, Hays (2001): Thermal conditions in nests of loggerhead turtles: further evidence suggesting female skewed sex ratios of hatchling production in the Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 263, str. 45–63

Houghton, Myers, Lloyd, King, Isaacs, Hays (2007): Protracted rainfall decreases temperature within leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) clutches in Grenada, West Indies: Ecological implications for a species displaying temperature dependent sex determination. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 345, str. 71–77

Lance (1997): Sex Determination in Reptiles: An Update. *AMER. ZOOL.*, 37:504-513

Maldonado, Piedra, Mendoza, Valencia, Martinez, Larios (2002): Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology* 129, str. 20–26

Pieau, Dorizzi, Richard-Mercier (1999): Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 55, str. 887–900

Ramsey, Crews (2008): Steroid signaling and temperature-dependent sex determination—Reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, str. 283–292

## 9. POPIS KRATICA

AR = androgenski receptor

DHT = dihidroksitestosteron

E<sub>2</sub> = 17β-estradiol

IA = inhibitor aromataze

NBG kompleks = nadbubrežno-bubrežno-gonadni kompleks

PT = prijelazna temperatura

TDS = temperaturno-ovisna determinacija spola

TOR = temperaturno-osjetljivo razdoblje

TRM = temperatura koja rezultira mužjacima

TRŽ = temperatura koja rezultira ženkama

## **10. SAŽETAK**

Među kralješnjacima postoji mnoštvo različitih čimbenika koji mogu biti presudni za određivanje spola, od genotipa do okolišnih utjecaja. Gmazovi su kao skupina posebno zanimljivi jer su u njih zabilježeni primjeri za sve oblike determinacije spola, a u ovom prikazu naglasak je na temperaturno-ovisnoj determinaciji spola (TDS) koja se javlja kod svih vrsta morskih kornjača.

Kritičan korak u determinaciji jajnika je različita ekspresija aromataze pri različitim temperaturama. Lokalizirana produkcija estrogena u gonadama usmjerava njihov razvoj prema jajnicima, dok istodobno inhibira ekspresiju gena specifičnih za muški spol. Na temperaturi koja rezultira mužjacima izostaje regulirajuća uloga aromataze te se razvijaju testisi.

## **11. SUMMARY**

A variety of sex-determining systems exist among vertebrates, ranging from primarily genotypic to primarily environmental. Reptiles as a group are particularly interesting in that examples of the entire range are evident. In this seminary focus is on temperature-dependent sex determination (TSD) which are found in all sea turtles.

Temperature-based differences in aromatase expression is a critical step in ovarian determination. Localized estrogen production facilitates ovarian development while inhibiting male-specific gene expression. At male-producing temperatures aromatase is not upregulated, thereby allowing testis development.