

**AZ ÖSZTROGÉN RECEPTOR ALTÍPUSOK JELENLÉTE
ÉS SZEREPE A TERHES PATKÁNY UTERUSBAN;
A SZTEREOIZOMÉRIA BEFOLYÁSA A
LIGAND-RECEPTOR KÖLCÖNHATÁSOKRA**

Ph.D. értekezés tézisei

Minorics Renáta

Témavezető:
Prof. Falkay György

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2005.

BEVEZETÉS

A szexuáliszteroidok az emberi szervezet reprodukciós folyamatait szabályozó hormonok. Szerkezeti felépítésük és biológiai hatásaik alapján három csoportot különböztetünk meg: androgéneket, ösztrogéneket és gesztagéneket. Az ösztrogének kiemelkednek a szteroidok közül, mivel számos különböző szövet, illetve biológiai célszerv működését képesek befolyásolni. Továbbá a 17β -ösztradiol (E_2) és származékai nagy jelentőséggel bírnak az emlőcarcinoma kezelésében, a menopauza utáni tünetek enyhítésében, a csontritkulás folyamatának lassításában, valamint egyéb reprodukzív szervekkel kapcsolatos rendellenességek gyógyításában.

Az ösztrogén hatások az ösztrogénfüggő szignáltranszdukciós út aktiválásán keresztül jönnek létre. Több mint 40 éve Jensen mutatta ki patkány uterusból az E_2 -t nagy affinitással, de kis kapacitással kötő fehérje molekulát, az ösztrogén receptort (ER). 1996-ig az egyetlen ismert fehérje volt, melyen keresztül az ösztrogénfüggő gének transzkripcióját befolyásolni lehetett. Ekkor Kuiper és munkatársai egy második, az eredetitől eltérő ER-t klónoztak patkány prosztatából. Az új receptort ER β -val jelölték, és az elsőként leírt ER az ER α nevet kapta.

Az ösztrogének folyamatosan növekvő terápiás felhasználásának köszönhetően az ösztrogén hatások feltérképezése az orvostudomány egyik legnagyobb érdeklődésre számot tartó kutatási területévé vált. Az ER β klónozása után ez a terület még jobban a figyelem középpontjába került. Napjainkban az ösztrogének szervezetben betöltött szerepét két különböző szempont alapján vizsgálják. Egyrészt folyamatban van az ER altípusok szöveti eloszlásának és a feltételezett funkcióinak meghatározása. Másrészt új ösztrogén származékok előállításával ER α vagy ER β szelektív módon kívánják befolyásolni a jelátviteli mechanizmust, és ezáltal további ismereteket gyűjteni a ligand-receptor kölcsönhatás természetéről.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a fenti kettős megközelítésnek megfelelően a következő kísérleti célokat határoztuk meg:

1. Az ösztrogén receptor altípusok kifejeződésének és szerepének feltárása terhes patkány uterusban.
 - a. Az ösztrogén és progeszteron kötőhelyek maximális számának meghatározása korai terhes patkány uterusban radioligand telítési vizsgálattal.
 - b. Az ER α és β mRNS expresszió feltérképezése nem terhes és 4-8, 10, 15, 18, 20 és 22 napos terhes patkány uterusban, reverz transzkripció-s-polimeráz lánc reakció (RT-PCR) alkalmazásával.
 - c. Az ER α és ER β funkcionális vizsgálata korai terhes patkány uterusban *in vivo* szelektív ER α agonista, propil-pirazol-triol (PPT) kezelés során.
2. Újonnan szintetizált ösztron és ösztradiol sztereoizomerek farmakológiai jellemzése.
 - a. Tizenhat, originális ösztron és ösztradiol származék ER kötődési képességének és szelektivitásának megállapítása radioligand kötési vizsgálatok segítségével.
 - b. A tesztelt molekulák *in vivo* ösztrogén aktivitásának meghatározása uterustömeg-növekedés vizsgálattal.
 - c. A vizsgált sztereoizomerek farmakológiai jellemzőiből levonható szerkezet-hatás összefüggések megállapítása.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az ösztrogén receptor altípusok feltérképezése terhes patkány uterusban

Telítési vizsgálat

Az ösztrogén és progeszteron kötőhelyek számának meghatározása radioligand telítési vizsgálattal történt 4-8 napos terhes patkány uterus citoszolból a megfelelő triciált ligandok ($[^3\text{H}]\text{E}_2$ és $[^3\text{H}]\text{ORG 2058}$) felhasználásával. Az uterus frakció preparálását az irodalomban közölt módszer szerint végeztük. 10^{-5} M E_2 -t és ORG 2058-at használtunk a nem-specifikus kötés meghatározásakor. A terhes patkány uterus ösztrogén és progeszteron kötőhelyeinek maximális számát (B_{max}) a Rosenthal-függvény segítségével számítottuk.

RT-PCR vizsgálat

Az ER altípusok mRNS kifejeződésének időbeli változását a terhesség alatt RT-PCR vizsgálattal követtük nyomon. A nem terhes és 4-8, 10, 15, 18, 20 és 22 napos terhes patkány uterus szövetmintákból a total RNS kivonását fenol-kloroform-izoamil-alkohol felhasználásával végeztük. 0,5 μg RNS-t denaturáltuk és M-MLV reverz transzkriptáz segítségével cDNS-t állítottunk elő. A felsokszorozás során cDNS-t, Taq polimerázt és $\text{ER}\alpha$ és $\text{ER}\beta$ primereket használtunk. Az RT-PCR termékeket 2%-os agaróz gélen elektroforézissel választottuk el, majd UV fényben láthatóvá tettük. A mintákat fél-quantitatív denzitometriás méréssel értékeltük.

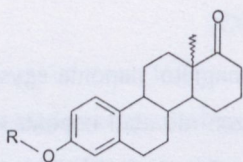
In vivo PPT kezelés

A kísérleti állatokat a terhesség 1., 2., 3. vagy 4. napjától naponta egyszer s.c. 250 µg PPT-vel kezeltük 3 napig. A kontroll csoport ezen idő alatt naponta egyszer 0,1 ml olíva olajat kapott s.c. Az uterus szövetet az utolsó dózis beadása után 24 órával eltávolítottuk, és regisztráltuk az implantációs helyek számát. Az ER α és ER β mRNS expressziót a fent leírt módon határoztuk meg.

Újonnan szintetizált ösztron és ösztradiol sztereoizomerek farmakológiai jellemzése

In vitro radioligand kötési vizsgálat

Molekuláink (1. ábra) azon képességét vizsgáltuk, hogy milyen mértékben képesek leszorítani az adott szteroid receptorról (ER, progeszteron receptor (PR) és androgén receptor (AR)) a specifikusan kötött radioligandot ($[^3\text{H}]\text{E}_2$, $[^3\text{H}]\text{ORG2058}$ és $[^3\text{H}]\text{dihidrotesztozsteron}$). A citoszol preparátumokat patkány és nyúl uterus, illetve patkány prosztata felhasználásával, az irodalomban közölt adatok alapján készítettük. Referencia molekuláink a következők voltak: E_2 , ORG2058 és dihidrotesztozsteron. Az inhibíciós konstans értékeit (K_i) a Prism 2.01 szoftver segítségével számítottuk. A molekulák ER kötődési képességét a relatív kötődési hányados (RBA) értékkel jellemeztük, melyet a következő egyenlet alapján számítottunk: $\text{RBA} = (K_{i,\text{E}_2} / K_{i,x}) \times 100$. Ahhoz, hogy megállapíthassuk, milyen mértékben tesznek különbséget a vegyületek az ER és a PR vagy az AR között, meghatároztuk a vegyületek szelektivitási hányadosát: $\text{SR} = K_{i,x} (\text{AR v. PR}) / K_{i,x} (\text{ER})$.

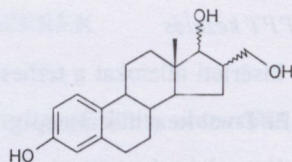


1 R = CH₃, C13β

2 R = H, C13β

3 R = CH₃, C13α

4 R = H, C13α

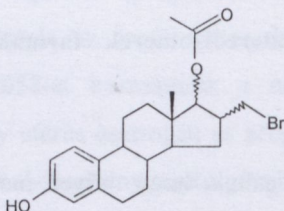


5 C16β, C17β

6 C16α, C17β

7 C16β, C17α

8 C16α, C17α

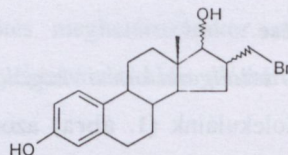


9 C16β, C17β

10 C16α, C17β

11 C16β, C17α

12 C16α, C17α



13 C16β, C17β

14 C16α, C17β

15 C16β, C17α

16 C16α, C17α

1. ábra Az újonnan szintetizált ösztрон és ösztradiol sztereoizomerek kémiai szerkezete.

In vivo uterustömeg mérési vizsgálat

A vizsgált vegyületek *in vivo* ösztrogén aktivitását uterustömeg-növekedési vizsgálattal határoztuk meg ovariectomizált patkányokon. Három héttel a műtét után az állatok 7 napig, naponta egyszer a tesztvegyületek olíva olajos szuszpenzióját kapták s.c. a következő dózisokban: 10, 30 és 50 µg/0,1 ml. A negatív kontroll csoportban 0,1 ml olíva olajat, a pozitív kontroll csoportban 10 µg/0,1 ml E₂-t injektáltunk a kísérleti állatokba. A 8. napon az uterusok tömegét meghatároztuk, majd 24 órás 95-100 °C-os szárítás után ismét lemértük tömegüket.

A nedves és száraz uterus tömegeket 100 g élő állatsúlyra normalizáltuk. A kapott adatokat egyutas ANOVA módszerrel, Neuman-Keuls poszttesztel hasonlítottuk össze.

EREDMÉNYEK

Ösztrogén receptor altípusok a terhes patkány uterusban

Az ösztrogén és progeszteron receptorok mennyisége a korai terhes patkány uterusban

A korai terhes patkány uteruson elvégzett radioligand telítési vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az ösztrogén kötőhelyek legnagyobb mennyiségben ($B_{\max} = 637,40 \pm 76,10$ fmol/mg) a terhesség 5. napján voltak jelen a patkány uterusban. A további vizsgálati napokon kisebb $B_{\max}$ értékeket kaptunk: 4. nap: $85,39 \pm 34,30$ fmol/mg, 6. nap: $B_{\max} = 302,05 \pm 2,95$ fmol/mg, 7. nap: $162,58 \pm 63,07$ fmol/mg és 8. nap: $565,13 \pm 114,68$ fmol/mg. A PR denzitás nem változott szignifikánsan a terhesség 7. napjáig a 4. naphoz viszonyítva (átlag: $B_{\max} = 335,30 \pm 45,62$ fmol/mg), azonban a 8. napon szignifikáns növekedést tapasztaltunk ($B_{\max} = 583,30 \pm 98,70$ fmol/mg). Az ER és PR denzitás hányadosa (ER/PR) a terhesség 5. napján a további vizsgálati napokhoz képest szignifikánsan kiemelkedő értéket mutatott ($ER/PR = 2,51 \pm 0,36$; $p < 0,001$), jelezve az ER domináns szerepét az adott napon lejátszódó folyamatokban.

Az ösztrogén receptor α és β mRNS expresszió változása a terhesség alatt patkány uterusban

Az ER altípusok mRNS expresszió változását a terhesség teljes ideje alatt

vizsgáltuk. A terhesség első felét tekintve az ER α mRNS expresszió változása hasonlóságot mutatott az ER fehérje mennyiségének változásával: az ER α mRNS kifejeződése is a terhesség 5. napján volt a legerőteljesebb, a további vizsgálati napokon szignifikánsan kisebb értékeket kaptunk. A terhesség 8. napján az ER α mRNS expresszió 27%-kal gyengébb volt az 5. naphoz viszonyítva, ez volt az általunk detektált legkisebb ER α mRNS érték. A terhesség 10-22. napja között az ER α mRNS expresszió fokozatosan emelkedett, míg a terminus napján érte el a maximális értéket.

Az ER β mRNS jelenlétét nem tudtuk detektálni a vizsgálati idő teljes tartama alatt, csupán a terhesség 7. napján volt először kimutatható, majd a 8. napon 11%-kal erősebb volt az ER β mRNS expresszió, mint az előző napon. A későbbiekben ER β mRNS aktivitást már csak a terhesség 10. és 15. napján figyeltünk meg. Az expresszió mértéke mindkét napon szignifikánsan kisebb volt, mint a terhesség 8. napján.

A PPT kezelés hatása az ösztrogén receptor α és β mRNS kifejeződésére

Az ER α mRNS expressziója jelentős változáson ment keresztül a PPT-kezelés hatására: minden vizsgálati napon lecsökkent az ER α mRNS kifejeződésének mértéke. Továbbá a terhesség 5. napjára jellemző emelkedett ER α mRNS expressziót sem lehetett kimutatni. Ezzel szemben fokozott ER β mRNS kifejeződést figyelhettünk meg: az ER β mRNS szintézise már a terhesség 4. napjától aktívnak bizonyult, és fokozatosan erősödött a terhesség 7. napjáig. Morfológiai változásokat is megfigyelhettünk az uterusokon. Az implantációs helyek száma szignifikánsan lecsökkent a PPT kezelés hatására ($15,5 \pm 1,9$ a kezelés előtt $\rightarrow 4,8 \pm 0,8$ a PPT-kezelés után).

Újonnan szintetizált ösztron és ösztradiol sztereoizomerek farmakológiai tulajdonságai

A vizsgált vegyületek szteroid receptor kötődési jellemzői

Minden vizsgált molekula koncentrációfüggő módon leszorította a specifikusan kötött [^3H]E₂-t a nyúl és patkány ER-ról, bár a vegyületek affinitási értékei tág határok között változtak. A K_i értékekből számított RBA és SR adatokat az **I.** és **II.** táblázat tartalmazza. Minél nagyobb az SR értéke, annál jobb az adott vizsgálati anyag szelektivitása az ER-ra.

I. táblázat Az újonnan szintetizált D-homoösztroon (**1-4**) és 16-hidroximetil-ösztradiol (**5-8**) sztereoizomerek ER-ra vonatkoztatott RBA, valamint SR értékei.
n.m.: nem történt meghatározás

vegyületek	RBA [%]	SR	
		PR	AR
E₂	100	1287	259,08
1	0,04	0,38	n. m.
2	0,21	0,67	n. m.
3	0,11	22,67	n. m.
4	0,71	43,72	n. m.
5	1,45	41,28	8,03
6	0,55	nem számítható	3,88
7	0,14	nem számítható	nem számítható
8	0,56	29,26	nem számítható

II. táblázat Az újonnan szintetizált 16-bromometil-ösztadiol-acetát (9-12) és 16-bromometil-ösztadiol (13-16) sztereoizomerek ER-ra vonatkoztatott RBA, valamint SR értékei.

vegyületek	RBA [%]	SR	
		PR	AR
E₂	100	207,27*	215,58*
9	0,06	3,66	nem számítható
10	0,42	11,58	0,86
11	0,04	2,49	0,56
12	0,05	3,20	0,06
13	0,50	18,12	6,71
14	90,59	205,96	1185,49
15	0,29	6,27	4,60
16	0,34	10,18	0,31

* meghatározta: Martel és munkatársai, 1998

Újonnan szintetizált ösztrol és ösztadiol sztereoizomerek hatása ovariectomizált patkány uteruson in vivo

Az *in vivo* uterustömeg-növekedési vizsgálat kivitelezéséhez minden vegyületcsoportból a legjobb ER affinitást mutató molekulát és epimer párját választottuk ki: **2, 4, 5, 6, 13** és **14**. Pozitív kontrollként 10 µg E₂ alkalmaztunk, mely maximális uterustömeg-növekedést váltott ki a vizsgálati körülményeink között.

Három vegyület (**5, 6** és **14**) mutatott ösztrogén aktivitást. A legjobb ER kötődési képességgel rendelkező **14** vegyület dózisfüggő tömegnövekedést váltott ki mind a nedves, mind a száraz uterusok tömegét vizsgálva. Az ER-hoz kisebb affinitással kötődő **5** és **6** molekula is szignifikáns uterustömeg-növekedést hozott létre, igaz csak a legkisebb alkalmazott dózisban (10 µg). A száraz uterusok adatainak kiértékelése után is hasonló eredményt kaptunk.

A további két vegyület (2 és 4) által kiváltott *in vivo* hatás nem tért el szignifikánsan a negatív kontroll (oliva olaj) csoport eredményeitől. Ez az eredmény a száraz uterus tömegek statisztikai értékelése után sem változott.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. ER altípusok a terhes patkány uterusban

Az elmúlt években, az endokrinológiában az egyik legintenzívebben kutatott tudományterületté vált az ER altípusok különböző szövetekben való eloszlásának és fiziológiai szerepének vizsgálata. Korábban még nem vizsgálták az ER α és β mRNS expresszió változását terhes patkány uterusban, valamint az altípusok terhesség során játszott szerepét sem. Ez irányította figyelmünket ezen receptor altípusok vizsgálatára a terhes patkány uterusban.

Az ER α és β mRNS is jelen van a patkány uterusban a terhesség időtartama alatt. Az ER α dominanciája, a nem terhes uterusral összehasonlítva, továbbra is megfigyelhető. Az ER β mRNS szintézise csak a terhesség középső harmadában (7-15 nap) volt kimutatható.

A terhesség fennmaradásának egyik kritikus mozzanata a blastocita beágyazódása az endometriumba. Patkányokban ez az esemény a terhesség 5. napján következik be, amelyhez számos endogén szabályozó faktor, mint a szteroid hormonok, a citokinek és a növekedési faktorok együtműködése szükséges. Mivel a terhesség 5. napján az ER denzitás és az ER α mRNS expresszió szignifikáns növekedését tapasztaltuk, feltételeztük, hogy az implantáció kialakulását elindító endogén E₂ jelet az ER α szignáltranszdukciós

út mediálja. A funkcionális vizsgálatok során bizonyítást nyert, hogy az ER α részét képezi a receptív endometrium kialakulását szabályozó endogén mechanizmusnak.

A terhesség 7-15. napjáig terjedő periódus kezdete, amely alatt az ER β mRNS expresszió aktív a terhes patkány uterusban, egybeesik a decidua kialakulásának idejével, amely során az endometrium sejtjei deciduaszövétté alakulnak. Ez a folyamat alapvetően ösztrogén reguláció alatt áll. Viszont a deciduaszövet későbbi fennmaradása és működése már progeszteron függő. Bizonyított, hogy a progeszteron kötőhelyek száma növekszik ösztrogén kezelés hatására, és mivel az ER β mRNS expresszió megjelenése után a PR denzitás megemelkedik a terhesség 8. napján, feltételezzük, hogy az endogén E₂ az ER β transzkripció útján keresztül fokozza a PR expressziót, s így befolyásolja a decidua kifejlődését és működését.

2. A kémiai szerkezet és a farmakológiai hatás közti összefüggések

Munkánk során a C3, C13, C16 és C17-es helyzetben módosított ösztron és ösztradiol epimer párok vizsgálatán keresztül tanulmányoztuk a sztereoizoméria befolyását a molekulák szteroid receptor kötődési képességére és *in vivo* hatékonyságára.

A radioligand kötési vizsgálatok eredményének és az ER, PR és AR ligand-kötőhely szerkezetének ismeretében megerősítettük, hogy a C3-as helyzetben szükséges az OH-csoport jelenléte, mivel ez a funkciós csoport képes H-híd kötés kialakítására a Glu 353 aminosavval az ER ligand-kötőhelyen.

Az epi-D-homoösztroon származékok, ahol a C13-helyzetű metilcsoport α térállású, jobb ER kötődési képességet mutattak.

A 16- bromometil-17-acetát epimerek (9, 10, 11 és 12) és a 16-bromometil-3,17-diol epimerek (13, 14, 15 és 16) ER affinitási értékei között figyelhető meg a legnagyobb különbség, igazolva azt a megállapítást, hogy a 17 β pozícióban szükséges az OH-csoport jelenléte, mely H-hidat kötés képez a His 524 aminosavval.

A C17-es helyzetben acetyl-csoportot tartalmazó molekulák gyenge AR ligandnak bizonyultak. A vizsgált vegyületek ER kötődési tulajdonsága a C16-os funkciós csoport kémiai jellemzőitől függ. Feltételezhető, hogy esetünkben az ER affinitási értékek közti különbség a hidroximetil és a bromometil csoport eltérő polaritásán alapul.

Molekuláink közül a 16 α -bromometilösztro-1,3,5(10)-trién-3,17 β -diol egy kiváló szelektivitással rendelkező, jó ER ligandnak tekinthető.

A vegyületek *in vivo* hatékonysága nem állítható minden esetben párhuzamba az *in vitro* receptorkötődési tulajdonságaikkal. A 16 β -hidroximetil-ösztradiol származékok azonos mértékű ösztrogén aktivitással rendelkeznek, mint a 16 α -bromometil-ösztradiol izomerek, bár K_i értékeik között egy nagyságrendnyi különbség figyelhető meg.

Eredményeinkben tükröződik, hogy a sztereoizoméria nagymértékben befolyásolja a ligand-receptor kölcsönhatás létrejöttét, bár az *in vitro* adatokból nem vonhatunk le rutinszerű következtetéseket az *in vivo* hatékonyságra vonatkozóan.

ANNEX

Az értekezés alapját képező közlemények és előadáskivonatok:

- I. P. Tapolcsányi, J. Wölfling, G. Falkay, Á. Márki, **R. Minorics**, Gy. Schneider: Synthesis and receptor binding examination of 16-hydroxymethyl-3,17-estradiol stereoisomers. *Steroids* 2002; 67:671-678.
- II. J. Wölfling, E. Mernyák, É. Frank, G. Falkay, Á. Márki, **R. Minorics**, Gy. Schneider: Synthesis and receptor-binding examinations of the normal and 13-epi-D-homoestrones and their 3-methyl ethers. *Steroids* 2003; 68: 277-288.
- III. **R. Minorics**, E. Ducza, Á. Márki, E. Páldy, G. Falkay: Investigation of estrogen receptor α and β mRNA expression in the pregnant rat uterus. *Molecular Reproduction and Development* 2004; 68: 463-468.
- IV. **R. Minorics**, E. Ducza, Á. Márki, G. Falkay: Alteration of estrogen receptor subtypes of the pregnant myometrium in the rat. 3rd Congress of the Federation of European Physiological Societies, 28 June - 2 July, 2003, Nice, France.
- V. **Minorics R.**, Ducza E., Páldy E., Márki Á., Falkay Gy.: Az ösztrogén receptor altípusok változásának vizsgálata terhes patkány uterusban. Ph.D. Tudományos napok 2004. Semmelweis Egyetem Doktori Iskola, Budapest, 2004. április 8-9.

- VI. **Minorics R.**, Márki Á., Falkay Gy.: Módosított ösztradiol és ösztron izomerek farmakológiai vizsgálata. Magyar Tudományos Akadémia Szteroidkéimiai Munkabizottság ülése, Szeged, 2004. június 28.
- VII. **R. Minorics**, E. Ducza, G. Falkay: Comparison of the effects of tamoxifen, ICI 182,780 and PPT on estrogen receptor subtypes mRNA expression in the early pregnant rat uterus. 4th Congress of the Federation of European Pharmacological Societies, 14-17 July, 2004, Porto, Portugal.
- VIII. **Minorics R.**, Ducza E.: Az ösztrogén receptor α és az α_{1A} -adrenerg receptor implantációban betöltött szerepének vizsgálata. VII. Clauder Ottó Emlékverseny, Visegrád, 2004. október 14-15.