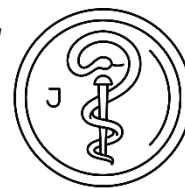




UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA
V MARTINE

Ústav lekárskej biochémie



BIOCHÉMIA POHLAVNÝCH HORMÓNOV

Jana JUREČEKOVÁ

Martin, 2023

Biochémia pohlavných hormónov

Vysokoškolské skriptá

Autor:

Mgr. Jana Jurečková, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie

Recenzenti:

doc. RNDr. Monika Ďurfinová, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie

doc. Mgr. Peter Urban, PhD.

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej a klinickej biochémie

Obsah vzdelávacieho materiálu neprešiel jazykovou, gramatickou a štylistickou korektúrou. Za odbornú a jazykovú stránku zodpovedá autor.

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Vydanie: prvé

Počet strán: 70

ISBN 978-80-8187-132-0

EAN 9788081871320

Predhovor

Pohlavné hormóny, patriace do skupiny steroidných hormónov, sú tradične definované ich úlohou v normálnej funkcii reprodukčného systému a vývine sekundárnych pohlavných znakov odlišujúcich pohlavia medzi sebou. Hlavnými ženskými pohlavnými hormónmi sú estrogény a progesterón. Hlavným mužským pohlavným hormónom je testosterón. Určité množstvá všetkých pohlavných hormónov sa však nachádzajú u oboch pohlaví.

Porozumenie mechanizmov účinkov pohlavných hormónov sa v priebehu ostatných rokov dramaticky zmenilo. Okrem reprodukčných orgánov pôsobia pohlavné hormóny aj na široké spektrum iných tkanív a majú vplyv na mnoho fyziologických procesov. Koncentrácie pohlavných hormónov v organizme sú odlišné nielen medzi pohlaviami, ale menia sa aj v priebehu života a sú ovplyvnené mnohými faktormi, medzi ktoré patria napríklad vek, menštruačný cyklus, menopauza, andropauza, stres alebo užívanie niektorých liekov.

Napriek tomu, že majú pohlavné hormóny v organizme esenciálne fyziologické funkcie, sú spájané aj s rizikom vzniku rôznych ochorení, vrátane onkologických. Medzi typické príklady onkologických ochorení, ktoré sú priamo spájané s pohlavnými hormónmi, patria karcinómy prsníka, vaječníkov, endometria a prostaty. K vzniku a rozvoju týchto ochorení môžu pohlavné hormóny svojím pôsobením nielen prispievať, ale niektoré typy nádorových buniek môžu tiež hormóny priamo produkovať, a tým spôsobovať symptómy ochorenia. Medzi hlavné ciele terapií týchto ochorení preto patrí čiastočné alebo úplné zastavenie syntézy určitého hormónu v organizme alebo blokovanie pôsobenia hormónu na úrovni špecifického receptora.

Tento učebný text obsahuje všetky informácie o štruktúre, biosyntéze, metabolizme, transporte a mechanizmoch účinku pohlavných hormónov a ich špecifických receptorov v ľudskom organizme. Určený je nielen pre študentov pregraduálneho štúdia lekárskeho, farmaceutického a prírodovedeckého fakúlt študujúcich biochémiu, ale aj pre študentov postgraduálnych odborov zaoberajúcich sa danou problematikou.

Zoznam skratiek

ACTH	adrenokortikotropný hormón
AKR	<i>aldo-ketoreduktáza</i>
AP-1	aktivačný proteín 1
AR-V	štiepny variant androgénového receptora
COMT	<i>katechol-O-metyltransferáza</i>
CYP	<i>cytochróm P450</i>
CYP11A1	gén kódujúci enzým dezmoláza
CYP11B1	<i>11β-hydroxyláza</i>
CYP17A1	<i>17α-hydroxyláza</i>
CYP19A1	<i>aromatáza</i>
DHEA	dehydroepiandrosterón
DHEAS	dehydroepiandrosterónsulfát
DHT	dihydrotestosterón
E1	estrón
E2	estradiol
E3	estriol
EGF	epidermálny rastový faktor
ERE	estrogén responzívne elementy
ERK	<i>extracelulárnym signálom regulovaná kináza</i>
ER- α	estrogénový receptor α
ER- β	estrogénový receptor β
ESR1	gén kódujúci estrogénový receptor α
ESR2	gén kódujúci estrogénový receptor β
FSH	folikulostimulačný hormón
GnHR	hormón uvoľňujúci gonadotropín
GP1R	s G-proteínom spojený estrogénový receptor 1
GST	<i>glutatión-S-transferáza</i>
HDL	lipoproteín s vysokou hustotou
17 β -HSD	<i>17β-hydroxysteroiddehydrogenáza</i>
3 β -HSD	<i>3β-hydroxysteroiddehydrogenáza</i>
Hsp90	proteín teplotného šoku 90

IGF-1	inzulínu podobný rastový faktor 1
IL-6	interleukín 6
KE	kryptický exón
LCAT	<i>lecitíncholesterolacyltransferáza</i>
LDL	lipoproteín s nízkou hustotou
LH	luteinizačný hormón
MAPK	<i>mitogénom-aktivovaná proteín kináza</i>
NADPH	nikotínamidadenínindinukleotidfosfát
NQO1	<i>chinónreduktáza</i>
P450 _{sc}	<i>cytochróm P450 postranný reťazec štiepiaci enzým</i>
PAPS	3'-fosfoadenozín-5'-fosfosulfát
PAPSS	<i>3'-fosfoadenozín-5'-fosfosulfátsyntáza</i>
PGR	progesterónový receptor
PI-3K	<i>fosfatidylinozitol-3-kináza</i>
PKA	<i>proteínkináza A</i>
PKC	<i>proteínkináza C</i>
SCR	koaktivátor steroidných receptorov
SERM	selektívne modulátory estrogénových receptorov
SHBG	pohlavné hormóny viažuci globulín
SO	spojovacia oblasť
SP-1	stimulačný proteín 1
SR-B1	scavengerový receptor B1
SRD5A	<i>5α-reduktáza</i>
STARD1	steroidogénny akútny regulačný proteín 1
STS	<i>steroidná sulfatáza</i>
SULT	<i>sulfotranferáza</i>
TGF- β	tranformujúci rastový faktor beta
UGT	<i>UDP-glukuronyltransferáza</i>

Obsah

1	Pohlavné hormóny	8
1.1	Štruktúra a názvoslovie pohlavných hormónov	9
1.2	Biosyntéza pohlavných hormónov	10
1.2.1	Biosyntéza androgénov	15
1.2.2	Biosyntéza estrogénov.....	20
1.3	Transport pohlavných hormónov v organizme.....	22
1.3.1	Androgény v cirkulácii.....	23
1.3.2	Estrogény v cirkulácii.....	24
1.4	Metabolizmus pohlavných hormónov	24
1.4.1	I. fáza biotransformácie pohlavných hormónov	25
1.4.2	II. fáza biotransformácie pohlavných hormónov	29
1.5	Exkrécia pohlavných hormónov	34
1.6	Mechanizmus pôsobenia pohlavných hormónov	34
1.6.1	Receptory pre pohlavné hormóny	35
2	Androgénový receptor	40
2.1	Štruktúra androgénového receptora.....	40
2.2	Varianty androgénového receptora.....	43
2.3	Ligandy androgénových receptorov	45
2.4	Signálne dráhy androgénového receptora.....	46
2.5	Mutácie a génové polymorfizmy androgénového receptora	48
3	Estrogénové receptory	51
3.1	Štruktúra estrogénových receptorov	51
3.2	Varianty estrogénových receptorov	53
3.3	Ligandy estrogénových receptorov	56

3.4	Signálne dráhy estrogénových receptorov	58
3.5	Mutácie a génové polymorfizmy estrogénového receptora α	60
3.6	Génové polymorfizmy estrogénového receptora β	61
4	Progesterónový receptor.....	63
4.1	Štruktúra progesterónového receptora	63
4.2	Štiepne varianty progesterónového receptora.....	64
4.3	Ligandy progesterónového receptora	65
4.4	Signálne dráhy progesterónového receptora.....	66
4.5	Polymorfizmy progesterónového receptora.....	67
5	Zoznam použitej literatúry	68

1 Pohlavné hormóny

Pohlavné hormóny, vrátane androgénov, estrogénov a progesterónu, sú pomenované predovšetkým kvôli ich úlohe v normálnej funkcii reprodukčného systému. Syntetizované sú v pohlavných žľazách a kôre nadobličiek, ale môžu vznikať aj v periférnych tkanivách konverziou prekursorových molekúl. Tradične sú pohlavné hormóny definované ich vplyvom na mužské a ženské reprodukčné orgány a sekundárne pohlavné znaky, ktoré odlišujú obe pohlavia. Ich pôsobenie v organizme je však oveľa komplexnejšie a majú vplyv na rôzne fyziologické a metabolické procesy.

Hlavným metabolickým účinkom mužských pohlavných hormónov, androgénov, je zvýšenie proteosyntézy. Proteoanabolický efekt androgénov sa prejaví zvýšením hematopoézy a rastom svalovej hmoty, čo bolo, a stále aj je, zneužívané pri podávaní derivátov androgénov pri dopingu športovcov. Okrem toho majú androgény aj množstvo špecifických účinkov. Podieľajú sa napríklad na maskulinizácii embrya, vývine mužských sekundárnych pohlavných znakov v puberte a spermatogenéze. Inhibujú ukladanie tukových zásob v určitých častiach organizmu a prispievajú tak k typicky mužskému ukladaniu tukových zásob, predovšetkým v oblasti pásu. Majú mierne aterogénne účinky zvyšovaním množstva LDL a VLDL. Cirkulujúce androgény môžu mať vplyv aj na správanie, agresivitu a libido. Okrem fyziologických funkcií môžu androgény prispievať aj k vzniku rôznych ochorení, ako je napríklad karcinóm prostaty.

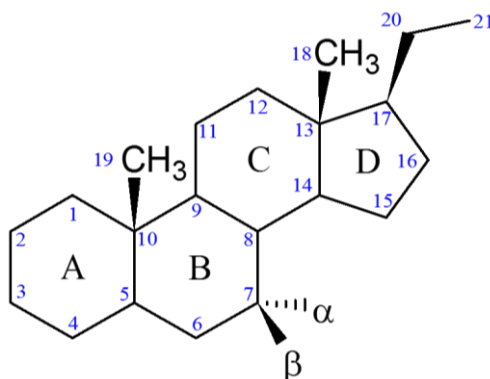
Estrogény sú tradične považované za ženské pohlavné hormóny. Zodpovedné sú predovšetkým za vývin a reguláciu ženských pohlavných orgánov a sekundárnych pohlavných znakov. U mužov majú úlohu pri dozrievaní spermií. Okrem úlohy v reprodukčnom systéme majú aj anabolické a metabolické účinky. Zvyšujú hustotu kostí, ovplyvňujú syntézu kolagénu, zvyšujú množstvo kolagénu v spojivovom tkanive, majú protizápalové účinky, stimulujú ukladanie tukových zásob v určitých častiach tela, predovšetkým na bokoch a nohách, stimulujú syntézu proteínov v pečeni, ovplyvňujú zrážanie krvi a spôsobujú zadržiavanie vody v organizme. Majú mierne antiaterogénne účinky znižovaním množstva LDL a zvyšovaním HDL. Okrem fyziologických funkcií môžu estrogény prispievať aj k vzniku rôznych patologických stavov, vrátane niektorých onkologických ochorení, ako je karcinóm prsníka a endometria.

Progesterón má úlohu predovšetkým pri vývine, diferenciácii a normálnej funkcii ženských pohlavných orgánov, hlavne maternice, vaječníkov, prsnej žľazy, ale aj pri regulácii

hypotalamo-hypofýzo-gonadálnej osi. Progesterón má tiež významnú funkciu počas tehotenstva, ale aj v centrálnom nervovom systéme. Okrem fyziologických funkcií sa môže progesterón podieľať aj na vzniku rôznych patologických stavov, napríklad fibrómov v maternici, endometrióze, ale aj karcinómu endometria a prsníka.

1.1 Štruktúra a názvoslovie pohlavných hormónov

Pohlavné hormóny patria medzi steroidné hormóny, ktoré majú spoločnú základnú cyklopentanoperhydrofenantrénovú štruktúru odvodenú od cholesterolu. V štruktúre sú prítomné spojené tri 6-členné kruhy (označené písmenami A, B a C) a jeden 5-členný kruh (označený písmenom D). Jednotlivé uhlíky steroidnej štruktúry sa označujú číslami a kruhy veľkými písmenami (Obrázok 1). Lokalizácia substituentov na steroidnej základnej štruktúre je označená číslom uhlíka, na ktorom sú pripojené.



Obrázok 1: Základná steroidná štruktúra pohlavných hormónov.

Jednotlivé uhlíky štruktúry sú označené číslami a kruhy veľkými písmenami. Atómy lokalizované pod rovinou základnej štruktúry sú znázornené čiarkovaným trojuholníkom a označujú sa ako α . Atómy lokalizované nad rovinou základnej štruktúry sú znázornené plným trojuholníkom a označujú sa ako β .

Atómy pripojené na asymetrických uhlíkoch sú označované α , ak sa nachádzajú pod rovinou základnej štruktúry a β , ak sú nad rovinou základnej štruktúry. Takýmto spôsobom môže vznikáť spektrum stereoizomérov - molekúl, ktoré majú rovnaký sumárny vzorec, ale odlišnú konformáciu. Biologická aktivita pohlavných hormónov závisí na ich schopnosti interagovať s ich špecifickými receptormi. Väzbová afinita špecifického receptora voči hormónu je závislá na prítomnosti konkrétnych funkčných skupín, ako aj celkovej trojdimenzionálnej štruktúre molekuly hormónu. Stereoizoméry hormónov môžu mať preto úplne odlišnú väzbovú afinitu voči receptorom, aktivitu alebo aj odlišné biologické účinky. Napríklad 17 β -estradiol je

biologicky aktívny, ale 17α -estradiol je prakticky inertný. Podobne 5α -dihydrotestosterón predstavuje aktívny androgén s vysokou afinitou voči vnútrobunkovému androgénovému receptoru, ale 5β -epimér sa na androgénový receptor neviaže, preto nemá androgénové vlastnosti, pôsobí však ako efektívny aktivátor hematopoézy.

Pohlavné hormóny sa rozdeľujú podľa počtu uhlíkov steroidnej štruktúry do troch skupín:

1. C_{21} steroidy - deriváty pregnánu – progesterón,
2. C_{19} steroidy - deriváty androstánu – androgény,
3. C_{18} steroidy - deriváty estránu - estrogény.

Pre štruktúru progesterónu je charakteristická dvojitá väzba medzi C_4 a C_5 uhlíkmi, oxo-skupina v polohe 3 a na uhlíku C_{17} v β -konfigurácii dvojuhlíkový bočný reťazec. Pre všetky androgény je charakteristická oxo- alebo hydroxylová funkčná skupina na C_{17} (štruktúrne vzorce progesterónu a androgénov sú na Obrázku 4). Základnou štruktúrnou charakteristikou estrogénov je aromatický kruh A s hydroxylovou skupinou v polohe 3 a oxo- alebo hydroxylová skupina na C_{17} . Všetkým estrogénom chýba metylová skupina v polohe 10 (štruktúrne vzorce estrogénov sú na Obrázku 6).

Prirodzene sa vyskytujúce pohlavné hormóny sa bežne označujú triviálnymi názvami, ktoré však neposkytujú informácie o presnej štruktúre molekuly. Presnejšie je označovanie systematickým názvoslovím, ktoré obsahuje názov základnej štruktúry a názov, počet, lokalizáciu a orientáciu všetkých funkčných skupín. Systematickým názvoslovím je napríklad štruktúra označená triviálnym názvoslovím ako testosterón pomenovaná 17β -hydroxyandrost-4-én-3-ón.

1.2 Biosyntéza pohlavných hormónov

Hlavným substrátom pre biosyntézu steroidných hormónov, medzi ktoré pohlavné hormóny patria, je cholesterol. Hlavným zdrojom cholesterolu pre syntézu steroidných hormónov je cholesterol z LDL lipoproteínových častíc, ktoré sa do buniek dostávajú endocytózou sprostredkovanou predovšetkým pomocou LDL receptorov a scavengerového receptora B1 (SR-B1). Okrem toho môže byť zdrojom aj *de novo* syntéza cholesterolu a hydrolýza zásobných esterov cholesterolu v bunkách.

Syntéza pohlavných hormónov predstavuje sériu reakcií vedúcich k postupnej modifikácii štruktúry cholesterolu. Reakcie zahŕňajú skrátenie bočného reťazca cholesterolu, zmenu polohy

dvojitej väzby a pridanie hydroxylových funkčných skupín, čím dochádza k postupnej premene cholesterolu cez pregnány, androgény až na estrogény.

Biosyntézu steroidných hormónov katalyzujú dve hlavné triedy enzýmov, enzýmy z rodiny *cytochrómov P450* a *hydroxysteroiddehydrogenázy (HSD)*. *Cytochrómy P450*, obsahujúce vo svojej štruktúre hem, aktivujú molekulový kyslík, pričom využívajú NADPH ako donor elektrónov. Katalyzujú reakciu, pri ktorej sa jeden atóm kyslíka naviaže na substrát a druhý atóm kyslíka sa redukuje za vzniku vody. To umožňuje enzýmom z rodiny *cytochrómov P450* katalyzovať spektrum reakcií, vrátane hydroxylačných reakcií a štiepenia C-C väzieb, ktoré prebiehajú aj počas syntézy steroidných hormónov. Každý enzým rodiny *cytochrómov P450* je označený skratkou *CYP* a číslom, ktoré zvyčajne označuje uhlík, na ktorom enzým katalyzuje reakciu.

Hydroxysteroiddehydrogenázy (HSD) katalyzujú konverziu hydroxysteroidov na príslušné oxosteroidy. Väčšina *HSD* enzýmov môže katalyzovať reakcie v oboch smeroch. Výnimkou sú *3β-hydroxysteroiddehydrogenázy (3β-HSD)*, ktoré katalyzujú nevratné reakcie, pričom premieňajú nielen hydroxylovú skupinu na treťom uhlíku na oxo-skupinu, ale katalyzujú súčasne aj izomerizáciu dvojitej väzby z C₅ na C₄.

Špecifické typy buniek ľudského organizmu obsahujú enzýmy potrebné pre syntézu pohlavných hormónov, ale len zriedkavo dochádza v jednej bunke ku kompletnej syntéze, z cholesterolu až po estrogény. Často je potrebná spolupráca viacerých typov buniek, respektíve tkanív, čo umožňuje ovplyvnenie syntézy pohlavných hormónov faktormi, ktoré budú nezávisle regulovať syntézu prekursorových molekúl a syntézu aktívnych pohlavných hormónov. Primárnymi orgánmi, v ktorých je lokalizovaná syntéza pohlavných hormónov sú kôra nadobličiek, pohlavné žľazy a placenta.

Prvým krokom biosyntézy všetkých steroidných hormónov je translokácia cholesterolu na vnútornú mitochondriálnu membránu, ktorá je regulovaná steroidogénnym akútnym regulačným proteínom 1 (STARD1), ktorý sa tiež označuje ako StAR. Na vnútornej mitochondriálnej membráne následne dochádza k štiepeniu bočného reťazca cholesterolu (C₂₇) za vzniku pregnenolónu (C₂₁) pomocou *cytochróm P450 postranný reťazec štiepiaceho* enzýmu (*P450_{scc}*), ktorý je tiež označovaný ako *dezmoláza* a je kódovaný génom *CYP11A1* (Obrázok 4). Štiepenie bočného reťazca cholesterolu zahŕňa tri katalytické kroky. Prvé dva vedú k naviazaniu hydroxylových skupín na uhlíky C₂₀ a C₂₂. V treťom kroku dochádza k štiepeniu väzby medzi týmito uhlíkmi.

Translokácia cholesterolu na vnútornú mitochondriálnu membránu a štiepenie bočného reťazca cholesterolu je kľúčový regulačný krok syntézy steroidných hormónov. Hlavnými faktormi, ktoré ovplyvňujú rýchlosť syntézy pregnenolónu preto sú:

1. transport cholesterolu na vnútornú mitochondriálnu membránu,
2. množstvo dostupného enzýmu - *cytochrómu P450sc*,
3. katalytická aktivita *cytochrómu P450sc*, ktorá môže byť ovplyvnená posttranslačnými modifikáciami, predovšetkým fosforyláciou.

Pregnenolón slúži ako prekursor všetkých steroidných hormónov syntetizovaných v mužských a ženských pohlavných orgánoch a v kôre nadobličiek.

Steroidogenéza v kôre nadobličiek

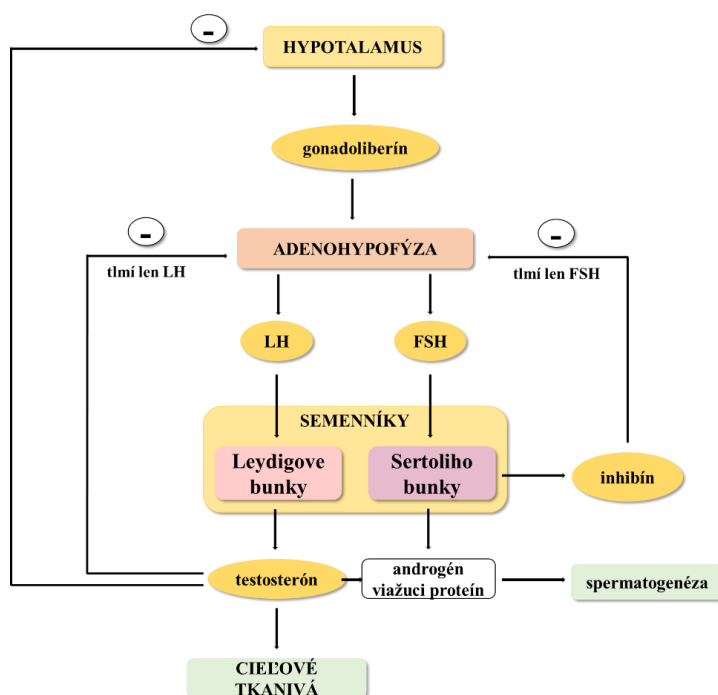
V kôre nadobličiek dochádza k biosyntéze mineralokortikoidov, glukokortikoidov, ale aj androgénových prekursorov a androgénov. Kôra nadobličiek pozostáva z troch funkčných zón, z ktorých každá je vzhľadom na špecifickú expresiu steroidogénnych enzýmov zodpovedná za produkciu rôznych skupín steroidov. Vonkajšia *zona glomerulosa* exprimuje enzýmy katalyzujúce syntézu hlavného mineralokortikoidu – aldosterónu, ktorá je kontrolovaná renín-angiotenzín-aldosterónovým systémom. Stredná *zona fasciculata* je zodpovedná za produkciu primárneho glukokortikoidu – kortizolu. V menšom množstve sa v tejto časti syntetizujú aj androgény a estrogény. Vo vnútornej *zona reticularis* vznikajú C₁₉ prekursor androgénov, vrátane dehydroepiandrosterónu a jeho sulfátu. Syntéza kortizolu a androgénových prekursorov je regulovaná hypotalamo-hypofýzo-andrenálnou osou. Hypotalamus produkuje hormón uvoľňujúci kortikotropín (kortikoliberín), ktorý stimuluje kortikotropné bunky hypofýzy k produkcii adrenokortikotropného hormónu (ACTH), ktorý následne stimuluje syntézu dehydroepiandrosterónu a kortizolu v kôre nadobličiek.

Steroidogenéza v pohlavných žľazách

Steroidogenéza v pohlavných žľazách vedie k syntéze androgénov a estrogénov. Syntéza pohlavných hormónov v pohlavných žľazách je u oboch pohlaví iniciovaná rozvojom hypotalamo-adenohypofýzo-gonadálnej osi v puberte. Hypotalamus produkuje epizodicky, približne každé dve hodiny, hormón uvoľňujúci gonadotropíny (GnHR), nazývaný tiež gonadoliberín, ktorý následne stimuluje syntézu a uvoľňovanie gonadotropínov - luteinizačného hormónu (LH) a folikulostimulačného hormónu (FSH) z adenohypofýzy.

K uvoľňovaniu gonadoliberínu z hypotalamu dochádza Luteinizačný hormón v cieľových bunkách zvyšuje expresiu steroidogénneho akútneho regulačného proteínu 1 (STARD1), čím sa zvýši transport cholesterolu na vnútornú mitochondriálnu membránu a stimuluje sa syntéza pohlavných hormónov.

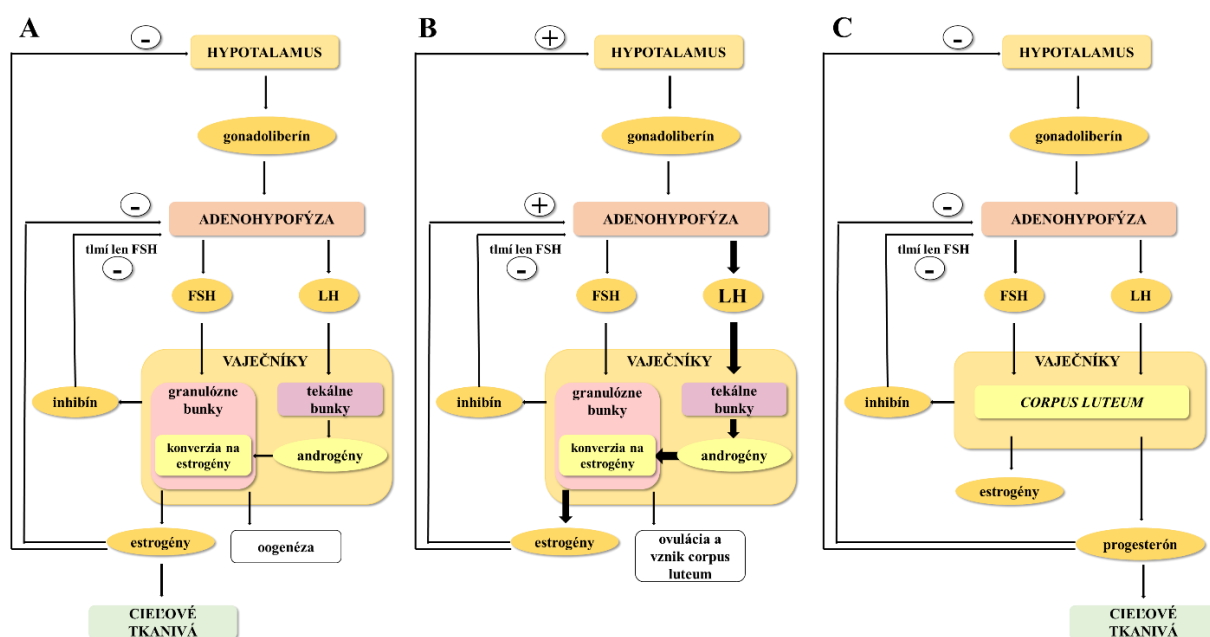
U mužov pôsobí LH na Leydigove bunky semenníkov, kde stimuluje syntézu testosterónu. Testosterón ovplyvňuje sekréciu LH, a to nepriamo - znížením frekvencie sekrécie gonadoliberínu z hypotalamu, ale aj priamo – znížením citlivosti receptorov pre gonadoliberín v adenohipofýze. Folikulostimulačný hormón u mužov pôsobí na Sertoliho bunky semenníkov, kde indukuje uvoľnenie inhibínu, ktorý následne mechanizmom spätnej väzby znižuje sekréciu FSH z hypofýzy. FSH v Sertoliho bunkách stimuluje aj sekréciu androgén viažuceho proteínu potrebného pre naviazanie testosterónu. Androgén viažuci proteín s naviazaným testosterónom sa vylučuje do semenotvorných kanálikov, čím zvyšuje koncentráciu testosterónu v mieste spermatogenézy (Obrázok 2).



Obrázok 2: Regulácia činnosti mužských pohlavných žliaz.

Gonadoliberín rytmicky uvoľňovaný z hypotalamu sa dostáva do adenohipofýzy, kde stimuluje sekréciu luteinizačného hormónu (LH) a folikulostimulačného hormónu (FSH). LH pôsobí na Leydigove bunky semenníkov, kde stimuluje syntézu testosterónu. Testosterón inhibuje sekréciu LH, a to nepriamo - znížením frekvencie sekrécie gonadoliberínu z hypotalamu, ale aj priamo – znížením citlivosti receptorov pre gonadoliberín v adenohipofýze. FSH pôsobí na Sertoliho bunky semenníkov, kde indukuje uvoľnenie inhibínu, ktorý následne mechanizmom spätnej väzby znižuje sekréciu FSH z hypofýzy. FSH v Sertoliho bunkách stimuluje aj sekréciu androgén viažuceho proteínu potrebného pre naviazanie testosterónu.

U žien FSH ovplyvňuje predovšetkým granulózne bunky vaječníkov, kde stimuluje enzýmy potrebné pre syntézu estrogénov. Luteinizačný hormón naopak pôsobí na tekálne bunky vaječníkov. Regulácia syntézy pohlavných hormónov a funkcie pohlavných žliaz u žien je komplikovanejšia a komplexnejšia ako u mužov, vzhľadom na výrazne zmeny hladín hormónov počas menštruačného cyklu (Obrázok 3).



Obrázok 3: Regulácia činnosti ženských pohlavných žliaz vo folikulárnej fáze cyklu (A), vo fáze tesne pred ovuláciou (B) a v luteálnej fáze menštruačného cyklu.

Gonadolibérin rytmicky uvoľňovaný z hypotalamu sa dostáva do adenohypofýzy, kde stimuluje sekréciu luteinizačného hormónu (LH) a folikulostimulačného hormónu (FSH). LH pôsobí na tekálne bunky vaječníkov a FSH na granulózne bunky vaječníkov, kde stimuluje syntézu estrogénov, ktoré mechanizmom spätnej väzby inhibujú sekréciu gonadolibérínu a gonadotropínov. (B) Pred ovuláciou estradiol začne zvyšovať citlivosť buniek adenohypofýzy na gonadolibérin, čím dochádza k stimulácii sekrécie LH a následnej syntéze estrogénov. (C) Po ovulácii sa prasknutý folikul transformuje na *corpus luteum*, ktorý začne produkovať progesterón a postupne aj estrogény. Progesterón inhibuje uvoľňovanie LH a FSH. Pokles LH vedie k atrofii corpus luteum, v dôsledku čoho dochádza k poklesu progesterónu a estrogénov v neskorej luteálnej fáze. Zníženie koncentrácie estrogénov vedie k stimulácii vylučovania gonadotropínov a k novému cyklu.

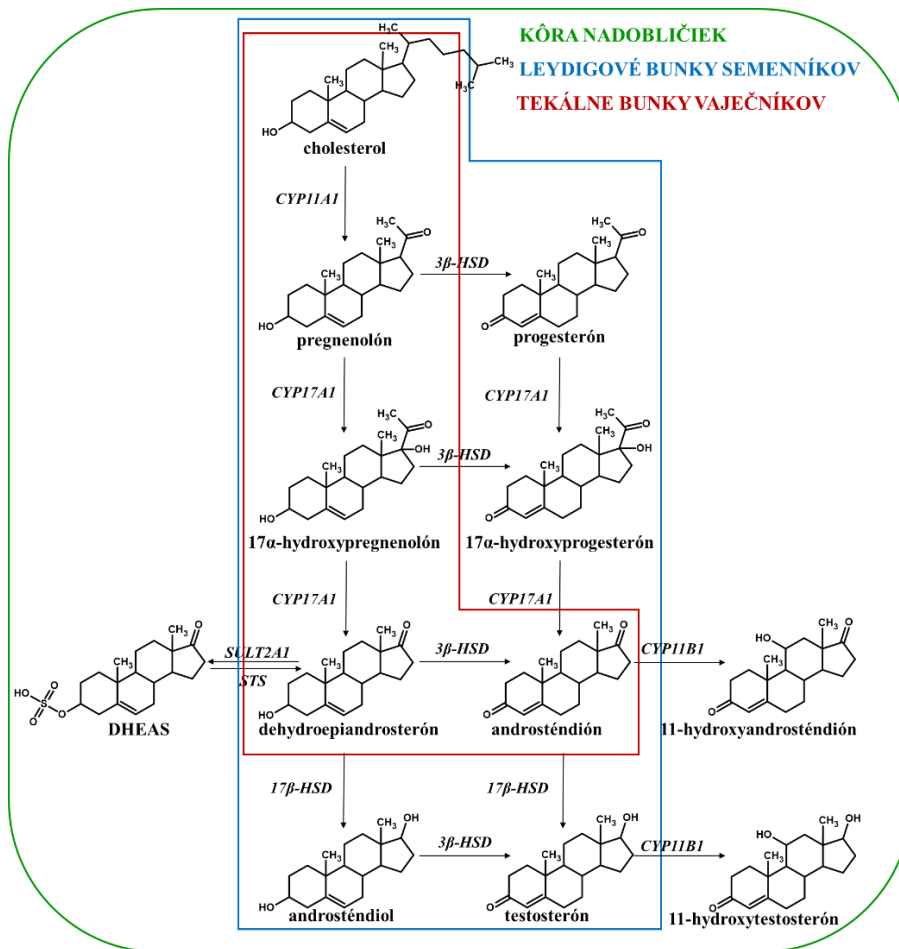
Na začiatku cyklu, v tzv. folikulárnej fáze, sa z adenohypofýzy postupne začne vylučovať viac gonadotropínov, ktoré stimulujú rast nového folikulu, ktorý začne produkovať zvýšené množstvá estrogénov. Estrogény pôsobiace prostredníctvom estrogénových receptorov indukujú proliferáciu epitelových a stromálnych buniek a hrubnutie endometria. Estrogény tiež stimulujú expresiu progesterónového receptora, čím sa zabezpečí odpoveď na progesterón

neskôr vo fáze po ovulácii. Zvýšená syntéza estrogénov v tejto fáze začne postupne potláčať vylučovanie FSH. V neskorej folikulárnej fáze však estradiol začne zvyšovať citlivosť buniek adenohipofýzy na gonadoliberín, ktoré začnú vylučovať zvýšené množstvá gonadotropínov - predovšetkým LH. Výrazný vzostup LH spolu s estradiolom vedie k ovulácii. Po ovulácii dochádza k prudkému poklesu estradiolu a následne aj LH. Prasknutý folikul sa transformuje na *corpus luteum*, ktorý začne produkovať progesterón a postupne aj estrogény. V postovulačnej fáze progesterón a estrogény vylučované z *corpus luteum* inhibujú uvoľňovanie LH a FSH. Pokles LH vedie k atrofii *corpus luteum*, v dôsledku čoho dochádza k poklesu progesterónu a estrogénov v neskorej luteálnej fáze. Rýchly pokles progesterónu vedie k menštruačnému krvácaniu. Zníženie koncentrácie estrogénov vedie k stimulácii vylučovania FSH a k novému cyklu.

1.2.1 Biosyntéza androgénov

Androgény sú syntetizované a vylučované primárne Leydigovými bunkami semenníkov, tekálnymi bunkami vaječníkov a bunkami *zona reticularis* nadobličiek. Prehľad syntézy androgénov v jednotlivých oblastiach je na Obrázku 4.

V *zona reticularis* nadobličiek enzým *17 α -hydroxyláza* (*CYP17A1*) katalyzuje *17 α -hydroxyláciu* pregnenolónu za vzniku *17 α -hydroxypregnenolónu*, ktorý je substrátom *17,20-lyázovej* aktivity *CYP17A1* enzýmu, čím vzniká dehydroepiandrosterón (DHEA). Väčšina DHEA je sulfonylovaná *sulfotransferázou 2A1* (*SULT2A1*) za vzniku DHEA sulfátu (DHEAS), ktorý predstavuje hlavný C₁₉ steroid produkovaný nadobličkami. Malá časť vznikajúceho DHEA je v *zona reticularis* konvertovaná na androsténdiol enzýmom *aldo-ketoreduktáza 1C3* (*AKR1C3*), ktorý je tiež označovaný ako *17 β -hydroxysteroiddehydrogenáza B5* (*HSD17B5*). DHEA a androsténdiol môžu byť ďalej konvertované pomocou enzýmu *3 β -HSD* na androsténdión a testosterón. Testosterón môže vznikáť aj konverziou androsténdiónu enzýmom *AKR1C3*, ktorý má *17 β -hydroxysteroiddehydrogenázovú* aktivitu. V nadobličkách sa nachádza aj enzým *11 β -hydroxyláza* (*CYP11B1*), ktorého aktivitou môžu byť androsténdión a testosterón premieňané na 11-hydroxyderiváty, 11-hydroxyandrosténdión a 11-hydroxytestosterón, ktoré sú uvoľňované do cirkulácie a môžu byť aktivované v periférnych tkanivách. Všeobecne platí, že nadobličky uvoľňujú do cirkulácie len malé množstvo aktívnych androgénov, ale prevažne androgénové prekursor, ktoré sú na aktívne androgény premieňané až v periférnych tkanivách. Približne od štvrtej dekády veku začína dochádzať k postupnému znižovaniu sekrécie



Obrázok 4: Prehľad syntézy androgénov v nadobličkách, semenníkoch a vaječníkoch.

Farebnými rámečkmi sú vyznačené reakcie prebiehajúce v nadobličkách (zelený), semenníkoch (modrý) a vo vaječníkoch (červený). DHEAS – dehydroepiandrosterónsulfát

Primárnym zdrojom androgénov u mužov sú Leydigove bunky semenníkov. Syntéza prebieha rovnakým mechanizmom ako v *zona reticularis* nadobličiek (Obrázok 4). Vzhľadom na absenciu expresie *SULT2A1* je však DHEA vznikajúci počas syntézy premieňaný buď na androsténdiol enzýmom *17 β -hydroxysteroiddehydrogenáza B3 (HSD17B3)* alebo na androsténdión enzýmom *3 β -HSD*. Androsténdiol a androsténdión sú následne premieňané na testosterón. Testosterón môže byť v Leydigových bunkách metabolizovaný na 5 α -dihydrotestosterón (DHT).

U žien dochádza k syntéze androgénov okrem *zona reticularis* nadobličiek aj v tekálnych bunkách vaječníkov, kde prebieha rovnakým mechanizmom, ako v semenníkoch. Hlavným produktom syntézy androgénov v tekálnych bunkách je androsténdión (Obrázok 4).

Aktivácia androgénov a androgénových prekursorov v periférnych tkanivách

Okrem testosterónu produkovaného semenníkmi, je väčšina androgénov syntetizovaných v nadobličkách a vo vaječníkoch vo forme neaktívnych androgénových prekursorov. Tieto môžu byť následne konvertované na aktívnu formu v cieľových bunkách, ktoré exprimujú potrebné enzýmy. Aktívne androgény po sprostredkovaní účinku sú následne enzymaticky inaktivované predtým, ako sú vylúčené z bunky. Takýto koncept pôsobenia hormónov sa nazýva intrakrinológia a je odlišná od klasického konceptu endokrinológie, v ktorom žľaza produkuje do cirkulácie aktívny hormón, ktorý priamo pôsobí na receptory v cieľových tkanivách.

Intrakrinológia je definovaná nasledujúcimi princípmi:

1. receptor pre daný hormón a enzýmy metabolizujúce prekursory hormónu sú exprimované súčasne v tej istej cieľovej bunke,
2. neaktívne prekursory hormónu sú vychytávané z cirkulácie,
3. každá cieľová bunka môže sama regulovať množstvo aktívneho hormónu, ktorý v nej vznikne špecifickým súborom enzýmov,
4. aktívny hormón môže byť tvorený niekoľkými enzymaticky katalyzovanými reakciami, čo umožňuje viac úrovní regulácie,
5. pred vylúčením je hormón enzymaticky inaktivovaný v tej istej cieľovej bunke,
6. cieľová bunka do extracelulárneho priestoru alebo do cirkulácie vylučuje len zanedbateľné množstvo aktívneho hormónu, čím nedochádza k systémovému nadbytku aktívneho hormónu.

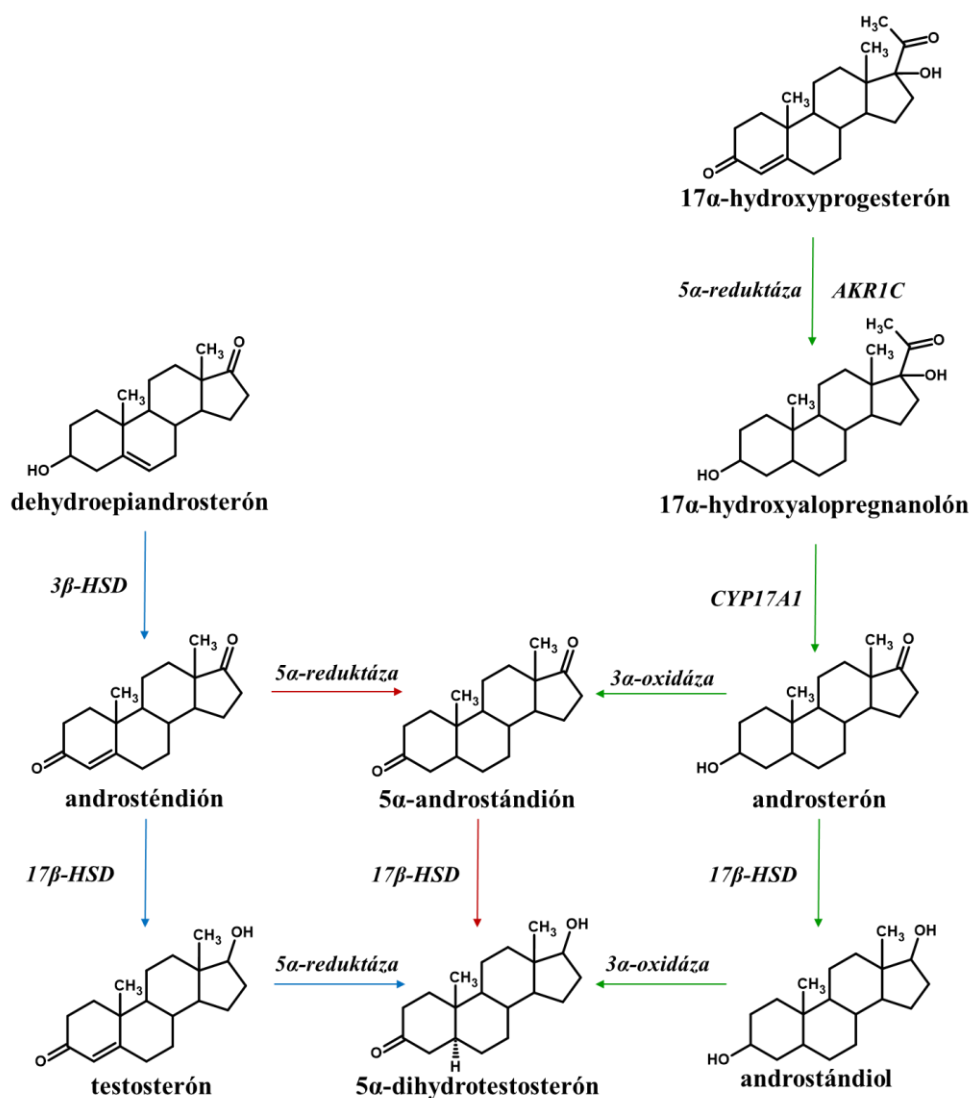
Narušenie intrakrinného mechanizmu môže vzniknúť ako dôsledok:

1. lokálnych zmien expresie, ktoré budú viesť k efektom špecifickým pre cieľové tkanivo,
2. mutácií alebo polymorfizmov potrebných enzýmov, čo bude viesť k systémovým zmenám a môžu byť spojené s metabolickou dysfunkciou alebo vznikom nádorových ochorení závislých na pohlavných hormónoch.

Cirkulujúce biologicky aktívne androgény a androgénové prekurzory musia prechádzať bunkovou membránou cieľových buniek, na to aby boli metabolizované enzýmami, ktoré sa nachádzajú v cytoplazme buniek alebo na membráne endoplazmatického retikula, alebo aby aktivovali androgénový receptor. Nekongugované androgény, ktoré sú hydrofóbne, môžu voľne prechádzať bunkovou membránou pomocou difúzie. Kongugované androgény (sulfonylované) sú hydrofilné a vyžadujú aktívny transport cez špecifické transmembránové proteíny. Vstup kongugovaných androgénov do cieľových buniek je preto ovplyvnený viacerými mechanizmami, medzi ktoré patrí napríklad úroveň exprese transportných proteínov alebo substrátová špecificita transportných proteínov. Po vstupe kongugovaných androgénov do cieľových buniek musí tiež prebehnúť ich dekonjugácia. Sulfonylová skupina je hydrolyzovaná *steroidnými sulfatázami*, ktoré sú prítomné vo všetkých bunkách organizmu. Po dekonjugácii môžu byť v cieľových bunkách androgénové prekurzory metabolizované na aktívne androgény. Hlavným biologicky aktívnym androgénom je 5 α -dihydrotestosterón (DHT), ktorý môže vznikať niekoľkými spôsobmi.

V periférnych tkanivách môže byť DHEA konvertovaný enzýmom 3 β -HSD na androsténdión, ktorý slúži ako substrát pre syntézu testosterónu enzýmom 17 β -HSD. Následnou 5 α -redukciou testosterónu 5 α -reduktázou (SRD5A) vzniká biologicky aktívnejší DHT. V pečeni katalyzuje 5 α -redukciu predovšetkým 5 α -reduktáza 1 (SRD5A1), avšak v mužských reprodukčných orgánoch hlavne 5 α -reduktáza 2 (SRD5A2). Takýto mechanizmus predstavuje klasickú cestu biosyntézy DHT (Obrázok 5).

Alternatívna cesta biosyntézy DHT, tzv. 5 α -androstándiónová cesta, preskakuje testosterón ako medziprodukt. Týmto mechanizmom je androsténdión najskôr 5 α -redukciou katalyzovanou 5 α -reduktázou 1 (SRD5A1) konvertovaný na 5 α -androstándión, ktorý je následne enzýmom 17 β -HSD konvertovaný priamo na DHT, pričom sa netvorí testosterón ako medziprodukt. Tento mechanizmus biosyntézy DHT neprebíha v nadobličkách a pohlavných žľazách, ale má dôležitú úlohu v periférnych tkanivách, ktoré syntetizujú DHT z cirkulujúcich androgénových prekurzorov, nie však z testosterónu. Mimoriadny význam má tento mechanizmus aj napríklad pri intratumorálnej biosyntéze DHT z adrenálnych prekurzorov pri kastrofne-rezistentnom karcinóme prostaty, pri ktorom sú cirkulujúce hladiny testosterónu významne znížené chirurgickou alebo chemickou kastrofiou.



Obrázok 5: Prehľad najvýznamnejších intrakrinných dráh syntézy DHT v periférnych tkanivách.

Cirkulujúce androgénové prekurzory môžu byť v periférnych tkanivách konvertované na aktívne androgény, predovšetkým DHT. Modrými šípkami je vyznačená klasická cesta biosyntézy DHT. Červenými šípkami je znázornená alternatívna, tzv. 5α -androstándiónová cesta biosyntézy DHT. Zelenými šípkami je vyznačená biosyntéza DHT cestou zadných dvierok („backdoor pathway“).

Ďalšou alternatívnou cestou je syntéza DHT cestou zadných dvierok („backdoor pathway“), pri ktorej sa ako prekurzory využívajú C_{21} steroidy, predovšetkým 17α -hydroxyprogesterón, ktorý je 5α -redukciou enzýmom *SRD5A1* a pomocou *aldo-ketoreduktázy* (*AKR1C*) premieňaný na 17α -hydroxyalopregnanolón, ktorý je následne pomocou 17,20-lyázovej aktivity *CYP17A1* premieňaný na androsterón. Redukcia enzýmom *17β-HSD* a oxidácia *3α-oxidázou* následne vedie ku konverzii androsterónu na DHT. Táto dráha v ľudskom organizme prebieha predovšetkým za patologických podmienok, kedy v dôsledku deficitu enzýmov dochádza

k akumulácii progesterónu a 17α -hydroxyprogesterónu, ale aj počas embryonálneho vývinu mužského plodu.

Medzi hlavné androgénové prekurzory, z ktorých sa v periférnych tkanivách tvoria aktívne androgény, predovšetkým testosterón, u žien patria:

1. DHEAS vznikajúci v *zona reticularis* kôry nadobličiek,
2. DHEA vznikajúci v *zona reticularis*, v tekálnych bunkách vaječníkov a periférne z cirkulujúceho DHEAS,
3. androsténdión vznikajúci v nadobličkách, v tekálnych vaječníkov a periférne z cirkulujúceho DHEAS.

V periférnych cieľových tkanivách môže u žien dochádzať aj k syntéze DHT, ale jeho cirkulujúce sérové koncentrácie sú nízke.

Biologická aktivita steroidných hormónov môže byť významne ovplyvnená aj malými zmenami v štruktúre molekuly, preto metabolizmus androgénov v cieľových tkanivách predstavuje jeden z mechanizmov kontroly pôsobenia pohlavných hormónov. Poruchy metabolizmu androgénov v cieľových tkanivách v dôsledku genetických defektov môžu byť príčinou rôznych ochorení. Napríklad jednou z príčin mužského pseudohermafroditizmu môže byť deficit *5 α -reduktázy*. Pacienti s týmto autozomálne recesívnym ochorením majú normálne plazmatické koncentrácie testosterónu, ktorý ale v dôsledku deficitu enzýmu nemôže byť v cieľových tkanivách premieňaný na aktívny metabolit, DHT. Jedným z dôsledkov tohto ochorenia je preto abnormálny vývin mužských genitálií.

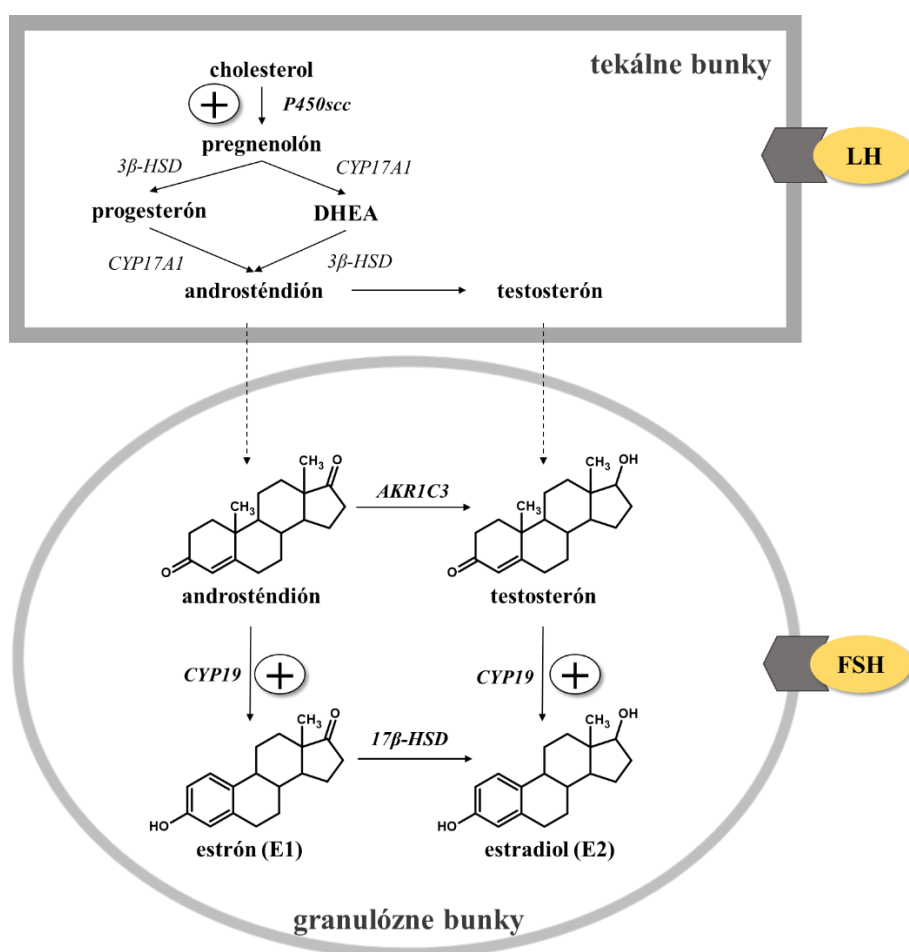
1.2.2 Biosyntéza estrogénov

Syntéza estrogénov, ženských pohlavných hormónov, je lokalizovaná predovšetkým vo vaječníkoch a počas tehotenstva v placentе. K syntéze estrogénov môže dochádzať aj v periférnych tkanivách z androgénových prekursorov.

Steroidogenéza vo vaječníkoch sa začína v tekálnych bunkách syntézou androsténdiónu. Androsténdión môže byť v tekálnych bunkách metabolizovaný na testosterón enzýmom *AKR1C3*, ktorý má *17 β -hydroxysteroiddehydrogenázovú* aktivitu, avšak väčšina androsténdiónu prechádza do granulóznych buniek, kde je pôsobením enzýmu *aromatáza* (*CYP19A1*) premieňaný na estrón (E1). Estrón je následne konvertovaný na estradiol (E2) enzýmom *17 β -HSD* (Obrázok 6). Testosterón vznikajúci v tekálnych bunkách

je tiež v granulóznych bunkách substrátom pre *aromatázu*, ktorá ho priamo premieňa na estradiol. Granulózne bunky exprimujú tiež enzým *estrogén sulfotransferáza (SULT1E1)*, ktorý katalyzuje sulfonyláciu estrónu, pričom vzniká estrón sulfát. Estradiol je hlavný produkt syntézy estrogénov počas folikulárnej fázy menštruačného cyklu. V luteálnej fáze cyklu je hlavným produktom steroidogenézy progesterón. Počas tehotenstva sa v placente syntetizuje estriol pomocou *16 α -hydroxylázy*.

Čo sa týka de novo syntézy pohlavných hormónov vo vaječníkoch je dôležité podotknúť, že vaječníky môžu pre syntézu pohlavných hormónov využívať aj DHEA a androsténdión, ktoré sa syntetizujú v kôre nadobličiek.



Obrázok 6: Biosyntéza estrogénov vo vaječníkoch.

Biosyntéza pohlavných hormónov vo vaječníkoch je rozdelená medzi tekálne bunky a granulózne bunky, ktoré exprimujú rôzny súbor enzýmov syntézy estrogénov. Luteinizačný hormón (LH) pôsobí na tekálne bunky vaječníkov, kde syntetizuje hlavne androsténdión a čiastočne testosterón, ktoré sú následne v granulóznych bunkách premieňané na estrón a estradiol. Granulózne bunky vaječníkov ovplyvňuje predovšetkým folikulostimulačný hormón (FSH), ktorý stimuluje predovšetkým *aromatázu* (CYP19).

Kľúčovým enzýmom v biosyntéze estrogénov je *aromatáza*. *Aromatáza* katalyzuje tri po sebe nasledujúce hydroxylačné reakcie C₁₉ steroidov s využitím troch koenzýmov NADPH a troch molekúl kyslíka za vzniku C₁₈ steroidnej štruktúry s aromatickým jadrom v A kruhu. Sekvencia troch reakcií prebieha v jednom aktívnom mieste enzýmu. Medzi endogénne substráty pre syntézu estrogénov *aromatázou* patria hlavne androstendión a testosterón. Substrátom pre *aromatázu* môže byť aj DHT, ktorý je však *aromatázou* len oxidovaný, ale nie aromatizovaný.

Aromatáza je mikrozómový enzým kódovaný génom *CYP19A1*, ktorý obsahuje viacero tkanivovo špecifických promótorov, ktoré sú regulované rôznymi mechanizmami. Expresia *aromatázy* je v ženskom organizme lokalizovaná predovšetkým vo vaječníkoch, ktoré produkujú veľké množstvá estrogénov s významnými lokálnymi účinkami a uvoľňujú estrogény do cirkulácie. *Aromatáza* je exprimovaná aj u mužov v semenníkoch, kde má dôležitú úlohu v normálnej spermatogéneze. K syntéze estrogénov však môže dochádzať aj v periférnych tkanivách exprimujúcich *aromatázu*, napríklad v tukovom tkanive, koži, kostnom tkanive alebo v mozgu. Biosyntéza estrogénov mimo pohlavných žliaz je však závislá na transporte androgénových prekursorov, keďže tieto tkanivá ich nie sú schopné syntetizovať z cholesterolu, a na ich následnej premene *aromatázou*, ktorá sa tvorí lokálne. Periférna produkcia estrogénov má veľký význam predovšetkým u žien po menopauze a u mužov. Zmeny expresie *aromatázy* boli zistené v rôznych typoch nádorov, medzi ktoré patria napríklad karcinóm prsníka, prostaty, endometria a iných, kde zvýšená expresia *aromatázy* vedie k intenzívnejšej syntéze estrogénov.

1.3 Transport pohlavných hormónov v organizme

Pohlavné hormóny sa po syntéze v nadobličkách a pohlavných žľazách uvoľňujú do krvného obehu. Z chemického hľadiska sú pohlavné hormóny steroidné, lipofilné molekuly, s veľmi nízkou rozpustnosťou vo vode. V telových tekutinách sa preto nachádzajú buď v konjugovanej forme (predovšetkým sulfonylované alebo glukuronidované), alebo v nekonjugovanej forme, naviazané na transportné proteíny. Steroidné hormóny sú na transportné proteíny naviazané nekovalentnými väzbami, čiže sú naviazané reverzibilne. Transport pohlavných hormónov do cieľových tkanív zabezpečuje pohlavné hormóny viažuci globulín (SHBG). SHBG je glykoproteín zložený z 373 aminokyselín a tvorí sa predovšetkým v pečeni, odkiaľ je uvoľňovaný do cirkulácie, kde viaže s vysokou afinitou testosterón

(65% - 78% testosterónu je v cirkulácii viazaného na SHBG) a s nižšou afinitou estradiol (30% - 50% estradiolu je v cirkulácii viazaného na SHBG). Významným regulátorom syntézy SHBG je inzulín. Okrem pečene dochádza k tvorbe SHBG aj v iných orgánoch, vrátane mozgu, maternice alebo semenníkov. Zvyšná časť pohlavných hormónov je v krvi transportovaná prevažne naviazaná na albumín, pričom naviazanie na albumín je v porovnaní s SHBG málo špecifické. Progesterón je v cirkulácii transportovaný predovšetkým naviazaný na albumín, ale čiastočne aj prostredníctvom transkortínu. Okrem transportu, špecifické transportné proteíny vytvárajú aj zásobu aktívnych hormónov a tiež ich chránia pred degradáciou enzýmami.

Časť pohlavných hormónov sa v cirkulácii nachádza aj vo voľnej forme (približne 1-10% celkovej koncentrácie v plazme) a predstavuje biologicky aktívnu frakciu - hormóny, ktoré môžu priamo pôsobiť, pretože len ako voľné môžu pohlavné hormóny voľne prechádzať cez bunkovú membránu.

1.3.1 Androgény v cirkulácii

Medzi androgény cirkulujúce v obehu patria jednak biologicky aktívne androgény, ale aj androgénové prekursor, ktoré vznikajú syntézou v kôre nadobličiek a v pohlavných žľazách. Okrem androgénov pochádzajúcich zo steroidogénnych orgánov sa v cirkulácii nachádzajú aj významné množstvá androgénových metabolitov vznikajúcich v periférnych tkanivách.

Najznámejším androgénom prítomným v cirkulácii u mužov aj žien je testosterón. Cirkulujúci testosterón je u mužov prítomný v približne 10-krát vyššej koncentrácii ako u žien a pochádza predovšetkým zo syntézy v semenníkoch. Nadobličky do cirkulácie poskytujú len malé množstvo testosterónu. Naopak u žien prispievajú nadobličky a vaječníky približne rovnakým dielom, každá z nich poskytuje do cirkulácii približne 25% testosterónu. Zvyšných 50% testosterónu pochádza z konverzie androgénových prekursorov v periférnych tkanivách. Väčšina biologicky aktívnych androgénov, testosterónu a DHT, sa v cirkulácii nachádza v nekonjugovanej forme naviazaná na pohlavné hormóny viažuci globulín (SHBG) alebo albumín, len malá časť (1-2%) cirkuluje neviazaná.

Medzi androgénové prekursor, ktoré sa nachádzajú v obehu patrí DHEA a jeho sulfonylovaný ester DHEAS, androsténdión, 11-hydroxyandrosténdión, androsténdiol a androsténdiol sulfát. Najväčšie zastúpenie z androgénov má v obehu DHEAS, ktorý sa ako jediná steroidná látka nachádza v obehu v mikromolárnych koncentráciách. U žien boli pozorované cyklické zmeny v koncentráciách testosterónu a androsténdiónu v priebehu menštruačného cyklu, pričom najvyššie koncentrácie sú uprostred cyklu.

Celková koncentrácia androgénov v cirkulácii neposkytuje presnú informáciu o ich biologickej aktivite a dostupnosti pre cieľové tkanivá, preto sa preferuje posudzovanie biologicky aktívnej frakcie androgénov v cirkulácii. Tzv. „voľná frakcia“ (androgény neviazané na proteíny) a „biologicky dostupná frakcia“ (androgény neviazané na proteíny alebo naviazané na albumín) môžu byť vypočítané z celkových koncentrácií androgénov, albumínu a SHBG.

1.3.2 Estrogény v cirkulácii

Primárne estrogény v cirkulácii sú estrón, estrón sulfát a 17 β -estradiol, ktorý predstavuje biologicky aktívnu formu. U žien pred menopauzou sú hlavným zdrojom týchto estrogénov vaječníky, k ich syntéze však dochádza aj v periférnych tkanivách exprimujúcich *aromatázu*, napríklad v tukovom tkanive. Syntéza estrogénov v periférnych tkanivách je zvlášť dôležitá pre ženy po menopauze a pre mužov. Estrogény tvorené v periférnych tkanivách pôsobia zvyčajne parakrinným a intrakrinným mechanizmom a preto cirkulujúce koncentrácie estrogénov nereflektujú lokálne koncentrácie. Hlavným estrogénom v cirkulácii je estrón sulfát, ktorý slúži ako zásobná forma pre tvorbu aktívnych estrogénov v cieľových tkanivách. Podobne ako u androgénov, aj väčšina nekonjugovaných estrogénov sa v cirkulácii viaže s vysokou afinitou na SHBG a s nízkou afinitou na albumín.

1.4 Metabolizmus pohlavných hormónov

Pohlavné hormóny sú z chemického hľadiska molekuly steroidnej štruktúry, na ktorej oxidáciu chýba v ľudskom organizme enzymatická výbava. Preto podobne, ako v prípade cholesterolu, je jediným možným spôsobom eliminácie ich premena na inaktívne, hydrofilné substráty, ktoré môžu byť efektívne vylúčené z organizmu močom alebo žlčou. Metabolizmus pohlavných hormónov prebieha prostredníctvom I. a II. fázy biotransformácie. V I. fáze biotransformácie dochádza k zmene ich biologickej aktivity a k pridaniu alebo odstráneniu funkčných skupín. V II. fáze biotransformácie prebiehajú konjugáčné reakcie, ktoré molekuly inaktivujú, dochádza k zvýšeniu ich polarita a rozpustnosti vo vode. Reakcie I. a II. fázy biotransformácie v organizme na seba zvyčajne nadväzujú. Steroidné molekuly však môžu byť aj priamo metabolizované enzýmami II. fázy biotransformácie, prípadne byť metabolizované enzýmami I. fázy až po konjugácii.

Centrálnu úlohu v biotransformácii pohlavných hormónov má pečeň a do určitej miery aj obličky. Množstvo periférnych tkanív však tiež obsahuje enzýmy potrebné pre metabolizmus pohlavných hormónov. Periférna expresia enzýmov metabolizmu umožňuje kontrolu lokálnych koncentrácií steroidných hormónov prostredníctvom aktivácie alebo inaktivácie prekursorov podľa špecifických potrieb jednotlivých tkanív.

1.4.1 I. fáza biotransformácie pohlavných hormónov

V závislosti na štruktúre hormónu môžu v I. fáze biotransformácie prebiehať nasledujúce reakcie:

1. redukčné reakcie v A-kruhu androgénov,
2. premeny 17 β -hydroxylovej skupiny na oxo skupinu,
3. hydroxylačné reakcie v rôznych pozíciách steroidnej štruktúry.

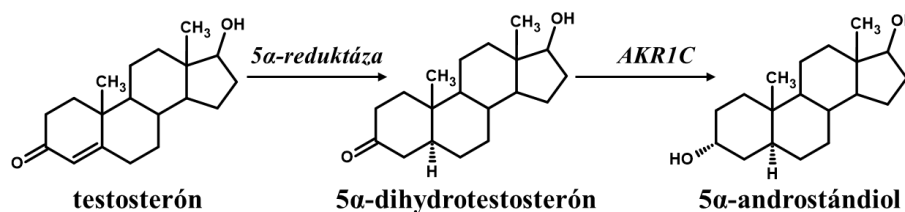
Redukčné reakcie v A-kruhu

Redukčné reakcie v A-kruhu predstavujú esenciálny krok kontroly periférnej aktivácie a inaktivácie androgénov. Redukcia v A-kruhu prebieha v dvoch krokoch. Prvá je redukcia dvojitej väzby na štvrtom uhlíku (C₄), po ktorej nasleduje redukcia 3-oxo skupiny na 3-hydroxylovú skupinu.

Redukcia dvojitej väzby v A-kruhu je ireverzibilná reakcia a prebieha stereošpecificky ako 5 α / β -redukcia. 5 α -redukcia je katalyzovaná 5 α -reduktázami (*SRD5A*), medzi ktoré patria tri izoenzýmy, z ktorých hlavne dva zabezpečujú v ľudskom organizme 5 α -redukciiu steroidov, *SRD2A1* a *SRD5A2* (Obrázok 7). Gén pre *SRD5A1* je lokalizovaný na chromozóme 5p15 a gén pre *SRD5A2* je lokalizovaný na chromozóme 2p23. Izoenzým *SRD5A2* je exprimovaný predovšetkým v tkanivách mužských pohlavných orgánov a prostate, kde katalyzuje premenu testosterónu na biologicky aktívny 5 α -DHT. Expresia izoenzýmu *SRD5A1* je lokalizovaná predovšetkým v pečeni, obličkách, koži a iných periférnych tkanivách. Hoci *SRD5A1* môže tiež tvoriť DHT, vzhľadom na tkanivovú distribúciu tohto izoenzýmu sa za jeho hlavnú funkciu považuje predovšetkým inaktivácia pohlavných hormónov.

Okrem 5 α -redukcie môže v organizme prebiehať aj 5 β -redukcia steroidov a žlčových kyselín, ktorá je katalyzovaná jediným enzýmom - *AKR1D1*, z rodiny *aldo-ketoreduktáz*, ktorý sa exprimuje primárne v pečeni. 5 β -redukciiou testosterónu vzniká 5 β -DHT, ktorý sa neviaže na androgénový receptor, nemá preto rovnaký účinok ako 5 α -DHT.

Druhý krok redukcie v A-kruhu, redukcia 3-oxo skupiny na 3-hydroxylovú skupinu, je katalyzovaná enzýmami z rodiny *aldo-ketoreduktáz*, konkrétne *AKR1C1*, *AKR1C2*, *AKR1C3* a *AKR1C4*. Jednotlivé izoenzýmy sú exprimované tkanivovo-špecificky v rôznych periférnych tkanivách, jedine *AKR1C4* je špecifický pre pečeň. Touto reakciou vznikajú biologicky neaktívne 3-hydroxy metabolity (Obrázok 7).



Obrázok 7: Redukcia testosterónu *5α-reduktázou* na *5α-dihydrotestosterón* s následnou redukciou enzýmami z rodiny *AKR1C* na *5α-androstándiol*.

Premeny 17β-hydroxylovej skupiny na oxo skupinu

Druhý typ reakcie I. fázy biotransformácie pohlavných hormónov, oxidáciu 17β-hydroxylovej skupiny, katalyzujú enzýmy z rodiny *17β-hydroxysteroiddehydrogenáz* (*17β-HSD*). Tieto enzýmy regulujú aktivitu androgénov a estrogénov vzájomnými premenami aktívnej formy hormónu obsahujúcej 17β-hydroxylovú skupinu a menej aktívnej formy obsahujúcej oxo skupinu na C₁₇. V nadobličkách, pohlavných žľazách a placentе, kde prebieha syntéza pohlavných hormónov, *17β-HSD* katalyzujú zvyčajne redukciu 17β-oxosteroidov na 17β-hydroxysteroidy, ktoré sú biologicky aktívnejšie. V cieľových tkanivách naopak katalyzujú oxidáciu 17β-hydroxysteroidov, čím ich inaktivujú. Vo všeobecnosti sú *17β-HSD* enzýmy multifunkčné, často majú prekrývajúcu sa substrátovú špecifickosť a expresiu, čo umožňuje ich vzájomné zastupovanie sa v prípade deficitu niektorého z enzýmov. Niektoré z týchto enzýmov napriek tomu fungujú ako dominantné katalyzátory pre určité reakcie metabolizmu androgénov a estrogénov. Doteraz bolo v ľudskom organizme identifikovaných 14 enzýmov s *17β-HSD* aktivitou, z ktorých viaceré katalyzujú reakcie metabolizmu pohlavných hormónov.

Enzým *HSD17B1* katalyzuje posledný krok v syntéze estrogénov, redukciu estrónu na estradiol. Exprimuje sa hlavne vo vaječníkoch, ale jeho zvýšená expresia bola zistená aj v bunkách karcinómu prsníka. *HSD17B2* je enzým endoplazmatického retikula, ktorý spôsobuje predovšetkým inaktiváciu hormónov. Katalyzuje oxidáciu testosterónu na androsténdión a oxidáciu estradiolu na estrón, čiže opačnú reakciu ako *HSD17B1*. Exprimuje

sa hlavne v pečeni, endometriu a endotelových bunkách veľkých ciev. *HSD17B3* katalyzuje posledný krok v syntéze androgénov v Leydigových bunkách semenníkov, redukciu androstendiónu na testosterón. V prípade absencie tohto enzýmu nie sú semenníky schopné premieňať androstendión na testosterón, čo vedie k mužskému pseudohermafroditizmu. *HSD17B5* patrí do rodiny *aldo-ketoreduktáz (AKR1C3)*. Okrem *17β-HSD* aktivity má aj *3α-HSD* a *20α-HSD* aktivitu. Môže premieňať androstendión na testosterón v tekálnych bunkách vaječníkov. Exprimuje sa tiež v prostate, prsnej žľaze a semenníkoch. *HSD17B6* katalyzuje premenu androstandiolu na DHT v prostate. *HSD17B7* má úlohu predovšetkým pri syntéze cholesterolu, ale prispieva tiež k tvorbe aktívnych estrogénov a k inaktivácii androgénov.

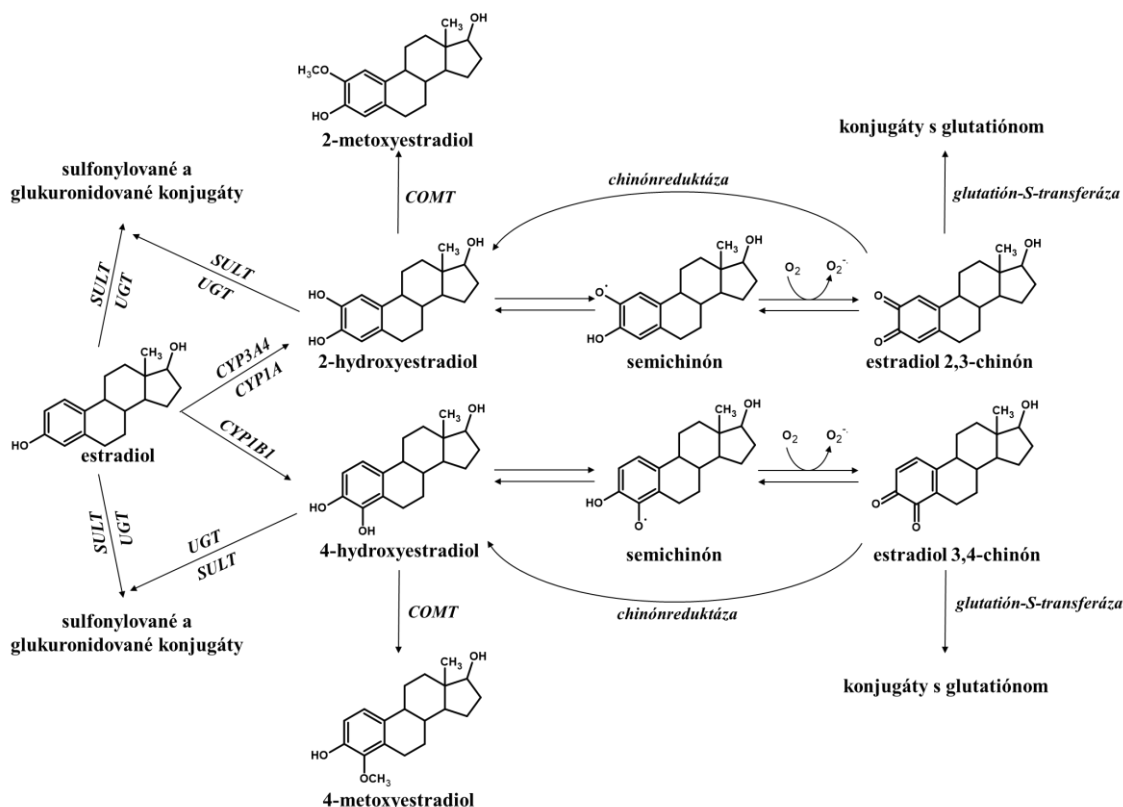
Hydroxylačné reakcie v rôznych pozíciách steroidnej štruktúry

Androgény a estrogény môžu byť hydroxylované v rôznych polohách enzýmami patriacimi do superrodiny *cytochrómov P450*. K expresii týchto enzýmov dochádza predovšetkým v pečeni, a preto práve v pečeni je lokalizovaný metabolizmus veľkej časti pohlavných hormónov.

Hydroxylačné reakcie estrogénov prebiehajú predovšetkým v pozíciách C₂ a C₄, pričom vznikajú 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol, 2-hydroxyestrón a 4-hydroxyestrón. Produkty, ktoré vznikajú týmito reakciami obsahujú v štruktúre na aromatickom jadre dve hydroxylové skupiny. Takéto štruktúry sa všeobecne označujú ako katecholové, preto sa produkty hydroxylácie estrogénov v pozíciách C₂ a C₄ označujú ako katecholestrogény. V pečeni katalyzujú 2-hydroxyláciu estrogénov predovšetkým enzýmy *CYP1A2* a *CYP3A4* (Obrázok 8). V extrahepatálnych tkanivách 2-hydroxyláciu estrogénov katalyzujú *CYP3A4* a *CYP1A1*, ktorý nie je exprimovaný v pečeni. Katalytickú aktivitu špecificky pre 4-hydroxyláciu estrogénov vykazuje enzým *CYP1B1*. Expresia *CYP1B1* bola zistená nielen v pečeni, ale aj v iných tkanivách, napríklad mliečnej žľaze, obličkách alebo v mozgu, kde preto tiež môže dochádzať k metabolizmu estradiolu a estrónu.

Katecholestrogény môžu v organizme pôsobiť ako genotoxické prokarcinogény a preto musia byť inaktivované reakciami II. fázy biotransformácie, ktoré sú popísané v kapitole 1.4.2. Ak nedôjde k inaktivácii katecholestrogénov v II. fáze biotransformácie, rýchlo sa oxidujú na semichinóny a chinóny. Oxidáciou 4-hydroxyestradiolu vznikajú veľmi reaktívne medziprodukty, schopné reagovať s purínovými bázami DNA, čo môže viesť k vzniku veľmi mutagénnych apurínových miest. Oxidáciou 2-hydroxyestradiolu vznikajú chinóny, ktoré

tvoria stabilné DNA adukty a majú preto nižšiu genotoxicitu. Chinóny môžu byť tiež premieňané späť na katecholestrogény pôsobením *chinónreduktáz* (predovšetkým *NQO1*). Semichinónové medziprodukty sú radikálové zlúčeniny, ktoré môžu reagovať s molekulovým kyslíkom za vzniku superoxidového radikálu, ktorý môže tiež spôsobovať peroxidáciu lipidov a poškodenie DNA (Obrázok 8).



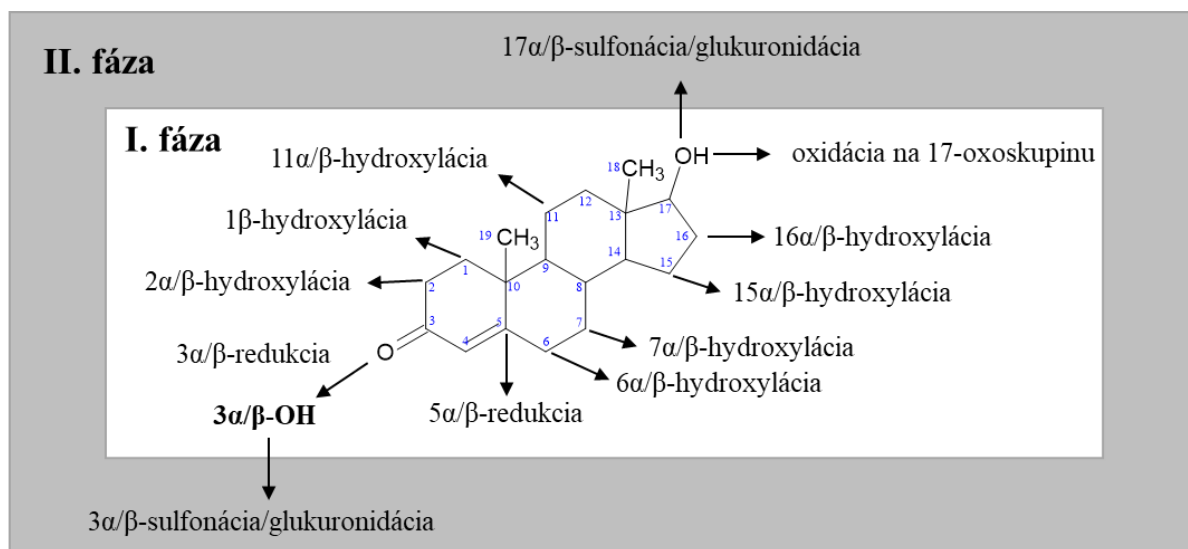
Obrázok 8: Prehľad metabolismu estradiolu.

Estradiol je v I. fáze biotransformácie hydroxylovaný predovšetkým v polohe C₂, enzýmami *CYP3A4*, *CYP1A1* a *CYP1A2*, za vzniku 2-hydroxyestradiolu a v polohe C₄, enzýmom *CYP1B1*, za vzniku 4-hydroxyestradiolu. 2-hydroxyestradiol a 4-hydroxyestradiol, nazývané tiež katecholestrogény, sú v II. fáze biotransformácie metabolizované enzýmom *katechol-O-metyltransferáza* (*COMT*) na 2-metoxysteradiol a 4-metoxysteradiol. Katecholestrogény môžu podliehať aj oxidácii na semichinóny až chinóny. Semichinónové medziprodukty sú radikálové zlúčeniny, ktoré môžu reagovať s molekulovým kyslíkom za vzniku superoxidového radikálu. Chinóny, vznikajúce oxidáciou katecholestrogénov, sú konjugované s glutatiónom enzýmami *glutathion-S-transferázami* a vo forme konjugátov vylučované z organizmu. Chinóny môžu byť tiež premieňané opäť na katecholestrogény pôsobením *chinónreduktáz*. V II. fáze biotransformácie sa polarita estradiolu, ale aj katecholestrogénov môže zvyšovať konjugáčnymi reakciami, sulfonyláciou *sulfotransferázami* (*SULT*) alebo glukuronidáciou pôsobením *UDP-glukuronyltransferáz* (*UGT*).

Okrem kvantitatívne dominantných 2- a 4-hydroxylačných reakcií môžu v malých množstvách v organizme vznikať aj 6 α -, 6 β -, 7 α -, 12 β -, 15 α -, 15 β -, 16 α - a 16 β -

hydroxyestrogény, ktorých vznik katalyzujú enzýmy *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2A6*, *CYP2A8*, *CYP3A4*, *CYP3A5* a *CYP3A7*.

Hydroxylácie v rôznych polohách štruktúry androgénov katalyzujú predovšetkým enzýmy z rodín *CYP1*, *CYP2*, *CYP3* a *CYP7* (Obrázok 9). V pečeni je z nich najviac zastúpený *CYP3A4*, ktorý katalyzuje 6 α -hydroxyláciu testosterónu a 16 α - a 7 α -hydroxyláciu DHEA.



Obrázok 9: Prehľad reakcií I. a II. fázy biotransformácie androgénov.

Reakcie I. fázy biotransformácie zahŕňajú 5 α / β -redukciu dvojitej väzby v A-kruhu, redukciu 3-oxoskupiny na 3-hydroxylovú a hydroxylácie v rôznych polohách štruktúry. Všetky reakcie I. fázy, okrem 5 α -redukcie, vedú k zníženiu aktivity. Reakcie II. fázy biotransformácie zahŕňajú konjugáciu 3- a 17-hydroxylových skupín. Na obrázku sú zosumarizované reakcie, ktorých substrátom môže byť testosterón, androstendión a DHEA.

1.4.2 II. fáza biotransformácie pohlavných hormónov

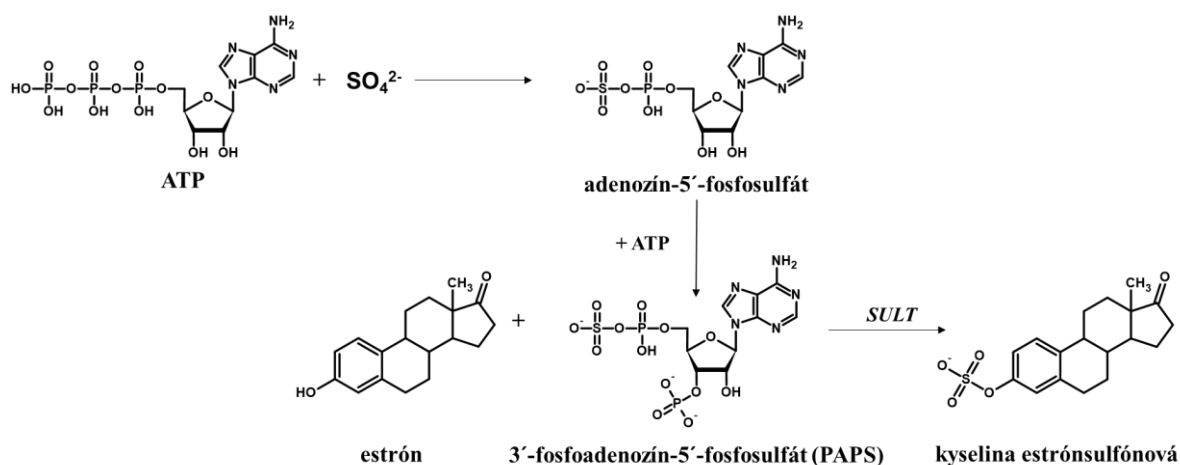
V rámci reakcií II. fázy biotransformácie sa polarita a rozpustnosť pohlavných hormónov zvyšuje konjugáciou, predovšetkým sulfonáciou a glukuronidáciou. Sulfonačné reakcie sú vratné a sulfónové kyseliny steroidov, ktoré pri nich vznikajú, môžu byť enzýmami sulfatázami premieňané späť na voľné steroidy. Naopak glukuronidácia je väčšinou nevratná reakcia. Sulfonačné reakcie prevládajú pri nízkej koncentrácii substrátov. Glukuronidačné reakcie prebiehajú, keď je kapacita sulfonačných reakcií saturovaná. Medzi ďalšie konjugačné reakcie II. fázy biotransformácie pohlavných hormónov patrí metylácia, konjugácia s glutatiónom a esterifikácia mastnými kyselinami.

Sulfonačné a desulfonačné reakcie

Sulfonačné a desulfonačné reakcie patria medzi kľúčové reakcie regulujúce účinok steroidných hormónov v rôznych tkanivách. Kontrolované sú dvomi rodinami enzýmov *sulfotransferázami* a *sulfatázami*.

Z chemického hľadiska dochádza pri sulfonačných reakciách k naviazaniu sulfonylovej skupiny (SO_3^-) na hydroxylovú skupinu steroidnej štruktúry, za vzniku derivátov nazývaných sulfónové kyseliny. Sulfonylová skupina sa môže naviazať na ktorúkoľvek hydroxylovú skupinu štruktúry, preto môžu vznikať rôzne typy sulfónových kyselín pohlavných hormónov. Pôvodne sa sulfónové kyseliny pohlavných hormónov považovali koncové produkty metabolizmu, keďže ich vyššia rozpustnosť vo vode urýchľuje ich vylúčenie z organizmu. Novšie výskumy však zistili, že napríklad kyselina DHEA sulfónová (DHEAS) alebo kyselina estrónsulfónová môžu slúžiť ako cirkulujúca zásoba pre periférnu tvorbu biologicky aktívnych hormónov.

Sulfonácia prebieha v dvoch na seba nadväzujúcich krokoch, katalyzovaných bifunkčným enzýmom *3'-fosfoadenozín-5'-fosfosulfátsyntázou* (PAPSS). V prvom kroku dochádza k reakcii anorganického sulfátu s adenzíntrifosfátom za vzniku adenzín-5'-fosfosulfátu, ktorý je následne fosforylovaný na 3'-fosfoadenozín-5'-fosfosulfát (PAPS). V druhom kroku je sulfonylová skupina prenášaná pomocou *sulfotranferáz* (SULT) na hydroxylovú skupinu steroidnej štruktúry (Obrázok 10). Sulfonácia steroidov prebieha prevažne na 3-hydroxylovej skupine.



Obrázok 10: Reakcie syntézy 3'-fosfoadenozín-5'-fosfosulfátu (PAPS), ktoré katalyzuje enzým *PAPS syntáza*, a následná sulfonácia estrónu *sulfotranferázou* za vzniku kyseliny estrónsulfónovej.

Hlavným zdrojom anorganického sulfátu pre sulfonačné reakcie je predovšetkým potrava a pitná voda, v menšom rozsahu tiež oxidácia aminokyselín cysteínu a metionínu. Enzymatická aktivácia sulfátu enzýmom *PAPSS* je vzhľadom na inertnosť sulfátového iónu esenciálnym krokom. Pre sulfonáciu steroidov je preto nevyhnutná koexpresia *SULT* enzýmov a *PAPSS*. V organizme sú prítomné dve izoformy *PAPSS*. Kým *PAPSS1* gén je exprimovaný univerzálne v tkanivách, *PAPSS2* je exprimovaný tkanivovo špecificky, predovšetkým v nadobličkách, hrubom čreve, pľúcach a v pečeni.

V ľudskom organizme zabezpečujú sulfonáciu steroidných hormónov hlavne štyri cytoplazmatické sulfotransferázy: *SULT1A1*, *SULT1E1*, *SULT2A1* a *SULT2B1a*. *SULT1A1* katalyzuje sulfonáciu spektra endogénnych a exogénnych látok, vrátane sulfonácie estradiolu. Enzým je lokalizovaný predovšetkým v pečeni, ale bol identifikovaný aj v mozgu, gastrointestinálnom trakte, nadobličkách, obličkách a pľúcach. *SULT1E1* má vysokú afinitu voči estradiolu a estrónu, ako aj voči rôznym syntetickým estrogénom, vrátane dietylstilbestrolu a tamoxifenu. Enzým je lokalizovaný hlavne v pľúcach, pečeni, svaloch, tukovom tkanive a maternici. *SULT2A1* katalyzuje sulfonáciu hydroxysteroidov, vrátane DHEA, androsterónu a pregnenolónu. Jej preferovaný substrát je však DHEA. Expresia *SULT2A1* bola zistená v pečeni, kôre nadobličiek, vaječníkoch, prostate, žalúdku a v čreve. Expresia *SULT2A1* v *zona reticularis* kôry nadobličiek je zodpovedná za masívnu produkciu DHEAS v tejto oblasti. *SULT2B1a* katalyzuje preferenčne sulfonáciu pregnenolónu. Expresia *SULT2B1a* bola zistená v kôre nadobličiek, placenty, vaječníkoch, prostate, pľúcach, obličkách a v hrubom čreve.

V prípade steroidných látok obsahujúcich dve hydroxylové skupiny, substrátová plasticita sulfotransferáz umožňuje aj sulfonáciu druhej hydroxylovej skupiny za vzniku bis-sulfonylovaných steroidov.

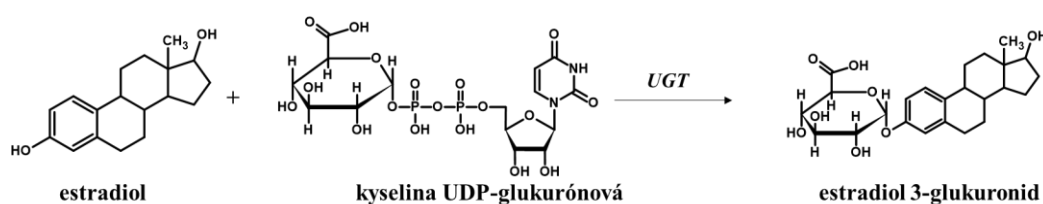
Sulfonačné reakcie patria medzi vratné reakcie. Biologicky aktívne nekonjugované steroidy môžu vznikáť z príslušných sulfónových kyselín prostredníctvom enzýmu *steroidnej sulfatázy* (*STS*). Hlavnými substrátmi *STS* sú sulfónové kyseliny estrónu, DHEA, pregnenolónu a cholesterolu. *STS* je lokalizovaná predovšetkým na membránach drsného endoplazmatického retikula a jej expresia bola zistená prakticky vo všetkých tkanivách organizmu. Aj napriek všeobecnému výskytu tohto enzýmu sa predpokladá, že expresia *STS* je regulovaná tkanivovo špecificky. Zvýšená expresia a aktivita *STS* bola zistená vo viacerých typoch nádorových tkanív, kde má úlohu pri zvyšovaní dostupnosti aktívnych hormónov podporujúcich rast nádorových buniek.

Glukuronidačné reakcie

Glukuronidačné reakcie sú katalyzované enzýmami zo superrodiny *UDP-glukuronyltransferáz (UGT)*, ktoré katalyzujú prenos glukurónovej skupiny z kyseliny UDP-glukurónovej na funkčnú skupinu (hydroxylovú) špecifického substrátu (Obrázok 11). Tieto enzýmy sú exprimované predovšetkým v pečeni, ale aj v iných extrahepatálnych tkanivách. Na rozdiel od sulfonačných reakcií sú glukuronidácie prevažne nevratné a vedú k inaktivácii pohlavných hormónov, zvýšením polarity a rozpustnosti vo vode uľahčujú aj ich vylúčenie močom.

Glukuronidácia androgénov je katalyzovaná predovšetkým enzýmami podrodiny *UGT2B*, predovšetkým *UGT2B7*, *UGT2B15* a *UGT2B17*. *UGT2B7* glukuroniduje len hydroxylovú skupinu v polohe C₃ 5 α -androstánov. *UGT2B7* najefektívnejšie glukuroniduje androsténdiol. *UGT2B15* katalyzuje konjugáciu 17-hydroxylovej skupiny testosterónu a DHT. *UGT2B15* je exprimovaná aj v tukovom tkanive, pričom jej najvyššia aktivita bola zistená u obéznych pacientov, čo môže prispievať k zvýšeným hladinám 3 α -androsténdiolglukuronidu pri obezite. *UGT2B17* katalyzuje konjugáciu 3 α -hydroxylovej skupiny testosterónu a DHT.

Glukuronidáciu estrogénov katalyzujú predovšetkým enzýmy podrodín *UGT1A* a *UGT2B7*. *UGT1A* izoformy zabezpečujú hlavne glukuronidáciu estrónu a 17 β -estradiolu. Estriol a 16 α -hydroxyestrón sú konjugované na 3-hydroxylovej skupine enzýmom *UGT1A10* a na 16 α -hydroxylovej skupine enzýmom *UGT2B7*. Katecholestrogény, vznikajúce v I. fáze biotransformácie estrogénov, môžu byť glukuronidované tiež v polohách C₂ a C₄.



Obrázok 11: Príklad glukuronidácie estradiolu *UDP-glukuronyltransferázou (UGT)* za vzniku estradiol 3-glukuronidu.

Metylačné reakcie

Metylačné reakcie majú významnú úlohu predovšetkým v II. fáze biotransformácie katecholestrogénov. Reakciu katalyzuje enzým *katechol-O-metyltransferáza (COMT)*, ktorý metyluje 2- a 4-hydroxyestrogény za vzniku 2- a 4-metoxiestrogénov, ktoré sú vylučované

z tela (Obrázok 8). Donorom metylovej skupiny v reakcii je S-adenozínmetionín, ktorý je syntetizovaný z metionínu a ATP. Metylácia katecholestrogénov enzýmom *COMT* predstavuje protektívny mechanizmus, ktorý zabraňuje ich oxidácii na semichinóny a chinóny, a tých ich cytotoxicite a genotoxicite. Najvyššia aktivita *COMT* bola v organizme zistená v pečeni, mozgu, obličkách, prsnej žľaze a v pľúcach, ale expresia *COMT* je prítomná vo väčšine tkanív. Deficit tohto enzýmu predstavuje rizikový faktor karcinogenézy.

Konjugácia s glutatiónom

Ak v organizme nedôjde k inaktivácii katecholestrogénov metyláciou enzýmom *COMT*, dochádza k ich oxidácii na semichinóny až chinóny. Hlavným detoxifikačným mechanizmom pre inaktiváciu chinónov je konjugácia s glutatiónom. Metabolická dráha začína dehydrogenáciou, po ktorej nasleduje konjugácia s glutatiónom s následnou extracelulárnou degradáciou glutatiónovej časti, čím vznikne cysteínový konjugát, ktorý je vylúčený z tela. V ľudskej plazme a moči boli detekované okrem konjugátov estrogénových chinónov aj cysteínové konjugáty androgénov a progesterónu. Konjugáciu s glutatiónom katalyzujú v organizme enzýmy z rodiny *glutatión-S-transferáz* (GST).

Esterifikácia s mastnými kyselinami

Prítomnosť pohlavných hormónov esterifikovaných mastnými kyselinami s dlhým reťazcom bola zistená v lipoproteínových časticiach v cirkulácii, v tkanivách syntetizujúcich pohlavné hormóny, ale aj v tukovom tkanive. Esterifikácia pohlavných hormónov môže byť katalyzovaná *lecitíncholesterolacyltransferázou* (*LCAT*), ktorá sa nachádza na lipoproteínových časticiach s vysokou hustotou (HDL). Takto sa môžu prenášať do iných lipoproteínových častíc a môžu byť vychytávané v periférnych tkanivách špecifickými receptormi. Pohlavné hormóny môžu byť esterifikované mastnými kyselinami aj priamo v periférnych tkanivách. Estery pohlavných hormónov môžu v organizme slúžiť ako zásobná forma aktívnych hormónov, ale môžu mať aj iné funkcie. V prípade 17-esterov estradiolu bola zistená napríklad antioxidačná aktivita. Esterifikácia mastnými kyselinami bola zistená aj v prípade pregnenolónu, DHEA, androstendiolu a testosterónu, ich fyziologický význam však nie je zatiaľ známy.

1.5 Exkrécia pohlavných hormónov

Pohlavné hormóny sú z organizmu vylučované predovšetkým vo forme konjugátov, a to hlavne močom, žľou a slinami. Vo všeobecnosti sú rýchlejšie vylučované glukuronidované konjugáty, ako sulfonylované. Približne 80% konjugovaných steroidov je vylučovaných močom. Vylučovanie nekonjugovaných steroidov v moči je nízke, len 5-10% všetkých steroidov v moči predstavujú nekonjugované steroidy.

Steroidné látky môžu byť v pečeni vylučované aj do žlče, avšak množstvo steroidov vylúčených stolicou je nízke, vzhľadom na ich reabsorpciu v čreve. Vyššia biliárna exkrécia bola zistená u estrogénov. Črevná mikroflóra má hydrolázovú aktivitu voči konjugátom steroidov, čo vedie k vyššiemu podielu nekonjugovaných steroidov v porovnaní so žľou a hydrolýza konjugátov tiež pravdepodobne napomáha reabsorpcii steroidov v čreve.

Steroidné látky sú vylučované aj do slín. Nekonjugované steroidy prechádzajú pasívnou difúziou cez membrány acinárnych buniek slinných žliaz. Ich koncentrácia v slinách poskytuje informáciu o ich koncentrácii v sére. Avšak, v rámci acinárnych buniek môže do určitej miery dochádzať k metabolizmu steroidov, čo môže ovplyvňovať ich koncentrácie v slinách. Do slín môžu pomocou ultrafiltrácie cez extracelulárny priestor medzi acinárnymi bunkami prechádzať aj konjugované steroidy (napr. DHEAS), pričom ich koncentrácia v slinách bude závislá od intenzity produkcie slín.

1.6 Mechanizmus pôsobenia pohlavných hormónov

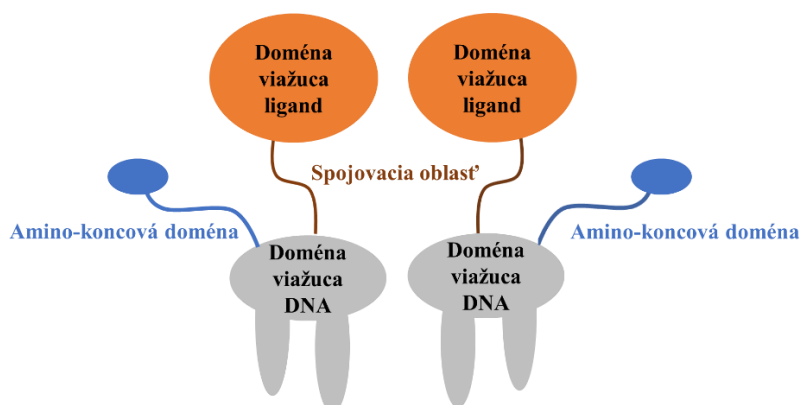
Schopnosť buniek reagovať na pohlavné hormóny je závislá predovšetkým od prítomnosti špecifických receptorov pre pohlavné hormóny, ktoré fungujú ako ligandom aktivované transkripčné faktory. Pohlavné hormóny, ktoré prechádzajú do buniek, sa viažu na príslušné receptory, čím dochádza k ovplyvneniu transkripcie cieľových génov. Takýto mechanizmus pôsobenia sa označuje ako genómový mechanizmus. Popísané bolo však aj pôsobenie prostredníctvom receptorov lokalizovaných na bunkovej membráne mechanizmom, pri ktorom nedochádza priamo k ovplyvneniu transkripcie génov. Takýto mechanizmus sa označuje ako negenómový mechanizmus, alebo mechanizmus nezávislý na transkripcii.

1.6.1 Receptory pre pohlavné hormóny

Receptory pre pohlavné hormóny patria do rodiny receptorov pre steroidné hormóny. Pred naviazaním ligandu sú receptory pre pohlavné hormóny lokalizované predovšetkým v cytoplazme buniek v neaktívnej forme v komplexoch so chaperónovými proteínmi. V bunkách boli identifikované tri hlavné typy receptorov pre pohlavné hormóny, a to androgénový receptor, estrogénové receptory (α a β) a progesterónový receptor.

Štruktúra receptorov pre pohlavné hormóny

Všetky typy receptorov pre pohlavné hormóny majú podobnú spoločnú štruktúru pozostávajúcu z domény na amino-konci receptora, domény viažucej DNA, spojovacej oblasti a domény viažucej ligand (Obrázok 12).



Obrázok 12: Schematické znázornenie štruktúry diméru receptorov pre pohlavné hormóny.

Doména na amino-konci receptora má funkciu predovšetkým v aktivácii transkripcie génov. V rámci tejto domény receptorov bola identifikovaná oblasť, ktorej funkciou je aktivácia transkripcie, označovaná ako AF-1. Táto oblasť predstavuje miesto interakcie receptorov s koregulátormi. Oblasť AF-1 reguluje transkripciu cieľových génov mechanizmom nezávislým na ligande. Domény na amino-konci receptorov vykazujú medzi receptormi pre pohlavné hormóny najväčšiu variabilitu.

Domény viažuce DNA predstavujú najviac konzervované oblasti medzi jednotlivými typmi receptorov pre pohlavné hormóny. Doména viažuca DNA obsahuje typickú štruktúru dvoch zinkových prstov, z ktorých každý je tvorený štyrmi cysteínovými zvyškami, ktoré koordinujú väzbou viažu ión zinku. Prvý zo zinkových prstov, obsahuje tzv. proximálny box,

ktorý má esenciálnu úlohu pri rozpoznávaní špecifických hormón responzívnych elementov v promótorových oblastiach cieľových génov, čo vedie k ovplyvneniu expresie génov, ako odpoveď na pôsobenie pohlavných hormónov. Prvý zinkový prst sa vsunie do veľkej jamky DNA a zabezpečí vytvorenie vodíkových mostíkov s negatívne nabitou DNA. Druhý zinkový prst obsahuje tzv. distálny box, ktorý interaguje s doménou viažucou DNA druhého receptora a má preto úlohu pri dimerizácii receptorov (Obrázok 13).



Obrázok 13: Štruktúra domén viažucich DNA diméru estrogénového receptora α a znázornenie interakcie s DNA (databanka proteínov - PDB ID: 1HCQ).

Jednotlivé monoméry diméru estrogénového receptora α sú na obrázku farebne odlišené zelenou a žltou farbou. Zinkové ióny v štruktúrach zinkových prstov sú znázornené bodkami. Jeden zinkový prst domény viažucej DNA obsahuje proximálny box, zabezpečujúci rozpoznávanie špecifických hormón responzívnych elementov v promótorových oblastiach cieľových génov. Druhý zinkový prst obsahuje distálny box ktorý interaguje s doménou viažucou DNA druhého receptora.

Za doménou viažucou DNA nasleduje spojovacia oblasť, ktorá obsahuje signalizačnú oblasť pre jadrovú lokalizáciu, zodpovednú za import receptora do jadra.

Na karboxylovom konci receptorov je lokalizovaná doména viažuca ligand. Je to oblasť naviazania hormónov. Doména viažuca ligand receptorov pre pohlavné hormóny pozostáva z 11 α -helixov, ktoré sú označované ako H1-H12 (neobsahujú helix H2) a niekoľkých krátkych β -vlákien. Doména viažuca ligand je usporiadaná do typickej trojvrstvovej sendvičovej štruktúry. Priestorovým usporiadaním helixov sa v štruktúre vytvára jamka viažuca ligand. Špecifickú úlohu v štruktúre má helix H12, ktorého funkciou je uzatvárať jamku viažucu ligand po naviazaní ligandu. V rámci domény viažucej ligand je lokalizovaná aj funkčná oblasť aktivácie transkripcie AF-2, ktorá na rozdiel od AF-1 vyžaduje prítomnosť ligandu. Doména viažuca ligand obsahuje aj oblasti viažuce koaktivátory a korepresory.

Presná štruktúra jednotlivých typov receptorov pre pohlavné hormóny bude detailne popísaná v kapitolách venovaných konkrétnym receptorom.

Genómový mechanizmus pôsobenia receptorov pre pohlavné hormóny

Ak nie je v bunke prítomný ligand – hormón, špecifické receptory pre pohlavné hormóny sú v cytoplazme prítomné v oligomérnych komplexoch so chaperónovými proteínmi, predovšetkým proteínom teplotného šoku 90 (Hsp90). Na stabilizáciu a usporiadanie komplexu receptora s Hsp90 sú potrebné aj ďalšie chaperónové proteíny, napríklad Hsp70, Hsp40 alebo p23. Vytvorenie komplexu s Hsp90 je nevyhnutné pre stabilizáciu receptorov v konformácii umožňujúcej nadviazať ligandu, tiež pre udržanie jeho rozpustnosti v bunkách, ale aj ako ochrana receptorov pred proteolytickou degradáciou. Okrem toho, kým je receptor v komplexe s Hsp90 nemôže pôsobiť ako transkripčný faktor a je udržiavaný v neaktívnej forme.

Pohlavné hormóny sa v cieľových bunkách viažu na príslušné špecifické receptory. Po nadviazaní hormónu na receptor dochádza ku konformačným zmenám domény viažucej ligand receptora, čo vedie k uvoľneniu receptora z komplexu s Hsp90 a vytváraniu homo- alebo heterodimérov, v závislosti na type receptora a nadviazaného ligandu. Dimerizácia dvoch monomérov receptorov je nevyhnutná pre ich funkčnosť. Konformačné zmeny receptorov spôsobené nadviazaním ligandu tiež umožňujú nadviazanie koaktivátorov, čím vzniká aktivovaný komplex. Medzi koaktivátory patria napríklad proteíny rodiny p160 koaktivátorov steroidných receptorov (SRC), medzi ktoré patria SRC-1 (NCOA-1), SRC-2 (GRIP1/TIF2/NCOA-2) a SRC-3 (AIB1/TRAM-1/ACTR/RAC3/PCIP), ktoré sú viac špecifické pre estrogénové a progesterónové receptory. Medzi koaktivátory špecifické pre androgénový receptor patria ARA70 a TBLR1. Konformačnou zmenou receptorov sa tiež sprístupní signálna oblasť pre jadrovú lokalizáciu a vzniknutý aktivovaný komplex môže prechádzať do jadra.

V jadre sa aktivovaný komplex viaže na špecifické hormón responzívne elementy v promótorových oblastiach cieľových génov, čím dochádza k aktivácii syntézy mRNA a následnej tvorbe proteínov, ktoré sú zodpovedné za zmeny vo funkcii, raste alebo diferenciácii buniek.

Receptory pre pohlavné hormóny môžu ovplyvňovať aj expresiu génov, ktoré nemajú hormón responzívne elementy v promótorových oblastiach, teda bez priameho nadviazania sa na DNA. V tomto prípade je expresia génov regulovaná interakciou aktivovaného komplexu s regulačnými proteínmi viazanými v promótorových oblastiach cieľových génov alebo tým, že receptory ovplyvnia pôsobenie iných transkripčných faktorov (Obrázok 14).

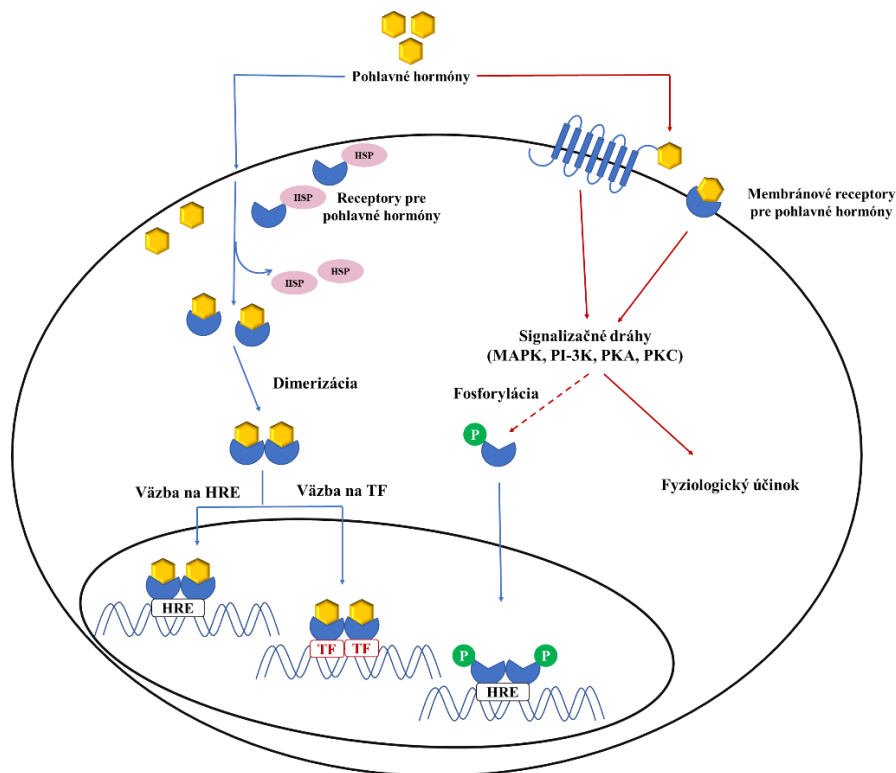
Mechanizmus pôsobenia receptorov pre pohlavné hormóny nezávislý na transkripcii

Podľa najnovších zistení môžu receptory pre pohlavné hormóny sprostredkovať aj aktiváciu rýchlych signalizačných kaskád. Takéto pôsobenie, označované ako negenómový mechanizmus alebo mechanizmus nezávislý na transkripcii, nevyžaduje translokáciu receptorov pre pohlavné hormóny do jadra, ani ich naviazanie na DNA. Takýto mechanizmus pôsobenia sprostredkovávajú predovšetkým receptory pre pohlavné hormóny lokalizované na plazmatickej membráne alebo v špecializovaných mikrodoménach (lipidových raftoch) lipidovej dvojvrstvy, ktoré sú obohatené o sfingolipidy, kaveolíny, kinázy z rodiny Src a G-proteíny (Obrázok 14).

Aktivované receptory pre pohlavné hormóny môžu sprostredkovať aktiváciu rôznych transdukčných dráh zahŕňajúcich napríklad aktiváciu G proteínu, mitogénom-aktivovanej proteín kinázy (MAPK), fosfatidylinozitol-3-kinázy (PI-3K)/Akt, Ras-Raf, proteínkinázy A (PKA) alebo proteínkinázy C (PKC). Popísaná je aj interakcia androgénového, estrogénového a progesterónového receptora s tyrozínkinázovou doménou Src, čo vedie k aktivácii mitogénom-aktivovanej proteín kinázovej (MAPK)/ extracelulárnym signálom regulovanej kinázovej (ERK-1/2) signalizačnej dráhy.

Väčšina pohlavných hormónov je v cirkulácii transportovaná vo väzbe na SHBG. Pohlavné hormóny naviazané na transportné proteíny však nemôžu voľne prechádzať bunkovou membránou. Objavený bol receptor pre SHBG (SHBGR), ktorý môže aktivovať signalizačné kaskády vedúce k fosforylácii receptorov pre pohlavné hormóny a ich koregulátorov, ktoré ovplyvňujú transkripčnú aktivitu receptorov pre pohlavné hormóny. Pre aktiváciu takejto signalizácie sa musí najskôr SHBG naviazať na SHBGR a následne musí dôjsť k naviazaniu hormónu. Ak sa hormón naviaže ako prvý, nemôže dôjsť k interakcii SHBG s SHBGR. Jedným z efektov sprostredkovaných SHBGR je zvýšenie intracelulárnej koncentrácie vápnika, čo aktivuje signalizačné kaskády vrátane PKA, PKC a MAPK.

Špecifická štruktúra, pôsobenie a funkcie jednotlivých receptorov pre pohlavné hormóny budú popísané samostatne v nasledujúcich kapitolách.



Obrázok 14: Schematické znázornenie genómového a negenómového pôsobenia receptorov pre pohlavné hormóny.

Receptory pre pohlavné hormóny po naviazaní hormónov vytvárajú diméry, ktoré sa viažu na hormón responzívne elementy (HRE) na DNA a iniciujú transkripciu cieľových génov. Receptory pre pohlavné hormóny môžu ovplyvňovať aj pôsobenie iných transkripčných faktorov (TF) alebo byť aktivované aj bez prítomnosti ligandu prostredníctvom fosforylácie. Negenómový mechanizmus pôsobenia sprostredkovávajú receptory na bunkovej membráne, ktoré po naviazaní hormónu aktivujú vnútrobunkové signalizačné dráhy, čím indukujú odpoveď bunky na pôsobenie hormónu. Okrem toho môžu indukovať aj fosforyláciu receptorov v cytoplazme a tak indukovať klasický genómový mechanizmus pôsobenia receptorov v jadre.

2 Androgénový receptor

Androgény pôsobia ako mužské pohlavné hormóny potrebné pre vývin mužského reprodukčného systému a sekundárnych pohlavných znakov. Súčasne však fungujú aj ako anabolické hormóny. Ich anabolické účinky na rôzne tkanivá, ako sú kosti, svaly a erytrocyty sú dlho známe. Biologická aktivita androgénov je sprostredkovaná predovšetkým ich interakciou s androgénovým receptorom, ktorý funguje ako ligandom aktivovaný transkripčný faktor, ktorý kontroluje expresiu špecifických génov. Expresia androgénového receptora bola zistená u širokého spektra tkanív. Androgény majú preto významný účinok na kosti, svaly, prostatu, tukové tkanivo a na reprodukčný, imunitný, kardiovaskulárny, nervový a hematopoetický systém.

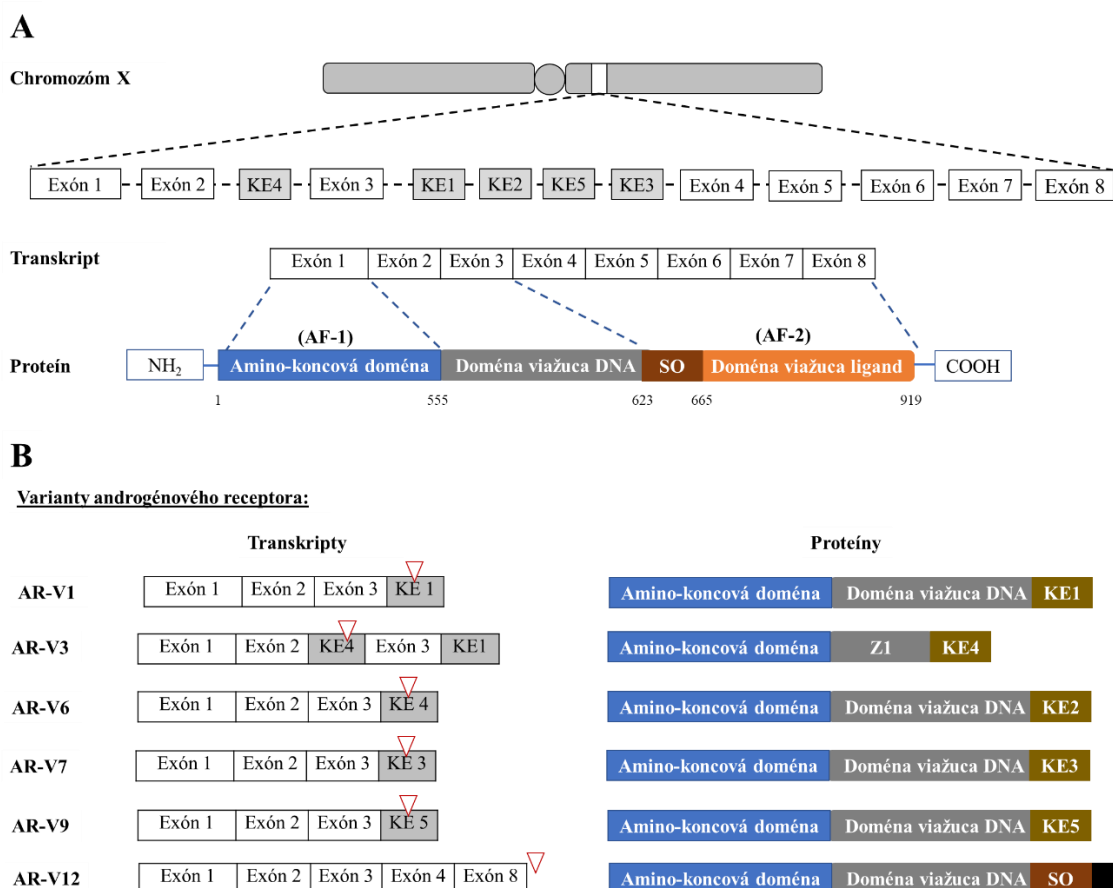
Androgénový receptor je kódovaný génom NR3C4 (jadrový receptor podrodiny 3, skupiny C, gén 4) lokalizovaným na X chromozóme v lokuse Xq11-q12. Proteín kódujúca oblasť má 2757 nukleotidov a pozostáva z 8 exónov. Expresia génu pre androgénový receptor je regulovaná jedným promótorom, ktorý obsahuje dva začiatky transkripcie vzdialené od seba 13 báz. Identifikované boli preto dve izoformy androgénového receptora. Izoforma A má 87 kDa, kým prevládajúca izoforma B (80%) má 110 kDa a 919 aminokyselín.

2.1 Štruktúra androgénového receptora

Štruktúra androgénového receptora zodpovedá základnej štruktúre receptorov pre pohlavné hormóny (Obrázok 15 A).

Doména na amino-konci androgénového receptora, ktorá predstavuje viac ako polovicu veľkosti receptora (aminokyseliny 1-555) a je kompletne kódovaná exónom 1, zdieľa 8,4% sekvenčnú homológiu s estrogénovým receptorom a 21,9% homológiu s progesterónovým receptorom. Doména na amino-konci androgénového receptora obsahuje dve homopolymérne oblasti - polyglutamínové (polyQ) a polyglycínové (polyG) fragmenty, s priemerným počtom 21 polyQ a 24 polyG opakovaní. Počet polyQ opakovaní má vplyv na zbalenie a konformáciu receptora, a tým aj na jeho transkripčnú aktivitu. Nižší počet opakovaní je spojený s vyššou transkripčnou aktivitou. V rámci amino-koncovej domény androgénového receptora je lokalizovaná na ligande nezávislá signálna oblasť AF-1, ktorá je nevyhnutná pre maximálnu aktivitu androgénového receptora. V AF-1 oblasti sú lokalizované aj dve jednotky aktivujúce transkripciu, Tau1 („transcription activation unit“) (aminokyseliny 110-370) a Tau5

(aminokyseliny 360-485) nevyhnutné pre sprostredkovanie interakcie medzi amino-koncovou doménou a doménou viažucou ligand androgénového receptora. Predstavujú tiež miesta pre naviazanie koregulátorov. Nízkomolekulové inhibítory zacielené na oblasť AF-1 sú preto schopné inhibovať aktivitu androgénového receptora.



Obrázok 15: Štruktúra génu pre androgénový receptor, usporiadanie funkčných domén receptora a prehľad klinicky významných variantov androgénového receptora.

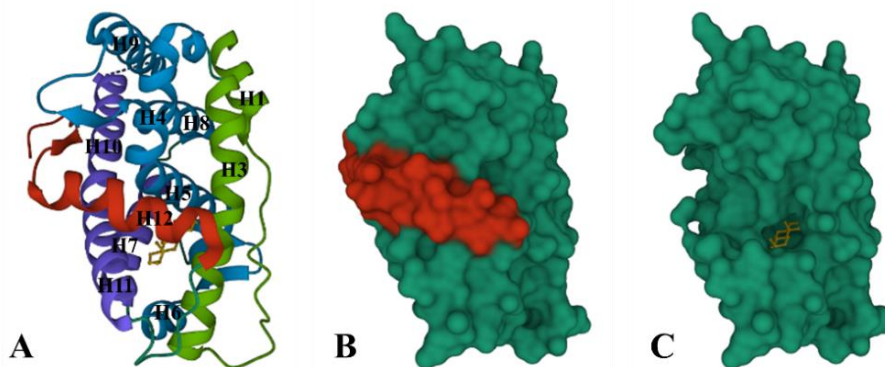
(A) Gén pre androgénový receptor je lokalizovaný na chromozóme X a je zložený z 8 exónov kódujúcich proteín. Znázornená je aj poloha kryptických exónov, ktoré vznikajú alternatívnym zostrihom. Amino-koncová doména receptora je kódovaná exónom 1, exóny 2 a 3 kódujú doménu viažucu DNA a exóny 4-8 kódujú spojovaciu oblasť a doménu viažucu ligand. (B) Alternatívnym zostrihom génu pre androgénový receptor môžu vznikať rôzne varianty androgénového receptora obsahujúce aj kryptické exóny. Znázornená je štruktúra transkriptov najvýznamnejších variantov androgénového receptora a ich zodpovedajúcich proteínov, ktoré vznikajú. Červenými šípkami je pri jednotlivých transkriptoch naznačená poloha stop kodónu ukončujúceho transláciu. AR-V – variant androgénového receptora; KE – kryptický exón; SO – spojovacia oblasť; Z1 – zinkový prst 1 domény viažucej DNA

Najviac konzervovanou doménou medzi receptormi pre pohlavné hormóny je doména viažuca DNA. Táto doména obsahuje motívy dvoch zinkových prstov, z ktorých každý je

tvorený štyrmi cysteínovými zvyškami, ktoré koordinujú ión zinku. Doménu viažucu DNA androgénového receptora tvoria aminokyseliny 556-623. Prvý zinkový prst obsahuje proximálny box (aminokyseliny 577-581, GSVK), ktorý sa vsunie do veľkej jamky DNA a má esenciálnu úlohu pri rozpoznávaní špecifických androgén responzívnych elementov. Druhý zinkový prst obsahuje distálny box (aminokyseliny 596-600, ASRND), ktorý interaguje s DNA viažucou doménou druhého androgénového receptora, má preto úlohu pri dimerizácii receptora.

Spojovacia oblasť androgénového receptora tvoria aminokyseliny 624 až 665. Medzi doménou viažucou DNA a spojovacou oblasťou je ešte lokalizovaná signálna oblasť pre jadrovú lokalizáciu (aminokyseliny 617-633), zodpovedná za import receptora do jadra. Spojovacia oblasť má okrem importu receptora do jadra aj regulačnú úlohu pri naviazaní na DNA a je tiež miestom posttranslačných modifikácií, medzi ktoré patrí acetylácia, metylácia, ubikvitinácia a fosforylácia.

Doména viažuca ligand androgénového receptora (aminokyseliny 666-919) pozostáva z 11 α -helixov (označovaných H1-H12) a štyroch krátkych β -vlákien, tvoriacich dva antiparalelné β -skladané listy (Obrázok 16).



Obrázok 16: Schematické znázornenie štruktúry domény viažucej ligand androgénového receptora v komplexe s DHT (databanka proteínov - PDB ID: 2AMA).

(A) Znázornenie usporiadania helixov domény viažucej ligand androgénového receptora. Helixy tvoriace jednotlivé vrstvy sendvičovej štruktúry sú farebne odlišné, pričom stredná vrstva je znázornená modrou farbou. Vonkajšie vrstvy majú zelenú a fialovú farbu. Helix12, ktorý má funkciu pri uzatváraní ligand viažucej jamky je vyznačený červenou farbou. Naviazaný ligand – DHT je na obrázku znázornený žltou farbou. (B) Priestorový 3D model štruktúry receptora, na ktorom je červenou vyznačený H12. (C) Priestorový 3D model štruktúry receptora po odstránení H12, na ktorom je možné vidieť DHT naviazaný v ligand viažucej jamke receptora.

Ligand viažuca doména je usporiadaná do typickej trojvrstvovej sendvičovej štruktúry. Helixy H1 a H3 tvoria prvú vrstvu α -helikálnej sendvičovej štruktúry. Podobne ako ostatné receptory pre pohlavné hormóny, ani androgénový receptor nemá helix H2. Stredná vrstva je

tvorená z helixov H4, H5, β -skladaného listu, H8 a H9. Tretiu vrstvu tvoria H6, H7, H10, H11 a druhý β -skladaný list. Priestorovým usporiadaním helixov dochádza k vytvoreniu ligand viažucej jamky, ktorá je ohraničená N-koncovými časťami helixov H3, H5 a H11. V rámci domény viažucej ligand je lokalizovaná aj funkčná oblasť AF-2, ktorá je tvorená helixami H3, H4 a H12. Helix H12 tvorí jadro funkčnej domény AF-2 a jeho funkciou je uzatvárať ligand viažucu jamku po naviazaní ligandu.

2.2 Varianty androgénového receptora

Transkripcia génu pre androgénový receptor je presne regulovaný proces. Množstvo mRNA, ktoré vzniká transkripciou génu pre androgénový receptor, je regulované pomocou 5'-promótor/supresorových elementov a regulačných oblastí v 3'-netranslatovanej oblasti, ktoré ovplyvňujú stabilitu transkriptu. Okrem toho androgénový receptor negatívnou spätnou väzbou inhibuje transkripciu vlastného génu tým, že sa aktívny homodimér androgénového receptora viaže na enhancerovú sekvenciu v intróne 2 génu pre androgénový receptor, čím spôsobí jeho inaktiváciu.

Identifikovaných bolo viac ako 30 rôznych variantov androgénového receptora vznikajúcich alternatívnym zostrihom mRNA. Najväčší klinický význam majú varianty androgénového receptora, ktorým chýba doména viažuca ligand na karboxylovom konci receptora, predovšetkým AR-V1, AR-V3, AR-V6, AR-V7, AR-V9 a AR-V12 (Obrázok 15 B). Tieto varianty androgénového receptora sú schopné iniciovať signalizačné dráhy, avšak bez potreby špecifického ligandu, čím sa vyhýbajú terapeutickému pôsobeniu.

Transkripcia niektorých génov regulovaných androgénovým receptorom, napríklad PSA, môže byť indukovaná aj kompletným androgénovým receptorom, ale aj variantami, ktorým chýba doména viažuca ligand. Varianty androgénového receptora bez domény viažucej ligand môžu však indukovať aj transkripciu iných génov ako kompletný androgénový receptor. Kompletný androgénový receptor indukuje hlavne transkripciu génov metabolizmu, sekrécie a diferenciácie. Najviac preštudovaný AR-V7 však ovplyvňuje hlavne transkripciu génov bunkového cyklu, napríklad UBE2C, ktorý má za úlohu indukciu proteolytickej degradácie cyklínov, a tým stimuluje progresiu bunkového cyklu. Otázny zostáva mechanizmus, akým môžu dva transkripčné faktory s identickými amino-koncovými doménami, ktoré majú úlohu v regulácii transkripčnej aktivity a identickými doménami viažucimi DNA indukovať transkripciu odlišných génov. Jedným z faktorov, ktoré môžu mať esenciálnu úlohu pre

aktiváciu transkripcie rôznych génov je FOXA1. Štúdiom signalizácie androgénového receptora boli identifikované tri triedy androgén responzívnych elementov:

- a) androgén responzívne elementy, ktoré sú nezávislé na FOXA1,
- b) androgén responzívne elementy, ktoré sú striktne závislé na FOXA1,
- c) androgén responzívne elementy, ktorých dostupnosť je inhibovaná FOXA1.

K interakcii medzi androgénovým receptorom a FOXA1 dochádza v prítomnosti androgénov – ligandov. Kritickú úlohu v tejto interakcii má preto pravdepodobne práve doména viažuca ligand. Varianty androgénového receptora bez domény viažucej ligand sú preto schopné indukovať transkripciu niektorých rovnakých génov, ako kompletný androgénový receptor (napr. TMPRSS2, PSA – obsahujúcich androgén responzívne elementy nezávislé na FOXA1), ale neindukujú transkripciu niektorých génov typicky indukovaných kompletným androgénovým receptorom (napr. RASSF3 – obsahujúcich androgén responzívne elementy striktne závislé na FOXA1) a môžu indukovať transkripciu niektorých génov, ktoré nie sú vôbec ovplyvňované kompletným androgénovým receptorom (napr. EDN2 – obsahujúcich androgén responzívne elementy inhibované FOXA1).

Otázny je stále aj presný mechanizmus, akým sa tieto varianty dostávajú do jadra, keďže im v sekvencii po alternatívnom zostrihu neostala sekvencia pre jadrovú lokalizáciu. Predpokladá sa, že môžu tvoriť heterodiméry s kompletným androgénovým receptorom alebo diméry s inými transkripčnými faktormi, napríklad s ZFX. Rôzne kombinácie heterodimérov môžu potom ovplyvňovať transkripciu rôznych génov. Ďalšou úrovňou pri zohľadňovaní klinického významu variantov androgénového receptora je aj skutočnosť, že androgénový receptor a jeho varianty môžu pôsobiť aj mechanizmom nezávislým na transkripcii a indukovať rýchle signalizačné kaskády.

Detekcia variantov androgénového receptora má význam predovšetkým u karcinómu prostaty. Zvýšená expresia AR-V7 bola zistená u kastračne rezistentného karcinómu prostaty a prítomnosť tohto proteínu bola pozorovaná vo väčšine metastáz karcinómu prostaty. Prítomnosť AR-V7 proteínu v cirkulujúcich nádorových bunkách pri karcinóme prostaty je spojená s progresiou ochorenia, zlou prognózou a ovplyvňuje aj odpoveď na podávanú terapiu. Pacienti s kastračne rezistentným karcinómom prostaty s AR-V7 pozitivitou v cirkulujúcich nádorových bunkách majú vyšší medián prežívania pri liečení chemoterapiou (taxánmi) v porovnaní s enzalutaminom alebo abirateronom. U pacientov s metastatickým kastračne rezistentným karcinómom prostaty bola zistená okrem AR-V7 aj expresia AR-V3 a AR-V9. Súčasná expresia AR-V7 a AR-V9 mRNA u týchto pacientov predikuje primárnu rezistenciu

voči abirateronu. Detekcia oboch proteínov, prípadne aj ďalších variantov androgénového receptora, má preto vyššiu prediktívnu hodnotu, ako analýza len jedného z nich.

2.3 Ligandy androgénových receptorov

Objavených alebo umelo nasyntetizovaných bolo veľké množstvo ligandov, ktoré sú schopné ovplyvňovať funkciu androgénového receptora naviazaním sa do ligand viažucej jamky domény viažucej ligand. Schopnosť androgénového receptora viazať množstvo rôznych ligandov je podmienená možnosťou meniť objem ligand viažucej jamky zmenou pozície a orientácie bočných reťazcov aminokyselín.

Na základe schopnosti ligandov aktivovať alebo inhibovať transkripciu génov regulovaných prostredníctvom androgénového receptora ich rozdeľujeme na agonistov a antagonistov.

Agonisti androgénového receptora

Hlavnými prirodzenými ligandami pre androgénový receptor sú endogénne androgény - testosterón a DHT. Testosterón a DHT v doméne viažucej ligand androgénového receptora tvoria štyri vodíkové väzby. Oxo-skupina na C₃ uhlíku interaguje s bočnými reťazcami aminokyselín Q711 a R752. Hydroxylová skupina na C₁₇ uhlíku interaguje s bočnými reťazcami aminokyselín N705 a T877. DHT na rozdiel od testosterónu nemá v A kruhu štruktúry dvojité väzby medzi C₄ a C₅ uhlíkmi, čo podmieňuje odlišné geometrické usporiadanie A-kruhu a odlišnú orientáciu oxo-skupiny na C₃ uhlíku, čím sa mení dĺžka a uhol vodíkovej väzby, ktorú táto skupina tvorí s aminokyselinou R752. V dôsledku toho sa DHT viaže na androgénový receptor s desaťkrát vyššou afinitou ako testosterón a 5-násobne sa tiež znižuje rýchlosť jeho disociácie z receptora. DHT je preto biologicky aktívnejší ako testosterón.

Antiandrogény

Medzi antiandrogény zaradujeme ligandy androgénového receptora, ktoré majú antagonistické účinky ako androgény, s ktorými súperia o naviazanie sa na androgénový receptor. Presný štruktúrny mechanizmus pôsobenia antagonistov androgénového receptora nie je zatiaľ známy. Predpokladá sa, že naviazaním antagonistu na receptor dochádza k zmene

pozície helixu H12, čím sa inhibuje naviazanie koaktivátorov receptora. Antiandrogény sú používané predovšetkým v terapii karcinómu prostaty.

Z chemického hľadiska môžu byť antiandrogény látky steroidnej, ale aj nesteroidnej štruktúry. Steroidné antiandrogény, vzhľadom na ich štruktúrnu podobnosť s androgénmi, môžu interagovať s androgénovým receptorom. Zistilo sa však, že môžu reagovať aj s inými receptormi pre steroidné látky. Majú preto veľmi limitované klinické využitie vzhľadom na ich nežiadúce vedľajšie účinky. Nesteroidné antiandrogény zaznamenali v terapii karcinómu prostaty veľký úspech. Prvá generácia nesteroidných antagonistov androgénového receptora (flutamid, nilutamid, R-bikalutamid) má relatívne nízku afinitu a nedokáže kompletne inhibovať signalizačné dráhy androgénového receptora. Klinicky sú používané v terapii pokročilého a metastatického karcinómu prostaty, často v kombinácii s antagonistami hormónu uvoľňujúceho luteinizačný hormón. Po určitom čase užívania však indukujú vznik rezistencie mutáciami androgénového receptora, voči ktorému môžu potom pôsobiť ako agonisti. Druhá generácia antagonistov (napr. enzalutamid) je oveľa účinnejšia. Bola však pozorovaná indukcia mutácii androgénového receptora aj podávaním druhej generácie antagonistov.

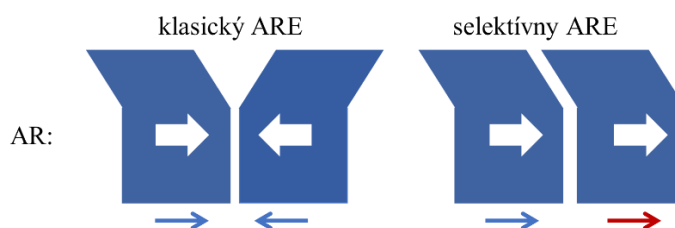
Nízkomolekulové ligandy môžu byť zacielené na miesta lokalizované takmer po celom androgénovom receptore, nielen na doménu viažucu ligand. Na potrebu vývoja nových antiandrogénov zacielených na iné oblasti receptora poukazuje identifikácia aktívnych štiepných variantov androgénového receptora, ktorým v štruktúre chýba práve doména viažuca ligand.

2.4 Signálne dráhy androgénového receptora

Biologický efekt androgénov prostredníctvom androgénového receptora je sprostredkovaný klasickým genómovým mechanizmom, ako aj mechanizmom nezávislým na transkripcii.

Ak nie je v bunke prítomný ligand, androgén, androgénový receptor je lokalizovaný v cytoplazme, ako monomér naviazaný na chaperónové proteíny (Hsp70, Hsp90, p23 a imunofilín). Naviazanie androgénu indukuje dimerizáciu receptora a vytvorenie aktivovaného komplexu, ktorý sa v jadre viaže na androgén responzívne elementy v promótorových oblastiach cieľových génov, čím dochádza k aktivácii klasického genómového mechanizmu pôsobenia, ako bolo popísané v predošlej kapitole (viď kapitola 1.6.1). DNA viažuce domény symetrických dimérov androgénového receptora rozpoznávajú klasické androgén responzívne elementy, čo sú sekvencie 5'-AGAACAnnnTCTTGT-3', pričom ako n sú označené akékoľvek

tri nukleotidy. Klasické androgén responzívne elementy tvoria dva hexaméry, ktoré majú navzájom opačnú orientáciu (Obrázok 17). Takéto responzívne elementy sú však rozpoznávané aj glukokortikoidovým, mineralokortikoidovým a progesterónovým receptorom. Špecifickosť pôsobenia je preto zabezpečená zapojením iných transkripčných faktorov a zosilovačov, ako aj tkanivovo špecifickou expresiou receptorov a tkavínovo špecifickým metabolizmom ligandov. Každý z týchto hormónov má však aj špecifické cieľové gény, a to aj v bunkách, ktoré exprimujú viaceré typy týchto receptorov. Identifikované tak boli aj selektívne androgén responzívne elementy, ktoré pozostávajú z hexaméru 5'-AGAACA-3', za ktorým po troch ľubovoľných nukleotidov nasleduje druhý hexamér, ktorého podobnosť s prvým hexamérom je nižšia ako v prípade klasického androgén responzívneho elementu a má paralelnú orientáciu, nie opačnú, ako to bolo v prípade klasického androgén responzívneho elementu.



Obrázok 17: Schematické znázornenie klasických a selektívnych androgén responzívnych elementov.

Klasické androgén responzívne elementy tvoria dva hexaméry 5'-AGAACA_{nnn}TCTTGT-3', pričom ako n sú označené akékoľvek tri nukleotidy, ktoré majú navzájom opačnú orientáciu. Takéto responzívne elementy sú však rozpoznávané aj glukokortikoidovým, mineralokortikoidovým a progesterónovým receptorom. Selektívne androgén responzívne elementy pozostávajú z hexaméru 5'-AGAACA-3', za ktorým po troch ľubovoľných nukleotidov nasleduje druhý hexamér, ktorého podobnosť s prvým hexamérom je nižšia, ako v prípade klasického androgén responzívneho elementu, a má paralelnú orientáciu.

Identifikované bolo veľké množstvo génov, ktoré sú regulované prostredníctvom androgénového receptora. Patria k nim napríklad KLK3, kódujúci prostatický špecifický antigén (PSA).

Androgénové receptory môžu ovplyvňovať transkripciu génov aj nepriamo, naviazaním sa alebo ovplyvnením iných transkripčných faktorov, napríklad aktivačného proteínu 1 (AP-1).

K aktivácii androgénových receptorov môže dochádzať aj nezávisle na naviazaní ligandu, predovšetkým fosforyláciou androgénových receptorov a ich následnou interakciou s koaktivátormi. Príkladom takého mechanizmu je aktivácia androgénových receptorov interleukínom 6 prostredníctvom proteín kinázy A, proteín kinázy C a MAPK dráhy. Aktivácia androgénového receptora nezávislá na ligande predstavuje jeden z mechanizmov vzniku hormonálnej rezistencie pri karcinóme prostaty. Aktivované androgénové receptory bez

naviazaného ligandu pravdepodobne regulujú inú skupinu génov, ako androgénové receptory s naviazaným ligandom.

Komplex androgénového receptora s androgénom môže tiež indukovať pôsobenie mechanizmom nezávislým na transkripcii, aktiváciou ERK, Akt a MAPK signalizačných dráh. K takémuto pôsobeniu androgénov dochádza v priebehu sekúnd až minút. Prebiehajú teda príliš rýchlo, aby boli sprostredkované zmenami transkripcie cieľových génov. Napríklad spojenie AR s c-Src je zodpovedné za rýchlu aktiváciu predovšetkým MAPK/ERK dráhy, s následnou translokáciou aktivovaného ERK-1/2 do jadra a fosforyláciou transkripčných faktorov, ktoré môžu ovplyvňovať expresiu génov kontrolujúcich bunkovú proliferáciu.

Zistilo sa, že pôsobenie androgénov mechanizmom nezávislým na transkripcii môže byť čiastočne sprostredkované aktiváciou androgénových receptorov viazaných na bunkovej membráne. Na ukotvení androgénového receptora na bunkovú membránu môže napríklad participovať filamín A, aktín viažuci proteín, ktorý zabezpečuje zosieťovanie aktínových vlákien v cytoplazme. Pôsobenie androgénov mechanizmom nezávislým na transkripcii môže byť sprostredkované aj inými typmi membránových receptorov. Železom regulovaný transportér podobný proteín 9 (ZIP9) sprostredkováva androgénmi indukovanú apoptózu folikulových buniek vaječníkov, ale aj nádorových buniek prostaty a prsníka. S G proteínom spojený receptor GPRC6A sprostredkováva účinok testosterónu na fosforyláciu ERK buniek karcinómu prostaty.

2.5 Mutácie a génové polymorfizmy androgénového receptora

Vzhľadom na lokalizáciu génu pre androgénový receptor na X-chromozóme, je jeho expresia u mužov monoalelová. Akákoľvek funkčná mutácia génu pre androgénový receptor bude preto u mužov spojená so zmenou fenotypu.

Doteraz bolo identifikovaných veľké množstvo rôznych mutácií génu pre androgénový receptor, ktoré majú vplyv na funkčnosť a aktivitu androgénového receptora. U niektorých z nich bola zistená asociácia so zvýšeným rizikom vzniku určitých ochorení, napríklad bulbospinálnej svalovej atrofie (Kennedyho choroba) alebo rôznych onkologických ochorení. Androgénový receptor a jeho mutácie sú intenzívne študované predovšetkým pri karcinóme prostaty. Hoci sa mutácie androgénového receptora vyskytujú len veľmi zriedkavo v skorých štádiách karcinómu prostaty, sú detegované približne u 10-30% pacientov s kastračne rezistentným karcinómom prostaty.

V géne pre androgénový receptor boli identifikované predovšetkým štyri typy mutácií, ktoré môžu viesť k zmenenej funkcii receptora:

- a) bodové mutácie vedúce k zámene aminokyseliny alebo vzniku stop kodónu,
- b) inzercie alebo delécie nukleotidov vedúce k posunu čítacieho rámca,
- c) čiastočné alebo kompletne delécie génu,
- d) intrónové mutácie spôsobujúce alternatívny zostrih.

Najčastejšie sa vyskytujú bodové mutácie vedúce k zámene aminokyselín. Približne 45% popísaných bodových mutácií androgénového receptora identifikovaných u pacientov s karcinómom prostaty je lokalizovaných v oblastiach kódujúcich doménu viažucu ligand. Spoločným znakom týchto mutácií je, že väčšinou modifikujú aminokyseliny tvoriace ligand viažucu jamku. V dôsledku týchto mutácií sa rozširuje spektrum ligandov, ktoré sú androgénovým receptorom rozpoznávané. Umožňujú napríklad interakciu androgénového receptora aj s inými pohlavnými hormónmi, napríklad s progesterónom alebo estrogénmi. Niektoré z mutácií v tejto oblasti môžu spôsobovať, že androgénový receptor bude aktivovaný aj antiandrogénmi a vedú k vzniku rezistencie na antiandrogény používané v terapii. Prvou mutáciou identifikovanou v tejto oblasti u pacientov s karcinómom prostaty bola zámene treonínu 877 za alanín (T877A). Treonín 877 v ligand viažucej jamke androgénového receptora tvorí vodíkovú väzbu so 17-hydroxylovou skupinou prirodzených ligandov, predovšetkým DHT. Zámene za menší alanín ovplyvňuje veľkosť a konformáciu jamky, takže aj iné ligandy môžu aktivovať receptor. V dôsledku vzniku tejto mutácie môže dochádzať k stimulácii rastu nádoru antiandrogénmi používanými v terapii. Ďalšou významnou mutáciou je zámene leucínu 701 za histidín (L701H), pri ktorej je androgénový receptor aktivovaný inými cirkulujúcimi steroidmi, ako napríklad glukokortikoidmi, kortizolom a kortizónom.

Najnižší počet bodových mutácií bol zistený v oblastiach kódujúcich doménu viažucu DNA. Najviac študovanou je zámene treonínu 575 za alanín, v oblasti kódujúcej prvý zinkový prst, ktorá stimuluje naviazanie androgénového receptora na nešpecifické androgén responzívne elementy. Táto mutácia bola nájdená na rovnakých transkriptoch ako mutácia T877A v doméne viažucej ligand, ktorá umožňuje aktiváciu abnormálnymi ligandami.

Približne 30% bodových mutácií u pacientov s karcinómom prostaty je lokalizovaných v exóne 1, ktorý kóduje doménu na amino-konci receptora. Väčšina týchto mutácií býva zistená po podaní terapie potláčajúcej androgény. V exóne 1 je lokalizovaný aj najviac sledovaný génový polymorfizmus androgénového receptora. Tento polymorfizmus je spojený

s variabilným počtom opakovaní CAG tripletu, ktorý kóduje glutamín. Najčastejšie bolo zistených 11 až 38 opakovaní CAG tripletu. Počet polyglutamínových opakovaní má vplyv na celú štruktúru androgénového receptora. Nižší počet opakovaní je spojený s intenzívnejšími interakciami medzi amino- a karboxylovým koncom receptora, čo umožňuje odpoveď na nižšie koncentrácie androgénov a efektívnejšiu aktiváciu receptora. Nižší počet CAG opakovaní by preto mohol mať vplyv na vyššie riziko karcinómu prostaty, progresiu ochorenia alebo odpoveď na terapiu. Naopak viac ako 40 CAG opakovaní bolo zistených u pacientov s bulbospinálnou svalovou atrofiou. U žien bola zistená asociácia nižšieho počtu CAG opakovaní s hirsutizmom, alopeciou a akné. Vyšší počet opakovaní je u žien spojený s nižším vekom pri diagnóze karcinómu prsníka.

V exóne 1 je lokalizovaný aj druhý polymorfizmus spojený s variabilným počtom opakovaní GGC tripletu, ktorý kóduje glycín. U pacientov s karcinómom prostaty bola zistená významne vyššia frekvencia výskytu menej ako 16 opakovaní tohto tripletu v porovnaní s kontrolnou skupinou.

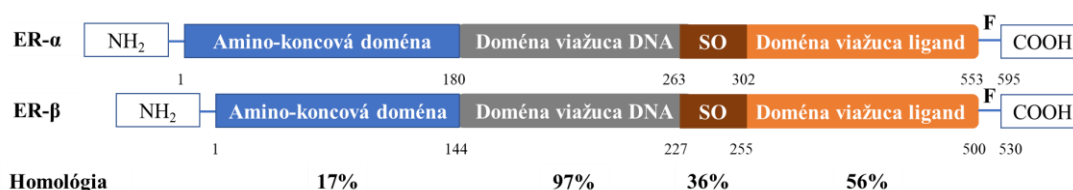
3 Estrogénové receptory

Estrogény sú tradične považované za ženské pohlavné hormóny, majú však úlohu v regulácii mnohých fyziologických a patologických procesov. Estrogény a ich receptory majú vplyv nielen na reprodukčný systém, ale môžu ovplyvňovať diferenciáciu, metabolizmus, proliferáciu a majú úlohu aj v patologických procesoch, ako napríklad karcinóm prsníka a endometria alebo osteoporóza. Estrogény pôsobia prostredníctvom interakcie s estrogénovými receptormi, ktoré fungujú ako ligandom aktivované transkripčné faktory.

Identifikované boli dva hlavné podtypy estrogénových receptorov, ktoré sa označujú ako estrogénový receptor α (ER- α), kódovaný génom *ESR1*, a estrogénový receptor β (ER- β), kódovaný génom *ESR2*. Gén kódujúci ER- α (*ESR1*) je lokalizovaný na chromozóme 6q25.1 a je zložený z 8 exónov. Kódujúca oblasť génu má dĺžku 1785 nukleotidov a je translatovaná na proteín obsahujúci 595 aminokyselín. Expresia ER- α bola zistená v rôznych tkanivách a bunkách, napríklad v maternici, stróme prostaty, tekálnych bunkách vaječníkov, Leydigových bunkách semenníkov, kostiach, prsnej žľaze, rôznych častiach mozgu, pečeni a v tukovom tkanive. Gén kódujúci ER- β (*ESR2*) je lokalizovaný na chromozóme 14q23.1. a pozostáva z 8 exónov, ktoré kódujú proteín dlhý 530 aminokyselín. Expresia ER- β bola zistená hlavne v hrubom čreve, epitelových bunkách prostaty, semenníkoch, granulóznych bunkách vaječníkov, kostnej dreni, slinných žľazách, vaskulárnych endotelových bunkách, ale aj v niektorých častiach mozgu.

3.1 Štruktúra estrogénových receptorov

Dva podtypy estrogénových receptorov sú charakterizované rôznou tkanivovou distribúciou, väzbovou afinitou voči ligandom a rôznym vplyvom na transkripciu génov. Funkčné domény receptorov ER- α a ER- β sú však usporiadané podobne (Obrázok 18) a zodpovedajú spoločnej základnej štruktúre receptorov pre pohlavné hormóny.



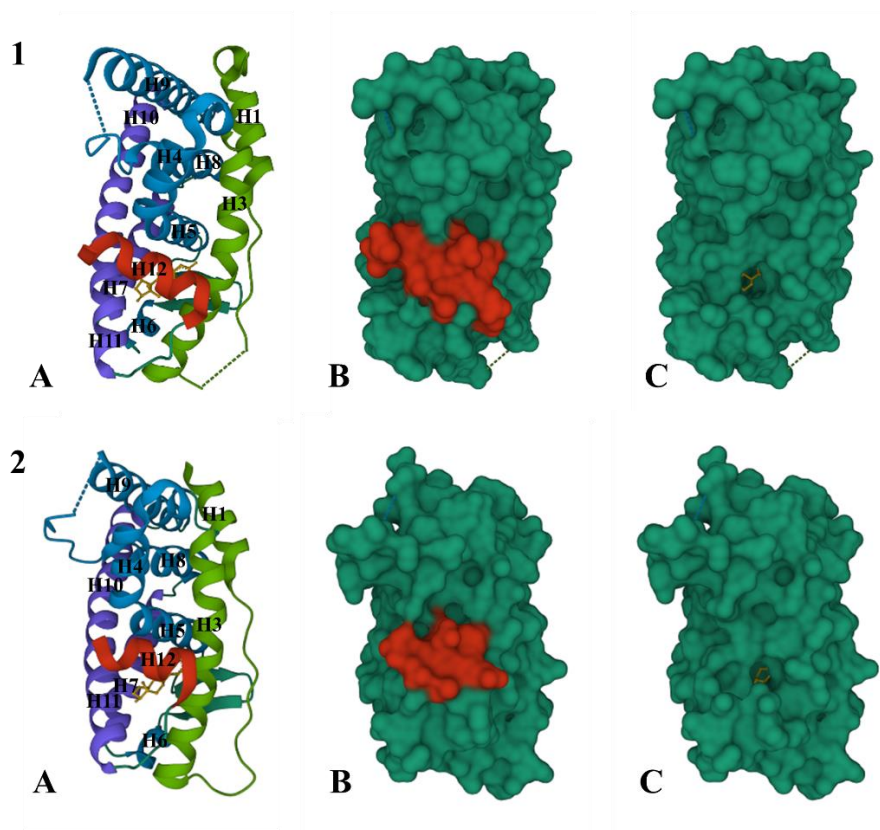
Obrázok 18: Schematické znázornenie domén ER- α a ER- β a ich vzájomnej homológie.
SO – spojovacia oblasť; F – doména na karboxylovom konci receptorov

Domény na amino-konci vykazujú medzi podtypmi estrogénových receptorov len okolo 17% homológiu. Samotná regulačná oblasť AF-1, ovplyvňujúca transkripciu cieľových génov mechanizmom nezávislým na ligande, lokalizovaná v tejto doméne, vykazuje medzi dvomi podtypmi receptorov približne 30% homológiu. ER- α a ER- β preto pravdepodobne regulujú expresiu cieľových génov rozdielnymi signálnymi dráhami. Funkčné štúdie ukázali, že AF-1 oblasť ER- β má represívnu funkciu a znižuje transkripčnú aktivitu ER- β .

Domény viažuce DNA oboch receptorov vykazujú až 97% homológiu. Oba podtypy estrogénových receptorov môžu preto pravdepodobne ovplyvňovať expresiu rovnakých génov. Štruktúra domény viažucej DNA je ako u všetkých receptorov pre pohlavné hormóny typická motívom dvoch zinkových prstov. Aminokyseliny tvoriace proximálny box na prvom zinkovom prste zabezpečujú interakciu s estrogén responzívnymi elementami na DNA. Aminokyseliny tvoriace distálny box druhého zinkového prsta prispievajú k dimerizácii receptorov.

Medzi doménou viažucou DNA a doménou viažucou ligand je lokalizovaná spojovacia oblasť, ktorá obsahuje signálnu oblasť pre jadrovú lokalizáciu. Na túto oblasť receptorov sa môžu viazať chaperónové bielkoviny umožňujúce translokáciu komplexu ligand-receptor do jadra. Táto doména estrogénových receptorov obsahuje serín (Ser305), ktorý môže podliehať fosforylácii.

Domény viažuce ligand estrogénových receptorov sú tvorené 11 helixami (H1-H12) usporiadanými do trojvrstvovej sendvičovej štruktúry, typickej pre receptory pre pohlavné hormóny (Obrázok 19). Helixy H4, H5, H6, H8 a H9 tvoria strednú vrstvu ohraničenú z jednej strany helixami H1 a H3 a z druhej strany H7, H10 a H11. Ligand viažuca jamka, ktorá je súčasťou tejto domény je z jednej strany uzatvorená antiparalelným β -skladaným listom a z druhej strany helixom H12. Ligand viažuce domény, obsahujúce regulačnú oblasť AF-2, vykazujú len približne 56% homológiu medzi dvomi podtypmi estrogénových receptorov, čo vedie k významným rozdielom v afinite receptorov voči ligandom, vrátane estrogénov, fytoestrogénov alebo terapeutických estrogénov. Dôvodom rozdielnej afinity ER- α a ER- β k ligandom môže byť aj skutočnosť, že ER- β má v dôsledku rozdielnej sekvencie menšie rozmery hydrofóbnej jamky ligand viažucej domény. Táto skutočnosť umožnila vývoj selektívnych antiestrogénov. ER- α vykazuje vyššiu afinitu k 17 β -estradiolu, kým ER- β má vyššiu afinitu k rôznym xenoestrogénom a fytoestrogénom. Regulačná oblasť AF-2 lokalizovaná v tejto doméne vykazuje medzi podtypmi estrogénových receptorov len 18% homológiu.



Obrázok 19: Kryštalografická štruktúra ligand viažucej domény estrogénového receptora α (1) (databanka proteínov - PDB ID: 1GWR) a estrogénového receptora β (2) (databanka proteínov - PDB ID: 3OLS) v komplexe s estradiolom.

(A) Znáozornenie usporiadania helixov domény viažucej ligand receptorov. Helixy tvoriace jednotlivé vrstvy sendvičovej štruktúry sú farebne odlišené, pričom stredná vrstva je znázornená modrou farbou. Vonkajšie vrstvy majú zelenú a fialovú farbu. Helix12, ktorý má funkciu pri uzatváraní ligand viažucej jamky je vyznačený červenou farbou. Naviazaný ligand – estradiol je na obrázku znázornený žltou farbou. (B) Priestorový 3D model štruktúry receptora, na ktorom je červenou vyznačený H12. (C) Priestorový 3D model štruktúry receptora po odstránení H12, na ktorom je možné vidieť estradiol naviazaný v ligand viažucej jamke receptora.

Estrogénové receptory na rozdiel od ostatných receptorov pre pohlavné hormóny obsahujú v štruktúre aj piatu doménu na karboxylovom konci, označovanú ako F doména. Presná funkcia tejto domény nie je stále známa.

3.2 Varianty estrogénových receptorov

Transkripciu *ESR1* génu, ktorý kóduje ER- α môže ovplyvňovať sedem promótorov, ktoré sú lokalizované pred prvým kódujúcim exónom. Zloženie promótorov je kriticky dôležité pre tkavínovo-spezifickú expresiu *ESR1* génu. Hoci rôzne promótorové oblasti vedú k vytvoreniu rôznych transkripčných variantov, tie sa však odlišujú len ich 5'-netranslatovanými oblasťami, všetky teda kódujú kompletný ER- α proteín s dĺžkou 66 kDa. Podobne aj promótorová oblasť *ESR2* génu, kódujúceho ER- β , obsahuje rôzne regulačné oblasti, ktoré dávajú vznik najmenej

siedmym transkripčným variantom, ktoré sa však tiež odlišujú len dĺžkou 5'-netranslatovanej oblasti.

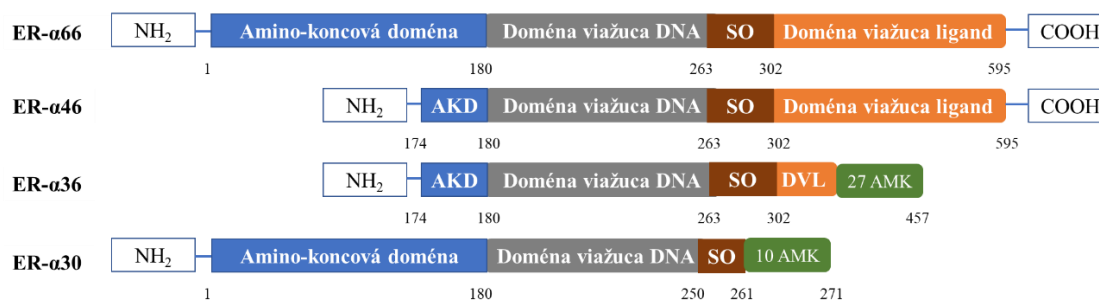
Alternatívnym zostrihom primárneho transkriptu dochádza k vzniku veľkého počtu mRNA štiepných variantov, ktorých expresia bola zistená v rôznych typoch zdravých tkanív (v endometriu, prsnej žľaze, hladkých svaloch,...), ale aj v nádorových tkanivách.

Alternatívny zostrih a rozdielne miesta iniciácie translácie podmieňujú vznik rôznych izoform ER- α a ER- β proteínov. Tieto izoformy estrogénových receptorov boli pozorované v normálnych, ale aj neoplastických tkanivách a môžu ovplyvňovať biologickú odpoveď na pôsobenie estrogénov, keďže môžu tvoriť nielen homodiméry, ale aj heterodiméry s plne funkčnými estrogénovými receptormi.

V prípade ER- α boli identifikované najmenej štyri izoformy proteínov (Obrázok 20). Izoforma ER- α 66 predstavuje kompletný receptor s molekulovou hmotnosťou 66 kDa. Identifikovaná bola aj izoforma s molekulovou hmotnosťou 46 kDa, označovaná ako ER- α 46, ktorá je tvorená alternatívnym zostrihom transkriptu *ESR1* génu, čím dochádza k strate exónu 1 a iniciácia translácie je posunutá do štartovacieho kodónu v exóne 2. V ER- α 46 izoforme chýba preto prvých 173 aminokyselín, v dôsledku čoho nie je v receptore prítomná regulačná oblasť AF-1. Zistilo sa, že ER- α 46 je silný inhibítor klasického ER- α a potláča proliferáciu buniek ako odpoveď na pôsobenie estradiolu.

Izoforma ER- α 36 je tvorená z promótora v intróne 1 *ESR1* génu, pokračuje exónom 2 až 6 a vynecháva exóny 7 a 8. Výsledkom je nový karboxylový koniec obsahujúci unikátnych 27 aminokyselín. V dôsledku týchto zmien ER- α 36 izoforma neobsahuje regulačné domény aktivujúce transkripciu (AF-1 a AF-2). ER- α 36 izoforma je lokalizovaná predovšetkým v cytoplazme a na plazmatickej membráne, sprostredkováva signalizáciu nezávislú na transkripcii. U pacientiek s karcinómom prsníka bola zistená asociácia expresie ER- α 36 so zlou prognózou.

Medzi najnovšie identifikované izoformy ER- α patrí ER- α 30. V štruktúre ER- α 30 chýbajú aminokyseliny zo spojovacej oblasti, doména viažuca ligand s regulačnou oblasťou AF-2, obsahuje však unikátnych 10 aminokyselín na karboxylovom konci. Tieto zmeny v štruktúre majú za následok zmenenú transkripčnú aktivitu v porovnaní s ER- α 66. Zvýšená expresia ER- α 30 u karcinómu prsníka je spojená s intenzívnejšou migráciou a proliferáciou, mohla by preto byť sľubným biomarkerom metastázovania.



Obrázok 20: Schematické znázornenie štruktúry najvýznamnejších izoform ER-α.

ER-α66 predstavuje kompletný receptor dlhý 595 aminokyselín. ER-α46 izoforma je tvorená alternatívnym zostrihom, čím dochádza k strete prvých 173 aminokyselín, v dôsledku čoho nie je v receptore prítomná regulačná oblasť AF-1. Izoforma ER-α36 je tvorená z promótoru v intróne 1 *ESR1* génu, pokračuje exónom 2 až 6 a vynecháva exóny 7 a 8. Výsledkom je nový karboxylový koniec obsahujúci unikátnych 27 aminokyselín. V štruktúre ER-α30 chýba doména viažuca ligand a regulačná oblasť AF-2, obsahuje však unikátnych 10 aminokyselín na karboxylovom konci.

AKD – doména na amino-konci receptora; DVL – doména viažuca ligand; SO – spojovacia oblasť

Podobne ako v prípade ER-α, bolo identifikovaných aj niekoľko izoform ER-β (ER-β1, ER-β2, ER-β3, ER-β4 a ER-β5), ktoré vznikajú predovšetkým alternatívnym zostrihom exónov 7 a 8, ktoré kódujú doménu viažucu ligand (Obrázok 21). ER-β1 izoforma predstavuje kompletný ER-β, teda plne funkčnú formu s veľkosťou 59 kDa, ktorá je jediná schopná vytvárať homodiméry.

ER-β2 izoforma (56 kDa) má zmenenú štruktúru domény viažucej ligand a obsahuje unikátnych 26 aminokyselín na karboxylovom konci, čím dochádza k zmenám afinity voči ligandom, ako aj regulačnej oblasti AF-2. ER-β2 vytvára heterodiméry preferenčne s ER-α. Expresia ER-β2 koreluje so zlou prognózou, vysokým gradom a vznikom metastáz u karcinómu prsníka, karcinómu vaječníkov a karcinómu prostaty.

Expresia ER-β3 izoformy, obsahujúcej unikátnych 44 aminokyselín na karboxylovom konci, bola zatiaľ pozorovaná len v semenníkoch, ale nebol zistený žiadny jej funkčný vplyv. Najmenej preštudovanou izoformou je ER-β4 (54 kDa), ktorej funkcia a expresia nie je známa. Expresia ER-β5 izoformy (53 kDa), ktorá na karboxylovom konci obsahuje 3 unikátne aminokyseliny bola zistená v tkanive prsníkov a prostaty a predpokladá sa, že môže mať úlohu pri karcinogenéze prostaty. Zmena štruktúry domény viažucej ligand ER-β5 izoformy spôsobuje, že jej chýba helix H12, ktorého funkciou je uzatvárať ligand viažucu jamku po naviazaní ligandu.



Obrázok 21: Schematické znázornenie štruktúry najvýznamnejších izoform ER-β.

ER-β1 predstavuje kompletný ER-β dlhý 530 aminokyselín. Všetky izoformy majú identických prvých 469 aminokyselín, avšak ER-β2 má na karboxylovom konci unikátnych 26 aminokyselín, ER-β3 44 unikátnych aminokyselín, ER-β4 12 aminokyselín a ER-β5 3 unikátne aminokyseliny.

DVL – doména viažuca ligand; SO – spojovacia oblasť

3.3 Ligandy estrogénových receptorov

Okrem estrogénov, ktoré sú prirodzene tvorené v pohlavných žľazách, ale aj v periférnych tkanivách organizmu pôsobením aromatázy, existuje aj široké spektrum organických a anorganických molekúl, ktoré môžu byť rozpoznané doménami viažucimi ligand estrogénových receptorov. Niektoré z týchto ligandov sa viažu selektívne na ER-α, kým iné sa selektívne viažu na ER-β. Okrem endogénnych estrogénov existujú ešte 4 skupiny ligandov estrogénových receptorov: fytoestrogény, xenoestrogény, selektívne modulátory estrogénových receptorov (SERM) a metaloestrogény. Z hľadiska rozdielov v afinite dvoch podtypov estrogénových receptorov sa zistilo, že ER-α má vyššiu afinitu k endogénnym estrogénom, hlavne estradiolu, kým ER-β má vyššiu afinitu k rôznym xenoestrogénom, fytoestrogénom, ale aj 3β-androstándiolu, ktorý je derivátom testosterónu.

Z hľadiska vplyvu na aktivitu estrogénových receptorov sa ligandy rozdeľujú na agonistov a antagonistov. Agonisti naviazaním sa na receptor indukujú zmenu konformácie helixu 12 tak, že môže dochádzať k naviazaniu koaktivátorov. Antagonisti naviazaním na receptor spôsobia zmenu pozície helixu 12 tak, že prekrýva väzbové miesta pre koaktivátory.

Fytoestrogény

Fytoestrogény sú nesteroidné molekuly produkované rastlinami. Fytoestrogény sa rozdeľujú do viacerých skupín, z ktorých najdôležitejšie sú: izoflavóny, kumestány a lignány. Vzhľadom na to, že fytoestrogény sú chemicky a štrukturálne podobné estradiolu, môžu participovať na

estrogénových a antiestrogénových vplyvoch prostredníctvom aktivácie alebo blokovania domén viažucich ligand estrogénových receptorov.

Xenoestrogény

Ďalšou skupinou ligandov estrogénových receptorov sú xenoestrogény, medzi ktoré patria syntetické chemické látky s estrogénnymi účinkami. Patria k nim niektoré liečivá, potravinové aditíva, zložky kozmetických prípravkov, pesticídy alebo priemyselné chemikálie. Liečivá špecificky syntetizované tak, aby napodobňovali pôsobenie prirodzených estrogénov sa využívajú u žien na liečbu rôznych ochorení. Zistilo sa však, že tieto liečivá môžu ovplyvňovať viaceré bunkové a molekulové mechanizmy, čo môže mať významný vplyv na zdravie a preto je ich používanie stále kontroverzné.

Selektívne modulátory estrogénových receptorov

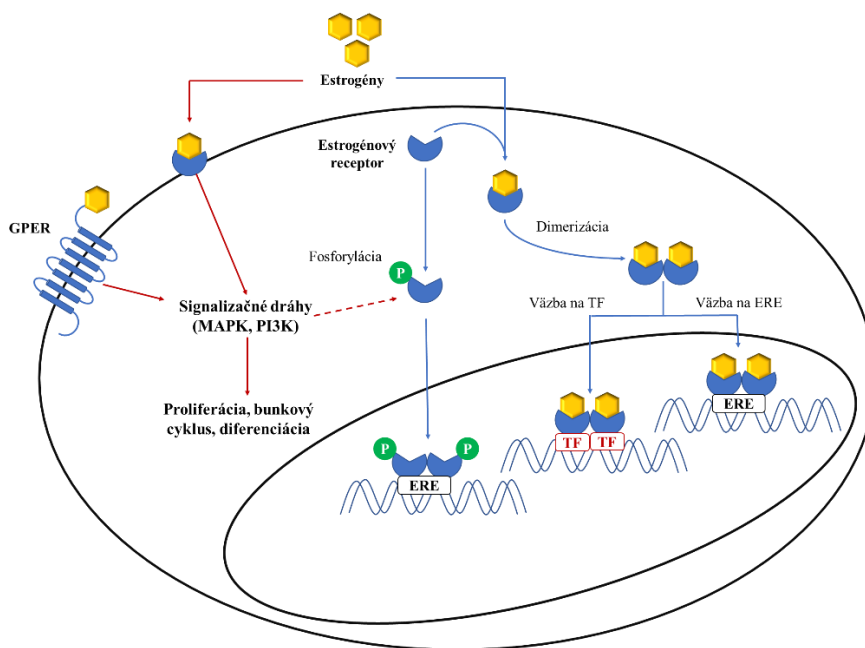
Selektívne modulátory estrogénových receptorov (SERM) môžu na rozdiel od xenoestrogénov pôsobiť ako agonisti, aj ako antagonisti estrogénových receptorov. Jedným z najviac využívaných SERM je tamoxifen používaný v terapii ER-pozitívnych karcinómov prsníka. Tamoxifen pôsobí ako antagonist v prsnej žľaze, ale ako agonista v maternici a kostiach, čím nedochádza k strate kostnej hmoty počas terapie. Jedným z mechanizmov, ktoré prispievajú k tkanivovej selektivitě tamoxifenu je rozdielna expresia kofaktorov v rôznych tkanivách. V maternici je ER- α exprimovaný spoločne s koaktivátorom 1 steroidných receptorov, avšak v prsnej žľaze nie sú exprimované spoločne.

Metalloestrogény

Okrem organických ligandov, aj niektoré anorganické molekuly, predovšetkým ióny ťažkých kovov môžu fungovať ako ligandy estrogénových receptorov. Všeobecne sa označujú ako metalloestrogény. Patria k nim napríklad: Al^{3+} , Sb^{3+} , Cd^{2+} , Cr^{2+} , Pb^{2+} , AsO_3^{3-} a iné. Tieto metalloestrogény sú schopné koordinovať sa s aminokyselinami v rámci domény viažucej ligand estrogénových receptorov, a tým blokovat' naviazanie estradiolu nekompetitívnym mechanizmom.

3.4 Signálne dráhy estrogénových receptorov

Biologický efekt estrogénov je sprostredkovaný rôznymi signálnymi dráhami: klasickým genómovým mechanizmom, ako aj mechanizmom nezávislým na transkripcii (Obrázok 22). Predpokladá sa, že v bunke dochádza ku vzájomnej kooperácii týchto mechanizmov a ich vzájomná regulácia je kľúčová pre udržiavanie homeostázy.



Obrázok 22: Mechanizmus pôsobenia estrogénových receptorov.

Estrogénové receptory po naviazaní estrogénov vytvárajú diméry, ktoré sa viažu na estrogén responzívne elementy (ERE) na DNA a iniciujú transkripciu cieľových génov. Estrogénové receptory môžu ovplyvňovať aj pôsobenie iných transkripčných faktorov (TF) alebo byť aktivované aj bez prítomnosti ligandu prostredníctvom fosforylácie. Negenómový mechanizmus pôsobenia estrogénov sprostredkávajú estrogénové receptory na bunkovej membráne a s G-proteínom spojený estrogénový receptor 1 (GPER1), ktoré aktivujú vnútrobunkové signálne dráhy, ktoré okrem proliferácie, bunkového cyklu a diferenciácie môžu indukovať aj fosforyláciu estrogénových receptorov v cytoplazme a tak indukovať klasický mechanizmus pôsobenia estrogénových receptorov v jadre.

Biologická aktivita estrogénov je sprostredkovaná predovšetkým klasickým, genómovým mechanizmom, teda ich naviazaním na estrogénový receptor, vytvorením aktivovaného komplexu, ktorý sa v jadre viaže na estrogén responzívne elementy v promótorových oblastiach cieľových génov. Estrogén responzívne elementy sú opakovania 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3' DNA palindrómu, v ktorom nnn sekvencia predstavuje akékoľvek tri nukleotidy, lokalizované v rôznej vzdialenosti od začiatku transkripcie. Medzi gény, ktoré sú regulované ER- α klasickým genómovým mechanizmom patria napríklad Myc, Fos alebo katepsín D.

Estrogénové receptory môžu ovplyvňovať aj expresiu génov, ktoré nemajú estrogén responzívne elementy v promótorových oblastiach, teda bez priameho naviazania sa na DNA.

Predpokladá sa, že asi tretina génov, ktoré sú regulované estrogénovými receptormi neobsahujú estrogén responzívne elementy. V tom prípade je expresia génov regulovaná interakciou s inými proteínmi viazanými v promótorových oblastiach alebo tým, že estrogénové receptory ovplyvnia pôsobenie iných transkripčných faktorov. Príkladom je interakcia estrogénových receptorov s transkripčnými faktormi, medzi ktoré patria aktivačný proteín 1 (AP-1), c-jun, Fos, alebo stimulačný proteín 1 (Sp-1), čím sa aktivuje transkripcia cieľových génov týchto transkripčných faktorov. Medzi gény, ktoré sú regulované ER- α takýmto mechanizmom patria napríklad Bcl2, cyklín D1, progesterónový receptor, LDL receptor alebo inzulínu podobný rastový faktor 1 (IGF-1). Ďalším príkladom takto regulovaného génu je gén kódujúci IL-6. Zníženie expisie IL-6 génu 17 β -estradiolom je sprostredkované interakciou estrogénových receptorov s dvomi transkripčnými faktormi, jadrovým faktorom $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) a CCAAT/enhancer viažucim proteínom β (C/EBP β).

Estrogénové receptory môžu byť aktivované aj bez prítomnosti ligandu (endogénnych estrogénov alebo agonistov) prostredníctvom fosforylácie špecifických aminokyselín. Napríklad, fosforylácia serínu (Ser) 118 v doméne na amino-konci ER- α je sprostredkovaná mitogénom-aktivovanými proteín kinázami (MAPK), ktoré sú aktivované interakciou medzi epidermálnym rastovým faktorom (EGF) a jeho membránovým receptorom (EGFR). Podobne proteín kináza A spôsobuje fosforyláciu serínu 236 v doméne viažucej DNA ER- α , čím ovplyvňuje dimerizáciu receptora. Fosforylácia môže byť indukovaná aj inými rastovými faktormi, napríklad inzulínu-podobnými rastovými faktormi I a II (IGF-I a IGF-II) alebo transformujúcim rastovým faktorom beta (TGF- β). Podobne ako ER- α aj ER- β môže byť aktivovaný fosforyláciou Ser106 a Ser124 prostredníctvom MAPK v prítomnosti EGF.

Estrogény môžu pôsobiť aj mechanizmami, ktoré sú príliš rýchle na to, aby mohli byť spôsobené aktiváciou transkripcie génov a syntézou proteínov. Tieto mechanizmy súčasne nie sú ovplyvnené inhibítormi transkripcie alebo translácie a sú indukované aj molekulami, ktoré neprechádzajú bunkovou membránou, napríklad komplexom estradiolu s albumínom. Sprostredkovateľom pôsobenia estrogénov mechanizmom nezávislým na transkripcii sú estrogénové receptory, ktoré sa nachádzajú na alebo v tesnej blízkosti membrány. Pripojenie cytosolových estrogénových receptorov na membránu je zabezpečené ich palmitoyláciou a väzbou na kaveolín. Takýto mechanizmus pôsobenia sprostredkováva aj ďalší typ estrogénového receptora, s G-proteínom spojený estrogénový receptor 1 (GPER1), lokalizovaný na bunkovej membráne a sarkoplazmatickom retikule. Tento receptor predstavuje hlavný alternatívny mediátor pôsobenia estrogénov mimo jadra. GPER1 je proteín obsahujúci 375 aminokyselín, pozostávajúci zo siedmich transmembránových domén. Receptor je

schopný s vysokou afinitou viazať estrogény, a tak aktivovať vnútrobunkové signálne dráhy. Pôsobenie estrogénov takýmto mechanizmom predstavuje komplexný proces. Po naviazaní ligandu dochádza k aktivácii rôznych transdukčných dráh zahŕňajúcich napríklad aktiváciu G proteínu, MAPK kinázy a fosfatidylinozitol-3-kinázy (PI-3K), čo vedie k tvorbe cyklických nukleotid monofosfátov (cAMP a cGMP) alebo zvýšeniu Ca^{2+} . Predpokladá sa, že pôsobenie estrogénových receptorov mechanizmom nezávislým na transkripcii je špecifické pre konkrétny typ buniek. Odpoveď na pôsobenie estrogénov môže byť rôzna a závisí na rôznych faktoroch, napríklad na konkrétnych typoch transdukčných molekúl prítomných v danej bunke. Dôležitým faktorom je aj to, že aj samotné estrogénové receptory môžu byť fosforylované prostredníctvom MAPK signalizačnej kaskády. Preto pôsobenie estrogénových receptorov na bunkovej membráne mechanizmom nezávislým na transkripcii môže indukovať aj klasický mechanizmus pôsobenia estrogénových receptorov v jadre.

3.5 Mutácie a génové polymorfizmy estrogénového receptora α

V *ESR1* géne, kódujúcom ER- α , bolo identifikovaných veľké množstvo polymorfizmov lokalizovaných v rôznych oblastiach génu. Jednoznačný funkčný vplyv jednotlivých polymorfizmov nie je zatiaľ presne známy, ale predpokladá sa, že polymorfizmy nachádzajúce sa v promótorovej oblasti génu by mohli ovplyvňovať transkripciu a množstvo vznikajúcej mRNA. Polymorfizmy ležiace v exónoch by naopak mohli ovplyvňovať stabilitu proteínu a jeho funkciu. Avšak aj tiché mutácie, alebo mutácie v nekódujúcich oblastiach by mohli spôsobovať štrukturálne zmeny v RNA, čím by mohli ovplyvňovať transkripciu a viesť k zmene génovej expresie.

Hlavnými sledovanými polymorfizmami v *ESR1* géne sú dva varianty lokalizované v intróne 1 a označované ako PvuII (T>C, rs2234693) a XbaI (A>G, rs9340799). Presný funkčný vplyv týchto polymorfizmov nie je zatiaľ známy, ale predpokladá sa, že C alela PvuII polymorfizmu by mohla vytvárať väzbové miesto pre transkripčný faktor B-myb, čím môže dochádzať k ovplyvneniu transkripcie a stability vznikajúceho transkriptu. Oba polymorfizmy by tiež mohli ovplyvňovať alternatívny zostrih mRNA transkriptu a tým ovplyvňovať funkciu ER- α . Medzi ochorenia, u ktorých bola popísaná možná asociácia týchto polymorfizmov patria karcinóm prsníka, endometria, prostaty, ale aj hyperlipidémia, hypertenzia, koronárna ateroskleróza alebo neurodegeneratívne ochorenia.

Ďalším sledovaným polymorfizmom je rs2077647, lokalizovaný v kodóne 10 exónu 1, kódujúcom amino-koncovú doménu ER- α . Je lokalizovaný v oblasti, ktorá kóduje regulačnú oblasť AF-1, ktorá pôsobí ako transaktivačná doména nezávislá na ligande a viažu sa sem koaktivátory alebo korepresory. Táto oblasť receptora ovplyvňuje transkripčnú aktiváciu ER-regulovaných génov interakciou s chromatínom-asociovanými transkripčnými faktormi. Táto oblasť môže byť tiež aktivovaná mechanizmom nezávislým na ligande, prostredníctvom molekúl, ako sú napríklad cAMP, dopamín alebo rastové faktory, čo vedie k aktivácii kinázových kaskád. Napriek tomu, že polymorfizmus rs2077647 lokalizovaný v kodóne 10 nespôsobuje zmenu aminokyseliny v proteíne, mohla by štrukturálna zmena RNA ovplyvňovať expresiu génu, alebo stabilitu primárneho transkriptu.

Ďalší sledovaný polymorfizmus, rs3798577, je lokalizovaný v 3'-netranslatovanej oblasti (3'-UTR) *ESR1* génu. Presný funkčný vplyv tohto polymorfizmu nie je známy. Vzhľadom na jeho lokalizáciu v 3'-UTR oblasti, ktorá je často cieľom pre regulačné miRNA a splicing faktory, by však mohol mať tiež vplyv na expresiu *ESR1*.

Okrem génových polymorfizmov, ktoré môžu mať vplyv na riziko vzniku niektorých ochorení, vrátane onkologických, môže dochádzať v géne pre ER- α aj k vzniku somatických mutácií, predovšetkým v nádorových bunkách, čo predstavuje jeden z mechanizmov vzniku rezistencie na podávanú hormonálnu terapiu. Najintenzívnejšie sú študované predovšetkým mutácie vedúce k zámene aminokyselín lokalizované predovšetkým v rámci domény viažucej ligand ER- α .

3.6 Génové polymorfizmy estrogénového receptora β

Množstvo polymorfizmov bolo identifikovaných aj v *ESR2* géne. Avšak vzhľadom na to že úloha ER- β , ktorý je týmto génom kódovaný, je menej popísaná a známa, tak aj menšia pozornosť sa venuje štúdiu genetických zmien s ním spojených.

Medzi najviac študované polymorfizmy *ESR2* génu patria rs1256049 a rs4986938, ktorých funkčný vplyv zatiaľ nie je presne známy. Polymorfizmus rs1256049 je synonymný variant lokalizovaný v exóne 5, ktorý kóduje doménu viažucu ligand. Popísaná je asociácia tohto polymorfizmu s osteoporózou, osteoartrítidou, karcinómom prostaty a karcinómom endometria. Polymorfizmus rs4986938 reprezentuje zmenu G za A v 3'-netranslatovanej oblasti exónu 8. Presný funkčný vplyv tohto polymorfizmu nie je známy, ale predpokladá sa, že netranslatované oblasti génov predstavujú regulačné oblasti, ovplyvňujú transláciu a môžu byť cieľovými

oblastami regulačných miRNA. Popísaná bola asociácia rs4986938 polymorfizmu s endometriózou, demenciou, poruchami menštruačného cyklu, Parkinsonovou chorobou a karcinómom prsníka a prostaty.

Medzi ďalšie študované polymorfizmy *ESR2* génu patria tri polymorfizmy lokalizované v promótorovej oblasti: rs3020449 (C>T), rs3020450 (A>G) a rs2987983 (C>T). Popísaná bola asociácia týchto polymorfizmov s rizikom karcinómu prsníka a prostaty.

4 Progesterónový receptor

Progesterónový receptor patrí do rodiny receptorov pre pohlavné hormóny. Podobne ako ostatné receptory pre pohlavné hormóny funguje predovšetkým ako ligandom aktivovaný transkripčný faktor. Naviazaním hormónu, progesterónu, progesterónový receptor reguluje expresiu špecifických génov, ktoré majú úlohu vo vývine, diferenciácii a proliferácii cieľových tkanív, ale aj pri rôznych patologických procesoch, napríklad pri vzniku a progresii hormónmi ovplyvňovaných nádorov.

Progesterónový receptor je kódovaný génom *PGR* lokalizovaným na chromozóme 11 v pozícii 11q22-q23. Identifikované boli dve hlavné izoformy progesterónového receptora, progesterónový receptor A (PGRA) a progesterónový receptor B (PGRB), ktoré vznikajú transkripciou rovnakého génu, ale z odlišných promótorov. Plnú dĺžku receptora má PGRB izoforma. V PGRA izoforme chýba 164 aminokyselín na amino-konci receptora.

4.1 Štruktúra progesterónového receptora

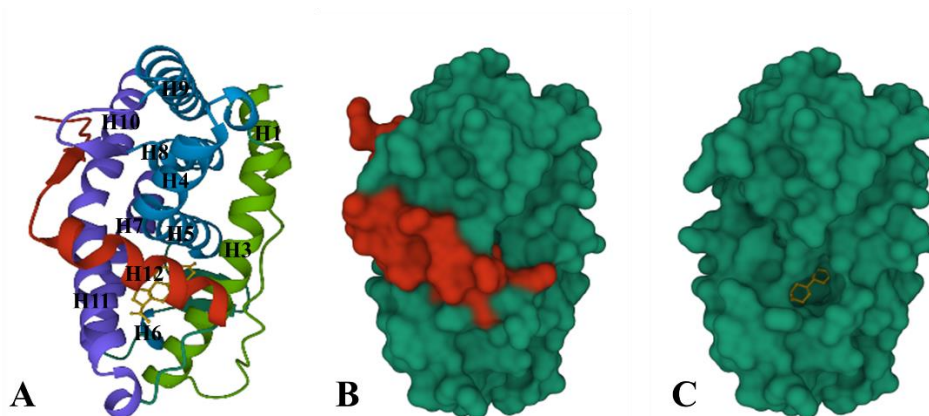
Podobne ako iné receptory pre pohlavné hormóny, aj progesterónový receptor pozostáva z troch hlavných domén – amino-koncovej domény, domény viažucej DNA a domény viažucej ligand, medzi ktorými sa nachádza spojovacia oblasť.

V oblasti amino-koncovej domény je lokalizovaná regulačná oblasť AF-1. Väčšia časť amino-koncovej domény progesterónového receptora je tvorená proteínom bez stabilnej 3-D štruktúry. Naviazaním koaktivátorov dochádza k zmene konformácie tejto oblasti. Tento mechanizmus umožňuje, aby rovnaká oblasť domény mohla reagovať na spektrum signálov, prispieva tiež k vyššej špecifickosti a nízkej afinite naviazania koaktivátorov, čo predstavuje ideálne vlastnosti dočasných, reverzibilných interakcií transkripčných faktorov s regulačnými proteínmi. V oblasti amino-koncovej domény PGRB izoformy, ktorá chýba v PGRA, je lokalizovaná tretia regulačná doména AF3, ktorá potláča aktivitu inhibičnej domény, ktorú obsahujú obe izoformy progesterónového receptora. V dôsledku toho PGRB funguje predovšetkým ako aktivátor transkripcie génov, kým PGRA vo väčšine buniek neaktivuje transkripciu, ale potláča transkripčnú aktivitu iných receptorov pre pohlavné hormóny (PGRB, androgénového receptora, estrogénových receptorov). Izoformy progesterónového receptora môžu mať v bunke odlišné konformácie, čo umožňuje PGRA interagovať s odlišnými koregulátormi ako PGRB. PGRA má napríklad vyššiu afinitu pre korepresor SMRT

v prítomnosti antagonistov progesterónového receptora ako PGRB. PGRA má tiež nižšiu afinitu voči koaktivátorom SRC-1 a SRC-2.

Doména viažuca DNA pozostáva z konzervovanej oblasti zinkových prstov a z variabilného predĺženia na karboxylovom konci, tvoreného približne 40 aminokyselinami. Tri aminokyseliny v proximálnom boxe zabezpečujú rozpoznanie a odlíšenie sekvencií špecifických hormón responzívnych elementov. Distálny box druhého zinkového prsta má úlohu v dimerizácii receptora.

Štruktúra domény viažucej ligand progesterónového receptora zodpovedá klasickej trojvrstvovej sendvičovej štruktúre tvorenej 11 helixami, ktorá tvorí ligand viažucu jamku uzatvorenú helixom 12 (Obrázok 23). Špecifické pre štruktúru ligand viažucej domény progesterónového receptora je, že helixy 10 a 11 sú spojené, a že helix 12 má na karboxylovom konci ešte dodatočné aminokyselinové zvisky, ktoré tvoria štruktúru slučky.



Obrázok 23: Kryštalografická štruktúra ligand viažucej domény progesterónového receptora v komplexe s progesterónom (databanka proteínov - PDB ID: 1A28).

(A) Znáznornenie usporiadania helixov domény viažucej ligand progesterónového receptora. Helixy tvoriace jednotlivé vrstvy sendvičovej štruktúry sú farebne odlišné, pričom stredná vrstva je znázornená modrou farbou. Vonkajšie vrstvy majú zelenú a fialovú farbu. Helix12, ktorý má funkciu pri uzatváraní ligand viažucej jamky je vyznačený červenou farbou. Naviazaný ligand – progesterón je na obrázku znázornený žltou farbou. (B) Priestorový 3D model štruktúry receptora, na ktorom je červenou vyznačený H12. (C) Priestorový 3D model štruktúry receptora po odstránení H12, na ktorom je možné vidieť progesterón naviazaný v ligand viažucej jamke receptora.

4.2 Štiepne varianty progesterónového receptora

Okrem hlavných dvoch izoforiem progesterónového receptora, PGRA a PGRB, ktoré vznikajú transkripciou z rôznych promótorov, boli identifikované aj ďalšie menšie izoformy kódované génom pre progesterónový receptor, vznikajúce alternatívnym štiepením primárneho mRNA transkriptu.

Izoformy mRNA označované ako PGR-S a PGR-T obsahujú pred exónom 4 nové sekvencie, exón S, resp. exón T, ktoré sú tvorené ponechaním časti intrónovej sekvencie. Ani exón S, ani exón T neobsahujú miesto iniciácie translácie. Translácia oboch izoforiem mRNA bude preto začínať prvým metionínom v exóne 4. Izoforma progesterónového receptora, ktorá vznikne nemá v štruktúre doménu viažucu DNA, bude mať preto úlohu predovšetkým v sprostredkovaní negenómového mechanizmu pôsobenia progesterónového receptora.

U endometriálnych karcinómov bol identifikovaný variant progesterónového receptora PGR-i45, ktorý obsahuje 252 bp inzerciu medzi exónmi 4 a 5. Výsledný proteín bude mať kompletnú amino-koncovú doménu, doménu viažucu DNA a spojovaciu oblasť. V dôsledku inzercie spôsobujúcej posun čítacieho rámca dochádza k skráteniu domény viažucej ligand.

Alternatívnym zostrihom alebo deléciou celých exónov vzniká množstvo ďalších variantov progesterónového receptora. Expresia izoforiem a variantov progesterónového receptora môže významne ovplyvniť odpoveď tkaniva na progesterón a tiež prispievať k proliferácii niektorých typov nádorov, predovšetkým karcinómu prsníka.

4.3 Ligandy progesterónového receptora

Existujú tri hlavné skupiny ligandov progesterónového receptora: agonisti, antagonisti a selektívne modulátory progesterónového receptora.

Agonisti naviazaním sa na doménu viažucu ligand aktivujú progesterónový receptor, a tým aj expresiu cieľových génov. Agonisti progesterónového receptora sa všeobecne nazývajú progestogény (označované tiež ako progestagény, gestogény alebo gestagény). Progestogény sú prirodzené alebo syntetické molekuly viažuce sa na progesterónový receptor. Hlavným prirodzeným agonistom progesterónového receptora je hormón progesterón. Ďalšími endogénnymi progestogénmi sú metabolity progesterónu, napr. 16 α -hydroxyprogesterón, 5 α -dihydroprogesterón, 11-deoxykortikosterón a iné.

Syntetické progestogény využívané v medicíne sa nazývajú progestíny. Progestíny sú štrukturálne analógy progesterónu a primárne sa využívajú ako antikoncepčné lieky, buď samostatne alebo v kombinácii s estrogénmi, a ako postmenopauzálna hormonálna substitučná terapia. Môžu sa využívať aj v liečbe dysmenorey, nepravidelnej menštruácie alebo bolesti sprevádzajúcich endometriózu.

Antagonisti progesterónového receptora, nazývané tiež antiprogestogény, zabráňujú progestogénom sprostredkovať ich biologické účinky. Naviazaním sa na progesterónový

receptor zabraňujú interakcii s koregulátormi. Vyvinutých bolo niekoľko syntetických steroidných aj nesteroidných ligandov progesterónového receptora súperiacich s progesterónom o naviazanie na receptor. Využívajú sa ako efektívna abortívna a postkoitálna antikoncepcia, ale aj v liečbe endometriózy, myómov maternice a meningiómov.

Selektívne modulátory progesterónového receptora môžu v rôznych tkanivách pôsobiť ako agonisti, aj ako antagonisti progesterónového receptora. Ich odlišné účinky sú ovplyvnené viacerými faktormi, napríklad pomerom PGRA a PGRB izoforiem v rôznych tkanivách a rôznej väzbovej afinite modulátorov voči izoformám. Ďalším faktorom môže byť interakcia s rôznymi koaktivátormi a korepresormi a ich relatívna dostupnosť v rôznych tkanivách. Klinicky sa využívajú pri rôznych gynekologických ochoreniach, ale aj v liečbe karcinómu prsníka a endometria.

4.4 Signálne dráhy progesterónového receptora

Ak nie je v bunke prítomný ligand, je progesterónový receptor v cytoplazme naviazaný na chaperónové proteíny. Naviazaním hormónu dochádza k iniciácii klasického genómového mechanizmu pôsobenia, ktorý prebieha podobne pri všetkých receptoroch pre pohlavné hormóny a je popísaný v kapitole 1.6.1. V bunkách exprimujúcich obe izoformy progesterónového receptora môžu pri genómovom mechanizme pôsobenia vznikať tri rôzne typy dimérov – PGRA homodimér, PGRB homodimér a PGRA-PGRB heterodimér. V ľudskom organizme väčšina buniek pozitívnych na progesterónový receptor exprimuje PGRA a PGRB v rovnakom pomere a bunky, ktoré by exprimovali len jednu izoformu sa vyskytujú vzácné. Z toho sa dá predpokladať, že v ľudskom organizme progesterón pôsobí v bunkách, ktoré exprimujú obe izoformy progesterónového receptora a pri vzniku aktivovaného komplexu vzniká predovšetkým PGRA-PGRB heterodimér. Pomer izoforiem progesterónového receptora ovplyvňuje aj schopnosť PGRA regulovať aktivitu PGRB, keďže PGRA je hlavný inhibítor transkripčnej aktivity PGRB. Účinok progesterónu, sprostredkovaný progesterónovým receptorom, klasickým genómovým mechanizmom, vedie po interakcii s koregulátormi a naviazaní aktivovaného komplexu na špecifické progesterón responzívne elementy k regulácii expresie cieľových génov. Identifikovaných bolo viac ako 300 koregulátorov progesterónového receptora. Predpokladá sa, že špecifické kombinácie koregulátorov s receptorom sú ovplyvnené ich dostupnosťou v cieľových bunkách, pričom ich zastúpenie je tkanivovo špecifické. Progesterónový receptor môže ovplyvňovať aj expresiu

génov, ktoré nemajú v promótorových oblastiach progesterón responzívne elementy interakciou progesterónového receptora s inými transkripčnými faktormi. Gény, ktoré sú regulované progesterónovým receptorom kódujú proteíny, ktoré majú úlohu v celom spektre bunkových procesov, vrátane metabolizmu lipidov, steroidných látok, bunkového cyklu, apoptózy, transkripcie a iných.

Okrem klasického genómového mechanizmu pôsobenia, bolo zistené aj rýchle, negenómové pôsobenie progesterónu, ktoré sa prejaví v priebehu sekúnd až minút. Negenómové pôsobenie progesterónu je sprostredkované aktiváciou vnútrobunkových signalizačných dráh (napr. MAPK signalizačnej dráhy, PI3K/AKT dráhy alebo aktivácie proteínkinázy C) cytoplazmatickými progesterónovými receptormi alebo membránovými progesterónovými receptormi (mPGR). Membránové progesterónové receptory sú štrukturálne odlišné od cytoplazmatických progesterónových receptorov a pozostávajú zo siedmych transmembránových domén.

4.5 Polymorfizmy progesterónového receptora

V géne pre PGR bolo identifikovaných viacero polymorfizmov. Medzi prvé študované patrí krátka *AluI* inzercia v intrónovej oblasti. Presný funkčný význam tejto inzercie nie je známy, ale predpokladá sa, že ovplyvňuje expresiu génu a stabilitu RNA. Popísaná bola asociácia *AluI* inzercie s endometriózou, karcinómom prsníka a vaječníkov. Ďalšie dva študované polymorfizmy PGR génu, Val660Leu v exóne 4 a Hist770Hist v exóne 5 sú v kompletnej väzbe s *AluI* inzerciou. Tieto tri polymorfizmy spolu tvoria komplex označovaný ako PROGINS. Viaceré epidemiologické štúdie naznačujú, že PROGINS môže mať vplyv na riziko vzniku benígnych, ale aj malígnych gynekologických ochorení. Identifikovaný bol aj štvrtý polymorfizmus, S344T, ktorý je tiež vo väzbe s PROGINS. Všetky spolu sú lokalizované v oblasti približne 75 kilobáz.

Medzi ďalšie študované jednonukleotidové polymorfizmy PGR génu patria G393G a dva polymorfizmy v promótorovej oblasti, +44C/T (rs518162) a +331G/A (rs10895068), ktoré sa nachádzajú medzi oblasťami začiatku transkripcie PGRA a PGRB. Polymorfizmus +331G/A vytvára nový začiatok transkripcie a preferuje tvorbu PGRB izoformy. Zistená bola asociácia +331G/A polymorfizmu s karcinómom endometria.

5 Zoznam použitej literatúry

Auchus ML, Auchus RJ. Human steroid biosynthesis for the oncologist. *J Investig Med*. 2012 Feb;60(2):495-503. doi: 10.2310/JIM.0b013e3182408567. PMID: 22222232; PMCID: PMC3653186.

Ceccarelli I, Bioletti L, Peparini S, Solomita E, Ricci C, Casini I, Miceli E, Aloisi AM. Estrogens and phytoestrogens in body functions. *Neurosci Biobehav Rev*. 2022 Jan;132:648-663. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.12.007. Epub 2021 Dec 7. PMID: 34890602.

Cork DM, Lennard TW, Tyson-Capper AJ. Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10(3):207. doi: 10.1186/bcr2097. Epub 2008 May 30. PMID: 18557990; PMCID: PMC2481493.

Dehm SM, Tindall DJ. Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol*. 2007 Dec;21(12):2855-63. doi: 10.1210/me.2007-0223. Epub 2007 Jul 17. PMID: 17636035.

Di Zazzo E, Galasso G, Giovannelli P, Di Donato M, Bilancio A, Perillo B, Sinisi AA, Migliaccio A, Castoria G. Estrogen Receptors in Epithelial-Mesenchymal Transition of Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 23;11(10):1418. doi: 10.3390/cancers11101418. PMID: 31548498; PMCID: PMC6826537.

Eisermann K, Wang D, Jing Y, Pascal LE, Wang Z. Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. *Transl Androl Urol*. 2013 Sep 1;2(3):137-147. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.15. PMID: 25045626; PMCID: PMC4101814.

Foster PA, Mueller JW. SULFATION PATHWAYS: Insights into steroid sulfation and desulfation pathways. *J Mol Endocrinol*. 2018 Aug;61(2):T271-T283. doi: 10.1530/JME-18-0086. Epub 2018 May 15. PMID: 29764919.

Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2019;116:135-170. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001. Epub 2019 Feb 4. PMID: 31036290; PMCID: PMC6533072.

Hachey DL, Dawling S, Roodi N, Parl FF. Sequential action of phase I and II enzymes cytochrome p450 1B1 and glutathione S-transferase P1 in mammary estrogen metabolism. *Cancer Res*. 2003 Dec 1;63(23):8492-9. PMID: 14679015.

Islam MS, Afrin S, Jones SI, Segars J. Selective Progesterone Receptor Modulators-Mechanisms and Therapeutic Utility. *Endocr Rev*. 2020 Oct 1;41(5):bnaa012. doi: 10.1210/endrev/bnaa012. PMID: 32365199; PMCID: PMC8659360.

Jin J, Wu P, Zhang X, Li D, Wong WL, Lu YJ, Sun N, Zhang K. Understanding the interaction of estrogenic ligands with estrogen receptors: a survey of the functional and binding kinetic studies. *J Environ Sci Health C Toxicol Carcinog.* 2020;38(2):142-168. doi: 10.1080/26896583.2020.1761204. Epub 2020 May 7. PMID: 32500833.

Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, Singh R, Bhasin S, Jasuja R. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids.* 2011;2011:812540. doi: 10.4061/2011/812540. Epub 2011 Jul 26. PMID: 22312471; PMCID: PMC3268042.

Li D, Zhou W, Pang J, Tang Q, Zhong B, Shen C, Xiao L, Hou T. A magic drug target: Androgen receptor. *Med Res Rev.* 2019 Sep;39(5):1485-1514. doi: 10.1002/med.21558. Epub 2018 Dec 19. PMID: 30569509.

Malik Aubead N. Role of Sex Hormones in Human Body. *Reproductive Hormones.* 2021 May 5; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.95778>

Miller WL. Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends Endocrinol Metab.* 2017 Nov;28(11):771-793. doi: 10.1016/j.tem.2017.09.002. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29031608.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Health Sciences Policy; Committee on the Clinical Utility of Treating Patients with Compounded Bioidentical Hormone Replacement Therapy; Jackson LM, Parker RM, Mattison DR, editors. *The Clinical Utility of Compounded Bioidentical Hormone Therapy: A Review of Safety, Effectiveness, and Use.* Washington (DC): National Academies Press (US); 2020 Jul 1. 4, Reproductive Steroid Hormones: Synthesis, Structure, and Biochemistry.

Pu H, Wen X, Luo D, Guo Z. Regulation of progesterone receptor expression in endometriosis, endometrial cancer, and breast cancer by estrogen, polymorphisms, transcription factors, epigenetic alterations, and ubiquitin-proteasome system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2023 Mar;227:106199. doi: 10.1016/j.jsbmb.2022.106199. Epub 2022 Sep 30. PMID: 36191723.

Raftogianis R, Creveling C, Weinshilboum R, Weisz J. Estrogen metabolism by conjugation. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2000;(27):113-24. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a024234. PMID: 10963623.

Schiffer L, Arlt W, Storbeck KH. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Apr 15;465:4-26. doi: 10.1016/j.mce.2017.08.016. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28865807; PMCID: PMC6565845.

Schiffer L, Barnard L, Baranowski ES, Gilligan LC, Taylor AE, Arlt W, Shackleton CHL, Storbeck KH. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *J Steroid Biochem Mol*

Biol. 2019 Nov;194:105439. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105439. Epub 2019 Jul 27. PMID: 31362062; PMCID: PMC6857441.

Stocco C. Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids*. 2012 Jan;77(1-2):27-35. doi: 10.1016/j.steroids.2011.10.013. Epub 2011 Nov 13. PMID: 22108547; PMCID: PMC3286233.

Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 2015 Jan;36(1):3-23. doi: 10.1038/aps.2014.18. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24909511; PMCID: PMC4571323.

Thomas MP, Potter BV. The structural biology of oestrogen metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 Sep;137:27-49. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.12.014. Epub 2013 Jan 4. PMID: 23291110; PMCID: PMC3866684.

Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014 Oct 15;24(3):329-42. doi: 10.11613/BM.2014.035. PMID: 25351351; PMCID: PMC4210253.

Wach S, Taubert H, Cronauer M. Role of androgen receptor splice variants, their clinical relevance and treatment options. *World J Urol*. 2020 Mar;38(3):647-656. doi: 10.1007/s00345-018-02619-0. Epub 2019 Jan 19. PMID: 30659302.

Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*. 2016 Dec 5;16(1):4-20. doi: 10.1002/rmb2.12006. PMID: 29259445; PMCID: PMC5715874.