

Ekspresja receptora estrogenowego alfa i beta w prawidłowych tkankach macicy u kobiet przed menopauzą

Estrogen receptor alpha and beta expression in normal endometrium and myometrium in premenopausal women

Artur J. Jakimiuk¹, Michał Bogusiewicz¹, Rafał Tarkowski¹, Piotr Dziduch¹, Aneta Adamiak¹, Andrzej Wróbel¹, Józef Haczyński², Denis Magoffin³, Jerzy A. Jakowicki¹

Estrogeny oddziałują na tkanki docelowe przez dwa typy receptora, alfa i beta (ER-alfa i ER-beta). Dystrybucja obu typów receptora oraz interakcje pomiędzy nimi w istotny sposób modulują efekt działania estrogenów. Celem pracy była ocena ekspresji receptorów estrogenowych w błonie śluzowej oraz mięśniu macicy kobiet w okresie przedmenopauzalnym. Próbkę endometrium oraz myometrium pobrano od 12 kobiet operowanych z powodu mięśniaków macicy. Ekspresję genów receptorów ER-alfa i ER-beta (mRNA) badano metodą odwrotnej transkrypcji (RT) i namnażania cDNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). W mięśniu macicy ekspresja receptora estrogenowego alfa była znacząco wyższa w porównaniu do receptora beta. W endometrium poziom ekspresji obu typów receptora wykazywał zbliżone wartości. Ekspresja receptora estrogenowego alfa była istotnie statystycznie wyższa w myometrium w porównaniu do endometrium, podczas gdy ekspresja ER-beta nie różniła się znacząco pomiędzy badanymi tkankami. Stosunek ekspresji ER-alfa do ER-beta nie różnił się istotnie pomiędzy myometrium a endometrium. Wyniki badań wskazują, że różnice w ekspresji receptorów pomiędzy błoną śluzową a mięśniem macicy dotyczą jedynie receptora alfa.

Słowa kluczowe: receptor estrogenowy, myometrium, endometrium

(Przegląd Menopauzalny 2003; 6: 12–17)

Wstęp

Przez wiele lat uważano, że istnieje tylko jedna forma receptora estrogenowego, przez który estrogeny mogą oddziaływać na komórki [1–3]. W 1996 r. Kuiper

i wsp. [4] odkryli istnienie nowej formy estrogenowego receptora w komórkach prostaty szczura. W tym samym roku inna grupa badaczy stwierdziła obecność tego receptora również u człowieka [5, 6]. Wcześniej poznane i scharakteryzowane białko określono jako re-

¹ II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie;
kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Rechberger

² Dział Medyczny Eli Lilly

³ Cedars-Sinai Burns and Allen Research Institute, Cedars-Sinai Medical Center/David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, California, USA



ceptor estrogenowy alfa (ER-alfa), zaś nowe jako receptor estrogenowy beta (ER-beta). Receptory estrogenowe alfa i beta nie są wzajemnymi izoformami, lecz dwoma różnymi białkami, kodowanymi przez dwa odrębne geny, zlokalizowane na różnych chromosomach. Gen kodujący receptor estrogenowy alfa znajduje się w genomie człowieka na długim ramieniu chromosomu 6. (14q22-24) [7], zaś gen kodujący receptor estrogenowy beta na długim ramieniu chromosomu 14. (14q22-24) [8].

Obie postacie receptora po przyłączeniu liganda mogą tworzyć zarówno formy homodimeryczne: alfa-alfa bądź beta-beta, jak i heterodimeryczne alfa-beta. Najniższy wskaźnik powinowactwa do liganda cechuje formę beta-beta [9].

Ekspresja receptorów estrogenowych jest różna w poszczególnych tkankach. Wykazano, że ekspresja ER-beta w nadnerczach myszy znacznie przewyższa ekspresję receptorów alfa [10]. ER-beta przeważa również w układzie sercowo-naczyniowym. Komórki żarniste jajnika ludzkiego zawierają zarówno ER-alfa, jak i ER-beta [11]. Różnorodna jest również lokalizacja tych receptorów w ośrodkowym układzie nerwowym. Niektóre struktury mózgu posiadają jedynie ER-alfa, inne ER-beta, a niektóre charakteryzują się występowaniem obu receptorów [12].

Brandenberger i wsp. [10], którzy jako pierwsi wykazali koekspresję obu typów receptora estrogenowego u człowieka wykorzystując do badań tkanki macicy płodu, zwrócili uwagę na wyższy poziom ekspresji ER-alfa. Ekspresję obu typów receptora uwidoczniono również w endometrium oraz myometrium uzyskanych od kobiet w okresie reprodukcyjnym [13, 14, 15, 16]. Matsuzaki i wsp. [13] przy pomocy hybrydyzacji *in situ* wykazali obecność transkryptów dla ER-alfa i ER-beta zarówno w komórkach nabłonkowych, jak i stromalnych endometrium oraz w komórkach błony mięśniowej macicy w przebiegu całego cyklu miesięcznego. W badaniach z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR) stwierdzono wyższy poziom ekspresji ER-alfa w porównaniu do ER-beta w prawidłowym endometrium, przy czym zależność ta była bardziej wyrażona w fazie proliferacyjnej cyklu [16]. Przewagę ekspresji receptora alfa nad receptorem beta w fazie proliferacyjnej cyklu uwidoczniono również w myometrium [15].

Celem pracy była ocena ekspresji receptora estrogenowego alfa i beta w prawidłowych tkankach macicy (myometrium i endometrium) u kobiet w okresie przedmenopauzalnym.

Materiał i metodyka

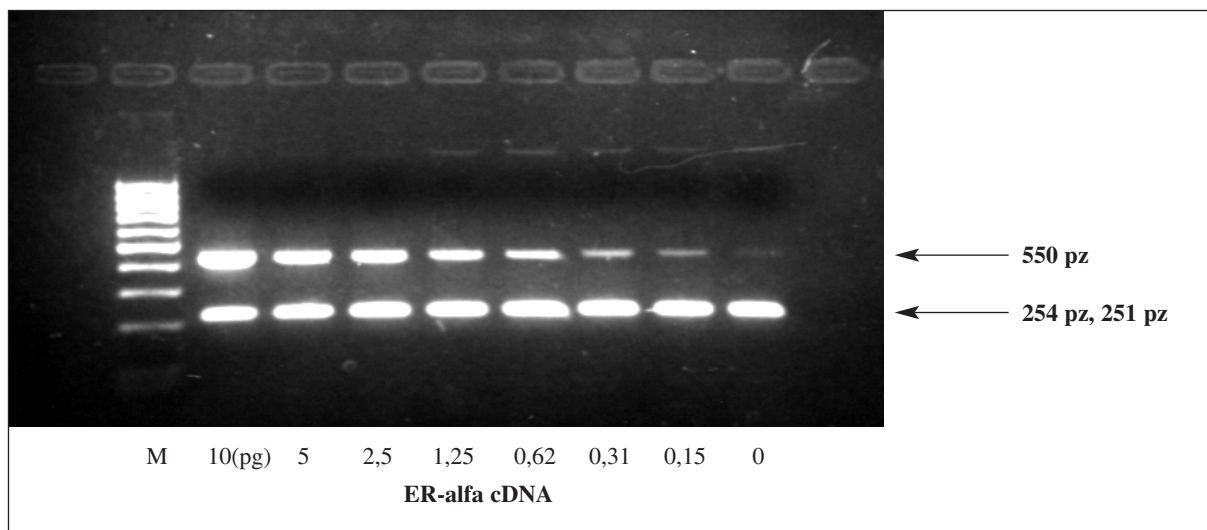
Badaniem objęto 12 pacjentek w wieku od 45 do 53 lat (średnia wieku 49,6±2,9 lat), które były operowane

w II Katedrze i Klinice Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie w latach 1999–2000 z powodu mięśniaków macicy. Z uzyskanych w czasie operacji preparatów pobierano próbki endometrium oraz myometrium. Ponadto, po uzyskaniu pisemnej zgody wykorzystano surowicę krwi pobraną przed zabiegami do oznaczenia poziomu stężenia FSH, LH i estradiolu.

Ekspresję genów receptorów ER-alfa i ER-beta (mRNA) badano metodą odwrotnej transkrypcji (RT) i namnażania cDNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Całkowite RNA izolowano z tkanek przy użyciu Trizol (Gibco BRL, USA) wg przepisu producenta. RNA wyizolowane z poszczególnych tkanek rozpuszczano w 10 µl wody *depowanej* (DEPC H₂O) i przechowywano w temp. -80°C. Porcję RNA (10 µl) przepisywano na cDNA inkubując w temp. 37°C przez 30 min w 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP, 5 µg oligo(dT) (Pharmacia, Piscataway, NJ), 40 U RNasin (Promega, Madison, WI) i 400 IU Maloney Murine Leukemia Virus-reverse transcriptase (M-MLV RT; Gibco BRL) w całkowitej objętości 40 µl. Następnie mieszaninę reakcyjną podgrzewano do temp. 95°C przez 5 min i schładzano do 4°C. Mieszaninę reakcyjną dzielono na porcje po 4 µl i przechowywano w temp. -80°C do czasu wykonania PCR. Jeden pg matrycy kontrolnej z wbudowanym miejscem cięcia DNA, 50 pmol każdego ze starterów, 1X PCR buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl], 2,5 mM MgCl₂, 10 µCi [³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol; Dupont NEN, Boston, MA), i 2,5 U *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) dodano do porcji cDNA. Reakcję przeprowadzano w całkowitej objętości 100 µl. ER-α i ER-β cDNA amplifikowano oddzielnie przez 25 cykli (94°C przez 60 s; 55°C przez 60 s; 72°C przez 60 s). Produkty amplifikacji wytrącano etanolem i cięto przy użyciu enzymu *Bam*HI, aby otrzymać produkty kontrolne. Produkty PCR rozdzielano na 2% żelu agarozowym. DNA wybarwiano bromkiem etydy, a następnie z żelu wycinano paski. Namnożone produkty z komórkowego RNA porównywano do wyniku (cpm) uzyskanego z matrycy kontrolnej DNA. Poziom ekspresji mRNA receptorów przeliczano na całkowite komórkowe DNA, w celu określenia całkowitej liczby komórek w każdej próbce.

Oligonukleotydy starterowe zostały zamówione w Gibco BRL (*Grand Island, NY*). Specyficzny fragment ER alfa cDNA o długości 505 par zasad amplifikowano przy użyciu starterów komplementarnych do zasad 803-822 i 1288-1307 opublikowanej sekwencji (Genebank accession numer M1674). Startery dla ER-beta cDNA były komplementarne do zasad 628-647 i 1052-1071 opublikowanej sekwencji (Genebank accession numer AF051427) i flankowały amplifikowany fragment o długości 444 par zasad. W celu otrzymania matryc kontrolnych w sekwencji ER-alfa cytozyny (C) podstawiono adeninę (A) przy zasadzie 1057,





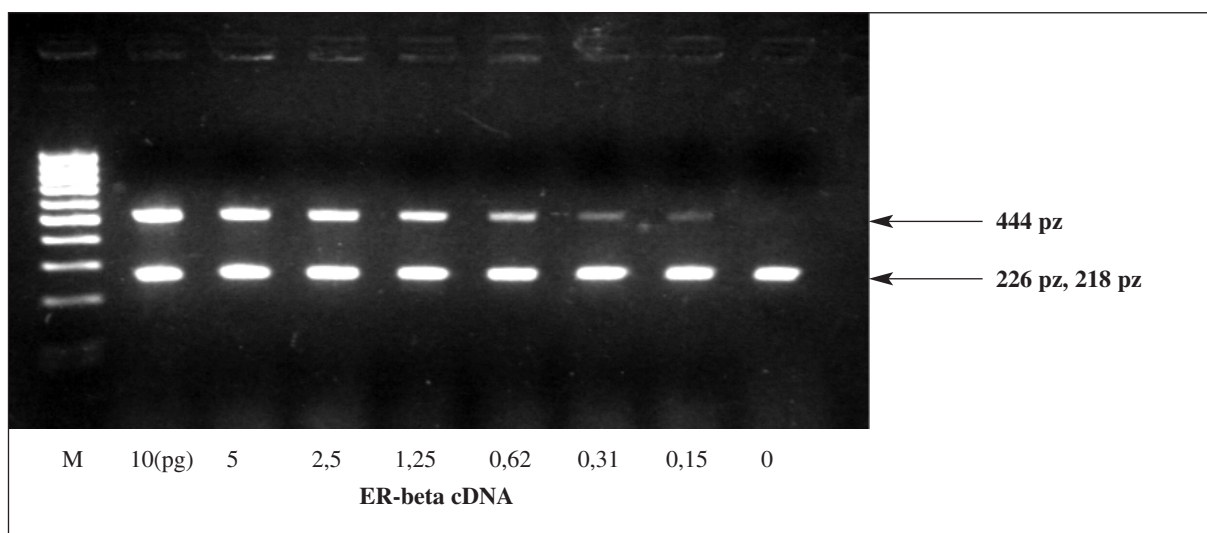
Ryc. 1. Krzywa standardowa dla receptora estrogenowego alfa. Produkty reakcji RT PCR rozwinięte na 2% żelu agarozowym, wybarwione bromkiem etydyny. Dziki typ 550 par zasad. Produkty kontrolne o długości 251 par zasad i 254 par zasad. M-Marker DNA Low Range Mass Ruler (MBI Fermentas)

a w matrycy dla ER-beta podstawiono C do G przy zasadzie 854 stosując ukierunkowaną mutagenezę, aby uzyskać specyficzne miejsce cięcia dla enzymu restrykcyjnego *BamHI* [12]. Matryca kontrolna (1 pg) była dodawana do każdej reakcji PCR.

Całkowite komórkowe DNA izolowano z tkanek przy użyciu Trizol (Gibco BRL) wg przepisu producenta. Osad DNA rozpuszczano w 50 µl 8 mM NaOH w 37°C przez 10 min, a następnie ustalano pH do wartości 7.4 1M HEPES. Stężenie DNA mierzono przy użyciu metody fluorescencyjnej (*PicoGreen dsDNA*

Quantitation Kit, Molecular Probes, Inc, Eugene, OR). Dokładnie 20 µl próby rozpuszczano w 2 ml roztworu PicoGreen i mierzono fluorescencję we fluorymetrze Turner Designs (Sunnyvale, CA). Stężenie DNA w próbce wyliczano z krzywej standardowej przez liniową regresję fluorescencji utworzonej z lambda DNA o znanym stężeniu (ryc. 1. i 2.).

W surowicy krwi pacjentek, którą pobierano przed zabiegami operacyjnymi oznaczano poziom stężenia FSH, LH i estradiolu. Uzyskaną surowicę przechowywano w komorze głębokiego zamrażania (-80°C) do



Ryc. 2. Krzywa standardowa dla receptora estrogenowego beta. Produkty reakcji RT PCR rozwinięte na 2% żelu agarozowym, wybarwione bromkiem etydyny. Dziki typ 444 pary zasad. Produkty kontrolne o długości 218 par zasad i 226 par zasad. M-Marker DNA Low Range Mass Ruler (MBI Fermentas)



Tab. I. Ekspresja ER-alfa i ER-beta oraz stosunek ER-alfa/ER-beta w badanym materiale

Material	Receptor	Średnia $\pm$ SD	Zakres
myometrium n=12	alfa [pgRNA/ μ gDNA]	18,0 $\pm$ 12,2*	5,2–45,9
	beta [pgRNA/ μ gDNA]	8,9 $\pm$ 4,6	3,0–17,1
	alfa/beta	2,6 $\pm$ 2,7	0,8–10,9
endometrium n=12	alfa [pgRNA/ μ gDNA]	4,9 $\pm$ 9,8	0,2–21,9
	beta [pgRNA/ μ gDNA]	5,1 $\pm$ 14,1	0,3–50,0
	alfa/beta	4,8 $\pm$ 12,0	0,4–43,0

* Istotnie statystycznie wyższa ekspresja receptora estrogenowego alfa w porównaniu do receptora beta ($p=0,02$) w mięśniach macicy.
Istotnie statystycznie wyższa ekspresja receptora estrogenowego alfa w myometrium w porównaniu do endometrium ($p=0,018$)

czasu analizy. Stężenie FSH, LH oraz estradiolu w badanych próbkach surowicy określano radioimmunologicznie wykorzystując znakowane ^{125}J komercyjne zestawy do oznaczeń hormonalnych (Estradiol, LH, FSH: [^{125}J] Coated Tube Radioimmunoassay SPECTRIA Orion Diagnostica, Finlandia).

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica Statsoft vs 5.1. stosując testy Manna-Whitneya oraz Wilcoxon. Wyniki testów uznano za istotne statystycznie przy $p<0,05$.

Wyniki

Ekspresję receptorów estrogenowych alfa i beta wykazano we wszystkich badanych próbkach. W mięśniach macicy ekspresja receptora estrogenowego alfa była znacząco wyższa w porównaniu do receptora beta ($p=0,02$) (tab. I). W endometrium poziom ekspresji obu typów receptora wykazywał zbliżone wartości. Ekspresja receptora estrogenowego alfa była istotnie statystycznie wyższa w myometrium w porównaniu do endometrium ($p=0,018$), podczas gdy ekspresja ER-beta nie różniła się znacząco pomiędzy badanymi tkankami. Stosunek ekspresji ER-alfa do ER-beta nie różnił się istotnie pomiędzy myometrium a endometrium.

Stężenia FSH, LH oraz estradiolu w surowicy kobiet objętych badaniem przedstawia tab. II.

Dyskusja

W szeregu badań wykazano, że oddziaływanie estrogenów na tkanki docelowe uzależnione jest od dystrybucji obu typów receptora estrogenowego oraz interakcji pomiędzy białkami receptorowymi. Receptor estrogenowy alfa i beta wykazują różne powinowactwo do substratów oraz odmiennie regulują transkrypcję genów [17]. Oba typy receptora tworzą homodimery lub heterodimery, które posiadają zdolność przyłączania

się do ERE (ang. *estrogen response elements*) w odcinkach regulatorowych genów [18]. Wzajemne oddziaływanie obu typów receptora wydaje się być jednym z najważniejszych mechanizmów, odpowiedzialnych za efekt działania estrogenów na tkanki docelowe. Opinię tę potwierdzają badania wykazujące, że receptor estrogenowy beta reguluje aktywność transkrypcyjną receptora typu alfa i w zależności od stężenia estrogenów pobudza lub hamuje ekspresję genów [19].

W niniejszej pracy oceniono i porównano ekspresję receptorów estrogenowych alfa i beta w prawidłowych tkankach macicy. W myometrium zaobserwowano dominację ekspresji ER-alfa nad ER-beta, podczas gdy w błonie śluzowej macicy poziomy ekspresji obu typów receptora nie różniły się znacząco. Pomimo to, stosunek ekspresji ER-alfa do ER-beta nie różnił się pomiędzy badanymi tkankami. Interesujący jest fakt, że ekspresja ER-alfa była ponadtrzykrotnie wyższa w myometrium niż w endometrium.

Różnice w ekspresji receptorów estrogenowych pomiędzy błoną śluzową a mięśniem macicy mogą warunkować specyficzną dla danej tkanki odpowiedź na estrogeny. Mogą także być wyrazem zaangażowania innych mechanizmów, regulujących ekspresję tychże receptorów w endometrium i myometrium. W dotychczas opublikowanych badaniach obserwowana zarówno w myometrium, jak i endometrium przewaga ekspresji ER-alfa nad ER-beta dotyczyła przede wszystkim fazy proliferacyjnej cyklu [15, 16]. W niniejszej pracy badaniami objęto populację kobiet w okresie przedmenopauzalnym. Pomi-

Tab. II. Stężenia FSH, LH i estradiolu w surowicy krwi

Hormon	Średnia $\pm$ SD	Zakres
FSH [mIU/ml]	19,7 $\pm$ 8,9	4,0–39,0
LH [mIU/ml]	17,8 $\pm$ 15,0	6,0–59,0
estradiol [pg/ml]	210,7 $\pm$ 297,2	13,0–950,0



mo że wszystkie uczestniczki badania zgłaszały regularne miesiączkowanie, u znacznej części pacjentek stwierdzono niezgodność pomiędzy fazą cyklu ustaloną na podstawie ostatniej miesiączki a obrazem histologicznym endometrium. W związku z tym niemożliwa była analiza zależności ekspresji receptorów od fazy cyklu płciowego. Z drugiej strony należy zauważyć, że zmiany w funkcjonowaniu osi podwzgórze-przysadka-jajnik zachodzące u kobiet przed menopauzą mogą wywierać istotny wpływ na ekspresję receptorów estrogenowych. W badaniach *in vitro* wykazano, że synteza obu typów receptora regulowana jest przez estradiol, ale przypuszcza się, że istotną rolę może odgrywać również FSH [20]. U większości uczestniczek naszego badania stężenia FSH w surowicy krwi odzwierciedlają zmiany hormonalne, charakterystyczne dla okresu przedmenopauzalnego (tab. II). Dlatego wielce prawdopodobne jest, że uzyskane przez nas wyniki obrazują zależności w ekspresji receptorów estrogenowych u kobiet w okresie przed menopauzą, które mogą wykazywać inną charakterystykę niż we wcześniejszych latach życia.

W dotychczas opublikowanych pracach nie dokonano ilościowej oceny ekspresji receptorów estrogenowych jednocześnie w błonie śluzowej i mięśniu macicy, uzyskanych od tej samej pacjentki. Zaskakującym wynikiem naszych badań było stwierdzenie wyższej ekspresji ER-alfa w myometrium w porównaniu do endometrium, co mogłoby sugerować większą wrażliwość myometrium na działanie estrogenów. Zważywszy jednak, że w świetle współczesnej wiedzy receptor estrogenowy beta reguluje aktywność transkrypcyjną receptora alfa [19] a stosunek ER-alfa/ER-beta pomiędzy badanymi tkankami nie różnił się istotnie statystycznie, bezwzględnie wyższa ekspresja receptora alfa nie może być uważana za cechę świadczącą o większej estrogenowrażliwości myometrium w porównaniu do endometrium.

Podsumowując, wyniki naszej pracy potwierdzają ekspresję obu typów receptora estrogenowego w prawidłowych tkankach macicy u kobiet w okresie przedmenopauzalnym. W świetle naszych badań różnice w ekspresji receptorów pomiędzy błoną śluzową a mięśniami macicy dotyczą jedynie receptora alfa.

Summary

Effects of estrogens are mediated by two types of estrogen receptor (ER-alfa and ER-beta). The responsiveness of target tissues to estrogens relies on the distribution of both receptor types as well as interactions between these two molecules. We aimed to evaluate the expression of ER-alfa and ER-beta genes in endometrium and myometrium in premenopausal women. Endometrium and myometrium samples were derived from 12 women subjected to surgery because of uterine leiomyomas. ER-alfa and ER-beta mRNAs were measured by quantitative assays based on reverse transcription (RT) of the mRNA and polymerase chain reaction (PCR) amplification of the cDNA. The expression of ER-alfa but not ER-beta was significantly higher in comparison to ER-beta in uterine myometrium. Interestingly, the expression of ER-alfa was higher in myometrium compared to endometrium, while the expression of ER-beta did not differ between these tissues. There were no differences in the ratio of ER-alfa/ER-beta expression between myometrium and endometrium. Our results indicate that differences in the expression of estrogen receptors between myometrium and endometrium are confined to receptor alpha.

Key words: estrogen receptor, myometrium, endometrium

Piśmiennictwo

1. Beato M, Truss M, Chavez S. Control of transcription by steroid hormones. Ann N Y Acad Sci USA. 1996; 784: 93-123.
2. Green S, Walter P, Kumar V, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erbA. Nature 1986; 320: 134-9.
3. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell 1995; 83: 835-9.
4. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 5925-39.
5. Mosselman S, Pohlman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of novel human estrogen receptor. FEBS Lett 1996; 392: 49-53.
6. Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of estrogen receptor beta in human tissues. J Mol Endocrinol 2000; 24: 145-55.
7. Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. EMBO J 1988; 11: 3385-8.



8. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, et al. *Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern.* J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 4258-65.
9. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. *Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA.* J Biol Chem 1997; 272: 19858-62.
10. Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY et al. *Tissue distribution of estrogen α and β mRNA in the midgestational human fetus.* J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 3509-12.
11. Jakimiuk JA, Weitsman SR, Yen H-W, et al. *Estrogen receptor α and β expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome.* J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 5532-8.
12. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler. *Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system.* J Comp Neurol 1997; 388: 507-25.
13. Matsuzaki S, Fukaya T, Suzuki T, et al. *Oestrogen receptor α and β mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle.* Mol Hum Reprod 1999; 5: 559-64.
14. Rey JM, Pujol P, Dechaud H, et al. *Expression of oestrogen receptor- α splicing variants and oestrogen receptor- β in endometrium of infertile patients.* Mol Hum Reprod 1998; 4: 641-7.
15. Wang H, Wu X, Englund K, et al. *Different expression of estrogen receptors α and β in human myometrium and leiomyoma during the proliferative phase of the menstrual cycle and after GnRHa treatment.* Gynecol Endocrinol 2001; 15: 443-52.
16. Witek A, Mazurek U, Paul M, Bierzyńska-Macyszyn G, Wilczok T. *Quantitative analysis of estrogen receptor mRNA in human endometrium through the menstrual cycle using a real-time reverse transcription-polymerase chain react assay.* Folia Histochem Cytobiol 2001; 39: 116-8.
17. Kuiper GGJM, Carlsson K, Grandien K, et al. *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β .* Endocrinology 1997; 138: 863-70.
18. Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, et al. *Human estrogen receptor (β) binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor α .* J Biol Chem 1997; 272: 25832-8.
19. Hall JM, McDonnell DP. *The estrogen β -isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens.* Endocrinology 1999; 140: 5566-78.
20. Yang P, Kriatchko A, TRoy SK. *Expression of ER- α and ER- β in hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and ovarian steroids.* Endocrinology 2002; 143: 2385-98.

Adres do korespondencji

II Katedra i Klinika Ginekologii AM w Lublinie
 Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 4
 ul. Jaczewskiego 8
 20-954 Lublin

