

İNSAN TESTİSİNDE ANDROJENLERİN ETKİ MEKANİZMASI

I. İnsan testisinde sitozolik androjen reseptörlerinin heterojenisitesi ve moleküler transformasyonu

S. Nezih HEKİM

*İstanbul Üniversitesi, Edirne Tıp Fakültesi,
Biokimya Kürsüsü, Fatih - İstanbul.*

ÖZET

İnsan testis dokusuna ait sitozol *in vitro* ^3H - R1881 (^3H - methyltrienolone) ile işaretlenmiş ve sukroz gradient santrifügasyon yöntemi ile analizlenmiştir. İonik kuvveti düşük olan tamponlarla hazırllanmış gradientlerde sedimentasyon katsayıları 3S ve 4S olan iki bağlanma yüzeyine rastlanmıştır. Her iki bağlanma yüzeyine ^3H - R1881'in bağlanması radyoaktif steroidin yüz katı soğuk R1881 ve testosteron ile engellendiği saptanmıştır. Progesteron'un ise sadece 3S'deki bağlanmayı engellediği izlenmiştir. Bunun yanı sıra ionik kuvveti yüksek olan tamponlarla (0.4 M KCl) hazırllanmış gradientlerde 4S'in 3S bağlanma yüzeyine ransforme olduğu görülmüştür.

Bu çalışmanın ışığı altında 3S'in androjen ve progesteron için ortak bir reseptör 4S'in ise sadece androjenlere spesifik bir reseptör olduğunu ve 4S'in 3S reseptörünün dimerizasyon ürünü olduğuna kanaat getirilmiştir.

GİRİŞ

Testiste iki tür androjen bağlayıcı protein bulunmuştur. Birincisi ABP (Androgen Binding Protein) diye adlandırılmakta olup sıçan¹, tavşan¹⁰, ve insan testisinde varlığı gösterilmiştir⁴. ABP adrojeni geniş kapasite ve düşük affinité ile bağlayan hücre - dışı sıvıda bulunan bir taşıyıcı proteindir. İkinci tür androjen bağlayıcı protein hücre içi reseptör özellikleri göstermekte olup ilk kez sıçan testisinde gösterilmiştir². Son zamanlarda insan testisinde varlığı ve düzeyi tarafımızdan saptanmıştır^{3,9}.

Bu çalışmamızda insan testisinde androjen reseptörlerinin heterojenisitesi saptanmış ve moleküler transformasyonları incelenmiştir. Bu incelemler, androjenlerin insan testisindeki etki mekanizmasının açıklanmasına

katkıda bulunmayı amaçlamaktadır. ^3H - methyltrienolone (^3H - RI881) güçlü bir androjen olarak bağlanma çalışmalarında kullanılmıştır. Rezeptöre olan bağlanmaları ve spesifisitelerini saptamada sukroz gradient santrifügasyon tekniğinden yararlanılmıştır.

GEREÇLER VE YÖNTEM

Bu çalışmada prostat kanserlerinin tedavisi amacıyla çıkarılan testisler ve testis kanserlerinde çıkarılan testislerin makro diseksiyon ile ayrılmış normal kısımları kullanılmıştır. Dokular elde edildiği sirada likid azot içerisinde dondurulmuş ve laboratuarda -70°C de saklanmıştır. Dokular en geç bir hafta içerisinde deneye alınmıştır.

^3H - RI881, 55.5 Ci/mmol ve radioinert RI881 (17 β - hydroxy - 17 α - methyl - estra - 4,9,11 - triene - 3 - one) Paris - Roussel - Uclaf'dan Dr. J. P. Raynaud tarafından hediye edilmiştir. Testosteron (androst - 4 - en - 17 β - ol - 3 - one), östradiol (estra - 1,3,5 - (10) - triene - 3,17 β - diol) Merck - Darmstadt, Progesteron (pregn - 4 - ene - 3, 20 - dione) Fluka - Buchs'dan satın alınmıştır. Sığır serum albumini (BSA) sigma, Dextran - T70 Upsala - Pharmacia, Norit A (charcoal) Fisher - USA'dan satın alınmıştır. Sintilasyon sıvısı için 4g PPO (Sigma - USA) ve 100 mg dimetil POPOP (Sigma - USA) 1 lt toluene (Merck - Darmstad) içerisinde çözülmüştür.

β - Sintilasyon sayacı olarak Searle - Mark III, Ultrasantrifüj olarak MSE - Superspeed - 70 aygıtları kullanıldı.

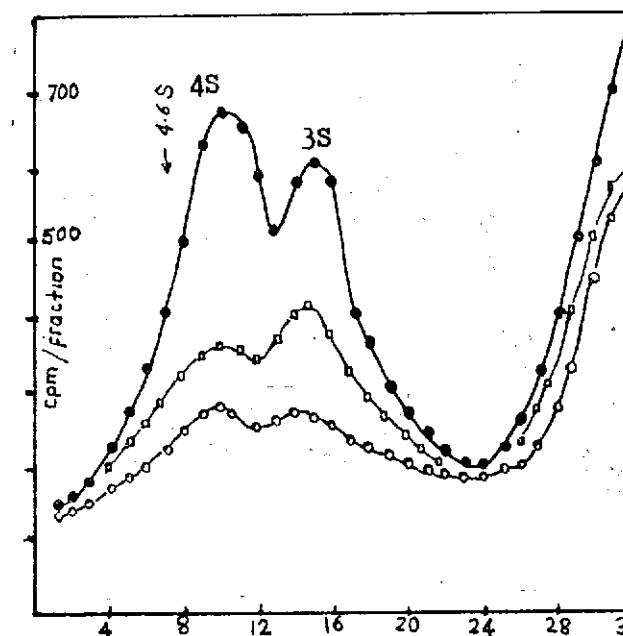
Doku parçaları soğuk odada ($+4^\circ\text{C}$) gevşemeye bırakılmış ve 1/3 doku/tampon oranına bağlı kalınarak TEGM tamponunda (50 mM Tris - HCl pH 7.4, 1mM EDTA, %10 Glycerol, 10 mM α - monothioglycerol) mexasla kıyılmış ve potter homojenizöründe homojenize edilmiştir. Homojenizat 105,000 xg de çevrilmiştir. Üst faz 1 saatlik santrifügasyondan sonra elde edilmiştir (sitozol). Sitozoller, DCC (%0.625 Dextran, %1.25 Charcoal) ile 2v sitoziol/1v DCC oranına bağlı kalmakarak 20 dakika inkübe edilmiş ve üst faz 2,000 xg de alınmıştır.

Üst faz'dan alınan 0.2 şer ml lik örnekler 10 nM ^3H - RI881 ve 10 nM ^3H - RI881 + 1 μM radio - inert steroidler ile 0°C de 3 saat inkübe edilmişlerdir. Gerek radioaktif gereksede radio - inert steroidler etil alkolde çözülcerek ilâve edilmiş olup son alkol konsentrasyonu %0.2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Inkübasyon sonunda 0.1 ml DCC eklenmiş ve üst faz 2,000 xg de çevrilerek elde edilmiştir. Her bir inkübasyon ortamından elde edilen DCC uygulanmış sitozoller, %10 gliserol içeren %5 - %20 linear sukroz gradient

içeren tüplerin üzerine yayılmıştır. Yayılan DCC uygulanmış sitozol hacmi 0.1 ml olup gradientler 18 ila 24 saat $+2^\circ\text{C}$ de 55,000 rpm de çevrilmiştir. Fransionlar santrifügasyon sonunda tübüñ dibinden itibaren peristaltik pompa yardımı ile toplanmıştır. Deney sırasında iç - standart olarak 4.6S (BSA) kullanılan olup sedimentasyon katsayıları Martin - Ames⁶ hesaplaması yöntemi ile saptanmıştır.

BULGULAR

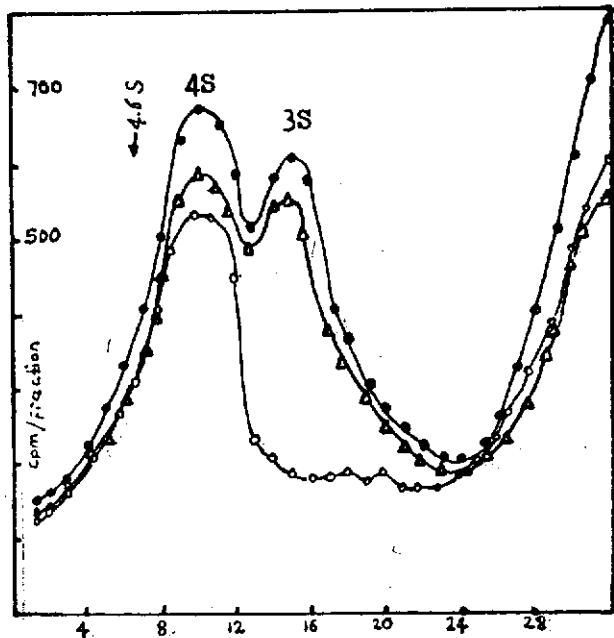
İnsan normal testisine ait sitoziolde, güçlü bir yapay androjen olan ^3H - RI881'in sedimentasyon katsayıları farklı iki proteine bağlı olduğu görülmüştür. Bunlardan birinin sedimentasyon katsayısının 3S (3 Svedberg), diğerinin ise 4S oldukları saptanmıştır (Şekil : 1).



Şekil : 1. İnsan testis dokusuna ait sitoziolik androjen bağlanma yüzeyleri: Sitozoller 10nM ^3H - RI881 ve 10nM ^3H - RI881 + 1 μM R1881 ile ayrıca 10nM ^3H - RI881 + 1 μM testosteron ile 0°C de 3 saat inkübe edilmiştir. İç standart olarak BSA (4.6 S) kullanılmış olup gradientler 2°C de 24 saat 55,000 rpm de çevrilmiştir. Total bağlanma (●—●) iki bağlanma yüzeyini göstermektedir. Bu bağlanma yüzeylerinin her ikisi de soğuk RI881 ile (○—○) ve testosteron (□—□) ile engellenmektedir.

Bu iki androjeni bağlayıcı proteinin reseptör karakterinde olup olmadığını saptamak için sitozoller $10\text{nM}^3\text{H}-\text{R1881}$ 'in yüz katı $1\mu\text{M}$ radio-inert R1881 ve bir doğal androjen olan $1\mu\text{M}$ testosteron ile inkübe edilmiştir. Sonuçta her iki bağlanmanında gerek radio-inert R1881 ile gerekse testosteron ile inhibe edildiği görülmüştür (Şekil : 1).

Daha sonra bu iki bağlayıcı proteinin sadece androjenler için mi yoksa diğer steroidler içinde spesifik olup olmadıklarını anlamak için $10\text{nM}^3\text{H}-\text{R1881}$ eklenmiş sitozoller $1\mu\text{M}$ östradiol ve $1\mu\text{M}$ progesteron ile inkübe edilmiştir. Östradiolün, $^3\text{H}-\text{R1881}$ 'in her iki bağlayıcı proteinede bağlanmasıını inhibe edemediği, progesteronun ise sadece 4S bağlayıcı proteine olan bağlanmayı inhibe edemediği görülmüştür (Şekil : 2). Progesteronun 3S bağlayıcı proteine $^3\text{H}-\text{R1881}$ 'in bağlanmasıını inhibe edebilmesi 3S bağ-

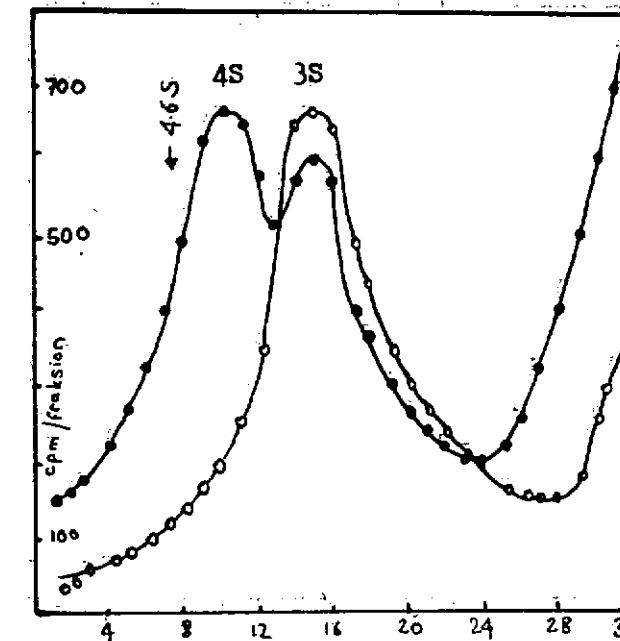


Şekil : 2. İnsan testis dokusuna ait sitozollerde östradiol ve progesteron, için androjen bağlanma yüzeylerinin spesifiteleri:

Sitozoller $10\text{nM}^3\text{H}-\text{R1881}$ ve $10\text{nM}^3\text{H}-\text{R1881} + 1\mu\text{M}$ östradiol ile ayrıca $10\text{nM}^3\text{H}-\text{R1881} + 1\mu\text{M}$ progesteron ile 0°C de 3 saat inkübe edilmiştir. İç standart olarak BSA (4.6 S) kullanılmış olup gradientler 2°C de 24 saat 55,000 rpm de çevrilmiştir. Total bağlanmayı ($\bullet-\bullet$) östradiolün engellememiği ($\Delta-\Delta$) progesteronun ise sadece 3S deki bağlanmayı engellediği ($\circ-\circ$) saptanmıştır.

ma yüzeyinin androjenler ve progesteron için ortak bir non-spesifik reseptör olduğunu göstermektedir.

$10\text{nM}^3\text{H}-\text{R1881}$ ile inkübe edilen sitozollerde iki bağlayıcı protein saptanmıştır. $10\text{nM}^3\text{H}-\text{R1881} + 0.4\text{ M KCl}$ (son konsentrasyon) ile inkübe edilen sitozollerde sadece sedimentasyon katsayıısı 3S olan bir bağlanma yüzeyine rastlanmıştır. Sonuç olarak bağlayıcı proteinlerin birbirine transforme olabildikleri görülmüştür (Şekil : 3).



Şekil : 3. İnsan testis dokusuna ait sitozolik androjen bağlanma yüzeylerinin transformasyonu:

Sitozoller $10\text{nM}^3\text{H}-\text{R1881}$ ile ve 0.4 M KCl içeren ortamda $10\text{nM}^3\text{H}-\text{R1881}$ ile 3 saat 0°C de inkübe edilmiştir. 0.4 M KCl içeren ortamda inkübe edilen sitozol genellikle 0.4 M KCl içeren sukroz gradiente diğeri ise gerekliler ve yöntem bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanan gradiente yayılmıştır. İç standart olarak BSA (4.6 S) kullanılmış olup gradientler 2°C de 24 saat 55,000 rpm de çevrilmiştir. Düşük ionik kuvvetli ortamda 3S ve 4S bağlanma yüzeyleri görüldürken yüksek ionik kuvvetli ortamda (0.4 M KCl) sadece 3S bağlama yüzeyi görülmüştür.

TARTIŞMA

Bu çalışmada insan testisine ait sitozollerde androjen reseptörlerinin sedimentasyon katsayıları, spesifiteleri ve transformasyonları saptan-

mıştır. Tüm çalışma boyunca androjen bağlama yüzeylerinin fizikokimyasal özellikleri ^3H - R1881'in doğal androjenler yerine bağlanması ile yürütülmüşdür. R1881'in seçilmesindeki amaçlar, bu yapay androjenin dokularda bulunabilecek serumdaki androjeni bağlayıcı proteinlerle bağlanmaması, inkübasyon sırasında metabolize olmayı ve androjen reseptörlerde yüksek affinité ile bağlanmasıdır.

İnsan testis dokusuna ait sitozolik androjen reseptörlerine ^3H - R1881'in bağlanması sukroz gradient santrifügasyon yöntemi ile saptanmıştır. Gerek spesifite çalışmalar gereksede moleküler transformasyonun incelenmesinde aynı teknikten yararlanılmıştır. Bu yöntemle sitozolik androjen reseptörlerinin heterojen oldukları görülmüştür. Farklı androjen bağlanma yüzeylerinden birinin sedimentasyon katsayısı 3S diğerinin ise 4S olarak saptanmıştır. Bunların reseptör karakterinde olup olmadıklarını göstermek için ^3H - R1881'i bağlama kapasiteleri incelenmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmada ^3H - R1881'in yüz katı radio-inert R1881 veya testosteronun aynı şekilde bağlanmayı inhibe ettikleri görülmüştür (Şekil : 1).

Bu, bağlanma yüzeylerinin androjenler için düşük kapasite ve yüksek affinité gösterdiklerine işaret etmektedir. Receptor dışındaki bağlayıcı proteinler ise geniş bağlama kapasitesi ve düşük bağlanma affinitesi ile karakterize edilir. Bu tip bağlanma yüzeyleri işaretli hormonun yüz katı radio-inert hormonla inhibe edilemezler inhibisyon için genellikle 10^3 yada 10^4 katı radio-inert hormonu gerektirirler⁸.

Spesifite çalışmaları 3S androjen reseptörünün non-spesifik yani hem progesterona hem de androjenlere bağlanabildiğini, 4S androjen reseptörünün ise sadece androjenlere spesifik olduğunu göstermektedir. Bu bulgu bize 3S reseptörünün 4S reseptörünün bir ön aşaması olabileceğini (prekürsörü) anımsattı. Yüksek tuz konsentrasyonunda (0.4 M KCl) yapılan çalışmalarda sadece 3S reseptöründe rastlayabildik. Receptor dimerlerinin 0.4 M KCl de monomerlerine ayrıldığı iyi bilinen bir fenomendir^{5,7}. Buna dayanarak 4S reseptörünün iki 3S reseptörünün dimerleşmesindenoluştuğu ileri sürülmüştür. Bu bulgu sitozolik androjen reseptörlerinin moleküler transformasyonunu olabileceğini göstermektedir.

Yapılan literatür çalışmalarına göre insan testisinde androjen reseptörlerinin fizikokimyasal özellikleri ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadığından bulgularımızı başka araştırmaların bulguları ile karşılaştırma olanağımız olmamıştır. Ne varki benzer model Jensen ve çalışma arkadaşları tarafından sıkı uterusunda östrojen reseptörleri için teklif edilmiştir^{5,7}. Bu modele

göre 4S östrojen reseptörü 5S östrojen reseptörune transforme olmakta ve 5S reseptörü hücre çekirdeğine transloke olmaktadır⁷. İnsan testisi içinde 3S androjen reseptörünün moleküler transformasyonu ile oluşan 4S androjen reseptörünün çekirdeğe translokasyonu konusundaki çalışmalarımız devam etmektedir.

SUMMARY

MECHANISM OF ANDROGEN ACTION IN HUMAN TESTIS

I. Heterogeneity and molecular transformation of androgen receptors in human testis cytosol.

Human testis cytosol labeled *in vitro* with ^3H - R1881 (^3H - methyltrienolone) and analyzed by sucrose gradient density centrifugation formed two peak of bound radioactivity with a sedimentation constant of about 3S and 4S in buffer of low ionic strength. The labeled 3S and 4S complexes were displaced with 100 fold excess cold R1881 and testosterone whereas only 3S was displaced by excess progesterone. On the other hand in buffer of high ionic strength (0.4 M KCl) 4S transformed to 3S complex.

Under the light of these observations we come to the conclusion that 3S is common receptor for both androgen and progesterone however 4S is highly specific for only androgens whereas 4S is the dimerisation product of 3S androgen receptors.

KAYNAKLAR

- 1 — HANSSON V., DJØSELAND O., REUSCH A., ATTRAMADAL A., TORGERSEN O.: *Steroids*, 21 : 457, 1973.
- 2 — HANSSON V., MCLEAN W. S., SMITH A. A., TINDALL D. J., WEDDINGTON S.C., NAYFEH S. N., FRENCH F.: *Steroids*, 23 : 823, 1974.
- 3 — HEKİM S.N., DAHL O., HØIESAETER P.-Å and STØA K.F.: *Androgen receptor measurements in human normal and malignant testis tissue*. The Norwegian Society of Endocrinology. Ann. Meeting, 5/2 - 8/2, 1978, Geilo - Norway, Congress Report.
- 4 — HSU A. F., NANKIN H. R., TROEN P.: in *The Testis in Normal and Infertile Men* (ed. by Troen P., Nankin H.R.), 421, 1977 Raven Press - New York.
- 5 — JENSEN E. V., NUMATA M., BRECHER P. I. and DE SOMBRE E. R.: in *The Biochemistry of Steroid Hormone Action* (ed. by Smellie R.M.S.), 133, 1973. Academic Press - New York.
- 6 — MARTIN, R.G. and AMES B.N.: *J. Biol. Chem.* 236:1372, 1961.
- 7 — NOTIDES A.C.: in *Receptors and hormone Action* (ed. by O'Malley B.W., Birnbaumer L.) 2:33, 1978, Academic Press, New - York,

8 HEKİM - İNSAN TESTİSİNDE ANDROJENLERİN ETKİ MEKANİZMASI

- 8 — O'MALLEY B.W., HARDMAN J.G.: *Hormone Action*, Part E., in *Methods in Endocrinology*, Vol. XL, New York, Academic Press, 1975.
- 9 — STØA K. F., HEKİM S. N., HØISAETER P.-A., DAHL O.: *J. Steroid Biochem.* 9 (9) : 813, 1978.
- 10 — WEDDINGTON S.C., BRANDTZAEG K., SLETTEN K., CHRISTENSEN T., HANSSON V., FRENCH F.S., PETRSZ P., NAYFEH S.N., RITZEN E.M.: in *Current Topics in Molecular Endocrinology* (ed. by O'Malley B. W., Means A.R.) 433, 1975, Plenum Press, New - York.