

Received: 2007.08.22
Accepted: 2007.09.24
Published: 2007.10.08

Niegenomowe działanie estrogenów

Non-genomic action of estrogens

Marta Świtalska, Leon Strządała

Zakład Onkologii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda
we Wrocławiu

Streszczenie

Estrogeny promują rozwój, proliferację, migrację i przeżywalność wielu komórek. Biologiczne działanie estrogenów zależy od ich związania się z receptorami estrogenowymi (ER), które wpływają na regulację procesów transkrypcyjnych. Wymaga to translokacji receptora związanego z estrogenem do jądra komórkowego i związania się do swoistego elementu odpowiedzi w DNA i regulacji ekspresji genów. Estrogeny mogą jednak również działać bez wiązania się do DNA – takie działanie nazywane jest niegenomowym działaniem estrogenów i jest niezależne od transkrypcji genów czy syntezy białek. Poprzez działanie nietranskrypcyjne (niegenomowe) estrogeny mogą aktywować kaskadę białek regulatorowych, takich jak MAPK, PI3K, kinazy tyrozynowe, czy także białka związane z błoną cytoplazmatyczną – kanały jonowe i receptory związane z białkiem G. Ważnym celem działania estrogenów są mitochondria. W mitochondriach również zidentyfikowano receptory estrogenowe. Obecność ER w mitochondriach może wskazywać, że estrogeny mogą regulować także transkrypcję genomu mitochondrialnego. Estrogeny mogą też na poziomie posttranslacyjnym regulować w mitochondriach procesy oddechowe, m.in. hamują aktywność mitochondrialnych białkowych kompleksów oddechowych – I, II, III i IV. Indukują różne izoformy syntazy tlenu azotu (NOS) i powstawanie w mitochondriach wolnych rodników (ROS).

Słowa kluczowe:

estrogeny • działanie niegenomowe • mitochondria • wolne rodniki • apoptoza

Summary

Estrogens can promote the development, proliferation, migration, and survival of target cells. Estrogen mediates its biological effects through its association with estrogen receptors (ERs). ERs act via the regulation of transcriptional processes, involving nuclear translocation and binding to specific response elements, leading to the regulation of gene expression. However, estrogens can also act without direct binding to DNA. This effect is called "non-genomic" and does not depend on gene transcription or protein synthesis. Through non-transcriptional (non-genomic) mechanisms, estrogens can modulate regulatory cascades such as MAPK, PI3K, and tyrosine kinases, and also membrane-associated molecules such as ion channels and G protein-coupled receptors. Important targets of estrogen action are mitochondria, within which ERs have been identified, thus implicating their role in the regulation of mitochondrial genome transcription. Estrogens may also regulate mitochondrial respiratory physiology at the post-translational level. They can inhibit mitochondrial respiratory complexes I, II, III, and IV, and can then also induce various isoforms of nitric oxide synthase (NOS) and mitochondrial reactive oxygen species (ROS).

Key words:

estrogens • non-genomic activity • mitochondria • free radicals • apoptosis

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11323.pdf
Word count:	3199
Tables:	–
Figures:	1
References:	37

Adres autorki: mgr Marta Świtalska, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Zakład Onkologii Doświadczalnej, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: switalska@iitd.pan.wroc.pl

WSTĘP

Estrogeny to żeńskie hormony płciowe, należące do grupy hormonów steroidowych, pochodnych cholesterolu. Syntetyzowane są w jajnikach, łożysku, jądrach i korze nadnerczy, których komórki zawierają cytoplazmę bogatą w cholesterol. Biologicznie najbardziej aktywny jest estradiol (E2), pochodna testosteronu. Nieco słabszym jest estron a najsłabsze działanie ma estriol, powstały w wyniku kolejnych przekształceń estronu. Estrogeny odpowiadają za rozwój drugorzędnych cech płciowych (macicy, pochwy, gruczołu mlekowego) oraz za zachowanie się charakterystyczne dla samicy. Wspólnie z progesteronem i hormonami gonadotropowymi sterują cyklem płciowym samic. Działają także na ośrodkowy system nerwowy, wpływając na zachowanie seksualne samic.

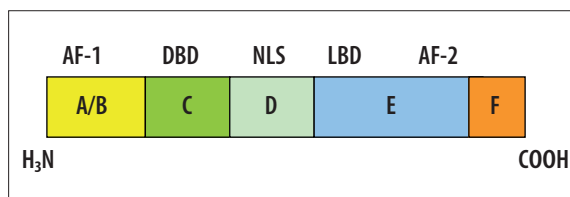
Oprócz dobrze poznanego wpływu na układ rozrodczy estrogeny wykazują wielokierunkowe działanie w licznych innych narządach i tkankach. Zmieniają m.in. korzystnie profil lipidowy we krwi – zmniejszają stężenie cholesterolu całkowitego i LDL a zwiększają stężenie HDL, obniżają poziom glukozy i insuliny. Estrogeny zwiększają także stężenie we krwi czynników krzepnięcia II, VII, IX i X oraz zmniejszają poziom fibrynogenu i antytrombiny II. Hormony te zwiększają wytwarzanie i uwalnianie tlenu azotu, redukują stężenie endoteliny (białko powodujące zwężanie naczyń krwionośnych i pośredniczące w regulacji odpowiedzi immunologicznej). Wpływają też na zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych. Mają również wpływ na biosyntezy tłuszczów, białek oraz zasad purynowych i pirymidynowych, poprzez oddziaływanie na kofaktory transhydrogenazy NADPH/NAD⁺ [9].

DZIAŁANIE GENOMOWE ESTROGENÓW

Estrogeny działają w komórce wiążąc się z receptorami estrogenowymi (ER) α i β , które są członkami dużej rodziny receptorów jądrowych. Receptory te działają jako czynniki transkrypcyjne aktywowane przez ligand, w następstwie czego ujawniają się biologiczne efekty ich działania [9].

Budowa obu receptorów ma cechy wspólne ze wszystkimi receptorami jądrowymi – są zbudowane z 6 domen oznaczonych od A do F.

Domeny A i B są umiejscowione na końcu aminowym białka, mają motyw AF-1 odpowiedzialny za aktywację transkrypcji niezależnie od przyłączenia liganda. Domena C bierze udział w dimeryzacji receptora oraz w przyłączaniu kompleksu ligand–receptor do swoistej sekwencji DNA. Właściwości wiązania DNA w pewnym stopniu wykazuje również domena D, która zawiera także sygnał



Ryc. 1. Budowa receptora estrogenowego; A/B – domena ma motyw AF-1 (activation function 1), odpowiedzialny za aktywację transkrypcji niezależnie od przyłączenia liganda, C – domena odpowiada za dimeryzację receptora oraz przyłączenie kompleksu ligand – receptor do DNA (DNA binding domain, DBD), D – domena zawiera sygnał lokalizacji jądrowej NLS; E – domena odpowiedzialna za przyłączanie liganda (LBD – ligand binding domain), odpowiada za aktywację transkrypcji, ma motyw AF-2 (activation function 2), F – funkcja tej domeny nie jest do końca wyjaśniona

lokalizacji jądrowej NLS. Na końcu karboksylowym znajduje się domena E, która zawiera strukturę hydrofobowej kieszeni przyłączającej swoisty ligand (np. estrogenowy). Umożliwia ona także dimeryzację receptorów jądrowych, a także jest odpowiedzialna za aktywację transkrypcji, zależną od przyłączenia liganda. Receptory estrogenowe zawierają również domenę F, której jednak funkcja nie jest do końca wyjaśniona [9].

Powinowactwo ER α i ER β jest odmienne wobec różnych ligandów. Estradiol wykazuje większe powinowactwo do ER α mniejsze do ER β . W przypadku receptorów estrogenowych ten sam ligand może być agonistą a innym razem antagonistą w zależności od tego, czy łączy się z ER α czy ER β , zależy to również od tego, do promotora którego genu przyłącza się ER. Na przykład, estradiol w kompleksie z ER β raz pełni rolę agonisty, aktywując transkrypcję genu witellogeniny, a innym razem antagonistę – hamując transkrypcję genu TNF- α . Endogenne ligandy ER są w większości tkanek agonistami. Odrębne ścieżki regulacji i właściwości biochemiczne obu receptorów mogą być połączone, gdy aktywują one transkrypcję jako heterodimer [9].

Modulacja transkrypcji genów przez estrogeny nazywana jest „genomowym” działaniem estrogenów w odróżnieniu od „niegenomowego” mechanizmu działania, który charakteryzuje się szybką odpowiedzią po ekspozycji na hormon (w przeciagu kilku sekund czy minut) i prowadzi do post-translacyjnych modyfikacji białek sygnałowych.

Klasyczny (genomowy) mechanizm działania estrogenów wymaga związania się estrogenów z receptorem i translokacji do jądra komórkowego. Następnie receptor ulega dimeryzacji (homodimery α - α i β - β , jak i heterodimery α - β) i wiąże

się do swoistego elementu odpowiedzi na DNA, zwanego estrogenowym elementem odpowiedzi ERE (estrogen response element), który jest umiejscowiony w promotorze określonych genów. Związanie hormonu indukuje także zmiany konformacyjne receptora wewnątrz domeny wiążącej ligand. Pozwala to na przyłączenie białek koaktywatorowych [3].

Ponad jedna trzecia genów człowieka, które są regulowane przez ER, nie zawiera sekwencji ERE. Molekularny mechanizm, poprzez który estrogeny regulują transkrypcję tych genów nie jest w pełni poznany. Estrogeny mogą regulować ekspresję genów bez wiązania się do DNA, a przez modulowanie funkcji innych klas czynników transkrypcyjnych, poprzez interakcję białko-białko. Na przykład interakcja ER ze znanym czynnikiem transkrypcyjnym AP-1, który jest kompleksem czynników transkrypcyjnych fos/jun. Wiele genów regulowanych przez estrogeny, które są pozbawione ERE, zawiera miejsca wiążące dla sierocego jądrowego receptora hormonów SF-1 (orphan nuclear hormone receptor), SFRE (SF-1 response element), które pełnią funkcję bezpośredniego miejsca wiązania receptora estrogenowego α (ER α) [3,6,22].

DZIAŁANIE NIEGENOMOWE

Za niegenomowe działanie estrogenów odpowiada receptor estrogenowy zlokalizowany w błonie komórkowej. W niegenomowym czy zwanym inaczej nietranskrypcyjnym działaniu estrogenów nie jest wymagane wiązanie się ER do DNA i synteza mRNA określonych genów [29].

RECEPTOR BŁONOWY ESTRADIOLU

W 1970 r. Pietras i Szego opisać miejsce wiązania estradiolu na powierzchni komórek śródbłonkowych [25]. Od tego czasu wieloma różnymi technikami potwierdzono i zbadano działanie błonowych receptorów estrogenów. Odkryto, że błonowe ER zaangażowane są w regulację:

- błonowych kanałów jonowych [21,33]
- receptorów związanych z białkiem G [11],
- kinaz tyrozynowych i białkowych kinaz aktywowanych mitogenem (MAPK) [20],
- cykazy adenylowej [1],
- fosfolipazy C (PLC) [15].

W błonie komórkowej mogą być umiejscowione zarówno ER α , jak i ER β . Zależy to najprawdopodobniej od interakcji ze swoistymi strukturami w dwuwarstwie lipidowej. Wykazano, że obie izoformy ER lokalizują się w kawolach – pęcherzykowatych wpukleniach błony komórkowej o średnicy 50–100 nm, występujących w wielu typach komórek [3,29].

Estrogeny mogą regulować wewnątrzbłonowe kanały jonowe. Część ich działań prowadzi do regulacji wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ w komórkach śródbłonkowych i mięśni gładkich. W komórkach mięśni gładkich naczyń estrogeny hamują kanały wapniowe typu L zależne od napięcia. Kontrolują także wpływ jonów K⁺, poprzez otwieranie kanałów Ca²⁺ i kanałów K⁺ aktywowanych napięciem, poprzez fosforylację zależną od cGMP [21,29].

Najlepiej zbadanym i opisanym mechanizmem niegenomowego działania estrogenów jest regulacja receptorów zwią-

zanych z białkiem G (GPCR). Wiązanie ER do białek G ściśle zależy od izoformy receptora. ER α łączy się z G_{ai}, może także łączyć się z podjednostką G_{βγ} ale nie z G_{αq} czy G_{αs}. Nie ma jak na razie doniesień o interakcji pomiędzy ER β a białkiem G [16,37]. W komórkach osteoblastów receptory estrogenowe po aktywacji estradiolem mogą się przyłączać i aktywować PLC β poprzez interakcję z białkiem G. Prowadzi to do utworzenia 1,4,5-trifosfoinozytolu (IP₃) i diacyloglicerolu (DAG), następnie do szybkiego wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ poprzez uwolnienie jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺ może prowadzić do aktywacji białkowej kinazy C (PKC) i aktywację drogi sygnałowej – cykazy adenylowej/kinazy białkowej A [15].

SZLAKI SYGNAŁOWE KINAZ MAPK, KINAZ TYROZYNOWYCH I LIPIDOWYCH AKTYWOWANE PRZEZ ESTROGENY

Estrogeny aktywują również inne szlaki sygnałowe, w tym kaskadę sygnałową kinaz aktywowanych mitogenem (MAPK), liczne kinazy tyrozynowe i kinazy lipidowe [3,29].

Aktywacja MAPK przez estrogeny zachodzi w wielu różnych tkankach. Główne szlaki aktywacji MAPK to kaskada białka ERK1/2, białko p38, białkowa kinaza aktywowana stresem (SAPK) lub kaskada białka JNK [29].

Jednak kaskada sygnałowa kinaz MAP może prowadzić do aktywacji ER niezależnej od liganda (ligand – independent activation). Główną rolę w aktywacji receptora niezależnej od liganda pełni fosforylacja ER. Za fosforylację receptora estrogenowego jest odpowiedzialny właśnie szlak MAPK [10].

W komórkach nerwowych i osteoblastach, a także innych typach komórek estrogeny powodują szybką aktywację białka ERK1/2, co następnie prowadzi do natychmiastowej transkrypcji genów c-Fos. W komórkach raka piersi wykryto, że aktywacja ERK przez E2 przekazywana jest przez szlak EGFR-2/PKC δ /Ras i prowadzi do efektów promujących wzrost [29].

W komórkach śródbłonkowych estrogeny aktywują białko p38 β prowadząc do aktywacji kinazy MAPKAP-2 (mitogen-activated protein kinase activated protein kinase) i następnie fosforylacji białka Hsp27. Za pomocą tej drogi sygnałowej estrogeny utrzymują kształt włókien naprężeniowych (stress fiber) i aktywność oraz integralność błony. Aktywacja p38 β przez estrogeny zapobiega apoptozie indukowanej hipoksją, indukuje migrację komórek śródbłonkowych i tworzenie nowych naczyń włosowatych [26].

Estrogeny regulują także aktywność JNK. W komórkach raka piersi pełnią rolę czynnika przeżycia komórki (cell survival factor), gdyż zapobiegają aktywacji JNK indukowanej chemio- lub radioterapią. JNK fosforyluje i inaktywuje białka Bcl2 i Bcl-xl prowadząc do utworzenia apoptosomu i śmierci komórki za pośrednictwem aktywacji kaspazy. Poprzez zapobieganie aktywacji JNK i fosforylacji Bcl2/Bcl-xl estrogeny chronią zatem komórki raka piersi przed apoptozą [27].

Traktowanie estrogenami komórek różnego typu prowadzi także do indukcji fosforylacji kinaz tyrozynowych.

Białkowym przekaźnikiem fosforylowanym przez estrogeny jest kinaza Src. Podczas traktowania estrogenem białko Src translokowane jest do błony plazmatycznej i nabywa aktywności kinazy [29].

Niegenomowe działanie estrogenów może przebiegać poprzez aktywację kinaz lipidowych. Podczas wiązania się E2 do receptora, ER α łączy się z regulatorową podjednostką kinazy lipidowej PI3K (kinaza 3-fosfatydoinozytolu), co następnie prowadzi do aktywacji podjednostki katalitycznej i wzrostu wewnątrzkomórkowego wytwarzania fosfoinozytolu. Kinaza PI3K fosforyluje pierścień inozytolu w pozycji D-3, katalizując syntezę lipidowych przekaźników drugiego rzędu – PIP₂ i PIP₃. Przekazują one sygnał m.in. do: serynowo-treoninowej kinazy Akt, zwanej również kinazą B. Akt reguluje z kolei, poprzez fosforylację, wiele wewnątrzkomórkowych kinaz białkowych, m.in. śródbłonkową izoformę syntazy tlenu azotu (eNOS) [30].

Wykazano, że aktywacja PI3K przez estrogeny ważna jest w komórkach raka piersi, gdzie E2 powoduje połączenie ER α z Src i p85 (podjednostka regulatorowa PI3K). Kompleks ten prawdopodobnie sprzyja aktywacji Src i PI3K, które wpływają na progresję cyklu komórkowego [23].

Estrogeny poprzez szlak PI3K regulują transkrypcję wielu genów. W komórkach śródbłonkowych regulują geny *Cox-2*. Aktywacja *Cox-2* indukuje wytwarzanie prostaglandyny PGI₂ i PGE₂, które pełnią bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu naczyń. *Cox-2* i cAMP stymulują angiogenezę, poprzez indukcję VEGF. Estrogeny, aktywując PI3K regulują transkrypcję *Cox-2*, wpływając w ten sposób na angiogenezę i migrację komórek śródbłonkowych naczyń [23].

INTEGRACJA DZIAŁANIA NIEGENOMOWEGO I GENOMOWEGO ESTROGENÓW NA POZIOMIE FOSFORYLACJI CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH

Droga przekazywania sygnału od receptora estrogeny może obejmować niegenomowe działanie estrogenów prowadzące do odpowiedzi genomowej. Ten niegenomowo-genomowy sposób przekazywania sygnału jest kolejnym mechanizmem, poprzez który ER mogą regulować transkrypcję [3]. Funkcje wielu czynników transkrypcyjnych są regulowane poprzez fosforylację przez kinazy białkowe. Celem niegenomowego działania estrogenów mogą być więc czynniki transkrypcyjne.

Czynniki transkrypcyjne Elk-1, C/EBP β i CREB – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP, (cAMP response element binding protein) są celami fosforylacji poprzez drogę zależną od MAPK. W różnego typu komórkach obserwuje się dwa procesy. Pierwszy z nich to fosforylacja Elk-1, która jest indukowana przez estradiol i aktywacja surowiczego elementu odpowiedzi (SRE) przez mechanizm, który zależy od ER i który wymaga aktywności szlaku MAPK. Drugi to: C/EBP β i CREB fosforylowane za pośrednictwem kaskady sygnałowej MAPK aktywowanej przez estradiol. Fosforylacja CREB prowadzi do ekspresji genów, które zawierają CRE. CREB fosforylowane przez kinazę aktywowaną cAMP/PKA, może być także aktywowane przez estradiol, który stymuluje wytwarzanie cAMP [3].

Aktywność transkrypcyjna AP-1 jest regulowana przez fosforylację za pośrednictwem MAPK. Aktywacja szlaku MAPK przez estradiol, prowadzi do silniejszego wiązania się AP-1 z DNA i zwiększenia aktywności transkrypcyjnej. Kolejnym przykładem jest fosforylacja NF- κ B przez kinazę Akt i aktywacja szlaku PI3K/Akt przez estradiol, co prowadzi do ekspresji genów zawierających miejsce wiązania dla NF- κ B [3].

WPLYW ESTROGENÓW NA MITOCHONDRIA

Mitochondria oprócz regulacji, takich procesów komórkowych jak oddychanie, apoptoza, czy fosforylacja oksydacyjna, mają także wpływ na homeostazę jonową, syntezę tłuszczu, hemu, aminokwasów i nukleotydów. Organella te kontrolują także syntezę steroidów. W mitochondriach komórek śródbłonkowych guza jajnika wykryto występowanie enzymów: aromatazy i dehydrogenazy 3- β -hydroksysteroidowej, zaangażowanych w biosyntezę estrogenów [19].

Oprócz tego, że w mitochondriach zachodzi biosynteza estrogenów, to egzogennie dodane do komórki estrogeny są transportowane właśnie do tych organelli. Badania wykazały, że gdy podano estrogeny pozbawionym jajników szczurom, to 75% podanego hormonu zostało przetransportowane do mitochondriów, a nie do jądra komórkowego komórek wątroby, nadnerczy czy śledziony. Lipofilne właściwości estrogenów pozwalają na ich łatwą dyfuzję przez dwuwarstwą lipidową błon komórkowych. Ponieważ mitochondria są bogate w lipidy, organella te są zatem swojego rodzaju rezerwuarem estrogenowym komórki [5].

Oprócz występowania pasywnej dyfuzji estrogenów do mitochondriów, w komórkach nowotworowych wątroby HepG2 zaobserwowano szybkie przekazywanie estrogenów z błony plazmatycznej do mitochondriów przez endocytozę zależną od receptora [5].

ESTROGENY A TRANSKRYPCJA GENOMU MITOCHONDRIALNEGO

W mitochondriach zidentyfikowano obydwie postaci receptora estrogenowego ER α i ER β , co może wskazywać na ich rolę w regulacji transkrypcji genomu mitochondrialnego [5]. W różnego typu komórkach po potraktowaniu estrogenami, zaobserwowano wzrost poziomu mRNA m.in. oksydazy cytochromu II (COII) [34], podjednostki III oksydazy cytochromowej (COIII) [2], podjednostki I dehydrogenazy NADPH (NADPH-DH1) [4] i białek podjednostki IV oksydazy cytochromu c (COX7RP) [35]. Prawdopodobnie w mechanizm wzrostu transkrypcji genów mitochondrialnych, pod wpływem estrogenów, jest zaangażowany estrogenowy element odpowiedzi ERE i receptor estrogenowy [5].

WPLYW ESTROGENÓW NA TWORZENIE ROS I AKTYWNOŚĆ ŁAŃCUCHA ODDECHOWEGO POPRZEC INTEGRACJĘ W MITOCHONDRIACH SYGNAŁU WAPNIOWEGO, cAMP I NOS

Estrogeny powodują w mitochondriach wzrost stężenia Ca²⁺. Mechanizm wzrostu [Ca²⁺] nie jest do końca poznany, ale przypuszczalnie wywołuje go hamowanie przez estrogeny wypływu Ca²⁺ z mitochondriów zależnego od jonów Na. Wzrost stężenia Ca²⁺ w mitochondriach promuje

z kolei tworzenie wolnych rodników (ROS). W komórce mitochondria są głównym źródłem ROS, takich jak anion ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 i wolne rodniki hydroksylowe ($\cdot OH$) [5].

Interakcje estrogenów z białkami łańcucha oddechowego, modyfikacje posttranslacyjne, takie jak fosforylacja i defosforylacja, które wpływają na aktywność białek mitochondrialnych, mogą uczestniczyć w tworzeniu wolnych rodników [5]. Inhibicja kompleksu IV lub oksydazy cytochromu c jest spowodowana przez fosforylację zależną od cAMP. Inhibicja ta znoszona jest poprzez defosforylację aktywowaną jonami Ca^{2+} . Proponuje się, że to stymulowany estrogenami wzrost komórkowego Ca^{2+} może aktywować mitochondrialną fosfatazę białkową, która defosforyluje oksydazę cytochromu c. Aktywne białko powoduje następnie wzrost błonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) i wytwarzanie ROS.

W wielu badaniach wykazano, że estrogeny hamują w mitochondriach kompleks I, II, III i IV łańcucha oddechowego oraz mitochondrialną syntazę ATP. Estrogeny w swoisty sposób hamują aktywność białek łańcucha oddechowego, nie wiadomo jednak jak mogą modyfikować białka mitochondrialne na poziomie posttranslacyjnym. Prawdopodobnie modyfikacja ta spowodowana jest przez fosforylację indukowaną estrogenem [5].

Co ciekawe w tym kontekście, genisteina – izoflawonoid występujący w soi o aktywności inhibitora kinaz tyrozynowych i wykazujący działanie estrogenopodobne powoduje wzrost wytwarzania ROS w mitochondriach komórek wątroby szczura. Wykazano, że wzrost stężenia wolnych rodników był wynikiem interakcji genisteiny z kompleksem III łańcucha oddechowego i indukował zmianę przepuszczalności błony mitochondrialnej [5].

Inhibicja kompleksu I łańcucha oddechowego także powoduje wytwarzanie ROS. Od czasu kiedy wiadomo, że estrogeny hamują działanie kompleksu I łańcucha oddechowego uważa się, że interakcje między kompleksem I a estrogenami mogą stymulować wytwarzanie wolnych rodników [5].

Estrogeny stymulują aktywność białkowych kinaz zależnych od cAMP w neuronach hipokampu, dzięki temu, że mogą indukować akumulację cAMP w mitochondriach (m.in. przez aktywację cykazy adenylowej). Jeśli estrogeny powodują wzrost poziomu cAMP w mitochondriach, wtedy fosforylacja kompleksów białkowych łańcucha oddechowego, zależna od cAMP, może modulować mitochondrialny potencjał błonowy (Ψ_m) i $[Ca^{2+}]_m$ na korzyść tworzenia ROS [14,28].

Estrogeny indukują także różne izoformy syntazy tlenku azotu (NOS) [8,36]. Inhibicja oksydazy cytochromu c zależna od NO generuje powstawanie $O_2^{\cdot-}$, które są następnie przekształcane do H_2O_2 (przebieżnika II rzędu). Estrogeny indukując aktywność i ekspresję NOS powodują wzrost NO, przez co uczestniczą w tworzeniu mitochondrialnego H_2O_2 . NO indukuje biogenezę mitochondriów, proces ten zaobserwowano w komórkach kilku linii komórkowych. Można zatem uznać, że estrogeny indukując powstawanie tlenku azotu wpływają na biogenezę mitochondriów. Aktywność mitochondrialnej syntetazy tlenku azotu (mtNOS) zależy

od jonów Ca. Proponuje się więc, że estrogeny poprzez indukcję wzrostu stężenia w mitochondriach Ca^{2+} mogą stymulować aktywność mtNOS, prowadząc do generowania wolnych rodników przez hamowanie aktywności oksydazy cytochromu c zależną od NO [32].

mtROS A PROLIFERACJA

W zależności od stężenia, estrogeny mogą pełnić rolę antyoksydantów lub prooksydantów [18]. Mitochondria wytwarzają niewielkie ilości ROS, które mogą być „wylapywane” przez komórkowe antyoksydanty. Niewielkie wytwarzanie ROS przez mitochondria sprawia, że są one dobrymi cząsteczkami sygnałowymi, gdyż ich poziom w komórce nie jest na tyle wysoki aby indukować stres oksydacyjny. Fizjologiczny poziom wolnych rodników pozwala na aktywację takich procesów komórkowych jak proliferacja i różnicowanie, nie wpływając na śmierć komórki [5].

Kinazy białkowe, mające domenę palca cynkowego, są aktywowane przez wolne rodniki. Aktywacja polega na uwalnianiu jonów cynku z domeny białka pod wpływem ROS, co skutkuje powstaniem mostka dwusiarczkowego. W taki sposób mogą być aktywowane kinazy c-raf i PKC [7, 12]. Białka te następnie na drodze szlaku MEK/ERK aktywują takie czynniki transkrypcyjne jak CREB i AP-1. Dochodzi do transkrypcji genów cyklu komórkowego (zawierających w DNA element odpowiedzi dla CREB lub AP-1) i ostatecznie do indukowanej estrogenami proliferacji komórek. Indukcja powstawania mtROS przez estrogeny może zatem aktywować proliferację komórek estrogenowrażliwych tkanek [5].

WPLYW ESTROGENÓW NA APOPTOZĘ KOMÓREK

Antyapoptotyczne działanie

Estrogeny mają wpływ również na proliferację i przeżywalność komórek nowotworowych. Zaobserwowano, że estradiol chronił komórki ludzkiego raka piersi MCF-7 przed apoptozą indukowaną m.in. przez promieniowanie UV. W komórkach MCF-7 obecność receptorów estrogenowych wykazano zarówno w jądrze komórkowym, błonie komórkowej jak i w mitochondriach. Estradiol blokował zmianę potencjału błonowego mitochondriów, zapobiegał wypływowi z mitochondriów cytochromu c oraz hamował indukcję przez UV powstawania wolnych rodników w mitochondriach. Estrogeny pełnią więc rolę czynników przeżycia komórek MCF-7, ale co istotne, tylko w stężeniu 1 nM; wyższe stężenie (10 nM) nie blokowało apoptozy indukowanej UV [24]. Estrogeny w stężeniu 1 nM, poprzez zapobieganie powstawaniu ROS, hamują aktywność kinazy JNK (kinaza ta jest aktywowana m.in. przez wolne rodniki), przez co zapobiegają translokacji do mitochondriów proapoptotycznego białka Bax. Mechanizmem poprzez który estrogeny chronią komórki MCF-7 przed apoptozą indukowaną promieniowaniem UV, chemio- czy radioterapią jest stymulacja aktywności manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) (manganese superoxide dismutase). MnSOD jest enzymem, który redukuje poziom wolnych rodników powstający podczas np. radioterapii [24].

Kousteni i wsp. [13] wykazali, że estrogeny chronią przed indukowaną apoptozą także osteocyty i osteoblasty

sty. Mechanizm hamowania apoptozy w tych komórkach zależy od aktywacji przez estrogeny szlaku sygnałowego Src/Shc/ERK, poprzez mechanizm niegenomowego działania estrogenów i zależy od domeny E receptora błonowego (domeny wiążącej ligand).

Proapoptyczne działanie

Badania Songa i wsp. wykazują natomiast przeciwne działanie estrogenów. Opierając się na wynikach badań, wykazujących że duże dawki estrogenów promują regresję hormonozależnych nowotworów piersi u kobiet po menopauzie, zbadali molekularny mechanizm działania estrogenów na przeżywalność komórek raka piersi. W swoich badaniach posłużyli się komórkami MCF-7 i komórkami LTED (long-term estrogen deprivation), które powstały w wyniku wzrostu komórek MCF-7 przez długi okres (6–24 miesiące) w warunkach pozbawionych estrogenów [31].

Duże stężenie estradiolu (≥ 1 nM) spowodowało obniżenie wzrostu komórek LTED, natomiast indukowało wzrost komórek MCF-7. Ponieważ obniżenie liczby komórek może wynikać ze wzrostu poziomu apoptozy, zbadano wpływ estradiolu na apoptozę komórek. Badania wykazały, że komórki LTED są wrażliwe na apoptotyczne działanie estradiolu, natomiast komórki MCF-7 są chronione przez E2 przed apoptozą [31].

Ważną rolę w inicjowaniu apoptozy pełni kompleks białkowy Fas/FasL. Ekspresję białka FasL wykryto zarówno w komórkach MCF-7 jak i LTED, natomiast ekspresję Fas udało się wykryć tylko w komórkach LTED. Brak ekspresji białka Fas w komórkach MCF-7 wiąże się z ich niewrażliwością na indukcję apoptozy przez estradiol. Zaobserwowano, że estradiol w stężeniu 0,1 nM powodował wzrost ekspresji białka FasL w komórkach LTED i MCF-7, nie miał natomiast wpływu na ekspresję białka Fas [31].

Apoptoza komórek raka piersi pod wpływem estrogenów nie zależy wyłącznie od białek Fas/FasL, zaangażowane są również i inne mechanizmy. Lewis i wsp. użyli w swoich badaniach komórek MCF-7 i MCF-7: 5C (komórki LTED poddane selekcji klonalnej). Wykazali, że apoptoza pod wpływem estradiolu jest zależna od mitochondriów. Przebiega poprzez wzrost ekspresji proapoptycznych białek Bax, Bak i Bim, zmianę integralności błony mitochondrialnej, translokację cytochromu c z mitochondriów do cytosolu i aktywację kaspazy 9. W komórkach MCF-7: 5C zachodzi wprawdzie pod wpływem estradiolu indukcja ekspresji białka Fas, ale komórki potraktowane przeciwciałem blokującym Fas nie są chronione przed apoptozą indukowaną estradiolem. Także redukcja ekspresji białka FasL za pomocą siRNA nie blokuje apoptozy komórek MCF-7: 5C. Wynika z tego, że indukcja apoptozy przez estradiol nie wymaga aktywacji białek Fas czy FasL i może przebiegać niezależnym szlakiem wewnętrznym z uwolnieniem cytochromu c z mitochondriów [17].

PODSUMOWANIE

Estrogeny oprócz wpływu na powstawanie drugorzędnych cech płciowych, wywierają wpływ na wiele procesów komórkowych. Regulują wzrost, proliferację, migrację i apoptozę komórek, wpływają na funkcjonowanie mitochondriów. Działają na wiele sposobów, poprzez różne mechanizmy: genomowy lub niegenomowy, w zależności od tego, czy zwiążą się z receptorem błonowym, mitochondrialnym czy jądrowym. Mechanizm niegenomowego działania estrogenów jest złożony i wciąż nie w pełni poznany, jednak wydaje się, że podstawowe znaczenie dla dalszego postępu będą miały badania nad integracją komórkowych szlaków sygnałowych na powierzchni i wewnątrz mitochondriów decydujące o apoptozie lub przeżyciu komórki.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aronica S.M., Kraus W.L., Katzenellenbogen B.S.: Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 8517–8521
- [2] Bettini E., Maggi A.: Estrogen induction of cytochrome c oxidase subunit III in rat hippocampus. *J. Neurochem.*, 1992; 58: 1923–1929
- [3] Björnström L., Sjöberg M.: Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic action on target genes. *Mol. Endocrinol.*, 2005; 19: 833–842
- [4] Chen J., Gokhale M., Li Y., Trush M.A., Yager J.D.: Enhanced levels of several mitochondrial mRNA transcripts and mitochondrial superoxide production during ethinyl estadiol-induced hepatocarcinogenesis and after estrogen treatment of HepG2 cells. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 2187–2193
- [5] Felty Q., Roy D.: Estrogen, mitochondria and growth of cancer and non-cancer cells. *J. Carcinog.*, 2005; 4: 1
- [6] Gottlicher M., Heck S., Herrlich P.: Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.*, 1998; 76: 480–489
- [7] Hammerling U., Hoyos B., Korichneva I., Chua R., Levi E.: The zinc-finger domains of kinases function as redox sensors. *The Oxy Club of Calif.*, 2003; 13
- [8] Hishikawa K., Nakaki T., Marumo T., Suzuki H., Kato R., Saruta T.: Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.*, 1995; 360: 291–293
- [9] Kalita K., Lewandowski S., Skrzypczak M., Szymczak S., Tkaczyk M., Kaczmarek L.: Receptory estrogenowe. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału, red.: Nowak J.Z., Zawilska J.B. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004; 604–616
- [10] Kato S., Endoh H., Masuhiro Y., Kitamoto T., Uchiyama S., Sasaki H., Masushige S., Gotoh Y., Nishida E., Kawashima H., Metzger D., Chambon P.: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by miogen-activated protein kinase. *Science*, 1995; 270: 1491–1494
- [11] Kelly M.J., Wagner E.J.: Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 1999; 10: 369–374
- [12] Korichneva I., Hoyos B., Chua R., Levi E., Hammerling U.: Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 44327–44331
- [13] Kousteni S., Bellido T., Plotkin L.I., O'Brien C.A., Bodenner D.L., Han L., Han K., DiGregorio G.B., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S., Roberson P.K., Weinstein R.S., Jilka R.L., Manolagas S.C.: Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 2001; 104: 719–730
- [14] Kulinskii V.I., Zobova N.V.: Submitochondrial distribution of cAMP during incubation with rat liver mitochondria. *Biokhimiya*, 1985; 50: 1546–1552
- [15] Le Mellay V., Grosse B., Lieberherr M.: Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 11902–11907

- [16] Le Mellay V., Lasmoles F., Lieberherr M.: G α (q/11) and G β y proteins and membrane signaling of calcitriol and estradiol. *J. Cell. Biochem.*, 1999; 75: 138–146
- [17] Lewis J.S., Meeke K., Osipo C., Ross E.A., Kidawi N., Li T., Bell E., Chandel N.S., Jordan V.C.: Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005; 97: 1746–1759
- [18] Liehr J.G., Roy D.: Pro-oxidant and antioxidant effects of estrogens. *Methods Mol. Biol.*, 1998; 108: 425–435
- [19] Matsumoto Y.: Study on the estrogen production in parenchymatous cells of epithelial ovarian tumor. *Osaka City Med. J.*, 1992; 38: 27–43
- [20] Migliaccio A., Di Domenico M., Castoria G., de Falco A., Bontempo P., Nola E., Auricchio F.: Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.*, 1996; 15: 1292–1300
- [21] Nakajima T., Kitazawa T., Hamada E., Hazama H., Omata M., Kurachi Y.: 17 β -Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca²⁺ currents in aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 1995; 294: 625–635
- [22] O'Lone R., Frith M.C., Karlsson E.K., Hansen U.: Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.*, 2004; 18: 1859–1875
- [23] Pedram A., Razandi M., Aitkenhead M., Hughes C.C.W., Levin E.R.: Integration of the non-genomic and genomic action of estrogen. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 50768–50775
- [24] Pedram A., Razandi M., Wallace D.C., Levin E.R.: Functional estrogen receptors in mitochondria of breast cancer cells. *Mol. Biol. Cell.*, 2006; 17: 2125–2137
- [25] Pietras R.J., Szego C.M.: Specific binding sites for oestrogen at the outer surface of isolated endometrial cells. *Nature*, 1977; 265: 69–72
- [26] Razandi M., Pedram A., Levin E.R.: Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 38540–38546
- [27] Razandi M., Pedram A., Levin E.R.: Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol. Endocrinol.*, 2000; 14: 1434–1447
- [28] Shingo A.S., Kito S.: Estrogen induces elevation of cAMP-dependent protein kinase activity in immortalized hippocampal neurons: imaging in living cells. *J. Neural. Transm.*, 2002; 109: 171–174
- [29] Simoncini T., Genazzani A.R.: Non-genomic action of sex steroids hormones. *Eur. J. Endocrinol.*, 2003; 148: 281–292
- [30] Simoncini T., Hafezi-Moghadam A., Brazil D., Ley K., Chin W.W., Liao J.K.: Interaction of estrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, 2000; 407: 538–541
- [31] Song R.X.D., Mor G., Naftolin F., McPherson R.A., Song J., Zhang Z., Yue W., Wang J., Santen R.J.: Effect of long-term estrogen deprivation on apoptotic responses of breast cancer cells to 17 β -estradiol. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 93: 1714–1723
- [32] Tatoyan A., Giulivi C.: Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 11044–11048
- [33] Valverde M.A., Rojas P., Amigo J., Cosmelli D., Orío P., Bahamonde M.I., Mann G.E., Vergara C., Latorre R.: Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*, 1999; 285: 1929–1931
- [34] Van Itallie C.M., Dannies P.S.: Estrogen induces accumulation of the mitochondrial ribonucleic acid for subunit II of cytochrome oxidase in pituitary tumor cells. *Mol. Endocrinol.*, 1988; 2: 332–337
- [35] Watanabe T., Inoue S., Hiroi H., Orimo A., Kawashima H., Muramatsu M.: Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol. Cell. Biol.*, 1998; 18: 442–449
- [36] Weiner C.P., Lizasoain I., Baylis S.A., Knowles R.G., Charles I.G., Moncada S.: Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 5212–5216
- [37] Wyckoff M.H., Chambliss K.L., Mineo C., Yuhanna I.S., Mendelsohn M.E., Mumby S.M., Shaul P.W.: Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 27071–27076