

U 75% chorych na raka piersi występuje ekspresja receptorów hormonalnych. Umożliwia to zastosowanie hormonoterapii istotnie zmniejszającej ryzyko zgonu chorych leczonych uzupełniająco lub paliatywnie. Poważnym problemem jest wtórna i pierwotna oporność na hormonoterapię. Zauważono, że 50% pacjentek z zaawansowanym nowotworem nie odpowiada na pierwszą linię hormonoterapii za pomocą selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych (*selective estrogen receptor modulators* – SERM). Zaobserwowano także, że u pacjentek z koekspresją receptorów hormonalnych i receptora HER2 występuje szczególnie duża szansa na wystąpienie pierwotnej hormonooporności lub skrócenie czasu trwania odpowiedzi na leczenie. Analizując mechanizm działania receptorów estrogenowych w klasycznej i nieklasycznej drodze przekazywania sygnału do jądra komórkowego albo w mechanizmie pobudzenia inicjowanego przy błonie komórkowej, można zaobserwować ich zależność od ścieżek aktywacji receptorów HER. Oddziaływanie między wymienionymi receptorami jest normalnym zjawiskiem w zdrowych komórkach. Wydaje się natomiast, że nadekspresja receptorów HER w komórkach nowotworowych tak istotnie wpływa na szlaki przewodzenia pobudzenia z receptorów estrogenowych, że może mieć związek z wytwarzaniem hormonooporności.

**Słowa kluczowe:** receptor estrogenowy, koregulatory, HER2, sygnał steroidowy inicjowany przy błonie komórkowej.

## Budowa i funkcja receptorów hormonalnych oraz mechanizm ich współdziałania z receptorami dla czynników wzrostu

*Structure and function of hormone receptors and their crosstalk with growth factor receptors*

Sylwia Dębska, Piotr Potemski

Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### Wstęp

Rak piersi – najczęściej występujący nowotwór złośliwy u kobiet w krajach uprzemysłowionych – stanowi od lat obiekt wytężonych badań owocujących coraz lepszym poznaniem jego biologii i stworzeniem nowych możliwości terapeutycznych. Od dawna znana jest jego hormonowrażliwość i możliwość ingerencji w gospodarkę hormonalną pacjentki zmieniającej przebieg choroby. Ocena ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych stanowi nieodłączny element standardowego badania histopatologicznego wchodzącego w skład postępowania diagnostycznego w przypadku raka piersi. Stwierdzenie ekspresji receptorów hormonalnych w komórkach raka piersi umożliwia zastosowanie hormonoterapii opartej na lekach z grupy selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych (*selective estrogen receptor modulator* – SERM), inhibitorach aromatazy, antagonistach receptorów estrogenowych (*selective estrogen receptor down-regulator* – SERD) albo deprywacji estrogenowej opartej na farmakologicznej lub chirurgicznej kastracji.

Od kilku lat standardem jest także ocena ekspresji receptora HER2 w błonie komórek nowotworowych. Cecha ta umożliwia zastosowanie leczenia ukierunkowanego molekularnie z zastosowaniem przeciwciała anty-HER2 trastuzumabu lub drobnocząsteczkowego inhibitora kinaz aktywowanych przez receptory EGFR i HER2 – lapatynibu.

Ekspresję receptorów estrogenowych (ER) wykazuje 70–75% raków piersi [1, 2] – dotyczy to ok. 60% pacjentek przed menopauzą i 75% pacjentek po menopauzie [3]. Z tego ponad 50% guzów wykazuje koekspresję receptorów progesteronowych (PR). W ok. 10% guzów z ekspresją ER występuje także nadekspresja HER2. Poza tym 50% guzów HER2-dodatnich wykazuje ekspresję ER [4].

Lekiem pierwszego rzutu w hormonoterapii raka piersi od ponad 20 lat jest przedstawiciel SERM – tamoksyfen. W leczeniu adiuwantowym lek ten zmniejsza względne ryzyko wznowy o ok. 40–50%, a zgonu z powodu raka piersi o 30–35% [1]. Około 30–50% pacjentek chorych na rozsiały raka piersi odpowiada na leczenie tamoksyfenem, ale w końcu w trakcie trwania leczenia każda z tych chorych wytwarza oporność na lek. Oznacza to także, że przynajmniej 50% pacjentek z zaawansowaną chorobą nie odpowiada na pierwszą linię hormonoterapii z wykorzystaniem SERM [6, 7]. Opcję terapeutyczną dla chorych na raka piersi z ekspresją receptorów hormonalnych (HR) po menopauzie stanowią inhibitory aromatazy (IA), ale podczas tego rodzaju leczenia również obserwuje się pierwotną i wtórную oporność. Na podstawie badań eksperymentalnych uważa się, że jedną z możliwych przyczyn

75% of breast cancers are hormonal receptor-positive and in these tumours there is a possibility of using hormone therapy, which significantly reduces the risk of death in both adjuvant and palliative treatment. Efficiency of the treatment is proportional to the level of hormone receptor expression. An important problem connected with hormone therapy is primary or secondary resistance to the treatment. About 50% of patients with metastatic breast cancer are not responsive to hormone therapy with selective oestrogen receptor modulators (SERMs). According to clinical observations, patients with coexpression of hormonal receptors and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) have an especially poor response to hormone therapy. Classical and non-classical nuclear-initiated steroid signalling of oestrogen receptors as well as their membrane-initiated steroid signalling crosstalk with signal pathways of growth factor receptors. This phenomenon can be seen in healthy cells, but in cancer cells with HER2 overexpression it is so intense that hormone resistance can develop.

**Key words:** estrogen receptor, coregulator, HER2, membrane-initiated steroid signaling.

powstawania wtórnej hormonooporności jest utrata ekspresji ER, co szacunkowo dotyczy ok. 40–50% guzów [8].

Podobnie jak hormonoterapia w raku piersi z ekspresją ER i receptora progesteronowego (*progesterone receptor* – PR) terapia anty-HER2 ma także ustaloną pozycję w leczeniu raka piersi z nadekspresją HER2. Trastuzumab w leczeniu paliatywnym zmniejsza względne ryzyko zgonu o 20% [9], a w leczeniu uzupełniającym o ok. 34% [10]. U pacjentek leczonych paliatywnie odsetek odpowiedzi bezpośrednich waha się w przedziale 3–81% [9]. Niestety, podobnie jak w przypadku hormonoterapii pierwotna i wtórna oporność dotyczy także leczenia opartego na trastuzumabie.

Wyniki badań laboratoryjnych oraz obserwacje kliniczne wskazują, że komórki nowotworowe z koekspresją receptorów hormonalnych i HER2 są mniej wrażliwe na hormonoterapię, a czas trwania odpowiedzi na terapię jest krótszy.

Niniejsza praca stanowi przegląd piśmiennictwa dotyczącego budowy i funkcji receptorów hormonalnych oraz mechanizmów ich współdziałania z receptorami dla czynników wzrostu, które mogą wiązać się z wytwarzaniem hormonooporności.

### Budowa receptora estrogenowego i mechanizm działania jądrowych receptorów estrogenowych

Istnieją dwa białka o właściwościach receptorów estrogenowych: ER- $\alpha$  i ER- $\beta$ , kodowane przez dwa różne geny. Receptory te są aktywowane przez 17- $\beta$ -estradiol, należą do receptorów wewnątrzkomórkowych, a dokładnie do rodziny hormonalnych receptorów jądrowych. W 1962 r. Elwood Jensen zidentyfikował białko receptorowe wiążące estrogen, a gen dla tego białka został sklonowany w 1986 r. W 1996 r. sklonowano gen drugiego rodzaju receptora estrogenowego, który nazwano ER- $\beta$ , przemianowując jednocześnie pierwszy odkryty receptor na ER- $\alpha$  [11].

Receptory ER- $\alpha$  i ER- $\beta$  ulegają odmiennej ekspresji w różnych tkankach:

- oba receptory obecne są w gruczole piersiowym, ośrodkowym układzie nerwowym, układzie krążenia, układzie immunologicznym, narządzie rodny, kościach (w narządach tych receptory prawdopodobnie działają przeciwstawnie do siebie: ER- $\alpha$  promuje proliferację, natomiast ER- $\beta$  aktywuje apoptozę i różnicowanie komórek),
- ER- $\alpha$  ulega ekspresji w wątrobie,
- ER- $\beta$  obecny jest w przewodzie pokarmowym, gruczole krokowym, płucach, komórkach ziarnistych jajnika; receptory ER- $\beta$  spełniają w tych komórkach ważne funkcje biologiczne: uczestniczą w różnicowaniu i organizacji macierzy zewnątrzkomórkowej oraz jej komunikacji z komórkami nabłonkowymi [11, 13].

Receptor estrogenowy działa jako zależny od ligandu czynnik transkrypcyjny zwiększający ekspresję określonych genów. Kodują one białka odpowiedzialne głównie za proliferację komórki, promowanie przeżycia i wzrost guza nowotworowego, np.:

- receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*insulin-like growth factor receptor 1* – IGF-1),
- cyklina D1,
- antyapoptotyczne białko Bcl-2,
- czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF).

Pobudzenie ER indukuje ekspresję receptorów dla czynników wzrostu (HER) oraz ich ligandów: transformującego czynnika wzrostu  $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$*  – TGF- $\alpha$ ) i amfireduliny. Aktywne ER mają także zdolność hamowania ekspresji niektórych genów kodujących białka zmniejszające transkrypcję albo mające właściwości antyproliferacyjne i antyangiogenne. Receptory estrogenowe  $\alpha$  i  $\beta$  mogą przyłączać się do podobnych miejsc w DNA i potencjalnie uruchamiać ekspresję tych samych genów, ale mogą być aktywowane przez różne ligandy i wchodzić w interakcje z innymi koregulatorami, a zatem wywierać odmienny wpływ na transkrypcję.

W patogenezie raka piersi odgrywają rolę głównie ER- $\alpha$ , znaczenie ER- $\beta$  nie jest dokładnie poznane. Zauważono, że receptory ER- $\beta$  po połączeniu z estrogenami mogą zachowywać się odmiennie niż ER- $\alpha$ , tzn. mają zdolność hamowania transkrypcji [14]. Leki z grupy SERM oddziałują zarówno na ER- $\alpha$ , jak i ER- $\beta$ , a siła ich działania zależy od rodzaju tkanki. Badania prowadzone ostatnio wskazują, że ER- $\beta$  mogą chronić przed powstaniem raka piersi [11]. Zauważono, że wiele guzów piersi traci ekspresję ER- $\beta$ , głównie poprzez metylację promotora genu. Gen dla ER- $\beta$  zaczął być w pewnym momencie postrzegany jako gen supresorowy. Niemniej ER- $\beta$ -dodatni rak piersi występuje niemal tak często jak ER- $\alpha$ -dodatni i ER- $\beta$  ulegają ekspresji w 40–75% guzów piersi [11, 14, 15], a wyjaśnienie roli ER- $\beta$  w onkogenezie wymaga dalszych badań.

Receptor estrogenowy  $\alpha$  kodowany jest przez gen *ESR1* zlokalizowany w części q24-q27 chromosomu 6., zawierający 488 274 zasady. Zidentyfikowano 2 izoformy ER- $\alpha$  o masie cząsteczkowej 66 kDa i 46 kDa [12].

Gen dla ER- $\beta$  (*ESR2*) jest zlokalizowany w części q23.2 chromosomu 14. i składa się z 61,2 tysięcy par zasad. Białko zbudowane jest z 530 aminokwasów [11, 17]. Receptor estrogenowy  $\beta$  ma taki sam schemat budowy jak ER- $\alpha$  – poszczególne elementy budowy receptorów wykazują różny stopień homologii.

Najważniejsze elementy budowy ER- $\alpha$  i ER- $\beta$  to 5 domen spełniających odmienne funkcje:

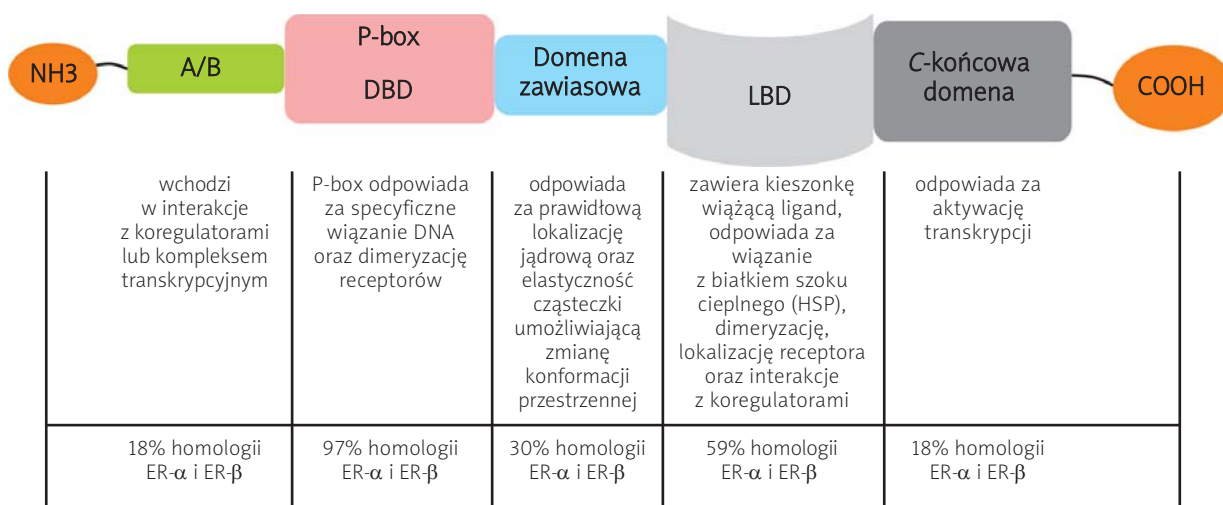
- domena A/B, której przypisuje się transkrypcyjną funkcję 1 (*transcriptional activity function*, TAF1 = AF1), odpowiada za aktywność transkrypcyjną receptora niezależną od ligandu, ale specyficzną dla tkanki i promotora,
- domena DBD (*DNA binding domain*),
- domena zawiasowa,
- domena LBD (*ligand binding domain*) zbudowana z 12 białkowych helis  $\alpha$ , przypisuje się jej transkrypcyjną funkcję 2 (*transcriptional activity function*, TAF2 = AF2) indukowaną przez ligand,
- domena C-końcowa (*C-terminal domain*) [11, 18, 19].

Na rycinie 1. przedstawiono schemat budowy ER oraz najważniejsze funkcje poszczególnych domen.

Zaobserwowano, że ER- $\beta$  może wykazywać transkrypcyjną funkcję 2 (AF2) niezależnie od ligandu, natomiast transkrypcyjna funkcja 1 (AF1) receptora ER- $\beta$  nie jest tak silna jak AF1 receptora ER- $\alpha$  – domena A/B ma raczej właściwości domeny represorowej, której usunięcie zwiększa aktywność transkrypcyjną ER- $\beta$ . Kieszonka wiążąca ligand ER- $\beta$  jest znacznie mniejsza niż analogiczny fragment receptora ER- $\alpha$  – stąd różnica w powinowactwie do ligandów. Istnieją liczne izoformy ER- $\beta$  będące wynikiem alternatywnego splicingu ostatnich kodujących eksonów (8 i 9). U ludzi wykryto 5 izoform ER- $\beta$ . Istnieją doniesienia, że niektóre z tych izoform (ER- $\beta$ 4 i ER- $\beta$ 5) mogą tworzyć heterodimery z izoformą ER- $\beta$ 1, nasilając jej zdolność aktywowania transkrypcji w sposób niezależny od ligandu. Inne z kolei (ER- $\beta$ 2) mają zdolność hamowania aktywności transkrypcyjnej ER- $\alpha$  zależnej od ligandu poprzez tworzenie heterodimeru ER- $\beta$ 2-ER- $\alpha$ , który jest degradowany przez proteosomy.

Aktywowane receptory tworzą homo- lub heterodimery. Połączenie z ligandem zmienia konformację ER, uwalnia go z kompleksu hamującego złożonego z kilku białek opiekuńczych i wreszcie powoduje dimeryzację ER. Ta kaskada zdarzeń umożliwia połączenie dimeru z białkami koregulatorowymi, od których zależy dalsze działanie receptorów. Wszystkie receptory jądrowe mają kieszonkę hydrofobową zlokalizowaną w domenie wiążącej ligand (LBD). Jeżeli receptor związany jest z agonistą, helisa 12 w tej kieszonce zostaje zorientowana antyrównolegle do helisy 11 i powoduje ekspozycję hydrofobowego rowka, co umożliwia wiązanie białek koregulatorowych. Jeżeli natomiast receptor wiąże antagonistę, helisa 12 układana jest w rowku hydrofobowym i uniemożliwia wiązanie koaktywatorów [14]. W zależności od tego, czy ligand jest agonistą czy antagonistą ER, rolę koregulatorów mogą odgrywać białka o różnych właściwościach. Prawdopodobnie kompleksy złożone z białek koregulatorowych mają odmienny skład w różnych tkankach [20].

Jak wspomniano wyżej, przyłączenie agonistów do ER uruchamia połączenie z koaktywatorami. Białko koaktywatorowe zawiera domenę RID (*receptor interacting domain*), w której najważniejsze są sekwencje „LXXLL boxes” odpowiedzialne za wiązanie z receptorem. L jest symbolem leu-



Ryc. 1. Schemat budowy receptorów estrogenowych  
Fig. 1. Scheme of estrogen receptors structure

cyny, a X innego dowolnego aminokwasu [21]. Białka spełniające funkcję koaktywatorów mogą działać na różne sposoby [22], np.:

- acetylują reszty lizynowe w *N*-końcowym fragmencie histonów H3 i H4, prowadząc do rozluźnienia struktury chromatyny,
- acetylują inne czynniki transkrypcyjne i koaktywatory,
- rekrutują koaktywatory drugorzędowe, np. metylotransferazę argininową 1 związaną z koaktywatorem (*coactivator associated arginine methyltransferase 1* – CARM1), białkową metylotransferazę argininową 1 (*protein arginine methyltransferase 1* – PRMT1), które metylują histony,
- wchodzi w interakcje ze składnikami różnych zależnych od ATP kompleksów remodelujących chromatynę,
- bezpośrednio wchodzi w interakcje i stabilizują wiązanie z podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi.

Dzięki połączeniu aktywowanego ER z koaktywatorami tworzy się duży kompleks białkowy, który ma zdolność przyłączenia się w okolicy promotora wybranego genu, a dokładnie w jego regionie ERE (*estrogen response element*) i uruchamiania transkrypcji.

Połączenie ER z antagonistą powoduje z kolei rekrutację białek korepresorowych (*nuclear receptor corepressor* – NCoR1, NCoR2/SMRT) oraz deacetyltransferaz histonowych uniemożliwiających transkrypcję genów. Wyróżnia się 4 klasy korepresorów o odmiennym mechanizmie działania:

- I – klasyczne, zawierające motyw wchodzący w interakcje z ER,
- II – zawierające motywy „LXXLL boxes”, ich rekrutacja zależy od estrogenów, działają jak antykoaktywatory,
- III – inne, niesklasyfikowane, ich miejsce działania znajduje się zwykle poza domeną LBD,
- IV – działające za pośrednictwem kompleksów białkowych, w których skład wchodzi [22].

W tabeli 1. przedstawiono przykłady koaktywatorów i korepresorów.

Tamoksyfen i raloksyfen należące do leków grupy SERM mają złożone właściwości agonistyczno-antagonistyczne, a przewaga jednych nad drugimi zależy od rodzaju tkanki i genu, którego transkrypcja ma być uruchomiona [6, 24].

Taka regulacja ekspresji genów zawierających w obszarze promotorowym region ERE nazywana jest klasyczną. Receptory ER mogą także uczestniczyć w regulowaniu eks-

presji genów, w których w miejscach promotorowych działają inne czynniki transkrypcyjne, np. specyficzne białko 1 (*specificity protein 1* – SP-1) lub białka należące do kompleksu transkrypcyjnego białka 1 aktywowującego Fos/Jun (AP-1). Ta droga działania ER nazwana jest nieklasyczną. Obie drogi umożliwiają przekazywanie sygnału płynącego od estrogenów do jądra komórkowego (*nuclear-initiated steroid signaling* – NISS) [25].

### Mechanizm pobudzenia receptorów estrogenowych zlokalizowanych przybłonowo

Receptory estrogenowe i ich ligandy mogą być zaangażowane w przekazywanie sygnału niezależnie od jądra komórkowego [26]. Ten proces nazywa się sygnalizacją steroidową inicjowaną przy błonie komórkowej (*membrane-initiated steroid signaling* – MISS). Możliwy jest dzięki małej frakcji receptorów ER lub ich krótszych transkrypcyjnych wariantów zlokalizowanych przy błonie cytoplazmatycznej. Wielkość tej frakcji zależy od cytoplazmatycznych białek sygnałowych zależnych od czynników wzrostu i modulatora niegenomowej aktywności receptorów estrogenowych (*modulator of nongenomic action of estrogen receptor* – MNAR). Pula ER uwięziona jest przy wewnętrznej powierzchni błony komórkowej dzięki pośrednictwu białek błonowych (kaweoliny 1, flotyliny 2, striatynowego białka wiążącego kaweolinę) lub dzięki powiązaniu z receptorami błonowymi (IGFR, EGFR, HER2) albo sygnałowymi białkami adaptorowymi (Shc) [27]. Za wiązanie ER z kaweoliną odpowiada jego C-końcowy fragment – łączy on w sobie własności domeny wiążącej ligand i funkcje AF2. Przybłonowe ER mogą pośrednio lub bezpośrednio aktywować EGFR, IGFR i HER2. Pośrednia aktywacja jest możliwa dzięki pobudzeniu przez kinazy tyrozynowej Src, a następnie metaloproteinaz cytoplazmatycznych (*matrix metalloproteinase* – MMP2 i 9). Te z kolei uwalniają czynnik wzrostu wiążący heparynę (*heparin-binding growth factor* – H-BGF), który aktywuje EGFR i kaskadę zależnych od niego przekaźników. Aktywacja receptorów dla czynników wzrostu odbija się na jądrowej puli ER, ponieważ uruchamia aktywującą fosforylację jądrowych receptorów ER oraz ich koaktywatorów, a następnie transkrypcję wybranych genów. Przybłonowa pula ER uczestniczy także w tworzeniu kompleksów sygnałowych z kinazami receptorowymi i białkami G.

**Tabela 1.** Przykłady koregulatorów receptorów estrogenowych

**Table 1.** Examples of estrogen receptors coregulators

Koaktywatory	Korepresory	
Rodzina koaktywatorów receptorów steroidowych p160 ( <i>steroid receptor coactivator, SRC family</i> ):	nazwa	klasa
• SRC-1 (NCoA-1)	NcoR	I
• TIF2 ( <i>transcriptional intermediary factor 2</i> )	SMRT	I
• GRIP1 (SRC-2, NCoA-2)	SAFB1/SAFB2	III
• RAC3 ( <i>receptor associated coactivator 3, CIP, ACTR, AIB 1, TRAM1, SRC3</i> )	HDAC4	III
CBP ( <i>CREB binding protein, p300</i> )	RTA	III
DRIP 250	NEDD	III/IV
P68/p72	SHIP	III/IV
E6-AP	SAP30	IV

Jakkolwiek hipoteza dotycząca znaczenia MISS w logiczny sposób próbuje wyjaśnić zależność działania ER i receptorów dla czynników wzrostu, pojawiają się polemiczne głosy, jak np. doniesienie Dowsett i wsp. przedstawione na SABCS 2009 (*Membrane ER in endocrine resistance in lab and the clinic: should we be convinced?* – Dowsett M.) [28]. W pracy tej wykazano, że przybłonowa lokalizacja ER występowała w hodowlach hormonoopornych komórek raka piersi MCF7 i BT474 wykazujących nadekspresję HER2. Nie udało się jednak takiej lokalizacji uwidocznić w guzach piersi utrwalonych w formalinie. Być może ten sposób utrwalania materiału uniemożliwia immunohistochemiczną ocenę przybłonowych ER. Jednak podobne trudności napotkano także przy próbie wybarwienia przybłonowych ER w komórkach z hodowli 3D. Stąd przypuszczenie, że przybłonową lokalizację ER wykazują tylko komórki hodowane w niektórych określonych warunkach.

### Budowa i funkcja receptora progesteronowego

Transkrypcja genu dla PR w gruczole piersiowym i narządzie rodny regulowana jest przez działanie ER. Receptor progesteronowy występuje w postaci dwóch izoform, PR-A i PR-B, kodowanych przez jeden gen położony w części q22-23 chromosomu 11. [2]. Transkrypcja poszczególnych izoform rozpoczyna się w dwóch różnych miejscach promotorowych [29]. Schemat budowy PR obejmuje:

- domenę regulatorową,
- domenę wiążącą DNA,
- część zawiasową,
- domenę wiążącą progesteron.

Izoforma B receptora zawiera dodatkowo segment BUS (*B-upstream segment*), znajdujący się przy końcu *N* łańcucha białkowego – jego funkcją jest aktywacja transkrypcji (*transcription activation function* – TAF).

Obie izoformy PR stanowią odmiennie czynniki transkrypcyjne z niewielkim obszarem wspólnego działania [30]. Przy braku połączenia z hormonem koniec *C* receptora hamuje transkrypcję. Połączenie z agonistą powoduje zmianę konformacji receptora, jego dimeryzację i uruchomienie transkrypcji.

Rola PR w patogenezie raka piersi nie jest dotychczas ustalona. Dane z badań epidemiologicznych wskazują, że kobiety po menopauzie przyjmujące hormonalną terapię zastępczą estrogenowo-gestagenową są narażone na większe ryzyko zachorowania na raka piersi niż kobiety przyjmujące jedynie suplementację estrogenową [30]. Zaobserwowano, że niektóre polimorfizmy genu dla PR mogą być związane ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi. Przykładem może być polimorfizm miejsca promotorowego +331 G/A. Kobiety z genotypem AG i AA mają znacznie większe ryzyko zachorowania niż nosicielki genotypu GG. Polimorfizm predysponujący do wystąpienia nowotworu wiąże się z nasiloną ekspresją izoformy PR-B, która ma większy potencjał transkrypcyjny. Poprzez interakcje z ER PR-B stymuluje ścieżkę przekaźników Src/p21ras/kinazy regulowane przez sygnał zewnątrzkomórkowy. Geny odpowiedzialne za przeżycie i proliferację komórki nowotworowej aktywowane przez PR-B to np.: inhibitor białek apoptotycznych – homolog *C* (*inhibitor of apoptosis proteins – IAP homologue C*), cyklina D3, gen antyapoptotycznego białka Bcl-XL [29, 31].

### Współdziałanie receptorów hormonalnych i receptorów dla czynników wzrostu

Obserwacje kliniczne wskazują, że pacjentki z rakiem piersi ER+/PR– są mniej wrażliwe na leczenie tamoksyfenem niż ER+/PR+. Guzy o fenotypie ER+/PR– częściej występują u starszych pacjentek (ze zmniejszonym pomenopauzalnym stężeniem estrogenów), diagnozowane są w bardziej zaawansowanym stadium choroby, częściej wykazują ekspresję HER1 (czyli EGFR, 25% vs 8%) i nadekspresję HER2 (24% vs 12%). Choroba charakteryzuje się agresywniejszym przebiegiem klinicznym i krótszym czasem przeżycia wolnym od nawrotu [32, 33]. Kiedy zauważono, że guzy bez ekspresji PR słabiej odpowiadają na hormonoterapię (40% guzów odpowiada na leczenie tamoksyfenem), pojawiła się hipoteza, wg której brak ekspresji PR świadczy o niefunkcjonalnych ER, zmniejszonym stężeniu krążącego estradiolu lub niefunkcjonalnej ścieżce przekaźnikowej zależnej od ER [33, 34]. Arpino i wsp. skłaniają się jednak ku stwierdzeniu, że hipoteza o niefunkcjonalnych ER nie jest w stanie w satysfakcjonujący sposób wyjaśnić braku ekspresji PR lub jej utraty w trakcie hormonoterapii. Badacze wychodzą z założenia, że aktywność receptorów dla czynników wzrostu zmniejsza ekspresję PR niezależnie od prawidłowego działania ER, przede wszystkim przez zwiększanie przybłonowej puli ER i uruchamianie sygnalizacji steroidowej inicjującej przy błonie komórkowej (MISS). Brak ekspresji PR może być zatem powiązany z nadekspresją lub nadaktywnością receptorów dla czynników wzrostu i wskazuje na dominującą rolę tej sygnalizacji w komórce nowotworowej. Autorzy proponują nawet 24–48-godzinną stymulację estrogenami u pacjentek przed diagnostyczną biopsją gruboigłową guzów piersi. Pozwoliłoby to na wyindukowanie tych PR, których brak zależy od zmniejszonego stężenia estradiolu, ale nie od aktywności receptorów rodziny HER [2, 32]. W konsekwencji takie postępowanie pozwoliłoby na uniknięcie w ocenie histopatologicznej wyników fałszywie ujemnych w odniesieniu do PR.

Z kolei ER mogą być fosforylowane i aktywowane przez liczne kinazy komórkowe, także te zależne od receptorów dla czynników wzrostu [MAPK, PI3K/AKT, p90rsk, Pak1 (*p21-activated kinase*)], białkowa kinaza A]. Receptory estrogenu ulegają fosforylacji w ważnych dla ich funkcji domenach – głównie w domenie A/B (AF1) – w miejscach ser 106/107, 118, 167, 305, thr 311. Ufosforylowana forma ER może wykazywać aktywność transkrypcyjną niezależną od ligandu lub po związaniu tamoksyfenu. Podobnie fosforylacja koaktywatorów może uruchamiać transkrypcję przy nieobecności ligandu lub w obecności tamoksyfenu, który zaczyna się wtedy zachowywać jak agonista ER. Fosforylacja korepresorów prowadzi do ich usunięcia z jądra komórkowego [35].

Receptory HER1 i HER2 regulują proliferację komórek poprzez aktywowanie ścieżek przekaźników, np. kaskady związanej z białkową kinazą aktywowaną przez miogeny (MAPK). Zaobserwowano zwiększoną aktywność MAPK (kinaza regulowana przez sygnał zewnątrzkomórkowy, *extracellular signal-regulated kinase* – ERK) w liniach komórkowych raka piersi hodowanych przez długi czas w warunkach deprivacji estrogenowej lub w opornych na antyestrogen-

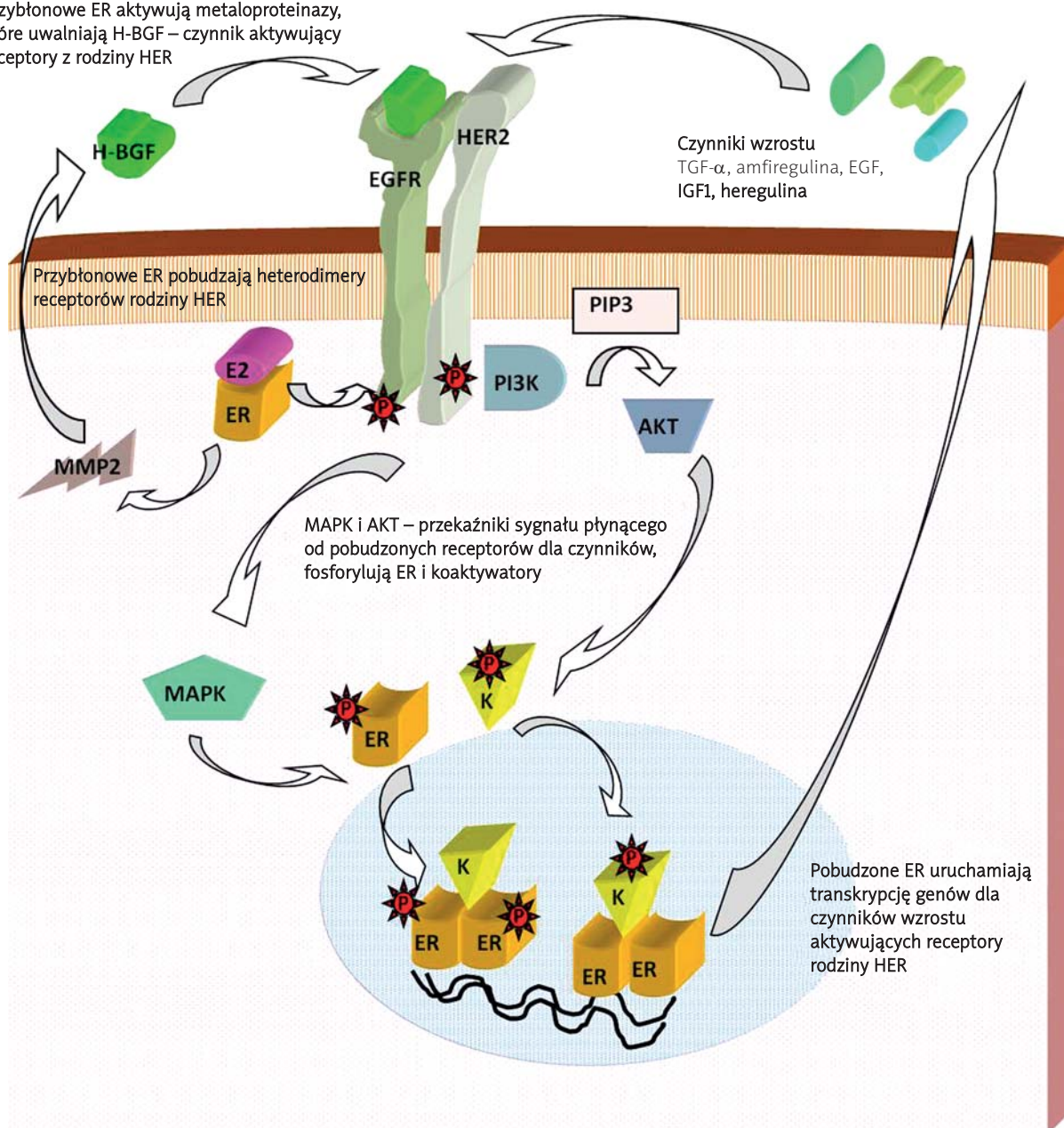
ny komórkach MCF-7. Obserwacje kliniczne wskazują na korelację pomiędzy zwiększoną aktywnością MAPK i zmniejszoną jakością i czasem trwania odpowiedzi na tamoksyfen [34].

Wiadomo obecnie, że ścieżka przekaźników HER1/HER2/MAPK nie tylko bezpośrednio pobudza transkrypcję genów odpowiedzialnych za wzrost komórek nowotworowych, ale także fosforyluje resztę serynową domeny A/B (AF-1) receptora ER- $\alpha$  w komórkach raka piersi. Taka fosforylacja, szczególnie w miejscu seryny 118 stanowiącej cel dla kinazy MAPK, promuje połączenie z koaktywatorami i uruchomienie aktywności transkrypcyjnej ER- $\alpha$ . Prawdopodobnie ta niezależna od ligandu aktywacja ER- $\alpha$  może odgrywać rolę w wytwarzaniu oporności na tamoksyfen. Wiąże się także z gorszym rokowaniem [34, 36, 37].

Wiązanie tamoksyfenu powoduje zmianę konformacji ER- $\alpha$ , a następnie połączenie z korepresorami domeny LBD (AF2) z jednoczesnym uniemożliwieniem połączenia koaktywatorów. Wspomniana fosforylacja Ser118 przebiegająca pod wpływem MAPK powoduje najprawdopodobniej rekrutację koaktywatorów i aktywację transkrypcji pomimo obecności tamoksyfenu [38].

Nie tylko aktywność kinaz MAPK ma wpływ na funkcje ER; zaobserwowano, że ścieżka pobudzenia PI3K i AKT także współdziała z receptorami hormonalnymi [18, 39–41]. Przybliżono położone ER- $\alpha$  po związaniu estradiolu wchodzi w interakcję z heterodimerami receptorów błonowych zawierającymi HER2 (element sygnalizacji MISS). Heterodimery HER2/HER3 są uznawane za mające największy potencjał mitogenny. Kompleks E2-ER- $\beta$  prawdopodobnie nasila aktyw-

Przybliżone ER aktywują metaloproteiny, które uwalniają H-BGF – czynnik aktywujący receptory z rodziny HER



Ryc. 2. Schemat współdziałania receptorów ER i HER

Fig. 2. Scheme of crosstalk between ER and HER receptors

ność heterodimerów receptorów dla czynników wzrostu, a te z kolei pobudzają przekaźniki PI3K i AKT, fosforylując receptory ER- $\alpha$  działające w mechanizmie NISS. PI3K wpływa na obie funkcje transkrypcyjne (AF1 i AF2) ER- $\alpha$ , AKT z kolei nasila aktywność domeny A/B (AF-1) poprzez fosforylację reszt serynowych s104, s106, s118 i s167. Tamoksyfen może blokować efekt działania estrogenów, ale nie pobudzenie płynące od przekaźników związanych z receptorami dla czynników wzrostu. Efektem takiego pobudzenia jest ekspresja Bcl-2 (hamowanie apoptozy) i cykliny D1 (przejście przez fazę G1-S). Fosforylacja ER- $\alpha$  jest prawdopodobnie momentem, w którym zbiega się sygnał płynący od AKT i MAPK [41].

Zależność działania receptorów dla czynników wzrostu i receptorów estrogenowych jest dwukierunkowa. Ujawnia się w mechanizmie MISS działania ER- $\alpha$ . Receptory te mogą także modulować efektywność sygnału płynącego do receptorów dla czynników wzrostu poprzez uruchamianie ekspresji ich ligandów, np. TGF- $\alpha$ , amfiredulina, EGF, IGF-1, heregulina [34, 38, 43]. Schemat powiązania pomiędzy działaniem receptorów ER i HER przedstawiono na ryc. 2.

## Podsumowanie

Wzajemne oddziaływania między ścieżkami pobudzenia ER i szlakami receptorów dla czynników wzrostu są zjawiskiem fizjologicznym w prawidłowych komórkach. W komórkach nowotworowych ulegające nadekspresji receptory dla czynników wzrostu tak silnie oddziałują na ER i ich koregulatory, że mogą wywoływać ich pobudzenie pomimo braku ligandu lub antagonizować działanie leków z grupy SERM. Badanie mechanizmów wytwarzania hormonooporności budzi obecnie duże zainteresowanie klinicystów. Wyniki badań laboratoryjnych wskazują na szczególną rolę receptorów dla czynników wzrostu w tym procesie. Znajdują one przełożenie na sytuacje kliniczne – toczą się obecnie badania kliniczne oceniające wyniki leczenia skojarzonego hormonoterapii i terapii ukierunkowanej molekularnie anty-HER2 u pacjentek z hormonoależnym rakiem piersi z nadekspresją receptora HER2. Niewykluczone, że taka strategia okaże się ważną opcją terapeutyczną dla określonej grupy pacjentek, u których istnieją przeciwwskazania do chemioterapii.

## Piśmiennictwo

- Creighton CJ, Massarweh S, Huang S, et al. Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically-associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. *Cancer Res* 2008; 68: 7493-501.
- Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7721-35.
- Masri S, Phung S, Wang X, Wu X, Yuan YC, Wagman L, Chen S. Genome-wide analysis of aromatase inhibitor-resistant, tamoxifen-resistant, and long-term estrogen-deprived cells reveals a role for estrogen receptor. *Cancer Res* 2008; 68: 4910-8.
- Ellis MJ, Tao Y, Young O i wsp. Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor her2-positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3019-25.
- Creighton CJ, Massarweh S, Huang S, et al. Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically-associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. *Cancer Res* 2008; 68: 7493-501.
- Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the her tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocrine Reviews* 2008; 29: 217-33.
- Kurokawa H, Lenferink AE, Simpson JF, Pisacane PI, Sliwkowski MX, Forbes JT, Arteaga CL. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5887-94.
- Johnston SR, Leary A, Martin LA, Smith IE, Dowsett M. Enhancing endocrine response with novel targeted therapies. why have the clinical trials to date failed to deliver on the preclinical promise? *Cancer* 2008; 112: 3.
- Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-her-2 therapy and personalized medicine. *The Oncologist* 2009; 14: 320-68.
- Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Fountzilias G, Murray S. Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *The Oncologist* 2008; 13: 620-30.
- Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *NRS* 2008; 10: 1-10.
- Flouriót G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Bruck V, Gannon F. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor- $\alpha$  (hER- $\alpha$ ) that is encoded by distinct transcripts and is able to repress hER- $\alpha$  activation function 1. *The EMBO Journal* 2000; 19: 4688-700.
- Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in epithelial tissues. *J Intern Med* 2008; 264: 128-42.
- <http://www.bio.cmu.edu/Courses/BiochemMols/ER/ERIntro.html>
- Fleming FJ, Hill AD, McDermott EW, O'Higgins NJ, Young LS. Differential recruitment of coregulator proteins steroid receptor coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid receptors to the estrogen receptor-estrogen response element by estradiol and 4-hydroxytamoxifen in human breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 375-83.
- Chang EC, Frasar J, Komm B, Katzenellenbogen BS. Impact of estrogen receptor on gene networks regulated by estrogen receptor in breast cancer cells. *Endocrinology* 2006; 147: 4831-42.
- Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ER $\alpha$  transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999; 140: 5566-78.
- Stoica GE, Franke TF, Moroni M, et al. Effect of estradiol on estrogen receptor- $\alpha$  gene expression and activity can be modulated by the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 2003; 22: 7998-8011.
- Berry M, Metzger M, Chambon P. Role of the two activating domains of the estrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *The EMBO Journal* 1990; 9: 2811-8.
- Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in epithelial tissues. *J Int Med* 2008; 264: 128-42.
- Bai Y, Gigue're V. Isoform-selective interactions between estrogen receptors and steroid receptor coactivators promoted by estradiol and ErbB-2 signaling in living cells. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 589-99.
- Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors and by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol* 2004; 33: 387-10.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, et al. Estrogen Receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007; 87: 905-31.
- Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, et al. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res* 2008; 68: 826-33.
- Massarweh S, Schiff R. Unraveling the mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: new therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1950-4.

26. Massarweh S, Schiff R. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocrine-Related Cancer* 2006; 13: S15-S24.
27. Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor to the plasma membrane. *PNAS* 2004; 101: 2076-81.
28. Dowsett M. Membrane ER in endocrine resistance In lab and the clinic: should we be convinced? [http://www.abstracts2view.com/sabcs09/view.php?nu=SABCS09L\\_3815&terms=](http://www.abstracts2view.com/sabcs09/view.php?nu=SABCS09L_3815&terms=)
29. De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res* 2003; 63: 5236-8.
30. De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. The progesterone receptor Val660→Leu polymorphism and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R636-9.
31. Huggins GS, Wong JY, Hankinson SE, De Vivo I. GATA5 activation of the progesterone receptor gene promoter in breast cancer cells is influenced by the +331G/A polymorphism. *Cancer Res* 2006; 66: 1384-90.
32. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, Elledge RM. Estrogen receptor – positive, progesterone receptor – negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen Resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1254-61.
33. Rakha EA, El-Sayed M, Green AR, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor – positive phenotype. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4772-8.
34. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1284-91.
35. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 926-35.
36. Britton DJ, Hutcheson IR, Knowlden JM, Barrow D, Giles M, McClelland RA, Gee JM, Nicholson RI. Bidirectional cross talk between ERα and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 96: 131-46.
37. Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Kondo N, Kobayashi S, Fujii Y, Iwase H. Low phosphorylation of estrogen receptor alpha (ERα) serine 118 and high phosphorylation of ERα serine 167 improve survival in ER-positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 755-63.
38. Atanaskova N, Keshamouni VG, Krueger JS, Schwartz JA, Miller F, Reddy KB. MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance. *Oncogene* 2002; 21: 4000-8.
39. Stoica GE, Franke TF, Wellstein A, et al. Estradiol rapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 818-30.
40. Stoica GE, Franke TF, Wellstein A, et al. Heregulin-b1 regulates the estrogen receptor-α gene expression and activity via the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 2003; 22: 2073-87.
41. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. The phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha. A new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 2001; 276: 9817-24.
42. Farach-Carson MC, Davis PJ. Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 839-45.
43. Bai Y, Giguere V. Isoform-selective interactions between estrogen receptors and steroid receptor coactivators promoted by estradiol and ErbB-2 signaling in living cells. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 589-99.

#### Adres do korespondencji

Sylwia Dębska

Klinika Chemioterapii Nowotworów

Katedra Onkologii

Uniwersytet Medyczny

ul. Paderewskiego 4

93-509 Łódź

e-mail: sylwia.debska@o2.pl