Współczesna Onkologia (2004) vol. 8; 10 (478–482)

Obecność receptorów estrogenowych (ER) w komórkach raka piersi jest korzystnym czynnikiem prognostycznym, a także czynnikiem predykcyjnym, określającym celowość leczenia hormonalnego.
Ostatnio został odkryty drugi typ receptorów estrogenowych. Wcześniej poznane receptory określono jako receptory α (ERα), a nowe nazwano receptorami estrogenowymi β (ERβ).
Rola ERα w raku piersi jest dobrze znana, natomiast funkcja i znaczenie ERβ nie są w pełni wyjaśnione. Oba receptory estrogenowe należą do grupy receptorów jądrowych. Zbudowane są z sześciu funkcjonalnych domen A do F. Wykazują znaczną zgodność pomiędzy domenami C i E (odpowiednio 96 proc. i 56 proc.). Receptory α i β mają podobną budowę, są jednak różnymi białkami, kodowanymi przez 2 odrębne geny. Gen kodujący receptor α znajduje się na długim ramieniu chromosomu 6., a dla receptora β na chromosomie 14.
ERα i ERβ mają różne funkcje i różne rozmieszczenie w tkankach. Badania wiązania liganda wskazują, że ERβ łączą się z naturalnym estrogenem 17β-estradiolem, podobnie jak receptory α. ERβ wykazują wyraźnie większe powinowactwo do fitoestrogenów. Dotychczasowe badania znaczenia ERβ w raku piersi przynoszą niejednoznaczne wyniki. Wdaje się, że obecność receptorów estrogenowych β może się okazać korzystnym czynnikiem rokowniczym. Skomplikowany proces aktywacji transkrypcji przez receptory estrogenowe, istnienie wielu izoform obu receptorów, udział koaktywatorów i koopresorów sprawiają, że ostateczny efekt zależy od wszystkich tych czynników.

Słowa kluczowe: receptory estrogenowe β, rak piersi.

Receptory estrogenowe β w raku piersi

Estrogen receptor β in breast cancer

Maria Litwiniuk, Jan Bręborowicz

Katedra i Klinika Onkologii, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

WSTĘP

Hormonoterapia jest najstarszą metodą systemowego leczenia raka piersi. Stosowana jest od ponad stu lat – od czasu, gdy w 1896 r. chirurg z Glasgow, George Beatson, opisał regresję raka po kastracji chirurgicznej [1]. Przez ponad pół wieku kastracja była jedyną dostępną formą leczenia hormonalnego. Stosowano ją w leczeniu zaawansowanego raka piersi u młodych kobiet, uzyskując odpowiedź na leczenie u mniej niż połowy pacjentek. Wyjaśnieniem tego zjawiska było wykrycie w 1967 r. receptorów estrogenowych (ER) i późniejsze określenie związku pomiędzy ich obecnością w rakach piersi a odpowiedzią na leczenie hormonalne. Gdy w komórkach raka stwierdza się ekspresję ER, remisja po leczeniu hormonalnym następuje u 50–60 proc. chorych (a nawet częściej, gdy obecny jest również receptor dla progesteronu – PgR) i u mniej niż 10 proc. – z receptorami ujemnymi [2]. Chociaż prawdopodobieństwo uzyskania remisji u pacjentek z ujemnymi receptorami jest małe, to jednak trudno wytłumaczyć istnienie takiej możliwości. Jedną z przyczyn może się okazać obecność wykrytych niedawno receptorów estrogenowych β.

Mimo że rodzina receptorów jądrowych, do których należą ER, jest bardzo liczna, przez wiele lat zakładano, że istnieje tylko jeden rodzaj receptorów estrogenowych. W 1996 r. odkryto – najpierw u zwierząt, potem u człowieka – drugi, specyficzny dla estrogenów receptor. Nowy receptor nazwano receptorem estrogenowym β (ERβ), a dotychczas znany – receptorem α (ERα) [3, 4].

BUDOWA I DZIAŁANIE RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH

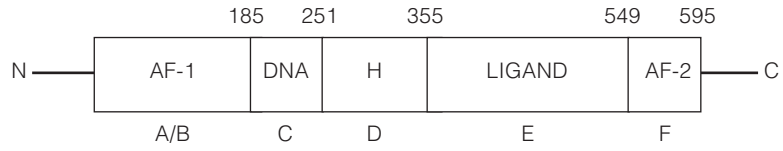
Receptory estrogenowe należą do grupy receptorów jądrowych. Ich zadaniem jest regulowanie procesów transkrypcji. W tym celu receptory te łączą się ze swoistymi cząsteczkami, ligandami, które swobodnie przechodzą przez błony komórkowe. Ligandami dla receptorów jądrowych są hormony steroidowe i tyroidowe, retinoidy, witamina D_3 i niektóre prostaglandyny [5].

Budowę receptorów estrogenowych przedstawiono schematycznie na ryc. 1.

Tak jak inne receptory jądrowe, oba receptory estrogenowe są zbudowane z sześciu funkcjonalnych domen A–F. ER posiadają 2 miejsca aktywujące transkrypcję. Miejsca te są zlokalizowane na końcu aminowym białka w domenach A/B (ang. *activation function 1* – AF1) i na końcu karboksylowym (ang. *activation function 2* – AF2).

Estrogen receptor (ER) has been found to be a significant predictor of survival and response to hormonal therapy in women with breast cancer.
Recently, a second type of ER has been discovered. The "old" one is now called estrogen receptor alpha (ERα) and the newly discovered one is called estrogen receptor beta (ERβ). While much is known about ERα, the role of ERβ is still undefined. ER belongs to the steroid/thyroid nuclear receptor family. Both ER subtypes contain six functional domains, designated as A – F. There is a high homology at the C and E regions (96% and 58%, respectively) and reduced homology between the other parts of the molecule. The genes for both receptors are located on different chromosomes, ER on chromosome 6, while ERβ on chromosome 14. The tissue distribution and physiological functions of ERβ and ERα are different.
The exact role of ERβ in breast cancer remains unclear. Recent studies have demonstrated that ERβ could be a marker of good prognosis.
Complex machinery of ER transactivation of target genes by estrogen through both receptor subtypes (α and β), variant isoforms and coregulatory proteins show that the final effect depends on all these factors.

Key words: estrogen receptor β, breast cancer.



A–F – domeny
AF1 – aktywacja transkrypcji niezależna od liganda
AF2 – aktywacja transkrypcji zależna od przyłączenia liganda
DNA – przyłączenie do DNA
H – zawias (ang. hinge)
ligand – miejsce przyłączenia liganda

Ryc. 1. Schemat budowy receptorów estrogenowych α
Fig. 1. Diagram of estrogen receptor α

W niektórych komórkach, dla uzyskania maksymalnej transkrypcji, konieczna jest aktywacja zarówno AF1, jak i AF2. W innych wystarczy aktywność jednego z nich. Oznacza to, że ten sam receptor może różnie działać w różnych komórkach. Tę hipotezę potwierdziło wykrycie w ostatnim czasie wielu białek, które wykazują preferencje dla AF1 lub AF2. Niektóre z tych białek pełnią rolę koaktywatorów łączących receptor z centrum transkrypcyjnym. Co ciekawe, AF1 może aktywować transkrypcje niezależnie od połączenia się receptora z ligandem. W przypadku AF2 warunkiem transkrypcji jest przyłączenie liganda. W domenie E znajduje się specjalna struktura przyłączająca ligand. Receptory pozbawione w sposób sztuczny tej struktury mogą aktywować transkrypcję mimo nieobecności liganda. Domena E odgrywa również rolę w procesie dimeryzacji receptora. Receptory estrogenowe, tak jak inne receptory steroidowe, mogą tworzyć dimery, łącząc się w homodimery (αα lub ββ) lub heterodimery (αβ).

Za przyłączenie kompleksu ligand-receptor do DNA odpowiedzialna jest domena C.

Receptory estrogenowe przyłączają się do fragmentu DNA, nazywanego elementem odpowiadającym na estrogen (ang. *estrogen responsive element* – ERE). Znana jest sekwencja tego elementu.

Oba receptory estrogenowe mogą aktywować transkrypcję genów dwiema drogami: albo poprzez klasyczny element ERE lub poprzez białko aktywujące AP1 (ang. *activator protein 1*). Gdy przekazywanie sygnału odbywa się poprzez ERE, receptory połączone z estrogenem ulegają dimeryzacji i łączą się z ERE jako homodimery (αα lub ββ) albo heterodimery (αβ). W przypadku oddziaływań poprzez AP1 powstają homodimery i potrzebny jest udział czynników trankrypcyjnych Fos i Jun. Gdy sygnał jest przekazywany poprzez AP1, ERα i ERβ działają przeciwnie. Połączenie ERα z estradiolem aktywuje transkrypcję, a z ERβ – hamowanie transkrypcji.

Obok aktywacji przez przyłączenie liganda istnieją jeszcze inne formy pobudzania transkrypcji. Jedną z nich jest fosforylacja. W receptorze α określono 2 miejsca – Ser118 i Tyr537, w których możliwe jest indukowanie transkrypcji bez przyłączenia liganda. Podobne miejsca istnieją w receptorze β.

W ostatnich latach odkryto wiele białek, które oddziałują z ERα i ERβ. Najlepiej poznane koaktywatory to SRC1 (ang. *steroid receptor coactivator 1*) i AIB1, a korepresory to N-CoR (ang. *nuclear receptor corepressor*) i SMRT (ang. *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*). Po przyłączeniu estradiolu ERα

A/B	C	D	E	F
17,5	96	30	59	18

Ryc. 2. Porównanie budowy receptorów estrogenowych α i β. Liczby oznaczają procent homologii w zakresie poszczególnych domen
Fig. 2. Similarity between estrogen receptors α and β. Numbers refer to a percentage of homology between each domain

ulega dimeryzacji, przyłącza się do ERE i w celu wytworzenia aktywnego centrum transkrypcyjnego potrzebuje współdziałania koaktywatorów. Przeciwnie, w przypadku braku liganda ER współdziała z korepresorami w celu inaktywowania odpowiednich genów. Stwierdzono np., że poziom N-CoR koreluje z wrażliwością lub opornością na leczenie tomoksyfenem [6–9].

PORÓWNANIE DWÓCH RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH α I β

Receptory α i β mają podobną budowę, są jednak różnymi białkami, kodowanymi przez 2 odrębne geny. Gen kodujący receptor α znajduje się na długim ramieniu chromosomu 6., a dla receptora β na chromosomie 14. Oba receptory dla estrogenów, tak jak inne receptory jądrowe, zbudowane są z 6 funkcjonalnych domen A–F.

Największe różnice pomiędzy receptorami α i β stwierdza się w zakresie domeny końca N-terminalnego, a największą zgodność pomiędzy domenami C i E (odpowiednio 96 i 56 proc.) (ryc. 2.).

Badania wiązania liganda wskazują, że ERβ łączą się z naturalnym estrogenem 17β-estradiolem podobnie, jak receptory α [10]. Interesujący jest fakt, że ERβ wykazują wyraźnie większe powinowactwo do fitoestrogenów – być może jest to preferowany receptor dla tych substancji [11].

By lepiej poznać funkcje obu receptorów estrogenowych na poziomie organizmu, wyhodowano myszy sztucznie pozbawione receptorów estrogenowych α (αERKO), receptorów β (βERKO) lub obu typów receptorów (αβERKO). Myszy pozbawione ERα są bezpłodne, samice nie wytwarzają ciałka żółtego, samce mają atrofię jąder. Samice myszy βERKO wykazują zmniejszoną płodność, samce są płodne [12].

OKREŚLANIE OBECNOŚCI RECEPTORÓW

W celu określenia obecności receptorów steroidowych wykonuje się testy biochemiczne i immunologiczne.

Metody biochemiczne to testy wiązania liganda. Polegają one na oznaczaniu białek wiążących estradiol. Estradiol jest ligandem zarówno dla receptorów estrogenowych α, jak i β, więc jednocześnie oznaczana jest zawartość obu typów receptorów. W testach immunologicznych stosuje się przeciwciała, skierowane przeciwko różnym fragmentom receptora. W powszechnie stosowanych testach, określających zawartość receptorów estrogenowych, oznaczane są tylko receptory α, gdyż stosuje się przeciwciało skierowane wybiórczo przeciwko ERα [13]. Pierwsze badania nad receptorami β opierały się na oznaczaniu mRNA za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Wynikało to częściowo z braku komercyjnie dostępnych przeciwciał do oznaczania ekspresji receptorów β metodą immunohistologiczną. Wadą technik PCR jest brak informacji na temat rozmieszczenia receptorów w komórce i – co ważniejsze – nie wiadomo, czy obecność genu wiąże się z obecnością białka kodowanego przez ten gen. Dodatkową komplikację stwarza fakt ekspresji ERβ w innych, nienowotworowych komórkach piersi. W technikach, takich jak PCR czy Western blotting, w których wykonuje się oznaczenia w homogenizowanych tkankach mogą wystąpić domieszki materiału z innych, nieinwazyjnych fragmentów badanego guza [14]. W ostatnim czasie wprowadzono wiele mono- i poliklonalnych przeciwciał do oznaczania ekspresji receptorów β. Są to przeciwciała skierowane przeciwko różnym fragmentom receptora estrogenowego β. Mnogość przeciwciał i stosowanych technik wiąże się z trudnościami w porównywaniu wyników otrzymanych przez różnych badaczy. W badaniu, w którym porównywano 7 przeciwciał stwierdzono, że niektóre z nich są bardziej przydatne do badania skrawków parafinowych, a inne do badania zamrożonych tkanek [15]. Stąd konieczność rozważnego wyboru odpowiedniego przeciwciała i metody oznaczania. W przyszłości na pewno powstaną standardy postępowania i programy kontroli jakości, tak jak się to stało w przypadku określania ekspresji receptorów estrogenowych α.

Prognostyczne znaczenie ekspresji receptorów estrogenowych β w raku piersi

Dotychczasowe badania roli receptorów estrogenowych β w raku piersi przynoszą sprzeczne wyniki. Speirs i wsp. metodą RT-PCR, określali zawartość mRNA dla ERα i ERβ. Stwierdzili, że ekspresji receptorów β towarzyszą przerzuty do węzłów chłonnych [16]. W podobnym badaniu nie stwierdzono zależności pomiędzy zawartością mRNA dla ERα i β, a stopniem histologicz-

nej złośliwości, wielkością guza i zajęciem węzłów chłonnych. Najwyższe poziomy mRNA dla ERβ stwierdzono w guzach ER- i PgR-ujemnych, a więc w guzach niewrażliwych na leczenie hormonalne [17]. Ponieważ taką zależność stwierdzano również w innych badaniach, postulowano możliwość udziału receptorów estrogenowych β w oporności na leczenie tamoksyfenem [18, 19]. Mann i wsp. doszli do przeciwnych wniosków. W grupie 118 kobiet stosujących po operacji tamoksyfen określili metodą immunohistochemiczną zawartość receptorów α i β. Lepsze przeżycia stwierdzili u pacjentek, u których stwierdzano ekspresję receptorów β w tkance nowotworowej i ekspresja ta występowała w więcej niż 10 proc. komórek guza. Dotyczyło to zarówno pacjentek z przerzutami, jak i bez przerzutów do węzłów chłonnych [20]. W innym badaniu, w którym również posłużono się metodą immunohistochemiczną, badano zależność pomiędzy ERβ, ERα i receptorami dla progesteronu (PgR) a wybranymi czynnikami prognostycznymi. Obecność receptorów estrogenowych β korelowała z brakiem przerzutów do węzłów chłonnych, niskim stopniem histologicznej złośliwości i niską frakcją komórek w fazie syntezy. Nadmierna ekspresja receptora HER-2 występowała znamiennie częściej u pacjentek, u których w guzach nie stwierdzano obecności receptorów estrogenowych β [21]. Badanie oparte było na pomiarze ekspresji białka, a nie jak w przypadku PCR – pomiarze mRNA dla tego białka.

W ostatnim czasie pojawiły się prace, wskazujące na potencjalną rolę receptorów α i β w procesie złośliwej transformacji łagodnych zmian w piersiach.

Bardzo interesujące wyniki przynoszą badania nad rolą receptorów estrogenowych β, prowadzone na liniach komórkowych. Badano linie MCF-7 zawierające tylko receptory estrogenowe α (ERα$^+$) i niezawierające receptorów estrogenowych β. W liniach tych estradiol nasila proliferację i indukuje powstawanie guzów. Wprowadzenie ERβ do komórek MCF-7 hamuje proliferacje *in vitro* i zapobiega tworzeniu się guzów w mysich ksenotransplantach, poddanych działaniu estradiolu. W komórkach tych ERβ hamuje proliferację poprzez wstrzymywanie transkrypcji genów dla c-myc, cykliny D1 i cykliny A i zwiększanie ekspresji p21 i p27 (czynników, odpowiedzialnych m.in. za zatrzymanie komórek w fazie G_2 cyklu komórkowego). Badania te wskazują, że receptory estrogenowe α i β wywierają przeciwne działanie na proliferację i tworzenie guzów w komórkach MCF-7 [22].

W ciągu ostatnich dwóch lat pojawiło się wiele doniesień na temat ERβ, jednak dotychczasowe badania nie przynoszą jednoznacznych wyników. Wydaje się, że obecność receptorów estrogenowych β może się okazać korzystnym czynnikiem rokowniczym. Skomplikowany proces aktywacji transkrypcji przez receptory estrogenowe, istnienie wielu izoform obu receptorów, udział koaktywatorów i koopresorów wskazują, że ostateczny efekt zależy od wszystkich tych czynników [23].

POTENCJALNE KLINICZNE ZNACZENIE OKREŚLANIA EKSPRESJI RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH β W RAKU PIERSI

Uzupełniające leczenie hormonalne u chorych z guzami wykazującymi obecność receptorów estrogenowych i progesteronowych to standardowe postępowanie o ustalonej wartości. Metaanaliza, obejmująca 37 000 chorych leczonych w ramach 55 randomizowanych badań klinicznych wykazała, że stosowanie tamoksyfenu przez 5 lat po operacji powoduje obniżenie względnego rocznego ryzyka nawrotu o 47 proc., a zgonu z powodu raka o 26 proc. [24]. Ciągle jednak nie jest znany optymalny czas trwania tego leczenia. Badania na liniach komórkowych wskazują na możliwość niekorzystnego działania przedłużonej ekspozycji na tamoksyfen. Nie jest również jednoznacznie ustalona rola innych leków hormonalnych (np. z grupy inhibitorów aromatazy) lub terapii sekwencyjnej w leczeniu uzupełniającym.

W zaawansowanej chorobie na leczenie hormonalne odpowiada 50–60 proc. pacjentek z dodatnim receptorem estrogenowym α. U ok. 10 proc. chorych stwierdza się również odpowiedź bez stwierdzonej ekspresji ERα. Jest możliwe, że w grupie pacjentek bez obecności receptorów estrogenowych α w guzie istnieje podgrupa potencjalnych kandydatek do leczenia hormonalnego (np. chore ERα$^-$ i ERβ$^+$).

Najprawdopodobniej istnieją różne typy raka, wymagające zindywidualizowanego leczenia. Być może określenie ekspresji receptorów β będzie pomocne przy wyborze najbardziej odpowiedniego leczenia hormonalnego.

Wydaje się również, że badania receptorów estrogenowych β stwarzają nowe perspektywy dla hormonoterapii zastępczej. Naturalne lub syntetyczne ERβ-selektywne estrogeny nie powinny zwiększać ryzyka raka piersi i być może znajdą zastosowanie w chemoprewencji tego nowotworu.

PIŚMIENNICTWO

1. Beatson GT. *On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the MAMMA: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases.* Lancet 1896; ii: 104-7, 162-5.
2. Pieńkowski T. *Rak piersi.* W: *Onkologia kliniczna.* Krzakowski M (red.). Borgis, Warszawa 2001; tom 2: 87-139.
3. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustaffson JA. *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary.* Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 5925-30.
4. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. *ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor.* FEBS Lett 1996; 392: 49-53.
5. Tkaczyk M, Kalita K. *Receptor estrogenowy β – budowa, regulacja i funkcja.* Post Bioch 2001; 47 (1): 72-9.

6. Speirs V, Kerin MJ. *Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer*. Br J Surg 2000; 87: 405-409.
7. McDonnell DP, Norris JD. *Connections and regulation of the human estrogen receptor*. Science 2002; 296: 1642-4.
8. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. *Estrogen receptor transcription and transactivation estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer*. Breast Cancer Res 2000; 2 (5): 335-44.
9. Ramsey TL, Risinger KE, Jernigan SC, et al. *Estogen receptor β isoforms exhibit diferences in ligand-activated transcriptional acttivity in an estrogen response element sequence-dependent manner*. Endocrinology 2004; 145: 149-60.
10. Kuipper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta.* Endocrinology 1997; 138: 863-70.
11. Kuipper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. Endocrinology 1998; 139: 4252-63.
12. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, et al. *Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta*. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95 (26): 15677-82.
13. Palmieri C, Saji S, Gustafsson JA, et al. *False negatives in oestrogen-receptor assay*. Lancet 2000; 356: 944-5.
14. Saunders PTK, Millar MR, Williams K, et al. *Expression of oestrogen receptor beta (Er beta1) protein in human breast cancer biopsies*. Br J Cancer 2002; 86: 250-6.
15. Skliris GP, Parkes AT, Limer JL, et al. *Evaluation of seven oestrogen receptor beta antibodies for immunohistochemistry, western blotting, and flow cytometry in human breast tissue.* J Pathol 2002; 197: 155-62.
16. Speirs V, Parkes AT, Kerin MJ, et al. *Coexpression of estrogen receptor alpha and beta: poor prognostic factors in human breast cancer?* Cancer Res 1999; 59: 525-8.
17. Iwao K, Miyoshi Y, Egawa Ch, et al. *Quantitative analysis of estrogen receptor – alpha and – beta messenger RNA expression in breast carcinoma by real-time polymerase chain reaction*. Cancer 2000; 89: 1732-8.
18. Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, et al. *Estrogen receptor beta messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: relationship to steroid receptor status and regulation by progestins.* Cancer Res 1999; 59: 529-32.
19. Speirs V, Malone C, Walton DS, et al. *Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients*. Cancer Res 1999; 59: 5421-4.
20. Mann S, Laucirica R, Carlson N, et al. *Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer*. Hum Pathol 2001; 32: 113-18.
21. Jarvinen TAH, Pelto-Huikko M, Holli K, Isola J. *Estrogen receptor beta is coexpressed with ER alpha and PR and associated with nodal status, grade and proliferation rate in breast cancer*. Am J Path 2000; 156: 29-35.
22. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, et al. *Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G_2 cell cycle arrest*. Cancer Res 2004; 64: 423-8.
23. Speirs V. *Oestrogen receptor beta in breast cancer: good, bad or still too early to tell?* J Pathol 2002; 197: 143-7.
24. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Tamoxifen for early breast cancer: an overwiew of randomized trials*. Lancet 1998; 351: 1451-67.

ADRES DO KORESPONDENCJI
dr med. **Maria Litwiniuk**
Klinika Onkologii
Akademia Medyczna
ul. Łąkowa 1/2
61-878 Poznań
tel. +48 61 854 90 19
e-mail: litwiniuk@skrzynka.pl