

Rola aromatazy w raku sutka

The role of aromatase in breast cancer

Katarzyna Jarząbek, Sławomir Wołczyński

Zdecydowana większość raków sutka u kobiet w wieku postmenopauzalnym jest estrogenozależna. Pytanie czy czynnikiem stymulującym wzrost guza jest pula estradiolu surowiczego czy produkcja miejscowa w tkance jest kluczowym zagadnieniem. Wydaje się, że miejscowa produkcja estrogenów w tkankach pełni podstawową rolę w rozwoju i wzroście guza, a aromataza jest kluczowym enzymem regulującym miejscową produkcję estrogenów.

W pracy przedstawiono współczesne poglądy na mechanizmy aktywacji i rolę aromatazy w zdrowym gruczole piersiowym i raku sutka.

Słowa kluczowe: rak piersi, aromataza

(Przegląd Menopauzalny 2003; 5:12–16)

Zgromadzone dowody epidemiologiczne, kliniczne i eksperymentalne jednoznacznie wskazują na udział estrogenów w patogenezie raka sutka. Wiadomo jednak, że ponad 2/3 raków sutka u kobiet pojawia się w okresie postmenopauzalnym, a więc po wygaśnięciu hormonalnej czynności jajnika. Dlaczego zatem proces wyraźnie estrogenozależny pojawia się najczęściej przy braku estrogenów w krążeniu?

Okazuje się, że to głównie lokalne procesy zaangażowane w powstawanie estrogenów w samym guzie odgrywają kluczową rolę w rozwoju i postępie choroby nowotworowej sutka.

Estrogeny syntetyzowane miejscowo w tkance wykazują biologiczną aktywność prawdopodobnie tylko w miejscu powstania, a mechanizmy kontrolujące ich produkcję podlegają w zasadniczym stopniu regulacji parakrynej lub/i autokrynej, a nie endokrynej, jak w gonadzie w okresie rozrodczym [1].

Biosyntezę estrogenów katalizuje mikrosomalny enzym aromataza P450 [2]. Aromataza P450 należy do grupy 480 białek – cytochromów P450. Grupą prostetyczną czyli niebiałkową jednostką enzymu w cytochromach jest hem. Białka z grupy cytochromów uczestniczą w przenoszeniu elektronów. W obecności tlenu węgla cytochromy 450 pochłaniają falę światła o długości 450 nm i stąd nazwa całej grupy. Cytochromy

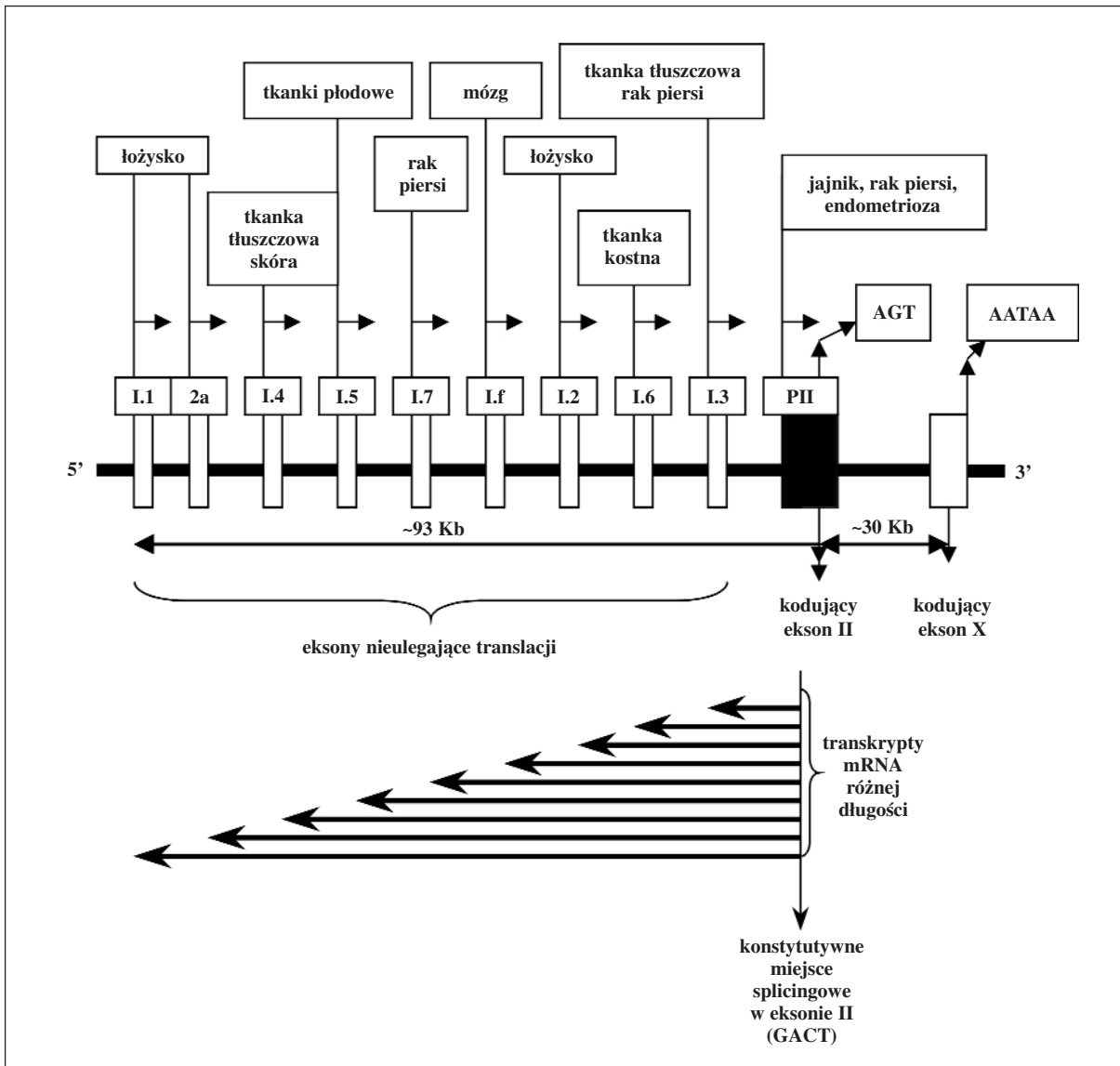
sklasyfikowano w 74 rodzinach. Aromataza należy do rodziny 19., w skład której wchodzi jeden przedstawiciel [3]. Gen aromatazy P450 oznaczony jest symbolem *CYP19*. Cytochrom P450 aromatazy wiąże androgenne steroidy C19 i katalizuje serię reakcji, prowadzących do powstania w pierścieniu A steroidu pierścienia fenolowego, charakterystycznego dla estrogenów C18 [4]. Enzymem związanym z aromatazą jest NADPH-reduktaza, powszechnie występująca w błonie retikulum endoplazmatycznego komórek [5]. Enzym ten katalizuje przeniesienie elektronów na aromatazę P450.

W latach 90. sklonowano ludzki gen *CYP19* i poznano jego sekwencję [6, 7]. Ustalono, że gen ten występuje w pojedynczej kopii i zlokalizowany jest na chromosomie 15q21.2 (ryc. 1.).

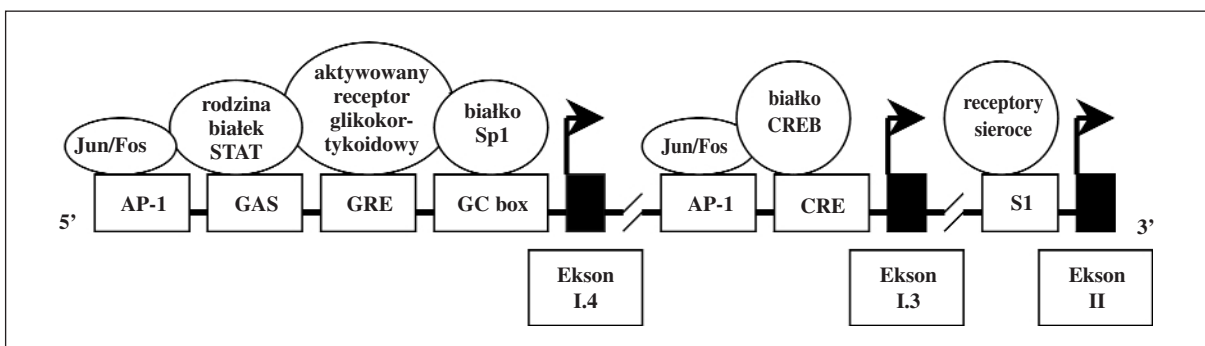
Gen *CYP19* jest największym genem wśród rodziny cytochromu P450, rozciąga się na długość 123 tys. par zasad i składa się z 10 eksonów [8]. Ogromny odcinek – 93 tys. par zasad flankujący koniec 5' jest sekwencją niekodującą (tzw. region nieulegający translacji ang. 5'UTRs) i pełni funkcję regulatorową. Tylko 30 tys. par zasad (9 eksonów) pod kontrolą promotora II koduje funkcjonalne białko złożone z 503 aminokwasów. Odcinek nieulegający translacji opisano jako eksony pierwsze. Dotychczas zidentyfikowano 9 eksonów pierwszych, które nie kodują aromatazy, a znajdują się pod

Zakład Endokrynologii Ginekologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku,
kierownik: prof. dr hab. n. med. Sławomir Wołczyński





Ryc. 1. Organizacja ludzkiego genu *CYP19* kodującego aromatazę oraz schematyczna lokalizacja tkankowo-specyficznych promotorów (I.1, 2a, I.4, I.5, I.7, I.f, I.2, I.6, I.3, PII) genu *CYP19*



Ryc. 2. Schemat kluczowych miejsc regulatorowych promotorów: I.4; I.3, II genu aromatazy. GAS – *interferon activated sequence*; GRE – *glucocorticoid responsive element*; CRE – *cAMP responsive element*



kontrolą 9 różnych promotorów. Po raz pierwszy Means i Mahendroo wykazali, że transkrypty mRNA aromatazy w jajniku, łożysku i w komórkach zrębu tkanki tłuszczowej różnią się między sobą długością [9, 10]. Świadczy to o funkcjonowaniu tkankowo specyficznej regulacji ekspresji aromatazy przy udziale promotorów charakterystycznych dla danej tkanki. Promotory te zawierają sekwencje regulatorowe dla różnych czynników transkrypcyjnych i regulatorów. Długość powstających transkryptów mRNA zależy od syntetyzowanych przez tkankę czynników i w efekcie, z którego promotora włączana jest ekspresja. Powstające transkrypty różnią się między sobą długością końca 5'. Pomimo innej długości transkryptów, region kodujący dojrzałego transkryptu i końcowy produkt – aromataza jest w każdej tkance identyczny. Syntezę takiego samego produktu białkowego, niezależnie od długości powstającego transkryptu mRNA, zapewnia mechanizm alternatywnego składania genu zwanego *splicingiem* [11–13]. W procesie tym usuwane są z transkryptów pierwotnych eksony nieulegające translacji. W genie aromatazy istnieje 9 miejsc splicingowych 3', zlokalizowanych na końcu eksonów pierwszych, które charakteryzują się wspólnym motywem strukturalnym – tzw. sekwencją zgodną końca 3' zakończoną dinukleotydem AG. Natomiast drugie miejsce splicingowe, tzw. sekwencja zgodna końca 5' jest tylko jedno i znajduje się przed miejscem wyznaczającym start translacji ATG (sekwencja GACT).

Złożoność ekspresji aromatazy polega m.in. na włączaniu i wyłączaniu promotorów w odpowiedzi na syntetyzowane w komórce czynniki. Przełączenie ekspresji z jednego promotora na inny wyjaśnia częściowo tkankowo-specyficzną regulację ekspresji aromatazy, a także odgrywa zasadniczą rolę w zmienionej ekspresji aromatazy podczas rozwoju i wzrostu guza nowotworowego, prowadząc często do lokalnej nadprodukcji aromatazy i wzrostu biosyntezy estrogenów *in situ*. Produkcja estrogenów z androgenów jest tkankowo-specyficzna i zależy od miejsca ich biosyntezy.

Metodami biochemicznymi wykryto aktywność aromatazy w ok. 60–70% guzów i aktywność ta była dużo wyższa w porównaniu do aktywności w tkance tłuszczowej, czy zdrowej tkance gruczołowej otaczającej guz [14–16]. Również fibroblasty pochodzące z guza w hodowli *in vitro* charakteryzują się wyższą aktywnością w porównaniu do fibroblastów pochodzących ze zdrowej tkanki [17]. Wyniki te potwierdzono technikami biologii molekularnej, tj. techniką RT-PCR, stwierdzając w tkance guza znacznie wyższą zawartość transkryptów mRNA aromatazy w porównaniu do tkanki zdrowej [18]. Obserwacje te tłumaczą, dlaczego stężenia estradiolu w guzie nowotworowym osiągają wartości 30–100-krotnie większe niż w surowicy krwi [19, 20]. Można przypuszczać zatem, że surowiczy estradiol ma wtedy tylko nieznaczny wpływ na rozwój guza. Guzy nowotworowe, wykazujące ekspresję aro-

matazy stają się samowystarczalne w wytwarzaniu sygnałów proliferacyjnych i lokalnie wytworzone estrogeny na drodze autokrynej stymulują namnażanie się zmienionych genetycznie komórek nowotworowych. Dodatkowo wysokie stężenie estradiolu może predysponować do lokalnego powstawania katecholesteronów, działających genotoksycznie i powodujących zwiększenie liczby mutacji i zwiększenie inwazyjności. Udowodniono, że ekspresja aromatazy w rakach sutka ER(+) jest ważnym mechanizmem autokrynej regulacji wzrostu guza. Dane te wskazują, że wzrost aktywności lub/i ekspresji aromatazy jest związany z nowotworowym fenotypem guza sutka.

W zdrowym gruczole piersiowym, w tkance tłuszczowej ekspresja aromatazy regulowana jest z promotora I. 4 stymulowanego w obecności glikokortykoidów przez cytokiny klasy I (IL-6, IL-11) i TNF- α . Region regulatorowy promotora I.4 zawiera w swojej strukturze sekwencję GAS (interferon- γ *activated sequence*), która jest miejscem wiązania czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT oraz element GRE (*glucocorticoid response element*) [22–25]. Cytokiny: IL-6, LIF (*leukemia inhibitory factor*), OSM (onkostatyna M), których ekspresja zwiększa się wraz z wiekiem [26], uczestniczą w kaskadzie fosforylacji białka STAT3, za pośrednictwem kinazy Jak1. Kinaza Jak1 wiąże się do podjednostki receptora gp130 i aktywuje wiązanie liganda (cytokiny), dimeryzację receptora i fosforylację miejsca tyrozynowego. Fosfotyrozyna jest rozpoznawana przez domenę SH2 białka STAT. Po związaniu białka STAT dochodzi do jego fosforylacji, dimeryzacji, a następnie transportu do jądra i wiązania z sekwencją GAS. Gdy w miejscu regulatorowym GRE promotora pojawi się aktywowany receptor glikokortykoidowy i czynnik transkrypcyjny SP1, uruchamiana jest transkrypcja z promotora I. 4.

W zdrowym sutku w obecności deksametazonu TNF- α i estry forbolu również stymulują ekspresję aromatazy. Odbywa się to przez wiązanie w miejscu regulatorowym AP-1 (sekwencja TRE) heterodimeru c-jun/fos zaktywowanego przez TNF- α [27].

W fazie początkowej rozwoju nowotworu fibroblasty i adipocyty otaczające guz produkują estrogeny, które następnie pobudzają komórki nowotworowe do syntezy cytokin (IL-6, IL-11) i czynników wzrostu: TNF, LIF, OSM. Czynniki te stymulują dalszy rozwój i wzrost guza na drodze autokrynej i parakrynej, ponadto niektóre z tych czynników stymulują proliferację fibroblastów otaczających guz i ekspresję aromatazy w tych komórkach. Wydaje się, że w początkowym etapie kancerogenezy w sutku ekspresja aromatazy jest regulowana, tak jak w tkance prawidłowej, głównie poprzez promotor I.4 na drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego. Wraz z postępem choroby dochodzi do przełączenia ekspresji genu *CYP19* z promotora I.4 na promotory I.3 i II. Decydującą rolę w regulacji ekspre-



sji aromatazy z tych promotorów i syntezy estrogenów w sutku odgrywa cAMP lub czynniki wykorzystujące cAMP jako wtórny przekaźnik. Zidentyfikowano kilka czynników indukujących cAMP w raku sutka. Jednym z ważniejszych czynników syntetyzowanych w fibroblastach, adipocytach i komórkach nowotworowych jest prostaglandyna E₂ (PGE₂), stymulująca ekspresję aromatazy. PGE₂ indukuje ekspresję na drodze stymulacji cAMP, aktywując kinazy PKA i PKC. Ponadto same estrogeny produkowane w sutku zwiększają zawartość cAMP w komórkach nowotworowych na drodze parakrynej stymulując cyklazę adenylową [23]. Mechanizm przełączania ekspresji z promotora I.4 na I.3 i II oraz czynniki regulujące ekspresję genu *CYP19* z tych promotorów nie są jeszcze dokładnie poznane. Między promotorem I.3 i II znajduje się sekwencja S1 – tzw. *element milczący*, który negatywnie reguluje aktywność tych promotorów [28, 29]. W zdrowym sutku, gdy ekspresja aromatazy uruchomiana jest z promotora I.4, promotory I.3 i II są hamowane przez S1. Z miejscem S1 wiążą się receptory sieroce, głównie ERR-1 (*estrogen-related receptor 1*) [30]. Negatywna regulacja miejsca S1 odbywa się poprzez oddziaływanie ERR-1 z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, hamującymi ekspresję aromatazy jak białko EAR-3 (COUP-TF1) [31] lub ko-represorami transkrypcji: N-CoR i SMRT [32]. W guzie, w komórkach nowotworowych i otaczających adipocytach dochodzi do przełączenia ekspresji na promo-

tory cAMP-zależne I.3 i II, które zawierają element regulatorowy CRE (*cAMP-response element*). Gdy w komórce wzrasta zawartość cAMP, zostaje zniesiona transkrypcja z promotora I.4 i dokonuje się przełączenie na promotory I.3 i II. Sekwencja CRE znosi negatywną regulację ekspresji aromatazy elementu S1.

W zaawansowanych stadiach nowotworu aktywowany jest również niedawno zidentyfikowany nowy śródbłonkowy promotor I.7, który również nie jest aktywny transkrypcyjnie w zdrowym gruczole piersiowym [33]. Obok potencjału mitogennego w komórkach nowotworowych pochodzenia nabłonkowego estradiol stymuluje proces angiogenezy, po części przez stymulację syntezy VEGF prowadząc do neowaskularyzacji [34, 35]. Prawdopodobnie wysoki poziom transkryptów mRNA aromatazy pochodzących z promotora I.7 w raku sutka jest również związany z aktywnością i nadprodukcją aromatazy *in situ* oraz lokalną biosyntezą estrogenów, promującą wzrost i rozwój guza.

W sekwencji molekularnych zjawisk prowadzących do rozwoju procesu nowotworowego w sutku spaczona ekspresja aromatazy wydaje się być bardzo ważnym elementem. Poznawane złożone mechanizmy regulujące ekspresję aromatazy i jej aktywność pozwalają lepiej zrozumieć biologię procesu nowotworowego w sutku i stwarzają nadzieję na celowane zastosowanie selektywnych modulatorów aromatazy, zarówno w chemoprewencji raka sutka, jak i jego leczeniu.

Summary

The most of breast cancer in postmenopausal women is estrogen-dependent. The main question is which source of estrogen: estradiol circulating in the plasma or estradiol locally produced in extragonadal sites is a major factor stimulating the growth of the tumour. It seems that the local biosynthesis of estrogens in different tissues plays a crucial role in the development and growth of breast tumours and aromatase is a key enzyme regulating the local synthesis of estrogens. In our study we present recent concepts of the mechanisms activating aromatase and the role of aromatase in breast tissue and breast cancer.

Key words: breast cancer; aromatase

Piśmiennictwo

1. Grodin JM, Siiteri PK, McDonald PC. *Source of estrogen production in postmenopausal women.* J Clin Endocrinol Metab 1973; 36: 207-14.
2. Simpson ER. *Role of aromatase in sex steroid action.* J Mol Endocrinol 2000; 25: 149-56.
3. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, et al. *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession number and nomenclature.* Pharmacogenetics 1996; 6: 1-42.
4. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, et al. *Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis.* Endocr Rev 1994; 15: 342-55.
5. Simmons DL, Lalley PA, Kasper CB. *Chromosomal assignments of genes coding for components of the mixed function oxidase system in mice. Genetic localization of the cytochrome P-450 CN and P-450 PB gene families and the nadph-cytochrome P-450 oxireductase and epoxide hydrolase genes.* J Biol Chem 1985; 260: 515-21.
6. Means G D, Mahendroo M S, Corbin C J, et al. *Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis.* J Biol Chem 1989; 267: 19385-91.



7. Harada N, Yamada K, Saito K, et al. *Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene*. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 166: 365-372.
8. Sebastian S, Bulun S E. *A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project*. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4600-2.
9. Means GD, Kilgore MW, Mahendroo MS, et al. *Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissue*. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 2005-13.
10. Mahendroo MS, Means GD Mendelson CR, et al. *Tissue-specific expression of human P450 arom: the promoter responsible for expression in adipose is different from that utilized in placenta*. *J Biol Chem* 1991; 266: 11276-81.
11. Agarwal VR, Bulun SE, Leitch M, et al. *Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients*. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3843-9.
12. Simpson ER, Michael MD, Agarwal VR et al. *Cytochromes P450 expression of the CYP19 (aromatase) gene: unusual case of alternative promoter usage*. *FASEB J* 1997; 11: 29-36.
13. Harada N, Utsumi T, Takagi Y. *Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11312-6.
14. Miller WR. *Aromatase activity in breast tissue*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 39: 783-90.
15. Miller WR, Anderson TJ, Jack WJ. *Relationship between tumour aromatase activity, tumor characteristics and response to therapy*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990; 37: 1055-9.
16. Silva MC, Rowlands MG, Dowsett M, et al. *Intratamoral aromatase as a prognostic factor in human breast carcinoma*. *Cancer Res* 1989; 49: 2588-91.
17. O'Neill JS, Elton RA, Miller WR. *Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumor site*. *Br Med J* 1988; 296: 741-3.
18. Harada N. *Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 61: 175-84.
19. Pasqualini JR, Chetrite G, Blacker C, et al. *Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients*. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1460-4.
20. Chetrite GS, Cortes-Prieto J, Philippe JC, et al. *Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 72: 23-7.
21. Zhao Y, Mendelson CR, Simpson ER. *Characterization of the sequences of the human CYP19 (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes*. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 340-9.
22. Zhao Y, Nichols JE, Bulun SE, et al. *Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue. Role of a Jak/STAT pathway in regulation of adipose-specific promoter*. *J Biol Chem* 1995; 270: 16449-157.
23. Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, et al. *Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase gene)*. *Endocrinology* 1996; 137: 5739-42.
24. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. *Members of the family of signal transducers and activators of transcription*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4806-10.
25. Darnell JE Jr, Kerr I M, Stark GR. *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. *Science* 1994; 264: 1415-21.
26. Zhao Y, Nichols JE, Valdez R, et al. *Tumor necrosis factor- α stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activating protein-1 binding site upstream of promoter I. 4*. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1350-7.
27. Wang J, Chen S. *Identification of a promoter and a silencer at the 3' end of the first intron of the human aromatase gene*. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1479-88.
28. Zhou D, Chen S. *Characterization of a silencer element in the human aromatase gene*. *Arch Biochem Biophys* 1998; 353: 213-20.
29. Yang Ch, Zhou D, Chen S. *Modulation of aromatase expression in the breast tissue by ERR α -1 orphan receptor*. *Cancer Research* 1998; 58: 5695-700.
30. Klinge CM, Silver BF, Driscoll MD, et al. *Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor interacts with estrogen receptor, binds to estrogen response elements and half-sites, and inhibits estrogen-induced gene expression*. *J Biol Chem* 1997; 272: 31465-74.
31. Shibata H, Nawaz Z, Tsai SY, et al. *Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor 1 (COUP-TF1) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT)*. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 714-24.
32. Sebastian S, Takayama K, Shozu M et al. *Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of human CYP19 (aromatase P450) gene that is up-regulated in breast cancer tissue*. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 2243-54.
33. Losordo DW, Isner JM. *Estrogen and angiogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 6-12.
34. Mueller M D, Vigne J L, Minchenko A, et al. *Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β* . *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10972-7.

Adres do korespondencji

Zakład Endokrynologii Ginekologicznej
Akademii Medycznej w Białymstoku
ul. Skłodowskiej 24A
15-276 Białystok

