

Stanisław Chrapusta

HORMONY STEROIDOWE JAKO SWOISTE REGULATORY EKSPRESJI GENÓW*

Z Samodzielnej Pracowni Endokrynologii Onkologicznej
Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. Z. Paszko
Dyrektor: prof. dr hab. J. Steffen

Komórki organizmu wielokomórkowego w toku jego rozwoju z zapłodnionej komórki jajowej, zawierającej komplet informacji genetycznej (genotyp) ulegają różnicowaniu, które przejawia się specjalizacją ich struktury i funkcji. Specjalizacja ta jest wynikiem wykorzystania przez różne typy komórek odmiennych części informacji genetycznej. Prowadzi to do zróżnicowania ich reaktywności na wewnątrzustrojowe czynniki koordynujące działanie komórek, tkanek i narządów. Do tych czynników należą również hormony steroidowe (HS), do których — ze względu na podobieństwo budowy i mechanizmu działania — zalicza się także witaminę D₃.

MECHANIZM DZIAŁANIA HORMONÓW STEROIDOWYCH

Hormony steroidowe mogą docierać do wszystkich komórek, ale tylko w niektórych, tzw. komórkach docelowych, mogą wywołać swoisty efekt. Działanie HS na komórkę docelową powoduje zwykle wzrost aktywności polimeraz RNA i wzrost transkrypcji jednych, a spadek — innych genów. Następstwem tego są zmiany ilości odpowiednich mRNA i produktów ich translacji (białek) (17, 20). Wzrost ilości mRNA nie zawsze idzie w parze ze wzrostem ilości kodowanego przezeń białka, co świadczy o istnieniu dodatkowych szczebli regulacji na etapach potranslacyjnych (33).

Jak wynika z badań radioizotopowych, HS mogą wnikać do wszystkich komórek przez bierną dyfuzję (21, 27). Warunkiem koniecznym dla wywołania przez nie efektu genomowego jest obecność w komórce swoistych białek receptorowych (Rs) (12, 13, 15). Receptory wiążące HS należące do różnych klas, np. receptory androgenowe (AR), progestagenowe (PR), estrogenowe (ER) i glikokortykosteroidowe (GR) mogą współistnieć w tych samych komórkach. Ich obecność może być wynikiem konstytutywnej ekspresji genów kodujących te białka (8). Istnieje jednak wiele czynników, które mogą regulować ilość lub aktywność Rs w komórce (9). Regulacja ta może odbywać się na różnych poziomach procesu ekspresji genu (31) lub przez degradację Rs przez swoiste enzymy proteolityczne (22) i fosfatazy (1).

Po utworzeniu się kompleksu HS-Rs możliwe jest jego związanie się ze swoistym miejscem akceptorowym (MA) w chromatynie jądrowej

* Artykuł przedstawiono na konferencji pt. „Kliniczne zastosowanie badań nad receptorami hormonów steroidowych”, Warszawa, 1—2 czerwca 1987 r.

(ang. *processing*) (1, 4, 6). W toku obróbki usuwane są introny. Ponadto specjalne enzymy modyfikują końce 5' i 3' dojrzewającego mRNA. Na końcu 5' dołączany jest charakterystyczny zmetylowany nukleotyd guanylowy zwany kapturkiem (ang. *cap*). Jego obecność wpływa zapewne na stabilność mRNA w cytoplazmie oraz ułatwia przyłączenie mRNA do rybosomu. Z kolei na końcu 3' dojrzewającego mRNA dołączany jest zestaw (kilkudziesięciu do kilkuset) reszt adenylowych, tzw. łańcuch poli (A). Jego rola prawdopodobnie sprowadza się do przedłużenia żywotności mRNA w cytoplazmie. Może on również ułatwiać transport mRNA z jądra do cytoplazmy (1, 4).

Proces dojrzewania mRNA stanowi kolejny etap regulacji ekspresji genu. Decydując w tym czasie może, oprócz wspomnianych powyżej procesów, do różnego w różnych tkankach składania eksonów, tak że na bazie tego samego genu powstają cząsteczki mRNA o różnej sekwencji, dające początek różnym białkom.

Dojrzewające mRNA jest stopniowo opłaszczane swoistymi białkami, a następnie wędruje z jądra do cytoplazmy, by po połączeniu się z rybosomami stanowić matrycę, na której zsyntetyzowane zostanie białko. W cytoplazmie mRNA styka się jednak z enzymami nukleolitycznymi, które go degradują. Na czas życia mRNA w cytoplazmie ma wpływ zarówno jego ilość, jak i jego struktura, a w tym sekwencje kodowane przez gen, jak i sekwencje dodawane w trakcie dojrzewania mRNA (obróbka potranslacyjna). Zarówno etap transportu mRNA, jak i jego czas życia stanowią podstawę kolejnych etapów regulacji ekspresji genu (4).

HORMONALNA REGULACJA EKSPRESJI GENÓW

Prawidłowe funkcjonowanie złożonego organizmu wielotkankowego wymaga współdziałania wszystkich składników. U zwierząt regulacja tego współdziałania osiągana jest między innymi dzięki istnieniu hormonów. Pod względem budowy chemicznej i mechanizmu działania można wyróżnić dwa główne rodzaje tych związków. Hormony peptydowe, silnie hydrofilowe, działają za pośrednictwem błonowych receptorów (1). Receptory w wyniku kontaktu ze swoistym hormonem ulegają pobudzeniu stając się przez to zdolne do aktywacji licznych procesów biochemicznych przebiegających we wnętrzu komórki. Jak wynika z powyższego, hormony peptydowe wydają się oddziaływać na geny pośrednio. Hormony steroidowe łączą się ze swoistym receptorem w jądrze komórkowym tworząc kompleks hormon—receptor. Kompleks ten zdolny jest do bezpośredniego wiązania się z chromatyną i uaktywniania określonych genów (patrz następny artykuł). W obu wypadkach ostatecznym efektem działania hormonu może być regulacja ekspresji genu zachodząca na każdym z opisanych powyżej etapów.

Piśmiennictwo u autora

Adres autora: Zakład Biologii Komórki i Terapii Doświadczalnej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, 00-973, ul. Wawelska 15

i wywołanie efektu w postaci zmiany ekspresji określonych genów hormonozależnych (39). Struktura miejsc akceptorowych uwarunkowana jest zarówno przez sekwencję zasad azotowych w DNA (30, 36), jak i białka chromatyny, a w szczególności przez tzw. kwaśne białka niehistonowe (28, 36). Komórki docelowe dla HS zawierają także białka mogące maskować MA (11). Wyniki badań wskazują, że MA znajdują się w obrębie dyskretnej substruktury jądra komórkowego, tzw. matriks jądrowej (3), z którą zasocjowane są geny ulegające aktywnej transkrypcji (3, 7). Ilość MA dla danego Rs może zwiększać się w wyniku stymulacji komórek docelowych *in vivo* hormonem swoiście wiążącym się z tym białkiem receptorowym (3).

STRUKTURA I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA HORMONÓW STEROIDOWYCH

Receptory dla hormonów steroidowych „rozpoznają”, tj. wiążą swoiście i z silnym powinowactwem (stałe asocjacji kompleksów HS-Rs wynoszą pow. 10^6 l/mol) cząsteczki o określonej strukturze stereochemicznej, której odpowiada zwykle określona aktywność biologiczna. Istnieje również wiele związków niesteroidowych, których cząsteczki zawierają pewne elementy tej struktury i dzięki temu mogą działać agonistycznie lub antagonistycznie w stosunku do naturalnych HS, konkurując o te same miejsca receptorowe (34). Cząsteczki wszystkich naturalnych HS zawierają co najmniej 2 silnie polarne podstawniki związane z węglowodorowym rdzeniem steroidu. W przypadku steroidowych estrogenów najważniejszymi elementami struktury wydają się: aromatyczny pierścień A oraz 2 grupy polarne: 3-OH i 17 β -OH (estradiol, estriol) lub 17 = [(estron). Niektóre inne naturalne steroidy, np. testosteron, mogą również wywierać pewne efekty estrogenne za pośrednictwem ER (40). Efekty te obserwuje się jednak tylko przy ponadfizjologicznych stężeniach tych hormonów, czego przyczyną jest prawdopodobnie ich słabe powinowactwo do tego receptora. Słabe powinowactwo do ER i słabe działanie biologiczne wykazuje również 17 α -estradiol (6). Silnym estrogenem jest natomiast dietylostilbestrol (DES), który nie jest steroidem. Jak się wydaje, decydujące znaczenie odgrywa w tym przypadku istnienie w cząsteczce DES dwóch grup hydroksylowych położonych w niemal takiej samej odległości, jak w cząsteczce 17 β -estradiolu oraz wynikająca z jego struktury (brak skondensowanych pierścieni) znaczna giętkość cząsteczki, pozwalająca jej na dopasowanie się do konfiguracji miejsca wiążącego hormon w cząsteczce ER (5). Dość znaczne podobieństwo stereochemiczne wykazują natomiast cząsteczki naturalnych androgenów, mineralo- i glukokortykosteroidów oraz progesteronu i hormony te wykazują również dość znaczne krzyżowe powinowactwo do swych receptorów (23, 26). Te fakty mogą być przyczyną niektórych antagonistycznych i agonistycznych efektów ich działania. Modyfikacja struktury steroidu może w sposób drastyczny wpływać na swoistość jego oddziaływania z Rs, szczególnie w tych przypadkach, w których możliwe jest istnienie różnych konformacji przestrzennych zmodyfikowanej cząsteczki (26).

LOKALIZACJA BIAŁEK RECEPTOROWYCH

Nie ulega obecnie wątpliwości, że regulacja ekspresji genów hormonozależnych odbywa się w wyniku interakcji kompleksu hormon—receptor z chromatyną. Natomiast próby ustalenia lokalizacji Rs w nie-

obecności swoistego hormonu nie przyniosły dotąd ostatecznego rozstrzygnięcia tego problemu. Pierwotny model molekularnego mechanizmu działania SH zakładał, że Rs nie skompleksowany z hormonem znajduje się w cytoplazmie i ulega przemieszczeniu do jądra dopiero po związaniu się z hormonem (Gorski 1968, Jensen 1968) (8). Przesłanki dla tego modelu pochodziły z badań nad wiązaniem hormonów steroidowych przez izolowane frakcje subkomórkowe otrzymane przez mechaniczne rozbicie komórek. Wyniki badań immunocytochemicznych z zastosowaniem swoistych przeciwciał monoklonalnych przeciwko Rs wskazują jednak, że białka te są zlokalizowane w jądrze komórkowym także w nieobecności odpowiednich hormonów (18). Wniosek ten znalazł niezależne potwierdzenie także w badaniach nad wiązaniem SH przez frakcje subkomórkowe otrzymane przez enukleację komórek przy użyciu cytochalazyny B lub wirowanie całych komórek w skokowym gradencie gęstości (37). Według nowego modelu, następstwem powstania kompleksu SH-Rs nie jest translokacja Rs z cytoplazmy do jądra, lecz zmiana rozmieszczenia receptorów w obrębie jądra komórkowego, wywołana wzrostem powinowactwa białka receptorowego do chromatyny. Istnieją jednak doniesienia, które nie pozwalają ostatecznie wykluczyć istnienia cytoplazmatycznych Rs (38). Nie wiadomo, czy są to jedynie cząsteczki nowo syntetyzowane, czy też funkcjonalne cząsteczki receptora, „oczekujące” na sygnał hormonalny.

AKTYWACJA BIAŁKA RECEPTOROWEGO PRZEZ HORMON

Powstanie kompleksu HS-Rs zapoczątkowuje proces prowadzący do zmiany ekspresji genów hormonozależnych. Jak wynika z licznych badań, efekt działania hormonu zależy od rodzaju białka receptorowego, które pośredniczy w jego wywołaniu (2, 40). Rola hormonu polega na ułatwieniu przemiany Rs w formę zdolną do związania się z miejscem akceptorowym w chromatynie. Proces ten jest przypuszczalnie wieloetapowy. Białka receptorowe, izolowane z prawidłowych komórek w nieobecności swoistego hormonu, wykazują bardzo słabe powinowactwo do DNA, który jest silnie hydrofilowym polianionem. Związanie hormonu wywołuje wzrost hydrofilowości Rs (32). Efekt ten wynika przypuszczalnie ze zmiany konformacji białka, prowadzącej do zagłębienia się hydrofobowej domeny wiążącej steroid w głąb cząsteczki receptora. Przez łagodne ogrzewanie takiego kompleksu można wywołać dalszy wzrost jego hydrofilowości, czemu towarzyszy dalszy wzrost jego powinowactwa do DNA. Cząsteczka Rs może tworzyć z DNA kilkanaście wiązań typu jonowego (32). Wiązanie Rs z DNA nie ma jednak charakteru wyłącznie jonowego, gdyż jest hamowane przez związki interkalujące z DNA, które nie mają wpływu na wiązanie receptora z innymi polianionami (4). Niektóre substancje działające antagonistycznie w stosunku do naturalnych HS również ułatwiają aktywację Rs *in vitro* i pozwalają na jego związanie się z chromatyną, ale kompleksy takie mają inną strukturę, niż kompleksy aktywowane przy udziale hormonu (34) i ich oddziaływanie z miejscami akceptorowymi może być odmienne.

W cytozolach otrzymanych przez homogenizację tkanek docelowych dla HS w środowisku o małej mocy jonowej białka receptorowe występują na ogół w formie kompleksów z substancjami niereceptorowymi (16, 35). Rola tych czynników w mechanizmie receptorowym nie jest

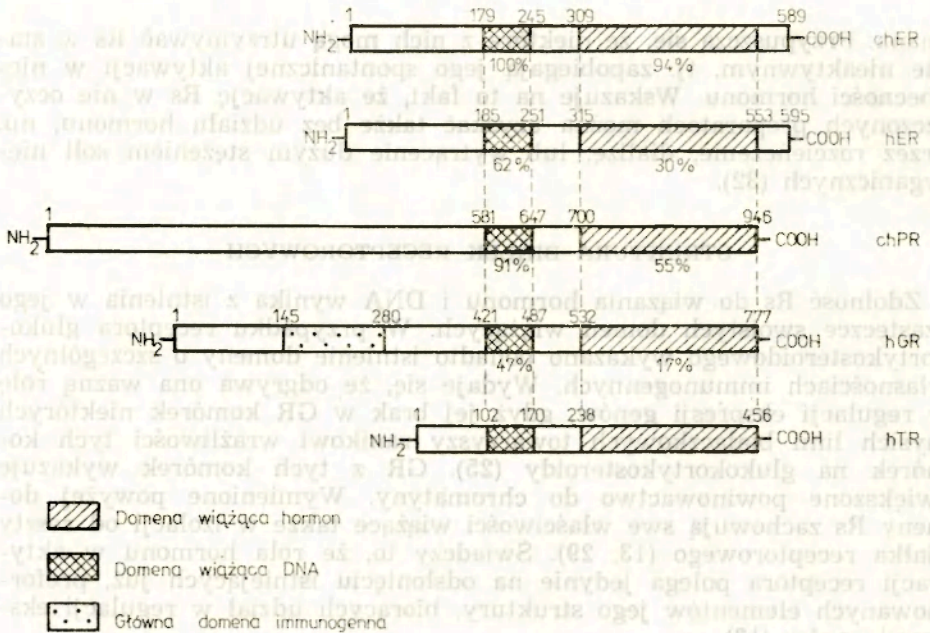
znana. Przypuszcza się, że niektóre z nich mogą utrzymywać Rs w stanie nieaktywnym, tj. zapobiegają jego spontanicznej aktywacji w nieobecności hormonu. Wskazuje na to fakt, że aktywację Rs w nieoczyszczonych preparatach można uzyskać także bez udziału hormonu, np. przez rozcieńczenie, dializę, lub wytrącenie dużym stężeniem soli nieorganicznych (32).

STRUKTURA BIAŁEK RECEPTOROWYCH

Zdolność Rs do wiązania hormonu i DNA wynika z istnienia w jego cząsteczce swoistych domen wiążących. W przypadku receptora glukokortykosteroidowego wykazano ponadto istnienie domeny o szczególnych właściwościach immunogennych. Wydaje się, że odgrywa ona ważną rolę w regulacji ekspresji genów, gdyż jej brak w GR komórek niektórych mysich linii białaczkowych towarzyszy zanikowi wrażliwości tych komórek na glukokortykosteroidy (25). GR z tych komórek wykazuje zwiększone powinowactwo do chromatyny. Wymienione powyżej domeny Rs zachowują swe właściwości wiążące także w izolacji od reszty białka receptorowego (13, 29). Świadczy to, że rola hormonu w aktywacji receptora polega jedynie na odsłonięciu istniejących już, preformowanych elementów jego struktury, biorących udział w regulacji ekspresji genów (13).

W ostatnich latach udało się sklonować geny kodujące szereg Rs i ustalić ich sekwencje nukleotydowe. Dzięki temu określono również I-rzędową strukturę (sekwencję aminokwasową) tych białek (14) i ustalono położenie poszczególnych domen. Domeny wiążące hormon znajdują się we wszystkich zbadanych Rs w pobliżu karboksylowego ($-\text{COOH}$) końca łańcucha polipeptydowego i zawierają znaczną liczbę aminokwasów hydrofobowych, co decyduje o ich hydrofobowych właściwościach (steroidy są również hydrofobowe) (19). Homologia (podobieństwo) I-rzędowej struktury tych domen Rs dla różnych klas hormonów steroidowych jest niewielka, natomiast bardzo znaczną homologię wykazują domeny wiążące te same hormony w Rs pochodzących od różnych gatunków kręgowców.

Charakterystyczne dla wszystkich zbadanych Rs jest istnienie silnie hydrofilowego fragmentu, zawierającego ogromną większość reszt cysteinowych ($-\text{Cys}$) wchodzących w skład białka receptorowego. Fragment ten tworzy domenę wiążącą DNA. Między tymi domenami różnych Rs również istnieje silna homologia (ryc. 1). W szczególności dotyczy ona wzajemnego położenia $-\text{Cys}$, które jest identyczne we wszystkich zbadanych pod tym względem Rs (19). Podobny fragment istnieje także w strukturze receptora dla hormonów tarczycy, który również jest białkiem jądrowym (19). O zdolności wiązania się Rs z DNA decyduje prawdopodobnie struktura przestrzenna, jaka tworzy się w wyniku powstania mostków dwusiarczkowych między resztami cysteinowymi; ważną rolę odgrywają tu przypuszczalnie również jony Zn^{2+} (15). Swoistość oddziaływania między danym Rs a odpowiednim miejscem akceptorowym zależna jest prawdopodobnie od „zmiennych” reszt aminokwasowych w domenie wiążącej DNA. Hipoteza ta znalazła już częściowe potwierdzenie. Zastąpienie domeny wiążącej DNA w ER przez analogiczny fragment GR powoduje, że tak otrzymany „hybrydowy” ER jest zdolny wywołać — przy udziale estrogenu — ekspresję genu zależnego od glukokortykosteroidów (15). Domena wiążąca hormon nie



Ryc. 1. Schematyczne porównanie 1-rzędowej struktury receptorów dla hormonów steroidowych i receptora dla hormonów tarczycy (TR). Struktura białek receptorowych została wydedukowana z sekwencji komplementarnych DNA (cDNA). Liczbami oznaczono kolejność reszt aminokwasowych znajdujących się na granicy wyróżnionych fragmentów struktury. Podobieństwo wybranych fragmentów sekwencji aminokwasowych wyrażono w % homologii. chPR — kurzy receptor progestagenowy, chER — kurzy receptor estrogenowy, hER — ludzki receptor estrogenowy, hGR — ludzki receptor glukokortykosteroidowy.

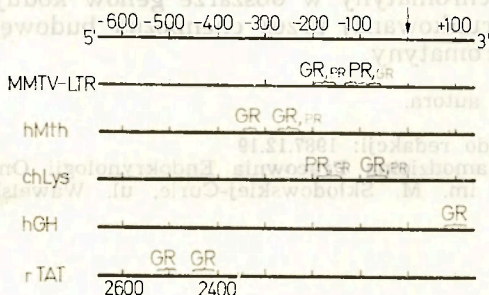
Fig. 1. Schematic comparison of primary structure of steroid hormones receptors and for thyroid hormones receptor (TR). Structure of receptor proteins has been deduced from complementary DNA sequences (cDNA). Numbers denote successions of amino acid rests present at the ends of selected fragments of structure. The similarity of selected fragments of amino-acid sequences is expressed in percents of homology. chPR — chicken progestagen receptor, chER — chicken estrogen receptor, hER — human estrogen receptor, hGR — human glucocorticosteroid receptor.

jest niezbędna dla aktywacji transkrypcji genów hormonozależnych. Delecyjne formy Rs pozbawione tej domeny wywołują konstytutywną ekspresję swoistych genów (13).

Białka receptorowe izolowane z tkanek zwierzęcych lub otrzymane przez ekspresję odpowiednich genów *in vitro* wykazują często heterogenność pod względem masy cząsteczkowej, powinowactwo do DNA, chromatyny i hormonów. Receptory dla hormonów steroidowych są kodowane przez geny unikalne. Heterogenność białka receptorowego może wynikać z istnienia różnych transkryptów odpowiedniego genu lub różnic w potranslacyjnej obróbce, np. w glikozylacji lub ufosforylowaniu. Ten ostatni proces może mieć istotne znaczenie w regulacji powinowactwa Rs do hormonu i składników chromatyny (1, 24). Różne formy tego samego Rs mogą pełnić odmienne role w regulacji ekspresji genów. Dane doświadczalne wskazują, że jedne z nich mogą bezpośrednio zwiększać aktywność RNA polimerazy II, inne — wywoływać wzrost ekspresji genów hormonozależnych przez oddziaływanie na sekwencje regulatorowe tych genów lub inne białka chromatyny (24).

ROLA BIAŁEK RECEPTOROWYCH W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

Receptory dla hormonów steroidowych wykazują *in vitro* zwiększone powinowactwo do fragmentów DNA lub syntetycznych polinukleotydów bogatych w pary A—T. Poszukiwania swoistych sekwencji DNA wiążących Rs doprowadziły do ustalenia tzw. sekwencji zgodności: 5' TGTTCT 3', obecnej w obrębie sekwencji wzmacniających wielu genów hormonozależnych kręgowców (4) oraz w tzw. sekwencjach powtarzających się (LTR) prowiralnego DNA w komórkach zakażonych mysim wirusem raka gruczołu mlekowego (MMTV) (4). Transkrypcja genów tego wirusa jest indukowana przez glukokortykosteroidy (30). Dla wybiórczego wiązania się Rs z DNA miejsc akceptorowych przypuszczalnie istotne są również fragmenty DNA bezpośrednio sąsiadujące z wymienioną powyżej sekwencją zgodności. Wyniki prac doświadczalnych wskazują, że sekwencja DNA wiążąca Rs składa się co najmniej z kilkunastu nukleotydów (10). Miejsca wiążące białka receptorowe dla hormonów steroidowych mogą znajdować się w sąsiedztwie promotora danego genu, w znacznej odległości od promotora lub w obrębie transkrybowanej części genu (ryc. 2) (30). Dostępność tych miejsc wiążących



Ryc. 2. Położenie miejsc wiążących (klamry) receptory dla hormonów steroidowych względem genów, których transkrypcja regulowana jest przez te hormony; miejsca, w których rozpoczyna się transkrypcja zaznaczono strzałką. LTR-MMTV — fragment prowiralnego DNA mysiego wirusa raka gruczołu mlekowego, hMth — ludzki gen metalotioneiny, chLys — kurzy gen lizozymu, hGH — ludzki gen hormonu wzrostowego, rTAT — szczurzy gen transaminazy tyrozynowej, GR — receptor glukokortykosteroidowy, PR — receptor progestagenowy.

Fig. 2. Localisation of receptor binding sites (braces) for steroid hormones in relation to genes, the transcription of which is regulated by hormones; sites at which the transcription begins are marked with arrow. LTR-MMTV — fragment of a proviral DNA of the mouse mammary tumor virus, hMth — human metalothioneine gene, chLys — chicken lysozyme gene, hGH — human gene of the growth hormone rTAT — rat tyrosine transaminase gene, GR — glucocorticosteroid receptor, PR — progesteragen receptor.

jest przypuszczalnie zależna od struktury chromatyny, która jest uzależniona od obecności innych białek wiążących się z DNA oraz chemicznych modyfikacji zasad azotowych w DNA (11, 28, 31).

Sekwencje DNA regulujące aktywność genów hormonozależnych mogą zawierać kilka miejsc wiążących jeden i ten sam lub kilka różnych Rs (ryc. 2) (30), z czym wiąże się możliwość aktywacji danego genu przez różne hormony steroidowe. Miejsca wiążące GR wykazują na ogół znaczne powinowactwo do PR lub AR i *vice versa* (30). Fakt ten może być przyczyną agonistycznego lub antagonistycznego działania odpowiednich hormonów.

Rola białek receptorowych w regulacji ekspresji genów polega prawdopodobnie na aktywacji sekwencji wzmacniających (15, 30, 31). W nieobecności tych białek ekspresja genów hormonozależnych jest hamowana przez inne swoiste sekwencje regulacyjne (15).

Istnieje także przypuszczenie, że Rs powodują wzrost ekspresji genów hormonozależnych przez wpływ na poliadenylację dojrzewającego mRNA oraz ułatwiają działanie innych czynników hormonalnych, np. hormonów tarczycy (21).

PODSUMOWANIE

Przytoczone w powyższym przeglądzie fakty i hipotezy wskazują, że ekspresja genów hormonozależnych uzależniona jest od następujących czynników i procesów:

1. Oddziaływania hormonów steroidowych ze swoistymi receptorami.
2. Wzajemnego oddziaływania różnych domen cząsteczki receptora.
3. Oddziaływania białek receptorowych z sekwencjami DNA regulującymi transkrypcję genów i białkami biorącymi bezpośredni udział w transkrypcji.
4. Organizacji chromatyny w obszarze genów kodujących białka hormonozależne, warunkowanej przez chemiczną budowę DNA i niereceptorowe białka chromatyny.

Piśmiennictwo u autora.

Praca wpłynęła do redakcji: 1987.12.19

Adres autora: Samodzielna Pracownia Endokrynologii Onkologicznej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie, ul. Wawelska 15, 00-973 Warszawa