

Received: 2013.05.06  
Accepted: 2014.02.20  
Published: 2014.06.09

## Molekularne aspekty działania 17 $\beta$ -estradiolu i progesteronu w komórkowych szlakach sygnałowych

### Molecular actions of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone and their relationship with cellular signaling pathways

Katarzyna Zielniok, Małgorzata Gajewska, Tomasz Motyl

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Streszczenie

17 $\beta$ -estradiol i progesteron, steroidy płciowe omawiane zazwyczaj w związku z modulacją funkcji reprodukcyjnych, regulują wiele wewnątrzkomórkowych procesów w komórkach docelowych, wyposażonych w odpowiednie receptory. Ostatnie lata przyniosły znaczny postęp w zrozumieniu mechanizmów działania steroidów płciowych na poziomie molekularnym. Oprócz tradycyjnej drogi przekazywania sygnału hormonalnego, związanej z regulacją transkrypcji genów, opisano mechanizmy szybkiego działania steroidów zwane niegenomowymi, w których regulacja aktywności komórki odbywa się przez interakcje z białkami regulatorowymi w błonie komórkowej i cytoplazmie. 17 $\beta$ -estradiol i progesteron modulują aktywność ważnych szlaków sygnałowych w komórce, działając przez powszechnie występujące kaskady regulatorowe kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK), kinazy 3-fosfatydyloinozytolu oraz kinaz tyrozynowych. Wynik ich działania w komórce jest wypadkową aktywności mechanizmów genomowego i niegenomowego oraz zależy od jej fizjologicznego i genetycznego kontekstu. Opisanie mechanizmów działania steroidów płciowych na poziomie molekularnym pozwala nie tylko zrozumieć złożoność ich oddziaływania w warunkach fizjologicznych, ale także występujących patologii. W pracy podsumowano wiadomości na temat działania 17 $\beta$ -estradiolu i progesteronu na poziomie molekularnym z wyjaśnieniem ich powiązania z komórkowymi szlakami sygnałowymi.

#### Słowa kluczowe:

17 $\beta$ -estradiol • progesteron • działanie genomowe • działanie niegenomowe • receptory dla steroidów • szlaki sygnałowe

#### Summary

Sex steroids: 17 $\beta$ -estradiol and progesterone play a major role in modulation of reproductive functions of the organism and participate in regulation of a broad spectrum of cellular processes in target cells via their specific receptors. Our understanding of molecular mechanisms of sex steroid action has significantly developed over the last years. Apart from the well-established effect of sex steroids on regulation of gene expression, some rapid nongenomic mechanisms have been identified, which are involved in modulation of the activity of several cellular, membrane-bound and cytoplasmic regulatory proteins. 17 $\beta$ -estradiol and progesterone regulate several signal transduction pathways, which involve activation of enzymes such as mitogen-activated protein kinases (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase and tyrosine kinases. Biological effects of sex steroids action constitute a complex interplay of genomic and nongenomic mechanisms, and depend on the physiological and genetic context of the target cell. Understanding the molecular mechanisms of sex steroids action is therefore

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Key words:</b>     | important and may broaden our knowledge about their role in both physiological and pathological processes. This review provides a comprehensive insight into the molecular actions of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone, aiming to present the role of these sex steroids in regulation of cellular signaling pathways. |
| <b>Full-text PDF:</b> | <a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1108390">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1108390</a>                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Word count:</b>    | 4623                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Tables:</b>        | –                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Figures:</b>       | 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>References:</b>    | 120                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

**Adres autorki:** mgr Katarzyna Zielniok, Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: kasia.zielniok@gmail.com

**Wykaz skrótów:** **Akt (PKB)** – kinaza białkowa B (protein kinase B), **DAG** – diacyloglicerol (diacylglycerol), **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor), **ER $\alpha$ /ER $\beta$**  – receptor estrogenowy alfa/beta (estrogen receptor alpha/beta), **ERKs** – kinazy regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe (extracellular-signal-regulated kinases), **GPCRs** – receptory sprzężone z białkami G (G protein coupled receptors), **HRE** – krótka sekwencja DNA wiążąca kompleksy receptorów hormonów (hormone response element), **IGF** – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor), **IP3** – trifosforan inozytolu (inositol triphosphate), **JNKs** – kinazy fosforylujące N-końcową domenę białka c-Jun (c-Jun N-terminal kinases), **MAPKs** – kinazy białkowe aktywowane mitogenami (mitogen-activated protein kinases), **mER** – błonowy receptor estrogenowy (membrane estrogen receptor), **mPR** – błonowy receptor progesteronowy (membrane progesterone receptor), **mTOR** – kinaza białkowa treoninowo-serynowa (ssaczy cel dla rapamycyny; mammalian target of rapamycin), **PKA** – kinaza białkowa A (protein kinase A), **PKC** – kinaza białkowa C (protein kinase C), **PLC** – fosfolipaza C (phospholipase C), **PRA/PRB** – receptor progesteronowy A/B (progesterone receptor A/B), **SHBG** – globulina wiążąca hormony płciowe (sex hormone binding globulin), **STAT** – czynniki transkrypcyjne aktywowane przez kinazę JAK (signal transducer and activator of transcription), **TNF** – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor).

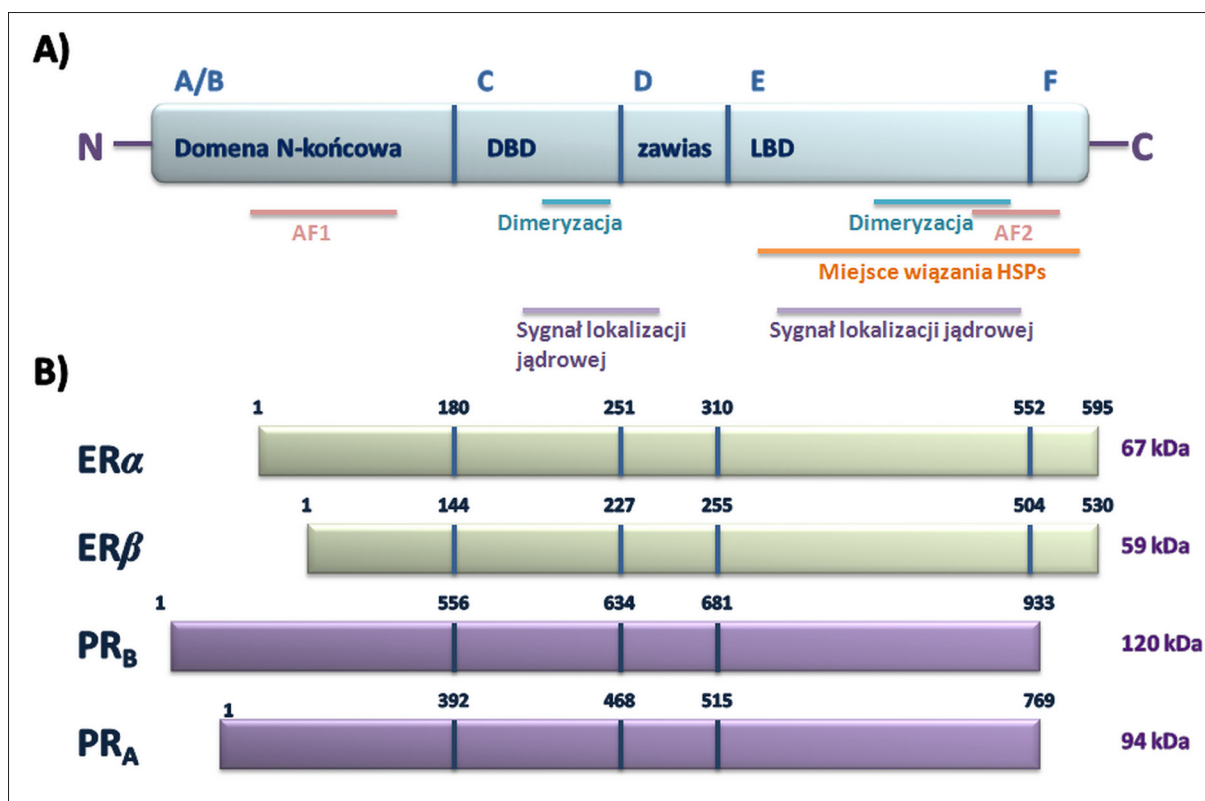
## WSTĘP

Hormony płciowe (zwane także steroidami płciowymi), są grupą lipofilnych cząsteczek syntetyzowanych z cholesterolu w gonadach, korze nadnerczy lub powstających przez przekształcenie z innych hormonów płciowych w komórkach wielu tkanek organizmu (np. wątrobie czy tkance tłuszczowej). Do grupy tej są zaliczane androgeny, estrogeny i progestageny. Mimo iż zwyczajowo są dzielone na „hormony żeńskie” (estrogeny i progesteron) i „hormony męskie” (androgeny), przedstawiciele tych dwóch grup występują fizjologicznie u obu płci, w różnych natomiast stężeniach i pełniąc odmienne role. Steroidy płciowe są transportowane we krwi w postaci związanej z białkami; testosteron i estradiol głównie z białkiem SHBG (sex hormone binding globulin), w niewielkim stopniu również z albuminami, natomiast progesteron wraz z transkortyną. Ze względu na swą hydrofobową naturę, przenikają przez błony komórkowe do wnętrza komórek docelowych na zasadzie dyfuzji. Po wnikięciu do komórki, hormony płciowe działają przez związanie ze swoistymi receptorami wewnątrzkomórkowymi, będącymi jednocześnie czyn-

nikami transkrypcyjnymi. Receptory te, aktywowane po związaniu z ligandem, ujawniają działanie wzmacniające bądź wyciszające ekspresję genów docelowych. Działanie aktywnych kompleksów hormon-receptor może się odbywać także pośrednio, przez oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi lub przez włączenie w wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne. Należy zatem zaznaczyć, że mechanizm działania hormonów płciowych może przebiegać w zróżnicowany sposób, pociągając za sobą wiele swoistych odpowiedzi, o charakterze których decydować będzie fizjologiczny i genetyczny kontekst komórek docelowych.

## Mechanizm działania hormonów płciowych

Rozwój badań nad działaniem hormonów steroidowych przypada na początek XX w., kiedy po raz pierwszy opisano zależność między nieprawidłowościami rozwoju embrionalnego kijańek i występującymi w jego wyniku chorobami a działaniem steroidów i hormonów tarczycy-



Ryc. 1. Schemat budowy receptorów dla steroidów z uwzględnieniem podziału na strukturalne i funkcjonalne domeny; **A)** – ogólny schemat budowy receptorów steroidowych z podziałem na funkcjonalne domeny: DBD – domena wiążąca DNA, LBD – domena wiążąca ligand, HSPs – białka szoku ciepłego, AF1/AF2 – miejsca aktywacji transkrypcji; **B)** – budowa poszczególnych izoform receptorów estrogeny i progesteronu: ER $\alpha$  (receptor estrogenowy  $\alpha$ ), ER $\beta$  (receptor estrogenowy  $\beta$ ), PRA (receptor progesteronowy izoforma A), PRB (receptor progesteronowy izoforma B). Na podstawie: [5,114]

cy [22]. Jeszcze w latach 50 ub.w. powszechnie sądzono, że działanie estradiolu w komórkach docelowych wynika z poddania go procesom utleniania i redukcji z udziałem koenzymów. Dopiero odkrycie techniki radioaktywnego znaczenia estradiolu pozwoliło nie tylko obalić istniejący pogląd i zrozumieć fizjologiczną rolę tego hormonu, ale również doprowadziło w 1958 r. do przełomowego odkrycia receptora estrogenowego, stanowiąc duży postęp w rozwoju badań nad mechanizmem działania estrogenów w następnych latach [44]. Kamieniem milowym w zrozumieniu mechanizmów działania wszystkich hormonów steroidowych była praca opublikowana przez Clevera i Karlsona w 1960 r. Badacze ci, testując działanie ekdyzonu (steroidowego hormonu linienia) na larwach owadów zauważyli zmiany w strukturze chromosomów obserwowane po 2 h od iniekcji hormonu, zanikające w ciągu 24 h. W sposób naturalny wskazywało to, że działanie tego steroidu miało swoje odzwierciedlenie na poziomie aktywności genów. Kilka lat później opracowano dwustopniowy model obrazujący wiązanie się wewnątrz komórek hormonu z receptorem o dużej swoistości oraz następującą w wyniku aktywacji powstałego kompleksu hormon-receptor indukcję ekspresji genów [45]. Był to pierwszy odkryty mechanizm działania steroidów w komórkach docelowych, który jeszcze przez wiele lat był uważany za jedyny.

### Receptorowa ścieżka działania

Według klasycznej teorii działania steroidów, 17 $\beta$ -estradiol (E2) i progesteron (P4) po wnikięciu do komórki regulują ekspresję określonych genów przez związanie się ze swoistymi receptorami jądrowymi, będącymi jednocześnie czynnikami transkrypcyjnymi. Proces ten ma charakter szlaku następujących po sobie zdarzeń, a pojawiająca się w jego wyniku regulacja ekspresji genów to tylko początek procesów komórkowych zaangażowanych w rozwój i odpowiedź fizjologiczną organizmu. Od czasu pierwszego sklonowania cDNA receptorów estrogenowych w latach 50 ub.w. odkryto i opisano u człowieka już ponad 60 różnych receptorów jądrowych, również takich, dla których ligandy nie istnieją lub nie są znane, zwanych receptorami sierocymi (orphan receptors), stanowiących interesujący obiekt przyszłych badań [60]. Według obowiązującej nomenklatury, receptory hormonów steroidowych znajdujące się w podrodzinie receptorów jądrowych NR3 są dzielone na trzy grupy: A – receptory estradiolu ER $\alpha$  i ER $\beta$ , B – receptory sieroce estradiolu ERR $\alpha$  i ERR $\beta$ , C – receptory pozostałych hormonów steroidowych, w której zawierają się receptory progesteronu PRA i PRB [70]. Receptory te są białkami o wyraźnej budowie modułowej, w których wyróżnić można pięć funkcjonalnych domen (ryc. 1) [30].

Domena N-końcowa, o najmniejszej homologii wśród receptorów jądrowych, zawiera sekwencję AF-1 odpowiadającą za wiązanie się kompleksów koaktywacyjnych [62]. Występujące następnie dwie domeny środkowe: domena C odpowiedzialna za wiązanie z DNA (DBD – DNA binding domain) i domena E za przyłączenie liganda (LBD – ligand binding domain), mają wysoce konserwatywną ewolucyjnie sekwencję wśród wszystkich receptorów steroidowych [5]. Domeny te są rozdzielone regionem zawiasowym, nazywanym także giętką (hinge), będącym najbardziej zmienną sekwencją receptorów o najmniej zbadanej relacji strukturalno-funkcjonalnej, podlegającej wielu potranslacyjnym modyfikacjom [91]. Znajdująca się częściowo w domenie E oraz kończąca w C-terminalnym rejonie białka sekwencja AF-2 również odpowiada za aktywację transkrypcji [77]. Receptory estrogenowe są kodowane przez dwa oddzielne geny (*ESR1* dla ER $\alpha$  i *ESR2* dla ER $\beta$ ), podczas gdy receptory progesteronowe są dwoma izoformami powstałymi przez alternatywny splicing tego samego genu (*PGR*). Mimo dużego podobieństwa budowy receptory progesteronowe są funkcjonalnie różnymi czynnikami transkrypcyjnymi, wykazującymi często przeciwstawne działanie. Wśród receptorów estrogenowych istnieje osiem izoform powstałych w wyniku alternatywnego splicingu dwóch genów (3 izoformy ER $\alpha$  i 5 izoformy ER $\beta$ ). Ekspresja obu receptorów występuje powszechnie w komórkach wielu tkanek, jednak przewagę ER $\alpha$  wykazują komórki błony śluzowej macicy, jajnika, podwzgórza oraz przewodów wyprowadzających jądra, podczas gdy ER $\beta$  komórki nerek, mózgu, serca, kości, płuc, błony śluzowej jelit, stercza i śródbłonna naczyńowego [5]. Ekspresję PR wykazują natomiast przede wszystkim komórki macicy i jajników oraz OUN (głównie podwzgórza) [5]. Szczegółowe informacje na temat receptorów estrogenowych zawiera obszerna publikacja Ascenzi i wsp. [3], a profile ekspresji receptora ER $\alpha$ , ER $\beta$  oraz PR w różnych tkankach organizmu znaleźć można na stronie: Nuclear Receptor Signaling Atlas ([www.nursa.org](http://www.nursa.org)).

Początkowo sądzono, że receptory steroidów aktywność transkrypcyjną osiągają tylko przez dimeryzację i przyłączenie liganda, a aktywny kompleks wiąże się ze swoistymi, palindromowymi sekwencjami DNA nazywanymi ogólnie HREs (hormone response elements), które w przypadku omawianych receptorów będą dwoma motywami: 5'-AGAACA-3' dla progesteronu i 5'-AGGTCA-3' dla estradiolu [38]. Obecnie wiadomo, że część receptorów jądrowych tworzy heterodimery z receptorami retinoidu X, które przyłączają się do bezpośrednio powtórzonych sekwencji HREs, podczas gdy receptory sieroce działają niezależnie od liganda na dwa możliwe sposoby: jako homodimery przyłączając się do bezpośrednio powtórzonych HREs lub jako monomery łącząc się z niesymetrycznymi HREs, znajdującymi się tylko po jednej stronie (ryc. 2) [60]. Zatem, działanie regulujące ekspresję genów przez receptory dla hormonów płciowych odbywa się nie tylko przez wiązanie z sekwencją HRE znajdującą się w rejonie promotorowym genu docelowego, ale również po przyłączeniu się w bezpośrednim sąsiedztwie jego sekwencji lub

oddziałując z innymi czynnikami transkrypcyjnymi [3]. Działanie to dla niektórych receptorów przebiega w obecności liganda, podczas gdy dla innych przy jego braku. Co więcej, regulacja ekspresji genów wymaga dostępu do aparatu transkrypcyjnego komórki, odbywa się bowiem na poziomie promotorów genów docelowych, wymagając aktywności kompleksów preinicjacyjnych w obszarze startu transkrypcji. Aktywność ta jest osiągana przez receptory steroidów w kontakcie z głównymi czynnikami transkrypcyjnymi (GTF – general transcription factors), takimi jak: TBP, TAFs, TFIIB, z czynnikami transkrypcyjnymi sekwencjoswoistymi (GATA-1, NF $\kappa$ B/p65, AP-1/Fos/Jun), z czynnikami przebudowującymi chromatynę (HMG1) oraz w kontakcie z koregulatorami transkrypcji: koaktywatorami lub korepresorami, zarówno dla receptorów zależnych od liganda, jak i dla tych od niego niezależnych [5]. Obecnie znanych jest już wiele koregulatorów receptorów steroidów płciowych, z których jednym z najlepiej poznanych jest białko SRC-1 (steroid receptor Co-activator-1) [71], będące koaktywatorem transkrypcji, który wiąże się zarówno z receptorami PR, jak i ER $\alpha$  w domenie AF-2, wzmacniając ich hormonozależną aktywność transkrypcyjną. Receptory klasy II z grupy receptorów kwasu retinowego RAR/RXR (heterodimery z receptorem retinoidów), które działają wyciszająco na transkrypcję genów docelowych w postaci niezwiązanej z ligandem, wyciszające działanie zawdzięczają aktywności korepresorów N-CoR (nuclear receptor Co-repressor) i SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) (ryc. 2). Represory te łączą się z heterodimerami receptorów RAR/RXR związanych z DNA tylko pod nieobecność hormonów [17]. Należy zatem podkreślić, że aktywność transkrypcyjna receptorów steroidów płciowych jest wypadkową ich współdziałania z wieloma białkami zaangażowanymi w procesy transkrypcji materiału genetycznego, a także różnych sygnałów docierających do jądra komórkowego. Przedstawione wyżej podstawowe informacje dotyczące receptorów steroidów płciowych pozwalają dokładniej prześledzić drogę ich genomowego działania poczynając od wnikięcia do komórki.

### Klasyczne, genomowe działanie steroidów płciowych

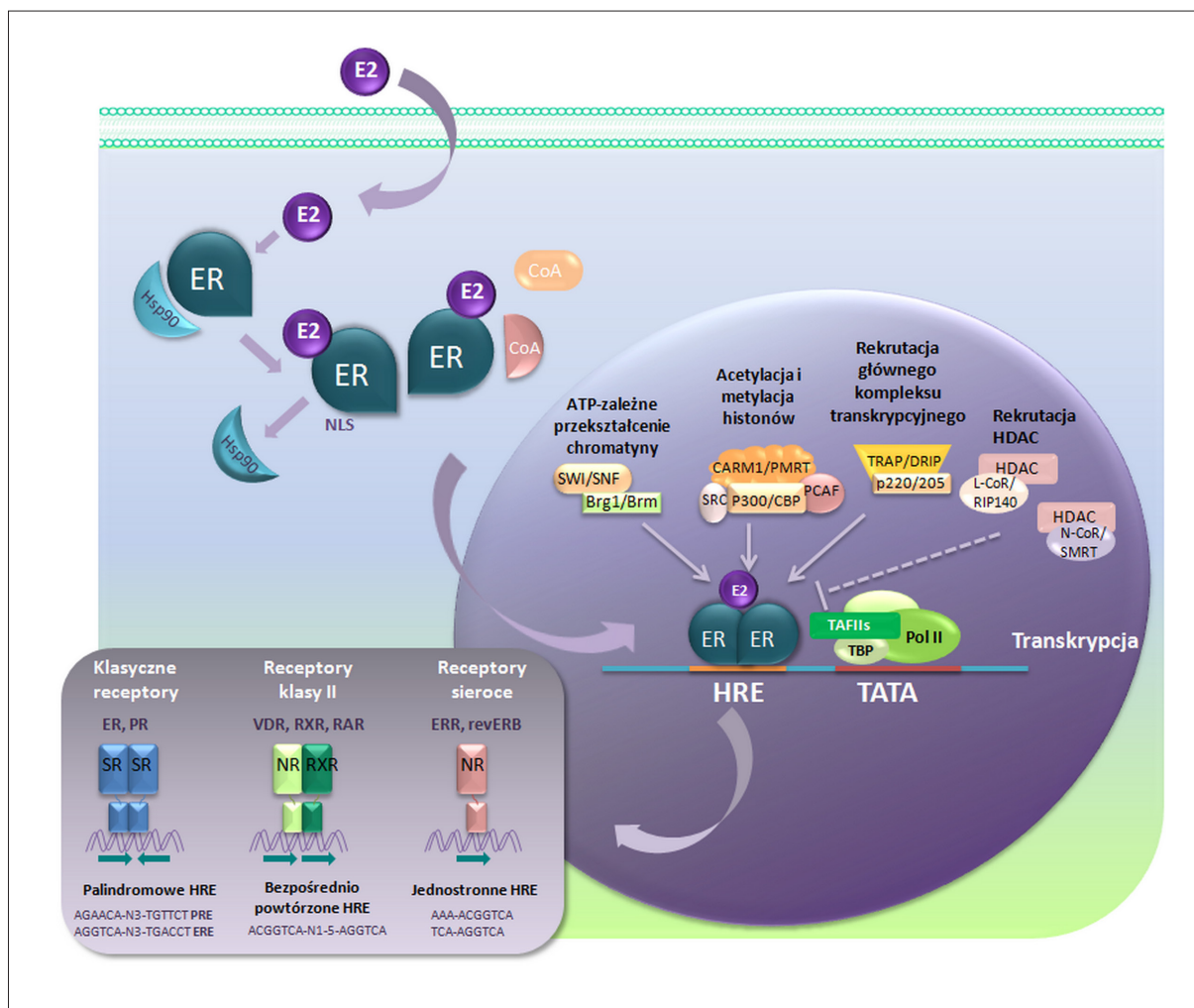
Uważa się, że lipofilne steroidy płciowe, transportowane we krwi głównie w postaci związanej z białkami (estradiol z SHBG i albuminami, progesteron z transkortyną), a tylko w około 5% krążących w postaci niezwiązanej, przenikają przez ściany naczyń krwionośnych i wnikają do komórek docelowych na zasadzie dyfuzji. Jeszcze do niedawna za komórki docelowe hormonów płciowych uważano tylko te znajdujące się w narządach rozrodczych (jajnikach, jądrach i najądrzach, macicy, gruczole sutkowy) [114].

Analizując fenotypy wielu naturalnie występujących mutacji genu aromatazy (enzymu konwertującego testosteron do estradiolu) oraz myszy z nokautem genów receptorów steroidów płciowych, opisano występujące w ich wyniku nieprawidłowości rozwoju wielu tkanek, co pozwoliło znacznie poszerzyć listę komórek docelo-

wych działania steroidów płciowych [40]. Znajdują się na niej komórki m.in. układu krążenia, układu nerwowego, przewodu pokarmowego, układu odpornościowego, skóry, nerek i płuc. W komórkach docelowych muszą występować swoiste receptory tych hormonów, które pod nieobecność sygnału hormonalnego są „zabezpieczone” w postaci związania z heterokompleksami białek opiekuńczych Hsp90 lub Hsp70 (heat-shock proteins), immunofilin (FKBP52 lub FKBP54) oraz białka p23 [98]. Receptory ER i PR są umiejscowione w komórkach zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórkowym. Należy jednak zaznaczyć, że ich umiejscowienie nie ma charakteru stałego, a jest raczej procesem dynamicznym, wypadkową translokacji z i do jądra komórkowego. Niemniej, pod nieobecność liganda większość receptorów ER i PR znajduje się w jądrze komórkowym, a nie w cytoplazmie, jak receptory innych steroidów, gdyż mają swoiste, ulegające konstytutywnej ekspresji sygnały lokalizacji jądrowej (NLS – nuclear localization signal) znajdujące się w domenie zawiasowej receptora [102]. Hormony płciowe przedostając się do cytoplazmy komórki natrafiają na nieaktywne receptory, które dzięki związaniu z kompleksem białek opiekuńczych wykazują takie sfałdowanie domeny LBD receptora, która utrzymuje konformację o najwyższym powinowactwie do hormonu [80]. Hormon wiążąc się ze swoistym receptorem w domenie LBD (blokowanej dotychczas białkiem Hsp90), powoduje zmianę jego konformacji przestrzennej i w jej wyniku, oddysocjowanie białek opiekuńczych i dimeryzację receptorów, czyniąc taki kompleks aktywnym i zdolnym do translokacji w kierunku jądra komórkowego [79,98]. Mechanizm ten zwiększa też znacząco powinowactwo receptora do DNA, nie tylko przez występujące następnie związanie koaktywatorów, lecz również przez odsłonięcie znajdujących się w rejonie DBD wtórnych sygnałów lokalizacji jądrowej NLS zależnych od liganda [35]. Działanie to jest uznawane za pierwszy element genomowej ścieżki oddziaływania hormonów płciowych [80]. Po translokacji do jądra komórkowego, kompleksy hormon-receptor stymulują ekspresję genów docelowych współdziałając z koaktywatorami i elementami kompleksu inicjacyjnego transkrypcji dla polimerazy II. Mogą działać według dwóch mechanizmów. Dwóch mechanizmów. Bezpośrednio, wiążąc się do palindromowych sekwencji DNA o charakterystycznym motywie GRE 5'-GGTACA-nnn-TGTTCT3' dla progesteronu lub ERE 5'-AGGTCA-nnn-TGA/TCCT3' dla estradiolu (gdzie n oznacza dowolną zasadę azotową), znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie genów docelowych lub pośrednio, przez związanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi stabilizując ich połączenie z DNA i rekrutując koaktywatory do powstałego kompleksu [49]. Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku tego drugiego mechanizmu, receptor hormonu nie wiąże się z DNA bezpośrednio. Co więcej, większość genów regulowanych przez ER nie ma perfekcyjnych, palindromowych ERE, a mimo to nadal motywy te pozostają funkcjonalne. Przykładami genów bezpośrednio regulowanych przez ER u człowieka są geny pS2, oksytocyny, c-myc, TGF- $\alpha$ , laktoferyny, prolaktyny, receptora progesteronowego

PRA, RAR $\alpha$ , keratyny 19 czy angiotensyny. Szczególnymi przykładami działania ER, jest niebezpośrednia regulacja według drugiego mechanizmu, m.in. wiązanie się ER $\alpha$  z białkiem Sp1 i transaktywacja genów IGFBP-4, receptora EGF, c-fos, bcl-2, genu receptora LDL, VEGF, cykliny D1, współdziałanie z białkami UDF-1 i USF-2 w rejonie promotora katepsyny D oraz ER $\alpha$  i ER $\beta$  z AP-1 regulujące ekspresję m.in. receptora progesteronowego PRB czy IGF-1 [22]. Lista regulowanych genów oraz pełen opis sekwencji ERE i ich modyfikacji znajdują się w publikacjach [49,72].

Warto podkreślić, że jakkolwiek regulacja genów nie jest możliwa bez uprzedniego przygotowania struktury DNA na taki kontakt. Oczywiście jest, że struktura chromatyny, w którą upakowany jest materiał genetyczny, warunkuje dostęp całego aparatu transkrypcyjnego do sekwencji kodujących genomu. Co więcej, struktura ta jest zasadniczo zaangażowana w regulację ekspresji genów [4]. Na najniższym poziomie organizacji DNA tworzy struktury zwane nukleosomami, składającymi się z histonów owiniętych podwójną nicią DNA. Zasadnym jest więc pytanie, w jaki sposób receptory steroidowe odnajdują i łączą się ze swoistymi motywami w sekwencjach poprzedzających geny docelowe. Wiadomo, że hormony steroidowe mogą się wiązać do regularnie zorganizowanej chromatyny prawdopodobnie ze względu na rotacyjną orientację HRE w nukleosomach [78]. Dane doświadczalne wykazują, że acetylacja histonów ma wpływ na ich luźniejsze związanie z DNA, a biorąc pod uwagę to, że podczas inicjacji transkrypcji są aktywne acetylotransferazy histonów, ich aktywność znosi hamujący wpływ histonów na transkrypcję [100]. Co ciekawe, niektóre z koaktywatorów receptorów steroidowych wykazują aktywność acetylotransferaz histonów, np. koaktywator receptorów steroidowych SRC1 (steroid-receptor coactivator 1) i koaktywator PCAF (p300/CBP-associated factor) (ryc. 2). Nie tylko stabilizują one powstające kompleksy hormon-receptor i *de facto* także kompleksy preinicjacyjne, lecz wzmacniają także transkrypcję genów docelowych przez reorganizację chromatyny [100]. Podobne działanie przebudowujące chromatynę opisano dla czynnika transkrypcyjnego NF-1, z którym mogą się łączyć receptory progesteronowe [18]. Transkrypcja genów aktywowana przez hormony płciowe odbywa się według powszechnie znanego mechanizmu z udziałem polimerazy RNA II. Do inicjacji transkrypcji jest wymagane związanie się podstawowych czynników transkrypcyjnych TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH w rejonie promotorowym genu. TFIID składa się m.in. z białka TBP (TATA box binding protein) oraz białek TAFs (TBP-associated factors), z którymi mogą oddziaływać receptory steroidowe [48]. Co więcej, zarówno receptory ER $\alpha$ , jak i PR współdziałają bezpośrednio z TFIIB [42]. Po związaniu do odpowiedniej sekwencji oraz rekrutacji wielu czynników transkrypcyjnych i białek regulujących transkrypcję, w odpowiedzi na działanie steroidów następuje start transkrypcji lub wzrost/spadek jej poziomu. Odpowiedź ta, będąc związaną z regulacją funkcjonowania komórki na poziomie materiału genetycznego, ma charakter długoterminowy i jest nazywana genomowym mechanizmem działania steroidów płciowych.



**Ryc. 2.** Szlak genomowej sygnalizacji steroidów płciowych na przykładzie 17β-estradolu. Po wnikięciu do komórki estradiol wiąże się przez domeny LBD z receptorami ER, powodując zmiany konformacji przestrzennej i oddysocjowanie białek opiekuńczych Hsp90 oraz odsłonięcie sygnałów lokalizacji jądrowej NLS. Następuje homo/heterodimeryzacja receptorów oraz ich translokacja do jądra komórkowego, gdzie aktywne dimery receptorów rozpoznają i wiążą się do swoistych sekwencji zwanych HRE, znajdujących się w rejonach promotorowych genów docelowych. Receptory związane z ligandem rekrutują kompleksy koaktywatorów: p160/SRC, CBP/p300, CARM-1/PRMT-1, P/CAF, BRG/Brm, TRAP/DRIP oraz korepresorów: RIP140 i L-CoR, regulując w ten sposób wraz z głównym kompleksem transkrypcyjnym ekspresję genów docelowych. Zarówno receptory związane jak i niezwiązane z ligandem mogą niekiedy hamować transkrypcję przez łączenie się z korepresorami N-CoR i SMRT oraz rekrutację deacetylaz histonów HDAC. Koaktywatory promują transkrypcję bezpośrednio przez ułatwienie rekrutacji głównego kompleksu transkrypcyjnego (TFII) oraz pośrednio przez przekształcenia chromatyny (acetylację oraz metylację histonów), które przygotowują materiał genetyczny do kontaktu z czynnikami transkrypcyjnymi. W ramce przedstawiono schematycznie rodzaje receptorów dla steroidów należących do rodziny receptorów jądrowych (NRs). ER – receptor estrogenowy, PR – receptor progesteronowy, VDR – receptor dla witaminy D, RXR – receptor retinoidowy, RAR – receptor kwasu retinowego, ERR – receptor skorelowany z estradiolem, RevERB – pierwszy receptor z grupy D, podrodziny 1 receptorów jądrowych. Zestawiono na podstawie: [11,94,114]

## MECHANIZM DZIAŁANIA GENOMOWEGO Z WYKORZYSTANIEM RECEPTORÓW BŁONOWYCH

Mimo iż od dawna ugruntowany jest pogląd, że receptory steroidów występują wewnątrzkomórkowo i przemieszczają się między jądrem komórkowym a cytoplazmą (a proces ten utrzymuje je w stanie dynamicznej równowagi między tymi komórkowymi przedziałami), około 40 lat temu pojawiły się doniesienia o występowaniu puli receptorów estrogenowych związanych z błoną komórkową, odkry-

tej po raz pierwszy w komórkach endometrium. Później odkryto ich występowanie w komórkach innych tkanek, m.in. w plemnikach, hepatocytach i gruczole sutkowym. W błonach komórkowych zanotowano występowanie obu izoform receptora, także ERβ [15]. Od tego czasu przeprowadzono wiele badań, które miały na celu sprawdzenie, czy receptory te są identyczne w porównaniu do tych jądrowych, różniąc się jedynie umiejscowieniem [96], czy też stanowią osobną subpopulację [105], lub czy istnieją jakieś strukturalne sygnały decydujące o ich translokacji w kie-

runku błony komórkowej. Najnowsze badania nad strukturą błonowych receptorów estrogenowych (mERs – membranous estrogen receptors) nadal nie rozstrzygają tej kwestii, wszystko wskazuje jednak, że są to osobne izoformy receptorów ER $\alpha$  (ER46) otrzymane przez alternatywny splicing [25]. Co więcej, przez substytucje aminokwasów [82] oraz modyfikacje potranslacyjne (palmitylację) [1] otrzymują sygnały determinujące ich błonową lokalizację. Wykazano również, że receptory te są umiejscowione w błonach w rejonach bogatych w kaweoliny (białka błonowe znane głównie z udziału w endocytozie), zwłaszcza w komórkach nabłonkowych [119]. Występowanie analogicznych receptorów błonowych progesteronu (mPR) również opisano [120]. Zaskakuje jednak znacznie bogatsza niż w mER liczba wariantów receptorów błonowych progesteronu. Do odkrytych początkowo podtypów receptorów błonowych mPR $\alpha$ , mPR $\beta$ , mPR $\gamma$ , charakteryzujących się u człowieka wysoką ekspresją w narządach rozrodczych, mózgu i nerkach [120], dołączono niedawno kolejne: mPR $\delta$  i mPR $\epsilon$  [99]. Wiadomo już, że receptor mPR $\alpha$  działa przez aktywację białka G nie należąc jednak do grupy receptorów białka G ze względu na inne pochodzenie ewolucyjne [104]. Niemniej jednak, działanie zarówno mERs, jak i mPRs pozostaje nadal słabo zbadane. Naukowcy skupiają się na opisywaniu szybkiego, niegenomowego działania receptorów błonowych, podczas gdy aspekt ich genomowej sygnalizacji pozostaje niezauważany. A właśnie istnienie pojedynczych doniesień, potwierdzających występowanie translokacji receptorów błonowych do cytoplazmy czy jądra komórkowego skłania do przypuszczeń, że istnieje mechanizm, przez który receptory błonowe mogą regulować ekspresję genów. W przypadku receptora mER $\alpha$  opisano jego translokację z błony komórkowej do jądra komórkowego, zarówno po związaniu z estradiolem, jak i bez, z tą różnicą, że translokację niezwiązaną z ligandem blokowało padanie inhibitorów MAPKs [57]. Co więcej, badania Xu i wsp. wykorzystujące błonowe receptory ER dowiodły translokacji receptorów do jądra komórkowego i aktywacji transkrypcji przez związanie z sekwencjami ERE [115]. Działanie to zaobserwowano tylko po uprzednim związaniu receptorów z estradiolem, a o jego bezpośrednim, genomowym działaniu świadczyło zarówno zahamowanie tego działania po podaniu inhibitora estradiolu, występujące także u dominujących negatywnych mutantów ER $\alpha$ , jak i brak hamującego działania po podaniu inhibitorów MAPK i Akt (wykluczających działanie niegenomowe).

### SZYBKI, NIEGENOMOWY MECHANIZM DZIAŁANIA

Mechanizm genomowego oddziaływania steroidów płciowych opisany wyżej charakteryzuje się odległym w czasie skutkiem działania. Oznacza to, że pierwsze zmiany ekspresji genów, będące następstwem działania hormonu, zaobserwować można po co najmniej kilku godzinach od ekspozycji. Jak więc należy tłumaczyć działanie steroidów, ujawniające się w ciągu kilku minut od ekspozycji? Jest zbyt szybkie, by być związanym z transkrypcją mRNA i syntezą białek. Jest więc oczywiste, że musi istnieć alternatywny mechanizm, związany z szybką odpowiedzią komórki na sygnalizację hormonami steroidowymi. Pierwsze obserwacje szybkiego działania estradiolu pojawiły się już w późnych

latach sześćdziesiątych ub.w. Wskazówki dotyczące nowej drogi działania steroidów płciowych pojawiły się wraz z odkryciem subpopulacji receptorów błonowych mER i w wyniku aktywowanej przez nie produkcji cAMP [22]. Inne badania tylko potwierdziły ich udział w alternatywnym mechanizmie sygnalizacji [56], zwanym później mechanizmem niegenomowym lub niejądrowym (poprawniej natomiast byłoby nazywać go mechanizmem nietranskrypcyjnym, podkreślając w ten sposób, że wiązanie receptorów do DNA i synteza RNA nie są w tym mechanizmie wymagane do osiągnięcia skutku działania) [94]. Należy jednak zaznaczyć, że nadal nie istnieje jednorodny system klasyfikacji mechanizmów niegenomowych, a ich podłoże molekularne w wielu przypadkach pozostaje jeszcze nieznane. Mechanizmy niegenomowe grupują wszystkie opisane działania steroidów płciowych, które nie sposób połączyć z działaniem genomowym, tzn. A) te, dla których skutek działania pojawia się zbyt szybko (w ciągu sekund lub minut); B) ujawniające się w obecności inhibitorów syntezy RNA lub białka; C) występujące po związaniu się steroidu z cząsteczkami trwale związanymi z błoną komórkową; D) indukowane w komórkach o wysokim stopniu upakowania chromatyny, w których brak jest procesów syntezy RNA i białka (np. plemnikach); E) obserwowane po związaniu się steroidów ze zmutowanymi receptorami, niezdolnymi do aktywowania procesów transkrypcji.

Mechanizm tego typu oddziaływań rozpoczyna się z chwilą związania steroidu z receptorem błonowym, zapoczątkowując wewnątrzkomórkową kaskadę sygnalizacyjną, regulującą wiele komórkowych procesów. W ten sposób regulacji mogą podlegać procesy m.in. wzrostu komórki, ich przeżycia, migracji czy tworzenia nowych naczyń krwionośnych, czyli nawet te długoterminowe, których wynik jest związany z regulacją transkrypcji genów (ale pośrednio, dopiero w następstwie aktywacji receptorów błonowych i wewnątrzkomórkowej kaskady sygnalizacyjnej) [13]. Niegenomowy mechanizm działania steroidów płciowych może przebiegać bezpośrednio, kiedy hormon jest jedynym agonistą, bądź pośrednio, jeśli skutek jego działania wymaga obecności innego agonisty. Co więcej, działanie bezpośrednie może być swoiste, kiedy przebiega z udziałem receptorów (tych klasycznych steroidowych i tych nieklasycznych jak wtórne przekaźniki sygnału) lub przebiegać bez udziału receptorów, gdy jest nieswoiste. Jak dotąd jedynym przykładem działania pośredniego jest działanie nieswoiste, aczkolwiek nie wyklucza się istnienia tożsamy mechanizmów, jak w przypadku działania bezpośredniego [23]. Obecnie wiadomo, że steroidowe receptory błonowe są zaangażowane w regulację jonowych kanałów błonowych, receptorów związanych z białkiem G, kinaz tyrozynowych oraz kinaz aktywowanych mitogenami. Wykazano że aktywują wytwarzanie cykazy adenylanowej oraz powodują aktywację fosfolipazy C.

### Aktywacja receptorów związanych z białkiem G i regulacja kanałów jonowych

Jednym z najlepiej poznanych szlaków niegenomowego działania steroidów płciowych jest aktywacja recepto-

rów związanych z białkiem G (GPCRs – G-protein-coupled receptors). Mianem białka G zwykle się określać rodzinę białek zaangażowanych w transdukcję sygnałów pochodzących ze środowiska zewnętrznego komórki, mających aktywność GTPaz. Za ich aktywację odpowiadają zakotwiczone w błonie komórkowej receptory GPCR, których zmiana konformacji przestrzennej wywołana związaniem się do ich podjednostki zewnętrznej komórkowej efektora (w postaci hormonu lub neuroprzekaźnika) powoduje modyfikację białka G. Niedawne odkrycia wskazują, że receptor białka G – GPR30, jest odrębnym receptorem błonowym estradiolu (mER) [85]. Co więcej, wszystko wskazuje na to, że działając przez receptor GPR30 estrogeny regulują szlak sygnałowy czynników wzrostu jednocześnie według dwóch przeciwstawnych mechanizmów [26]. Związanie liganda do GPR30 prowadzi do aktywacji cykazy adenylanowej i w jej następstwie aktywacji kinazy białkowej A (PKA). Aktywna kinaza PKA hamuje szlak ERK1/2 wzbudzony sygnalizacją płynącą z EGFR. Jednak zarówno estrogeny, jak i ich antagoniści, przez związanie z receptorem GPR30, powodują transaktywację receptora EGFR. Należy zatem podejrzewać, że sygnalizacja estrogenów płynąca z GPR30 przez aktywację i inhibicję szlaku EGFR, w pewnym sensie utrzymuje funkcjonalną równowagę aktywności kinaz ERK 1/2 [26].

Aktywacja białka G wywołuje kaskadę sygnalizacji komórkowej, która może regulować transkrypcję, ruch, kurczliwość lub sekrecję komórki [69]. Udowodniono, że 17 $\beta$ -estradiol może działać na izofomę  $\beta$  fosfolipazy C związanej z białkiem G w osteoblastach, powodując mobilizację jonów  $Ca^{2+}$  z siateczki śródplazmatycznej oraz wytwarzanie wtórnych przekaźników informacji, takich jak trifosforan inozytolu ( $IP_3$ ) czy diacyloglicerol (DAG). Powoduje to wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  [55]. Badania wykazały również, że estrogeny wpływają na różnicowanie neuronów dopaminergicznych śródmózgowia u myszy zgodnie z mechanizmem niegenomowym. Podanie 17 $\beta$ -estradiolu zwiększało wzrost neurytów, hamowany podaniem antagonistów szlaku cAMP/PKA i  $Ca^{2+}$ , ale nie antagonistów estrogenów [6]. Co więcej, odnotowano nagłe uwolnienie zmagazynowanych w zarodkowych neuronach dopaminergicznych jonów  $Ca^{2+}$  w następstwie aktywacji szlaku  $IP_3$  przez związanie estradiolu z receptorem błonowym [7]. Mechanizm związany z jonami wapnia występuje także w przypadku działania estradiolu na błonę śluzową macicy. Już jedno z pierwszych badań nad działaniem estradiolu przeprowadzone w latach 70 ub.w. na kulturach komórek endometrium wykazały nagły (poniżej 10 min) napływ do komórki jonów  $Ca^{2+}$  w odpowiedzi na podanie 17 $\beta$ -estradiolu [22]. Natomiast najwcześniejsze obserwacje szybkiego działania progesteronu dotyczą procesu dojrzewania oocytów u płazów. Opisano krótkotrwały przepływ jonów  $Ca^{2+}$  z powierzchni oocytu żaby *Rana pipens* w ciągu kilku sekund od podania progesteronu, poprzedzający spadek wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP i chwilowy wzrost cGMP. Inne badania ujawniły, że progesteron działając przez swój receptor

błonowy indukuje szlaki fosfolipidowe drugorzędowych przekaźników informacji powodując wytworzenie DAG (1,2-diacyloglicerolu) i aktywację kaskady PKC (kinazy białkowej C), stanowiących sygnał inicjujący oocyty do podziałów mejotycznych [22,67]. Analogiczne szybkie działanie progesteronu opisano dla plemników. Wykazano, że progesteron jest jednym z bodźców wywołujących reakcję akrosomalną. Dzieje się tak, że względu na zdolność progesteronu do wywołania szybkiego wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , a wzrost jest zależny od dawki hormonu i nie jest blokowany przez podanie swoistego antagonisty wewnątrzkomórkowych receptorów progesteronowych RU-486 [22]. Progesteron reguluje także przepływ innych jonów w plemnikach, m.in.  $Na^+$  i  $Cl^-$  oraz bierze udział w analogicznych jak w oocytach szlakach wtórnych przekaźników sygnałów prowadzących do wytworzenia DAG i  $IP_3$  i w konsekwencji aktywacji fosfolipazy C oraz prawdopodobnie fosfolipazy  $A_2$  w plemnikach po kapacytacji [22]. Niedawno opisano także udział zależnej od cAMP kinazy białkowej A w aktywowanej progesteronem reakcji akrosomalnej [36] oraz stymulację fosforylacji tyrozyny [61]. Szybka odpowiedź w dojrzałych ludzkich oocytach i komórkach warstwy ziarnistej w postaci napływu jonów  $Ca^{2+}$  odnotowano także dla estradiolu [66,103]. Nie wpływa on wprawdzie na przejście oocytu przez fazy dojrzewania mejotycznego, ale zdaje się zwiększać możliwość zapłodnienia dojrzałych oocytów [103]. W przypadku plemników 17 $\beta$ -estradiol powoduje wzrost ich ruchliwości, poboru tlenu, wytwarzaniu mleczanów oraz metabolizmu kilku innych substratów, zwiększając zdolność plemników do penetracji oocytu [22]. Należy jednak zaznaczyć, że wiązanie się 17 $\beta$ -estradiolu do receptorów błonowych ulegało osłabieniu w obecności progestagenów [22]. Po wszechnie wiadomo, że steroidy płciowe wykazują działanie wazodylatacyjne, opierające się na regulacji stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w komórkach śródbłonna naczyniowego i mięśni gładkich. W komórkach warstwy mięśniowej gładkiej naczyń krwionośnych estradiol hamuje działanie kanałów  $Ca^{2+}$  typu L bramkowanych zmianą potencjału [68], reguluje też błonowy przepływ jonów  $K^+$  przez otwieranie kanałów BK (big potassium channels, zwanych też Maxi- $K^+$ ) zależnych od zmian potencjału błonowego i wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , przez fosforylację zależną od cGMP [113] oraz bezpośrednie wiązanie się do podjednostki  $\beta$  kanału [106]. Podobny szybki mechanizm działania wykazuje progesteron w osteoblastach, powodując gromadzenie się w komórce jonów  $Ca^{2+}$  wywołane otwieraniem się kanałów  $Ca^{2+}$  typu L oraz mobilizację rezerw tych jonów z siateczki śródplazmatycznej [34]. Napływ jonów wapnia opisano także w komórkach dwunastnicy przez aktywację szlaku PLC po podaniu estradiolu [75]. Podsumowując, modulacja błonowych receptorów związanych z białkiem G oraz kanałów jonowych może tłumaczyć wiele z zaobserwowanych szybkich skutków działania steroidów płciowych na komórki, włączając kaskadę sygnalizacyjną PLC/DAG/ $IP_3$ , wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$  i aktywację kinazy białkowej C (PKC) oraz aktywację szlaku cykazy adenylanowej/kinazy białkowej A [47].

## AKTYWACJA SZLAKÓW KINAZ BIAŁKOWYCH

Działanie steroidów płciowych, przebiegające według szybkiego, niegenomowego mechanizmu jest związane z aktywnością kilku głównych ścieżek sygnalizacyjnych w komórce, odpowiadających za integrację i przekazywanie sygnałów zewnątrzkomórkowych (ryc. 3). Do ścieżek takich należą kaskady kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK – mitogen-activated protein kinases), kinaz tyrozynowych i lipidowych. Związane są zazwyczaj z odbiorem sygnalizacji pochodzącej od różnych czynników wzrostu, a ich aktywacja w komórce reguluje główne procesy, takie jak ekspresja genów, proliferacja i przetrwanie.

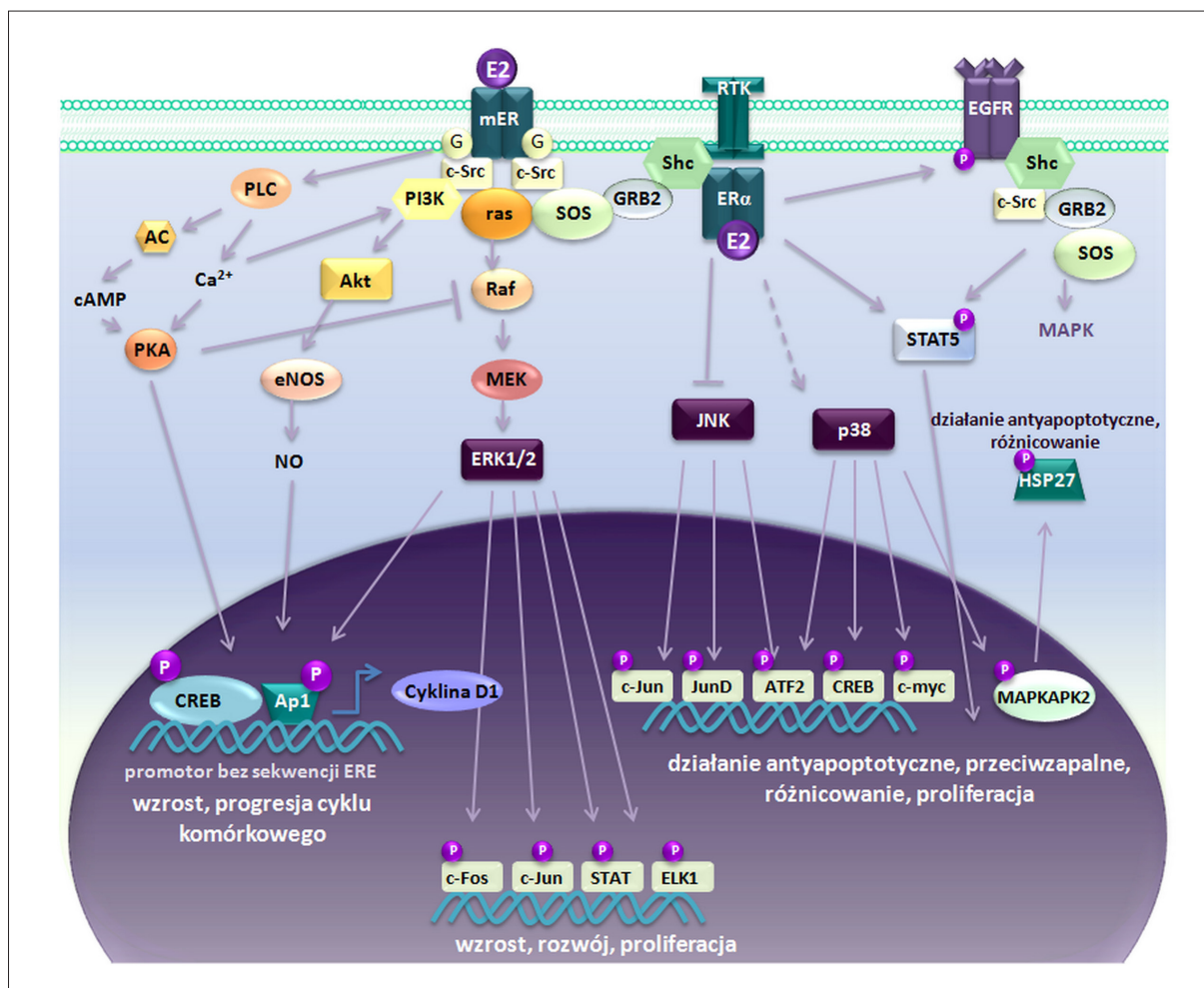
### Szlak MAPK i kinaz tyrozynowych

Kinazy MAP są grupą kinaz białkowych serynowo-treoninowych, odpowiadających głównie na wiele zewnątrzkomórkowych sygnałów wzrostu i czynników o charakterze stresowym i prozapalnym [16]. Aktywację szlaków kinaz MAP przez hormony płciowe opisano już dla kilku tkanek i zgrupować je można w trzy klasyczne kaskady sygnalizacyjne: ERK 1/2 (extracellular-signal-regulated kinases 1/2), kinaz p38 (p38 mitogen-activated protein kinases) oraz JNKs (c-Jun N-terminal kinases) [74]. Należy jednak zaznaczyć, że charakter oddziaływań między steroidami płciowymi a szlakiem MAPK jest złożony, ze względu na istnienie kilku poziomów ich wzajemnej regulacji [112]. Po pierwsze, aktywny kompleks kinaz MAP ma zdolność niezależnej od liganda aktywacji receptorów steroidowych, nie jest natomiast jeszcze wiadomo czy wszystkich rodzajów. Na pewno jednak fosforylacja receptora ER przez kinazy MAP odgrywa znaczącą rolę w jego aktywacji niezależnej od liganda [46]. Po drugie, to właśnie ekspozycja na estrogeny powoduje aktywację kinaz ERK 1/2 szlaku MAPK, opisaną w różnych typach komórek. Estradiol ma zdolność aktywacji MAPK wykazaną w komórkach nerwowych [110] (gdzie prowadzi do ekspresji genu białka c-Fos), w komórkach śródbłonna [50,90], osteoblastach [20] i adipocytach [32]. O mechanizmie aktywacji mogą świadczyć pośrednio właśnie badania na tych ostatnich. W adipocytach bowiem stwierdzono obniżenie skutku aktywacji MAPK przez estradiol po podaniu toksyny krztuśca, której działanie jest związane z blokowaniem wiązania się białka G do receptorów GPCR i hamowanie szlaku sygnałowego związanego z tymi receptorami. Podobny wynik uzyskano po podaniu fosfatazy białkowej 2 (PP2 – protein phosphatase 2, której substratami są m.in. białka Raf, MEK, Akt) oraz wortmanniny (swoistego inhibitora kinaz P13, mTOR czy MAPK) [32]. Dane te wskazują, że w mechanizmie aktywacji MAPK przez estradiol równolegle biorą udział szlaki związane z białkiem G/kinazami z rodziny Src/ oraz PI3K/Akt (ryc. 3) [94]. Istnieją badania dowodzące, że estradiol aktywuje właśnie szlaki Src/Ras/ERK [64] oraz PI3K/Akt [95]. To właśnie za pośrednictwem szlaku Src-PI3K-Akt-eNOS komórki śródbłonna w odpowiedzi na stymulację estradiolem uwalniają tlenek azotu (NO). W szlaku tym sygnał jest przekazywany od receptora błonowego mER do kinazy PI3K przez aktywację białka G i kompleks kinaz Src. W ten sposób uruchomiona ka-

skada kinaz aktywuje kinazę Akt (PKB), która ostatecznie aktywuje syntazę tlenku azotu eNOS i uwolnienie NO [37]. Jakże jest zatem znaczenie tych szlaków i przekazywanej za ich pośrednictwem informacji przez hormony płciowe? Odpowiedź na to pytanie zdaje się wynikać z samej funkcji pełnionej w komórce przez kinazę tyrozynową Src. Gen SRC, kodujący to białko jest zaliczany do protoonkogenów, bierze więc udział w regulacji podstawowych dla komórki procesów: proliferacji, adhezji, poruszania się i inwazji. Nie dziwi więc, że wzrost jej aktywności spowodowany mutacjami lub sygnałami indukowanymi przez czynniki wzrostu, jest obserwowany w różnych rodzajach nowotworów [116]. Zatem sygnalizacja hormonami płciowymi, aktywująca szlak Src/Ras/ERK będzie miała charakter stymulacji proliferacji komórki (ryc. 3) [13,63]. W przypadku estradiolu, aktywacja będzie się odbywała bezpośrednio przez oddziaływanie ER z kinazą c-Src, natomiast progesteronu przebiegała przez asocjację receptora PRB do ER (czyli tzw. „cross talk”) i wzbudzenie ścieżki aktywowanej przez ER [65]. Aktywacja przez hormony płciowe szlaku PI3K/Akt (uczestniczącego w przekazywaniu komórce sygnałów mitogennych i promujących przetrwanie), odbywająca się za pośrednictwem kinazy Akt (PKB) oraz regulacji ekspresji cykliny D1, będzie miała charakter stymulacji jej wzrostu [63]. Udowodniono, że niedobór estradiolu powoduje rozwinięcie się nadwrażliwości na mitogenne działanie E2 w komórkach raka gruczołu sutkowego właśnie przez wzrost aktywności MAPK [117]. Znacznie mniej wiadomo na temat udziału steroidów płciowych w aktywacji drugiej kaskady MAPK związanej z białkiem p38.

Istnieją doniesienia, że w komórkach śródbłonna naczyniowego estradiol ochronne działanie wykazuje właśnie przez aktywację białka p38 i indukcję kinaz MAPK oraz fosforylację HSP27 (heat shock protein 27) [83]. Estradiol w warunkach stresu metabolicznego zapobiega tworzeniu się włókien stresowych (EC stress fiber formation) oraz pomaga utrzymać integrację aktyny i błon w komórkach. Estradiol zapobiega apoptozie wywołanej hipoksją, stymuluje migrację komórek śródbłonna oraz wytworzenie prymitywnych przewodów kapilarnych. Przeciwną natomiast regulację szlaku p38 wykazuje estradiol w komórkach Kupfery. Niedawne doniesienia dowodzą, że przez negatywną regulację poziomu receptorów TLR4 (Toll-like receptor 4) estradiol hamuje szlak p38 oraz NF- $\kappa$ B, ograniczając w ten sposób uwalnianie cytokin prozapalnych [41]. Mechanizm ograniczenia ekspresji TLR4 nie jest jednak znany. Najnowsze badania przeprowadzone na komórkach nabłonka rogówki dowodzą, że 17 $\beta$ -estradol wykazuje działanie przeciwzapalne, ograniczając uwalnianie cytokin prozapalnych IL-6, IL-1 oraz TNF- $\alpha$  przez hamowanie szlaku p38 [109]. Wskazuje to jedynie, że molekularny mechanizm działania estradiolu przez szlaki wewnątrzkomórkowych przekazników informacji może być swoisty tkankowo i różnić się znacznie w zależności od funkcjonalnego profilu i aktywności życiowych komórek.

Zaangażowanie estradiolu w trzecią kaskadę ścieżki MAPK, szlak kinaz JNKs (c-Jun N-terminal kinases) zo-



**Ryc. 3.** Niegienomowy szlak sygnalizacji steroidów płciowych na przykładzie 17 $\beta$ -estradolu (E2). Grupując mechanizmy szybkiego działania estradiolu w szlaki wewnątrzkomórkowej sygnalizacji można przyjąć, że aktywuje on głównie trzy: Ras-Raf-MEK-MAPK, Src-PI3K-Akt-eNOS oraz PLC-PC-AMP/PKA, w obrębie których występuje wiele wzajemnych oddziaływań. Przedstawiono współdziałanie szlaków E2 ze szlakami czynników wzrostu (opis w tekście); mER $\alpha$  – błonowy receptor estrogenowy; RTK – receptory błonowe wykazujące aktywność kinaz tyrozynowych; EGFR – receptor dla nabłonkowego czynnika wzrostu (jeden z RTK); G – białka G; PLC – fosfolipaza C; AC – cyklaza adenylanowa; PKA – kinaza białkowa A; GRB2 – białko 2 związane z receptorem wzrostu (białko adaptorowe); c-Src – kinaza tyrozynowa Src; PI3K – kinaza-3 fosfatydiloinozytolu; Akt (PKB) – kinaza białkowa B; eNOS – syntaza-3 tlenku azotu; ras – małe onkogenne białka wykazujące aktywność GTPaz; raf – kinaza serynowo-treoninowa raf; MEK (MAPKK) – kinaza kinaz MAP; ERK1/2 – kinazy regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe; SOS – aktywator wymiany nukleotydów guaninowych (aktywuje białko ras); Shc – białko adaptorowe; JNK – kinazy fosforylujące N-końcową domenę białka c-Jun; p38 – kinazy p38 aktywowane mitogenami (odpowiedź na bodźce stresowe); MAPK – kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (zawierają się tu szlaki kinaz ERK1/2, p38, JNK); STAT5 – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 5; HSP27 – białko szoku ciepłego 27; CREB – czynnik transkrypcyjny aktywowany w wyniku fosforylacji przez PKA; Ap1 – czynnik transkrypcyjny 1; c-Fos – czynnik transkrypcyjny kodowany przez protoonkogen należący do genów wczesnej odpowiedzi (IEGs); JunD – czynnik transkrypcyjny należący do kompleksu AP1; ATF2 – aktywujący czynnik transkrypcyjny 2; c-myc – czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na sygnały mitogenne; ELK1 – aktywator transkrypcji; MAPKAPK2 – kinaza białkowa 2 aktywowana kinazami MAP. Na podstawie [29,118]

stało dowiedzione na linii mysich monocytów RAW 264.7 (wykazujących ekspresję receptorów ER). Wykazano, że estradiol obniża aktywowaną cytokinami ekspresję czynnika martwicy nowotworów TNF (tumor necrosis factor) przez hamowanie aktywności kinazy JNK [101]. W wyniku tego działania nie dochodzi do aktywacji czynników c-Jun i JunD, ich kumulacji w jądrze komórkowym i wiązania z sekwencją AP-1 promotora genu TNF- $\alpha$ , czyli jego transaktywacji. Mechanizm ten odgrywa główną rolę w ochronie kości przed wywołanym uwalnianiem z makrofagów

czynnikami TNF- $\alpha$ , pobudzeniem formowania osteoklastów i w następstwie resorpcją kości. Niemniej, wpływ estradiolu na szlak kinaz JNK może mieć też negatywny kontekst, jak w przypadku hamowania wywołanej przez chemioterapię i promieniowanie UV apoptozy komórek raka gruczołu sutkowego. Wykazano, że estradiol blokuje działanie kinaz JNK aktywowanych paklitakselem lub promieniowaniem UV, powodując zahamowanie fosforylacji czynników Bcl-2 i Bcl-xl, nie dopuszczając do aktywacji kaspaz i indukcji apoptozy [84].

Aktywacja ścieżki błonowej związanej z szybkim, niegenomowym mechanizmem działania steroidów płciowych może również prowadzić do regulacji transkrypcji, ale ważnym jest, że sygnalizacja pochodząca z receptorów błonowych reguluje także aktywność czynników transkrypcyjnych niezwiązanych z regulacją klasycznymi ER. Powiększa się zatem zakres genów regulowanych hormonami płciowymi, a aktywacja cytoplazmatycznych szlaków sygnałowych stanowi, oprócz drogi szybkiego działania w komórce, alternatywny mechanizm regulacji ekspresji genów. Jak dotąd opisano już kilka czynników transkrypcyjnych aktywowanych sygnalizacją mER, z których najczęściej badanym był CREB (cAMP response element-binding). Jego aktywację wykazano w komórkach hipokampa [108], adipocytach [32], komórkach raka jelita grubego [39] oraz nerwiaka płodowego [111]. Czynniki CREB aktywuje m.in. ekspresję c-Fos, podobnie jak inne opisane dla sygnalizacji błonowej estradiolu czynniki SRF (serum response factor) czy ELK1 [39]. Oprócz regulacji czynnika AP1 (opisanej wcześniej) [10], estradiol ma zdolność regulacji kilku czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT (signal transducers and activators of transcription), to jest: Stat1, Stat3 i Stat5 [9]. W przypadku progesteronu, analogiczną aktywację transkrypcji indukowaną szlakiem błonowym opisano dla czynnika transkrypcyjnego c-Ets-2 (promującego progresję cyklu komórkowego z fazy G<sub>1</sub>) regulującego ekspresję m.in. cykliny D1 [2]. Należy jednak podkreślić, że regulacja ekspresji genów indukowana aktywacją szlaków cytoplazmatycznych przez progesteron, jest w równym stopniu związana z transkrypcją swoistych genów regulowanych przez receptory progesteronowe [92], co tych z nimi niezwiązanych, aktywowanych w następstwie uruchomionych przez PR ścieżek MAPK [54]. Aktywowana przez progesteron kaskada kinaz MAPK jest ściśle związana z transaktywacją EGFR (epidermal growth factor receptor) i c-Src [21]. Wykazano również, że progesteron powoduje fosforylację i translokację czynników Stat5 [86] i Stat3 [81]. Biorąc pod uwagę, że progesteron przez aktywację szlaku Akt/c-Src oraz drogi kinaz MAPK wzmacnia i aktywuje sygnalizację związaną z EGFR (indukującą proliferację komórki), jakiegokolwiek deregulację tego szlaku są krytyczne w skutkach, przyczyniając się do niekontrolowanej proliferacji i rozwoju komórek nowotworowych [53,81].

#### INTEGRACJA SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH RÓŻNYCH HORMONÓW

Biorąc pod uwagę, że między sygnalizacją pochodzącą z błony komórkowej oraz szlakami sygnałowymi 17 $\beta$ -estradiolu i progesteronu zgrupowanymi razem pod pojęciem mechanizmów niegenomowych, występuje duża zbieżność nie tylko dla omawianych hormonów płciowych, ale dla hormonów steroidowych ogólnie, można przypuszczać, że szlaki te są w komórce funkcjonalnie powiązane (ryc. 3). Zhang i Trudeau zebrali istniejące doniesienia na temat współdziałania szlaków sygnałowych estradiolu i innych hormonów i podzielił je według trzech typów współdziałania [118]. W pierwszym, związanym z androgenami, 5 $\alpha$ -dihydrotestosteronem (DHT), przedstawili przypadek gdy dwa hormony regulują te same

czynniki transkrypcyjne tą samą ścieżką sygnałową. Chodzi o czynniki Elk-1 (ETS-like transcription factor 1), C/EBP $\beta$  (CCAAT enhancer binding protein-beta), CREB oraz c-Jun/c-Fos, które są aktywowane przez szlak Src/Shc/ERK zarówno przez estradiol, jak i dihydroksytęstosteron [52]. Opisano je w osteoblastach, osteocytach, fibroblastach zarodkowych i komórkach HeLa [51]. W drugim typie połączyli przypadki regulowania ścieżki działania jądrowych ER przez sygnalizację błonową wywołaną działaniem hormonów tarczycy (TH) – T3i T4. Dinda i wsp. wykazali, że hormony te działają w ten sam sposób co estrogeny w komórkach raka gruczołu sutkowego, indukując proliferację komórek przez regulację stężenia białka p53 i hiperfosforylację czynnika transkrypcyjnego pRb [19]. Działanie to jest hamowane przez inhibitory ER, co wskazuje na udział tych receptorów w wymienionym procesie. Natomiast podanie hormonów tarczycy związanych z agarozą, niezdolnych do przekroczenia błony komórkowej, nie zakłóciło fosforylacji receptora ER $\alpha$ , co wskazuje, że w szlaku tym uczestniczą receptory mTR (membrane thyroid receptor) związane z błoną komórkową [19]. Jak zauważają autorzy, szlak ten bardzo przypomina indukcję sygnałów wewnątrzkomórkowych przez EGF (epidermal growth factor – czynnik wzrostu nabłonka) i IGF (insulin-like growth factor – insulinopodobny czynnik wzrostu) [12,97]. Sygnalizacja pochodząca z EGF, oprócz bezpośredniego aktywowania nER może także wywoływać je pośrednio, przez aktywację koaktywatora nER – białka AIB1 (amplified in breast 1), zwanego także NCOA3 (nuclear receptor coactivator 3) [73]. W trzecim typie opisali regulację poziomu nER pośrednią i negatywną, bo w odpowiedzi na aktywację szlaku gonadoliberyny (GnRH) w mysich komórkach LbT2 ekspresji ulega enzym Ubc4 (ubiquitin-conjugating Enzyme 4), który powoduje ubiquitytację receptorów nER i w następstwie ich degradację w proteasomach [58].

#### NIEGENOMOWA SYGNALIZACJA STEROIDÓW PŁCIOWYCH – ZNACZENIE

Niegenomowy szlak sygnałowy steroidów płciowych nadal zawiera wiele niewiadomych, co zgodnie podkreślają naukowcy zajmujący się tym zagadnieniem. Nie chodzi tu tylko o zrozumienie pełnego mechanizmu, za pośrednictwem którego ta sygnalizacja się odbywa, ale także lub przede wszystkim o ustalenie czy istnieją szczególne sytuacje *in vivo* w stanach fizjologicznych lub patologicznych, w których odgrywa on znaczącą rolę. Należy przypuszczać, że poszczególne tkanki są wrażliwe na miejscowe lub ogólnoustrojowe oscylacje stężenia steroidów płciowych, a wrażliwość ta przejawia się w gotowości do wzbudzenia szybkiej odpowiedzi w postaci aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, czyli mechanizmu niegenomowego. Jest bardzo prawdopodobne, że jakiegokolwiek dysfunkcje złożonego systemu regulacji stężenia hormonów płciowych i związane z nimi stany patologiczne, mogą powstawać właśnie z udziałem sygnalizacji niegenomowej [94]. Nadal jednak brakuje badań, które by to jednoznacznie rozstrzygały. Dobrym modelem badawczym, wykorzystywanym w badaniach niegenomowego działania steroidów płciowych są zwierzęta mające punktowe mutacje w genie jednego z re-

ceptorów steroidowych, które uniemożliwiają wiązanie się aktywnego receptora steroidowego do DNA. Mutacje te zatem odpowiadają za utratę funkcji transkrypcyjnych receptora nie powodując jednak całkowitej utraty ich aktywności. Badania z użyciem tego modelu są szczególnie ciekawe, biorąc pod uwagę możliwość porównania fenotypów zwierząt z utratą funkcji transkrypcyjnych receptora, do tych z jego nokautem. Badania przeprowadzone przez Jakacką i wsp. na myszach z mutacją punktową receptora ER $\alpha$  w domenie odpowiedzialnej za wiązanie z DNA wykazały, że heterozygotyczne samice były bezpłodne z poważnymi zaburzeniami strukturalnymi i funkcjonalnymi jajników, podczas gdy badania nad myszami z nokautem ER dowodzą, że wystarczy jedna prawidłowa kopia genu ER, aby zachować niemal prawidłową aktywność funkcjonalną receptorów [43]. Należy zatem przypuszczać, że do prawidłowego wzrostu i osiągnięcia aktywności funkcjonalnej komórek zależnych od sygnalizacji steroidami płciowymi niezbędne jest współdziałanie zarówno genomowych, jak i niegenomowych szlaków. Należy również zaznaczyć, że odkrycie i zrozumienie mechanizmów niegenomowego działania steroidów płciowych stworzyło nowe możliwości farmakologicznego regulowania ich aktywności w terapii przeciwnowotworowej, a także pozwoliło wytłumaczyć wiele przypadków braku odpowiedzi na leczenie inhibitorami receptorów.

Rozważając znaczenie obu mechanizmów działania steroidów płciowych oraz ich wzajemne powiązanie uprawnionym jest założenie, że genomowa sygnalizacja pozwala na działanie długotrwałe, dotyczące programowania komórki na właściwe jej zadania i funkcje przez wysublimowaną regulację na poziomie genetycznym. Natomiast sygnalizacja niegenomowa jest mechanizmem, za pośrednictwem którego steroidy płciowe wzbudzają w komórce aktywność niezbędną w adaptacji do dynamicznie zmieniającego się środowiska [94]. Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku działania szybkiego, steroidy uruchamiają w komórce narzędzia, które już istnieją i funkcjonują, gotowe do szybkiej odpowiedzi na sygnalizację płynącą z błony komórkowej, natomiast wynik takiej sygnalizacji może być długoterminowy, właśnie ze względu na istnienie wzajemnych funkcjonalnych powiązań między oboma drogami działania.

### Oporność na działanie estrogenów i ich antagonistów w powiązaniu z sygnalizacją czynników wzrostu

17 $\beta$ -estradiol działa pobudzająco na proliferację komórek i prawdopodobnie aktywuje niektóre onkogeny, co może sprzyjać rozwojowi oraz progresji chorób nowotworowych, przede wszystkim raka gruczołu sutkowego, jajników oraz błony śluzowej trzonu macicy. Proliferację wywołaną działaniem estradiolu można jednak zahamować w komórkach nowotworowych wykazujących ekspresję ER, przez podawanie swoistych inhibitorów aromatazy (blokowanie powstawania estradiolu) lub inhibitorów receptora estrogenowego (np. tamoxifenu). Szacuje się jednak, że nawet 50% pacjentów z nowotworami ER-dodatnimi od początku nie reaguje lub szybko staje się oporna na działanie tych

leków [24,59,87]. W wielu przypadkach opisywana oporność jest związana z nadekspresją bądź nadmierną aktywnością białek zaangażowanych w szlaki sygnałowe czynników wzrostu i estradiolu, np. HER2, IGF-1R (członków rodziny receptorów EGFR) oraz białka c-Src [33,87]. Wykazano, że nadekspresja białka Cas (wiążącego c-Src) w komórkach nowotworowych zmniejsza ich przeżywalność i oporność na tamoxifen [107]. Badania na modelu oporności na tamoxifen, ujawniającej się w postaci zwiększonej liczby receptorów ER $\alpha$  umiejscowionych w cytoplazmie/błonie komórkowej oraz zwiększonej sygnalizacji cytoplazmatycznej, dowodzą, że zablokowanie kinazy c-Src przywracało hamujące działanie tamoxifenu na wzrost komórek nowotworowych oraz spadek ekspresji receptorów [24]. Aktywowany EGFR przez białka Grb2 i Sos oraz kaskadę Ras/Raf/MEK uaktywnia kinazy MAPK, a przez to fosforylację czynników transkrypcyjnych promujących proliferację, działa więc w podobny sposób jak estrogeny przez mER (ryc. 3) [24]. Podobnie jak w przypadku szlaku E2/mER może działać przez aktywację PI3K, Akt oraz aktywować czynnik STAT5 [93]. Koekspresja c-Src i EGFR powoduje nową fosforylację w domenie katalitycznej EGFR, która wprawdzie nie wpływa na aktywność katalityczną receptora, ale znacznie zwiększa proliferację, transformację oraz tworzenie zmiany nowotworowej w warunkach *in vivo* [8]. Można zatem przypuszczać, że podłoże oporności na inhibitory ER jest związane ze zwiększoną aktywnością układu GFR-c-Src oraz ER-c-Src. Można również zakładać, że proliferacyjne szlaki sygnałowe mER i EGFR mają wspólne ogniwa, które nie ograniczają się tylko do ścieżek MAPK i Akt oraz czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT [29]. Należy przyjąć, że proliferacyjne działanie estradiolu na komórki raka gruczołu sutkowego nie ogranicza się do sygnalizacji związanej z jego receptorami, ale występuje w związku z aktywnością wielu białek adaptorowych i czynników wzrostu. Aktywność i poziom tych cząsteczek często determinuje losy komórki i jej wrażliwość na leczenie przeciwnowotworowe. Zatem zrozumienie i odkrycie nowych mechanizmów wiążących sygnalizację estrogenów z innymi szlakami sygnałowymi w komórce może mieć przełomową rolę w ustalaniu skuteczniejszego leczenia nowotworów hormonozależnych.

### Działanie steroidów płciowych niezależne od receptorów

Oprócz klasycznego działania steroidów płciowych za pośrednictwem swoistych receptorów, indukcja sygnałów pochodzących od steroidów płciowych może się odbywać niejako pośrednio, gdy nośnikiem tej informacji nie jest swoisty receptor hormonu. Taki mechanizm opisano dla 17 $\beta$ -estradiolu (oraz androgenów), transportowanych we krwi wraz z cząsteczkami globuliny wiążącej hormony płciowe (SHBG). SHBG jest glikoproteiną osoczną, mającą duże powinowactwo do steroidów płciowych, regulującą ich biodostępność oraz wychwyt przez komórki docelowe. Jej wytwarzanie w wątrobie jest regulowane przez steroidy płciowe (estradiol pobudza, a testosteron je hamuje), wzrastając podczas przyjmowania antykoncepcji doustnej oraz osiągając niemal dziesięciokrotny wzrost w przebiegu

cięży [88]. Jednak szczególnie ważnym działaniem w omawianych mechanizmach działania steroidów płciowych jest jej zdolność do przekazywania komórce sygnału hormonalnego oraz modulacji szlaków sygnałowych estrogenu. W błonach komórkowych znajduje się swoisty receptor dla SHBG -  $R_{SHBG}$ , będący częścią szlaku transdukcji sygnału związanego z kaskadą cykazy adenylanowej i cAMP. SHBG może się wiązać ze swoim receptorem w błonie komórkowej tylko w postaci niezwiązanej z hormonem. Po związaniu z receptorem ma nadal równie duże powinowactwo do hormonu jak w postaci wolnej w osoczu [48]. W odróżnieniu od innych błonowych receptorów białek,  $R_{SHBG}$  do aktywacji i inicjacji sygnału wymaga nie tylko związania z SHBG, lecz również rekrutacji hormonu steroidowego do powstałego kompleksu SHBG- $R_{SHBG}$  [89]. Związanie się estradiolu do kompleksu SHBG- $R_{SHBG}$  uaktywnia cyklazę adenylanową i wytwarzanie cAMP. Badania przeprowadzone na modelach nowotworowych udowodniły, że aktywacja receptora  $R_{SHBG}$  hamowała proliferacyjne [27] i antyapoptotyczne [14] działanie estradiolu na komórki raka gruczołu sutkowego linii MCF-7. [27] Skutek ten, zapoczątkowany wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP i aktywacją kinazy białkowej A (PKA), osiągany był prawdopodobnie przez hamowanie szlaku MAPK zamiast kinazy MAP [28]. Jak przytacza autor; istnieją badania wskazujące, że aktywacja szlaku SHBG przeciwdziała wywołanej estradiolem aktywacji kinazy ERK (jednej z dróg szlaku MAPK kontrolującej proliferację komórki) [14] oraz że aktywacja kinazy ERK jest hamowana zarówno przez cAMP, jak i PKA [45], prowadząc do spadku ekspresji ER $\alpha$  [46]. Trzeba jednak pamiętać, że mechanizm ten opisano dla modelu nowotworowego, a więc na tej podstawie trudno ocenić, czy i w jaki sposób występuje on w warunkach fizjologicznych.

## PODSUMOWANIE

Steroidy płciowe są zaangażowane w regulację wielu podstawowych dla życia procesów w organizmie. Począwszy od poczęcia, rozwoju płodowego, przez pokwitanie i okres dojrzałości płciowej, a kończąc na starzeniu organizmu, są jednymi z głównych czynników regulujących podstawowe fizjologiczne aktywności zarówno na poziomie tkanek, jak i pojedynczych komórek. To właśnie poznanie mechanizmów działania steroidów płciowych na poziomie molekularnym ujawniło istnienie sieci ich wielopłaszczyznowych oddziaływań w komórce, za pośrednictwem których wywierają one właściwe działanie fizjologiczne. Przyjmując, że działanie 17 $\beta$ -estradiolu i progesteronu jest swoiste tkankowo, skutki ich działania będą zależeć w równej mierze od genetycznego ukierunkowania komórki, jak i stanu czynnościowego, w którym ona się znajduje. Zawsze jednak będzie to również wypadkowa sygnalizacji płynącej z otaczającej tkanki i całego ustroju. Zrozumienie złożoności tego zagadnienia, może stworzyć szansę na opracowanie skuteczniejszej terapii przeciwnowotworowej. Odkrycie i opisanie działania nienomowego steroidów pozwoliło zrozumieć wiele mechanizmów oporności na leczenie oraz stworzyło szansę na farmaceutyczną ingerencję w wiele nowych, komórkowych szlaków. Jest oczywiste, że jeszcze wiele aspektów działania steroidów płciowych pozostaje nieznanymi i wymaga dalszych badań. Opisanie interakcji między poszczególnymi szlakami sygnałowymi steroidów oraz ich powiązania z sygnalizacją indukowaną przez czynniki wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe uzmysławia, jak wiele aspektów działania steroidów płciowych wymaga jeszcze dokładnego zbadania.

## PİSMIENICTWO

- [1] Acconcia F., Ascenzi P., Bocedi A., Spisni E., Tomasi V., Trentalancia A., Visca P., Marino M.: Palmitoylation-dependent estrogen receptor  $\alpha$  membrane localization: regulation by 17 $\beta$ -estradiol. *Mol. Biol. Cell.*, 2005; 16: 231-237
- [2] Albanese C., Johnson J., Watanabe G., Eklund N., Vu D., Arnold A., Pestell R.G.: Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 23589-23597
- [3] Ascenzi P., Bocedi A., Marino M.: Structure-function relationship of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ : impact on human health. *Mol. Aspects Med.*, 2006; 27: 299-402
- [4] Beato M., Eisfeldt K.: Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res.*, 1997; 25: 3559-3563
- [5] Beato M., Klug J.: Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update*, 2000; 6: 225-236
- [6] Beyer C., Karolczak M.: Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *J. Neurosci. Res.*, 2000; 59: 107-116
- [7] Beyer C., Raab H.: Nongenomic effects of oestrogen: Embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *Eur. J. Neurosci.*, 1998; 10: 255-262
- [8] Biscardi J.S., Maa M.C., Tice D.A., Cox M.E., Leu T.H., Parsons S.J.: c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor

- receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 8335-8343
- [9] Bjornstrom L., Sjoberg M.: Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions. *Mol. Endocrinol.*, 2002; 16: 2202-2214
- [10] Bjornstrom L., Sjoberg M.: Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl. Recept.*, 2004; 2: 3
- [11] Brosens J.J., Tullet J., Varshochi R., Lam E.W.: Steroid receptor action. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 2004; 18: 265-283
- [12] Bunone G., Briand P.A., Miksicsek R.J., Picard D.: Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.*, 1996; 15: 2174-2183
- [13] Castoria G., Barone M. V., Di Domenico M., Bilancio A., Ametrano D., Migliaccio A., Auricchio F.: Non-transcriptional action of estrogen and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J.*, 1999; 18: 2500-2510
- [14] Catalano M.G., Frairia R., Boccuzzi G., Fortunati N.: Sex hormone-binding globulin antagonizes the antiapoptotic effect of estradiol in breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2005; 230: 31-37
- [15] Chambliss K.L., Yuhanna I.S., Anderson R.G., Mendelsohn M.E., Shaul P.W.: ER $\beta$  has non-genomic action in caveolae. *Mol. Endocrinol.*, 2002; 16: 938-946

- [16] Chang L., Karin M.: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 2001; 410: 37-40
- [17] Chen J.D., Evans R.M.: A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 1995; 377: 454-457
- [18] Di Croce L., Koop R., Venditti P., Westphal H.M., Nightingale K.P., Corona D.F., Becker P.B., Beato M.: Two-step synergism between the progesterone receptor and the DNA-binding domain of nuclear factor 1 on MMTV minichromosomes. *Mol. Cell*, 1999; 4: 45-54
- [19] Dinda S., Sanchez A., Moudgil V.: Estrogen-like effects of thyroid hormone on the regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, in breast cancer cells. *Oncogene*, 2002; 21: 761-768
- [20] Endoh H., Sasaki H., Maruyama K., Takeyama K., Waga I., Shimizu T., Kato S., Kawashima H.: Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 235: 99-102
- [21] Faivre E.J., Lange C.A.: Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2007; 27: 466-480
- [22] Falkenstein E., Norman A.W., Wehling M.: Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000; 85: 2072-2075
- [23] Falkenstein E., Tillmann H.C., Christ M., Feuring M., Wehling M.: Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.*, 2000; 52: 513-556
- [24] Fan P., Wang J., Santen R.J., Yue W.: Long-term treatment with tamoxifen facilitates translocation of estrogen receptor alpha out of the nucleus and enhances its interaction with EGFR in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, 2007; 67: 1352-1360
- [25] Figtree G.A., McDonald D., Watkins H., Channon K.M.: Truncated estrogen receptor  $\alpha$  46-kDa isoform in human endothelial cells: relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation*, 2003; 107: 120-126
- [26] Filardo E.J., Quinn J.A., Frackelton A.R.Jr., Bland K.I.: Estrogen action via the G protein coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol. Endocrinol.*, 2002; 16: 70-84
- [27] Fortunati N., Catalano M.G., Boccuzzi G., Frairia R.: Sex hormone-binding globulin (SHBG), estradiol and breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2010; 316: 86-92
- [28] Fortunati N., Fissore F., Fazzari A., Becchis M., Comba A., Catalano M.G., Berta L., Frairia R.: Sex steroid binding protein exerts a negative control on estradiol action in MCF-7 cells (human breast cancer) through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase A. *Endocrinology*, 1996; 137: 686-692
- [29] Fox E.M., Andrade J., Shupnik M.A.: Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids*, 2009; 74: 622-627
- [30] Fuller P.J.: The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *FASEB J.*, 1991; 5: 3092-3099
- [31] Furukawa T., Kurokawa J.: Regulation of cardiac ion channels via non-genomic action of sex steroid hormones: implication for the gender difference in cardiac arrhythmias. *Pharmacol. Ther.*, 2007; 115: 106-115
- [32] Garcia Dos Santos E., Dieudonne M.N., Pecquery R., Le Moal V., Giudicelli Y., Lacasa D.: Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinol.*, 2002; 143: 930-940
- [33] Gee J.M., Robertson J.F., Gutteridge E., Ellis I.O., Pinder S.E., Rubini M., Nicholson R.I.: Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signaling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2005; 12: S99-S111
- [34] Grosse B., Kachkache M., Le Mellay V., Lieberherr M.: Membrane signalling and progesterone in female and male osteoblasts. Involvement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , inositol trisphosphate, and diacylglycerol, but not cAMP. *J. Cell. Biochem.*, 2000; 79: 334-345
- [35] Guiochon-Mantel A., Lescop P., Christin-Maitre S., Loosfelt H., Perrot-Applanat M., Milgrom E.: Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.*, 1991; 10: 3851-3859
- [36] Harrison D.A., Carr D.W., Meizel S.: Involvement of protein kinase A and A kinase anchoring protein in the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction. *Biol. Reprod.*, 2000; 62: 811-820
- [37] Haynes M.P., Li L., Sinha D., Russell K.S., Hisamoto K., Baron R., Collinge M., Sessa W.C., Bender J.R.: Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 2118-2123
- [38] Helsen C., Kerkhofs S., Clinckemalie L., Spans L., Laurent M., Boonen S., Vanderschueren D., Claessens F.: Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2012; 348: 411-417
- [39] Hennessy B.A., Harvey B.J., Healy V.:  $17\beta$ -Estradiol rapidly stimulates c-fos expression via the MAPK pathway in T84 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2005; 229: 39-47
- [40] Hewitt S.C., Korach K.S.: Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction*, 2003; 125: 143-149
- [41] Hsieh Y.C., Frink M., Thobe B.M., Hsu J.T., Choudhry M.A., Schwacha M.G., Bland K.I., Chaudry I.H.:  $17\beta$ -estradiol downregulates Kupffer cell TLR4-dependent p38 MAPK pathway and normalizes inflammatory cytokine production following trauma-hemorrhage. *Mol. Immunol.*, 2007; 44: 2165-2172
- [42] Ing N.H., Beekman J.M., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W.: Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 17617-17623
- [43] Jakacka M., Ito M., Martinson F., Ishikawa T., Lee E.J., Jameson J.L.: An estrogen receptor (ER) $\alpha$  deoxyribonucleic acid-binding domain knock-in mutation provides evidence for nonclassical ER pathway signaling *in vivo*. *Mol. Endocrinol.*, 2002; 16: 2188-2201
- [44] Jensen E.V., Jacobson H.I., Walf A.A., Frye C.A.: Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches. *Physiol Behav.*, 2010; 99: 151-162
- [45] Jensen E.V., Suzuki T., Kawashima T., Stumpf W.E., Jungblut P.W., DeSombre E.R.: A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968; 59: 632-638
- [46] Kato S., Endoh H., Masuhiro Y., Kitamoto T., Uchiyama S., Sasaki H., Masushige S., Gotoh Y., Nishida E., Kawashima H., Metzger D., Chambon P.: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, 1995; 270: 1491-1494
- [47] Kelly M.J., Lagrange A.H., Wagner E.J., Ronnekleiv O.K.: Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. *Steroids*, 1999; 64: 64-75
- [48] Klein-Hitpass L., Schwerk C., Kahmann S., Vassen L.: Targets of activated steroid hormone receptors: basal transcription factors and receptor interacting proteins. *J. Mol. Med.*, 1998; 76: 490-496
- [49] Klinge C.M.: Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.*, 2001; 29: 2905-2919
- [50] Klinge C.M., Blankenship K.A., Risinger K.E., Bhatnagar S., Noisin E.L., Sumanasekera W.K., Zhao L., Brey D.M., Keynton R.S.: Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 7460-7468

- [51] Kousteni S., Bellido T., Plotkin L.I., O'Brien C.A., Bodenner D.L., Han L., Han K., DiGregorio G.B., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S., Roberson P.K., Weinstein R.S., Jilka R.L., Manolagas S.C.: Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors, dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 2001; 104: 719-730
- [52] Kousteni S., Han L., Chen J.R., Almeida M., Plotkin L.I., Bellido T., Manolagas S.C.: Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 1651-1664
- [53] Lange C.A.: Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008; 108: 203-212
- [54] Lange C.A.: Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol. Endocrinol.*, 2004; 18: 269-278
- [55] Le Mellay V., Grosse B., Lieberherr M.: Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 11902-11907
- [56] Levin E.R.: Cellular functions of the plasma membrane estrogen receptor. *Trends Endocrinol. Metab.*, 1999; 10: 374-377
- [57] Lu Q., Ebling H., Mittler J., Baur W.E., Karas R.H.: MAP kinase mediates growth factor-induced nuclear translocation of estrogen receptor alpha. *FEBS Lett.*, 2002; 516: 1-8
- [58] Luo M., Koh M., Feng J., Wu Q., Melamed P.: Cross talk in hormonally regulated gene transcription through induction of estrogen receptor ubiquitylation. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 7386-7398
- [59] Macedo L.F., Sabnis G., Brodie A.: Preclinical modeling of endocrine response and resistance: focus on aromatase inhibitors. *Cancer*, 2008; 112: 679-688
- [60] Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M.: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 1995; 83: 835-839
- [61] Martinez F., Tesarik J., Martin C.M., Soler A., Mendoza C.: Stimulation of tyrosine phosphorylation by progesterone and its 11-OH derivatives: Dissection of a Ca<sup>2+</sup>-dependent and a Ca<sup>2+</sup>-independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 255: 23-27
- [62] McKenna N.J., O'Malley B.W.: Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 2002; 108: 465-474
- [63] Migliaccio A., Castoria G., Auricchio F.: Src-dependent signalling pathway regulation by sex-steroid hormones: therapeutic implications. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39: 1343-1348
- [64] Migliaccio A., Di Domenico M., Castoria G., de Falco A., Bontempo P., Nola E., Auricchio F.: Tyrosine kinase/p21ras/MAPkinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.*, 1996; 15: 1292-1300
- [65] Migliaccio A., Piccolo D., Castoria G., Di Domenico M., Bilancio A., Lombardi M., Gong W., Beato M., Auricchio F.: Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.*, 1998; 17: 2008-2018
- [66] Morley P., Whitfield J.F., Vanderhyden B.C., Tsang B.K., Schwartz J.L.: A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology*, 1992; 131: 1305-1312
- [67] Morrill G.A., Kostellow A.B.: Progesterone induces meiotic division in the amphibian oocyte by releasing lipid second messengers from the plasma membrane. *Steroids*, 1999; 64: 157-167
- [68] Nakajima T., Kitazawa T., Hamada E., Hazama H., Omata M., Kurachi Y.: 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> currents in aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 1995; 294: 625-635
- [69] Neves S.R., Ram P.T., Iyengar R.: "G protein pathways". *Science*, 2002; 296: 1636-1639
- [70] Nuclear Receptors Nomenclature Committee: A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 1999; 97: 161-163
- [71] Oñate S.A., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W.: Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, 1995; 270: 1354-1357
- [72] O'Lone R., Frith M.C., Karlsson E.K., Hansen U.: Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.*, 2004; 18: 1859-1875
- [73] Osborne C.K., Schiff R.: Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast*, 2003; 12: 362-367
- [74] Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H.: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.*, 2001; 22: 153-183
- [75] Picotto G., Vazquez G., Boland R.: 17 $\beta$ -estradiol increases intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in rat enterocytes. Potential role of phospholipase C-dependent store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem. J.*, 1999; 339: 71-77
- [76] Pietras R.J., Szego C.M.: Partial purification and characterization of estrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem. J.*, 1980; 191: 743-760
- [77] Pike A.C., Brzozowski A.M., Hubbard R.E., Bonn T., Thorsell A.G., Engstrom O., Ljunggren J., Gustafsson J.A., Carlquist M.: Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J.*, 1999; 18: 4608-4618
- [78] Piña B., Brüggemeier U., Beato M.: Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell*, 1990; 60: 719-731
- [79] Powell E., Wang Y., Shapiro D.J., Xu W.: Differential requirements of Hsp90 and DNA for the formation of estrogen receptor homodimers and heterodimers. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 16125-16134
- [80] Pratt W.B., Toft D.O.: Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 1997; 18: 306-360
- [81] Proietti C., Salatino M., Rosembli C., Carnevale R., Pecci A., Kornbliht A.R., Molinolo A.A., Frahm I., Charreau E.H., Schillaci R., Elizalde P.V.: Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 4826-4840
- [82] Razandi M., Alton G., Pedram A., Ghonshani S., Webb P., Levin E.R.: Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 1633-1646
- [83] Razandi M., Pedram A., Levin E.R.: Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 38540-38546
- [84] Razandi M., Pedram A., Levin E.R.: Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol. Endocrinol.*, 2000; 14: 1434-1447
- [85] Revankar C.M., Cimino D.F., Sklar L.A., Arterburn J.B., Prossnitz E.R.: A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 2005; 307: 1625-1630
- [86] Richer J.K., Lange C.A., Manning N.G., Owen G., Powell R., Horwitz K.B.: Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 31317-31326

- [87] Riggins R.B., Thomas K.S., Ta H.Q., Wen J., Davis R.J., Schuh N.R., Donelan S.S., Owen K.A., Gibson M.A., Shupnik M.A., Silva C.M., Parsons S.J., Clarke R., Bouton A.H.: Physical and functional interactions between Cas and c-Src induce tamoxifen resistance of breast cancer cells through pathways involving epidermal growth factor receptor and signal transducer and activator of transcription 5b. *Cancer Res.*, 2006; 66: 7007-7015
- [88] Rosner W.: The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormonebinding globulin: recent advances. *Endocr. Rev.*, 1990; 11: 80-91
- [89] Rosner W., Hryb D.J., Khan M.S., Nakhla A.M., Romas N.A.: Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 1999; 69: 481-485
- [90] Russell K.S., Haynes M.P., Sinha D., Clerisme E., Bender J.R.: Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 5930-5935
- [91] Sentis S., Le Romancer M., Bianchin C., Rostan M.C., Corbo L.: Sumoylation of the estrogen receptor  $\alpha$  hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.*, 2005; 19: 2671-2684
- [92] Shen T., Horwitz K.B., Lange C.A.: Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogenactivated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 6122-6131
- [93] Silva C.M., Shupnik M.A.: Integration of steroid and growth factor pathways in breast cancer: focus on signal transducers and activators of transcription and their potential role in resistance. *Mol. Endocrinol.*, 2007; 21: 1499-1512
- [94] Simoncini T., Genazzani A.R.: Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur. J. Endocrinol.*, 2003; 148: 281-292
- [95] Simoncini T., Hafezi-Moghadam A., Brazil D.P., Ley K., Chin W.W., Liao J. K.: Interaction of ER with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, 2000; 407: 538-541
- [96] Singh S., Shaul P.W., Gupta P.D.: Conventional estrogen receptors are found in the plasma membrane of vaginal epithelial cells of the rat. *Steroids*, 2002; 67: 757-764
- [97] Smith C.L.: Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol. Reprod.*, 1998; 58: 627-632
- [98] Smith D.F., Toft D.O.: Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.*, 1993; 7: 4-11
- [99] Smith J.L., Kupchak B.R., Garitaonandia I., Hoang L.K., Maina A.S., Regalla L.M., Lyons T.J.: Heterologous expression of human mPR $\alpha$  and mPR $\beta$  in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids*, 2008; 73: 1160-1173
- [100] Spencer T.E., Jenster G., Burcin M.M., Allis C.D., Zhou J., Mizzen C.A., McKenna N.J., Onate S.A., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W.: Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 1997; 389: 194-198
- [101] Srivastava S., Weitzmann M.N., Cenci S., Ross F.P., Adler S., Pacifici R.: Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. *J. Clin. Invest.*, 1999; 104: 503-513
- [102] Stenoién D.L., Mancini M.G., Patel K., Allegretto E.A., Smith C.L., Mancini M.A.: Subnuclear trafficking of estrogen receptor- $\alpha$  and steroid receptor coactivator-1. *Mol. Endocrinol.*, 2000; 14: 518-534
- [103] Tesarik J., Mendoza C.: Nongenomic effects of 17  $\beta$ -estradiol on maturing human oocytes: Relationship to oocyte developmental potential. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995; 80: 1438-1443
- [104] Thomas P., Pang Y., Dong J., Groenen P., Kelder J., De Vlieg J., Zhu Y., Tubbs C.: Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterin membrane receptor-alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology*, 2007; 148: 705-718
- [105] Toran-Allerand C.D., Guan X., MacLusky N.J., Horvath T.L., Dianò S., Singh M., Connolly E.S.Jr, Nethrapalli I.S., Tinnikov A.A.: ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 8391-8401
- [106] Valverde M.A., Rojas P., Amigo J., Cosmelli D., Orio P., Bahamonde M.I., Mann G.E., Vergara C., Latorre R.: Acute activation of Maxi-K channels (*hSlo*) by estradiol binding to the  $\beta$  subunit. *Science*, 1999; 285: 1929-1931
- [107] van der Flier S., Brinkman A., Look M.P., Kok E.M., Meijer-van Gelder M.E., Klijn J.G., Dorssers L.C., Foekens J.A.: Bcar1/p130Cas protein and primary breast cancer: prognosis and response to tamoxifen treatment. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92: 120-127
- [108] Wade C.B., Dorsa D.M.: Estrogen activation of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*, 2003; 144: 832-838
- [109] Wang C., Shi X., Chen X., Wu H., Zhang H., Xie J., Yang X., Gou Z., Ye J.: 17- $\beta$ -estradiol inhibits hyperosmolarity-induced proinflammatory cytokine elevation via the p38 MAPK pathway in human corneal epithelial cells. *Mol. Vis.*, 2012; 18: 1115-1122
- [110] Watters J.J., Campbell J.S., Cunningham M.J., Krebs E.G., Dorsa D.M.: Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology*, 1997; 138: 4030-4033
- [111] Watters J.J., Dorsa D.M.: Transcriptional effects of estrogen on neuronal neurotensin gene expression involve cAMP/protein kinase A-dependent signaling mechanisms. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 6672-6680
- [112] Weigel N.L., Zhang Y.: Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J. Mol. Med.*, 1998; 76: 469-479
- [113] White R.E., Darkow D.J., Lang J.L.: Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ. Res.*, 1995; 77: 936-942
- [114] Wierman M.E.: Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Adv. Physiol. Educ.*, 2007; 31: 26-33
- [115] Xu Y., Traystman R.J., Hurn P.D., Wang M.M.: Membrane restraint of estrogen receptor alpha enhances estrogen-dependent nuclear localization and genomic function. *Mol. Endocrinol.*, 2004; 18: 86-96
- [116] Yeatman T.: A renaissance for Src. *Nat. Rev.*, 2004; 4: 470-480
- [117] Yue W., Wang J.P., Conaway M., Masamura S., Li Y., Santen R.J.: Activation of the MAPK pathway enhances sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to the mitogenic effect of estradiol. *Endocrinol.*, 2002; 143: 3221-3229
- [118] Zhang D., Trudeau V.L.: Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 2006; 144: 306-315
- [119] Zhu W., Smart E.J.: Caveolae, estrogen and nitric oxide. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2003; 14: 114-117
- [120] Zhu Y., Bond J., Thomas P.: Identification, classification and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 2237-2242

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.