

Aromataza cytochromu P450 – kluczowy enzym syntezy estrogenów

INGA KOWALEWSKA-ŁUCZAK, MAREK KMIEĆ, ARKADIUSZ TERMAN

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR,
ul. Doktora Judyńca 6, 71-460 Szczecin

Kowalewska-Łuczak I., Kmieć M., Terman A.

Aromatase cytochrome P450 – the key enzyme of estrogen synthesis

Summary

The synthesis of estrogens from androgens is catalyzed by an enzyme complex called aromatase, and therefore has a unique potential to influence the physiological balance between the sex steroid hormones. This enzyme complex consists of two components: aromatase cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. Aromatase is conserved amongst all vertebrates and mammals in particular. It is a member of the cytochrome P450 super-family of enzymes. Within this, aromatase cytochrome P450 is presently the sole member of family 19, and is encoded by the gene known as CYP19 which contains a number of tissue-specific promoters that direct aromatase expression in different tissues via alternative splicing. A number of tissues in mammals have the capacity to express aromatase. These include the ovaries and testes, the placenta, adipose tissue, osteoblasts of bone, vasculature smooth muscle, and numerous sites in the brain.

Keywords: aromatase, enzyme

Biosynteza estrogenów zachodzi u wszystkich kręgowców, zarówno u ssaków, ptaków, gadów, płazów, jak i u ryb kostno- i chrzęstnoszkieletowych. Co ciekawe, proces syntezy estrogenów odnotowano nawet u lancetnika, natomiast nie stwierdzono tego procesu u zwierząt bezkręgowych. U wielu gatunków zwierząt synteza estrogenów w mózgu jest włączona w regulację zachowań zależnych od płci, np. karmienie, oraz często wyznacza dymorfizm płciowy, np. śpiew samców ptaków podczas godów. Kluczowym enzymem odpowiedzialnym za syntezę estrogenów jest aromataza.

Aromataza (EC 1.14.14.1), zwana także syntetazą estrogenową, jest kompleksem enzymatycznym odpowiedzialnym za katalizowanie syntezy estrogenów. Kompleks ten, o masie cząsteczkowej 58,09 kDa, składa się z dwóch białek. Jednym z nich jest specyficzna hemoglikoproteina, aromataza cytochromu P450 (monooksygenaza), drugim białkiem jest niespecyficzna mikrosomalna reduktaza flawoproteinowa (reduktaza NADPH cytochromu P450) (33). Aromataza cytochromu P450 jest odpowiedzialna za przyłączanie substratu i katalizowanie reakcji prowadzących do utworzenia fenolowego pierścienia A, charakterystycznego dla estrogenów, natomiast reduktaza odpowiada za przeniesienie elektronów z NADPH na cytochrom P450 (3).

Sekwencja aminokwasowa aromatazy cytochromu P450, która składa się z 503 aminokwasów (11), jest konserwatywna u zbadanych dotąd gatunków zwierząt. Stwierdzono wysoki stopień homologii pod tym wzglę-

dem u ludzi i bydła – 86%. Podobieństwo pod względem sekwencji aminokwasowej aromatazy cytochromu P450 u myszy, szczurów, drobiu i pstrągów w stosunku do sekwencji aromatazy u ludzi wynosi, odpowiednio: 81%, 77%, 73% i 52% (22). Natomiast stopień homologii pomiędzy kozami, owcami, bydłem, świniami, końmi, małpami (makakami) i ludźmi przedstawiono w tabeli 1 (6). Aromataza należy do nadrodziny cytochromu P450 (21), która jest bardzo liczna i należy do niej około 480 członków skupionych w 74 rodzinach, z których aromataza jest jedynym przedstawicielem rodziny 19 (8). Nazwa rodziny pochodzi od węgla C19 steroidu, z którym związana jest grupa metylowa, która jako pierwsza ulega hydroksylacji w procesie syntezy estrogenów (33).

Większość wiadomości o katalitycznej funkcji aromatazy zostało określone podczas badań nad tym enzymem u ludzi. Cytochrom P450 przyłącza cząsteczki

Tab. 1. Stopień (%) homologii sekwencji aminokwasowej pomiędzy wybranymi gatunkami zwierząt

%	Kozy	Owce	Bydło	Świnie	Konie	Małpy
Owce	100					
Bydło	98,0	98,0				
Świnie	87,1	87,1	86,3			
Konie	78,5	78,5	78,3	81,5		
Małpy	84,3	84,3	84,3	80,5	78,9	
Ludzie	83,7	83,7	83,9	80,9	78,3	97,4

tlenu do substratów poprzez reakcje, które są uzależnione od skutecznego przeniesienia elektronu z cząsteczki donora. Proces prowadzący do aromatyzacji androgenów jest złożony i wymaga przeniesienia trzech par elektronów, wykorzystując trzy mole tlenu i trzy mole zredukowanego NADPH do syntezy jednego mola estrogenu.

Reakcja powoduje dwie kolejne hydroksylacje grupy metylowej związanej z węglem C19 (poprzez działanie 19-hydroksylazy) substratu i powstają pośrednie pochodne, w których w grupie związanej z węglem C19 zaszła reakcja hydroksylacji i oksydacji. Trzecia reakcja oksydacji prowadzi do rozszczepienia grupy metylowej związanej z węglem C19 i aromatyzacji pierścienia A steroidu (26). Androstenodion i testosteron są dobrze poznanymi i prawdopodobnie najważniejszymi fizjologicznie substratami reakcji aromatyzacji. Natomiast 16-hydroksy-androstenodion, powstający w wątrobie podczas hydroksylacji siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEAS) pochodzącego z nadnerczy płodu, jest dodatkowym substratem wykorzystywanym w łożysku do syntezy estrioli podczas ciąży u kobiet oraz niektórych naczelnych. Co więcej, aromatyzacja nie zawsze jest kompletna. Pośrednie pochodne 19-hydroksy i 19-oksy-androstenodion i testosteron są uwalniane podczas metabolizowania androgenów przez aromatazę i są dodatkowymi produktami reakcji w niektórych tkankach i komórkach (26).

Aromataza cytochromu P450 jest produktem genu CYP19. Gen ten zmapowano w chromosomie 15 ludzi (9), jak również w chromosomie 10 kóz, w chromosomie 7 owiec (16), w chromosomie 10 bydła (17), w chromosomie 1 świń (10) i w chromosomie 9 myszy (36).

Stopień homologii sekwencji nukleotydowej genu aromatazy kóz, owiec, bydła, świń, koni, małp i ludzi przedstawia tabela 2 (6).

U ludzi gen kodujący aromatazę cytochromu P450 (gen CYP19) składa się z dziewięciu eksonów (eksony od II do X) rozdzielonych intronami. Ekspresja genu jest regulowana przez osiem tkankowo specyficznych alternatywnych regionów promotorowych. Każdy z tych promotorów jest połączony ze specyficzną sekwencją nie ulegającą translacji (5'UTR), zwaną też eksonem I (28). Region promotorowy II wraz z regionem promotorowym I.3 są odpowiedzialne za ekspresję aromatazy w jajnikach (23) i jądrach (7), promotor I.4 wraz z promotorem I.3 odpowiadają za ekspresję genu CYP19 w tkance tłuszczowej (27), natomiast promotor I.1 jest głównym promotorem odpowiedzialnym za aktywność aromatazy w łożysku (28).

Wszystkie nie ulegające translacji eksony są składowane w tym samym miejscu w pewnej odległości od miejsca startu translacji, które znajduje się w eksonie II. W konsekwencji, otwarta ramka odczytu sekwencji kodującej, zaczynająca się trzema nukleotydami, ATG, w pozycji 39 końca 5', a zakończona kodonem TAG, jest identyczna w każdym przypadku. Dlatego

Tab. 2. Stopień (%) homologii sekwencji nukleotydowej genu aromatazy wybranych gatunków

%	Kozy	Owce	Bydło	Świnie	Konie	Małpy
Owce	99,9					
Bydło	95,0	96,3				
Świnie	90,4	90,3	90,2			
Konie	76,3	84,9	74,8	83,5		
Małpy	60,1	86,0	59,0	84,7	72,0	
Ludzie	80,6	86,0	79,9	85,2	74,5	82,8

też powstające białko ma zawsze identyczną budowę i wielkość (503 aminokwasy) (12).

Taka tkankowo-specyficzna ekspresja genu aromatazy zachodząca pod kontrolą różnych promotorów występuje u większości gatunków ssaków. Sześć dystalnych promotorów zidentyfikowano u owiec (35), a pięć u bydła (15). U szczurów i myszy występuje jeden gen i kilka alternatywnych promotorów (32), natomiast u gatunków takich, jak np. świnie (13) istnieje kilka izoform genu kodującego aromatazę.

Aromataza cytochromu P450 zlokalizowana jest w siateczce wewnątrzplazmatycznej gładkiej w większości komórek zwierząt. Ekspresję genu aromatazy wykryto u ludzi w komórkach ziarnistych jajników (29), ciałku żółtym (5), łożysku (33), komórkach Sertoliego (4) i komórkach Leydiga (34) oraz w wielu miejscach poza gonadami – w tkance tłuszczowej (1), w mózgu (18), skórze (31), wątrobie (19), kościach (30) i naczyniach krwionośnych (20).

U zwierząt ekspresję aromatazy wykryto w tych samych miejscach. Jednakże zdolność łożyska do syntezy estrogenu jest właściwa dla naczelnych i licznych gatunków zwierząt kopytnych, takich jak bydło, owce, świnie, konie (2, 13, 25, 35, 37). Łożysko gryzoni (myszy i szczury) nie ma zdolności do syntezy androgenów (32).

Aromataza cytochromu P450 obecna w jajnikach i łożysku uczestniczy w regulacji funkcji reprodukcyjnych. Natomiast obecność aromatazy w pozagonadalnych tkankach sugeruje, że estrogen powstający dzięki temu enzymowi pełni fizjologiczną funkcję nie tylko hormonu steroidowego, lecz także odgrywa rolę we wzroście i różnicowaniu.

Podczas badań prowadzonych na myszach z unieczynnionym genem aromatazy (aromatase-knockout, ArKO) wykazano liczne anomalie układu rozrodczego, jak i tkanki tłuszczowej spowodowane brakiem aromatazy. Samice myszy ArKO wykazywały niedorozwój zewnętrznych genitaliów i macicy, natomiast zrąb jajnika był hiperplastyczny o budowie charakterystycznej dla zrosniętych pęcherzyków. Rozwój gruczołów mlekowych zbliżał się do takiego, jaki występuje w okresie przedpokwitania samic. Natomiast samce myszy ArKO cechowały się normalną anatomią genitaliów, lecz gruczoły płciowe były powiększone (14). U myszy ArKO, zarówno u samców, jak i samic

wykazano akumulację wewnątrzbrzuszej tkanki tłuszczowej. Obserwowano również wzrost objętości adipocytów w gonadach i w okolicach nerek (24). Aromataza cytochromu P450 jest wyjątkowym członkiem nadrodziny cytochromu P450. Ze względu na swoją rolę w syntezie estrogenów enzym ten może mieć zarówno ledwo uchwytne, jak i duży wpływ na proces reprodukcji. Dlatego też potrzebne są dalsze badania tego ważnego enzymu prowadzące do zrozumienia roli, jaką odgrywa w organizmie.

Piśmiennictwo

1. Agarwal V. R., Ashanullah C. I., Simpson E. R., Bulun S. E.: Alternatively spliced transcripts of the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in adipose tissue of women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, 82, 70-74.
2. Almadhidi J., Moslemi S., Drosowsky M. A., Seralini G. A.: Equine cytochrome P450 aromatase exhibits an estrogen 2-hydroxylase activity in vitro. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1996, 59, 55-61.
3. Amarenh B. A., Simpson E. R.: Detection of aromatase cytochrome P450, 17 α -hydroxylase cytochrome and NADPH:P450 reductase on the surface of cells in which they are expressed. *Mol. Cell Endocrinol.* 1996, 119, 69-74.
4. Andó S., Sirianni R., Forastieri P., Casaburi I., Lanzino M., Rago V., Giordano F., Giordano C., Carpino A., Pezzi V.: Aromatase expression in prepubertal Sertoli cells: effect of thyroid hormone. *Mol. Cell Endocrinol.* 2001, 178, 11-21.
5. Benyo D. F., Little-Ihrig L., Zeleznik A. J.: Noncoordinated expression of luteal cell messenger ribonucleic acids during human chorionic gonadotropin stimulation of the primate corpus luteum. *Endocrinology* 1993, 133, 699-704.
6. Bobes R. J., Miranda C., Pérez-Martínez M., Luu-The V., Romano M. C.: Isolation and characterization of goat ovarian aromatase cDNA: assessment of the activity using an intact cell system and placental expression. *Theriogenology* 2004, 62, 532-543.
7. Carreau S., Bourguiba S., Lambard S., Silandre D., Delalande C.: The promoter(s) of the aromatase gene in male testicular cells. *Reprod. Biol.* 2004, 4, 23-34.
8. Chang G. W. M., Kam P. C. A.: The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes. *Anesthesia* 1999, 54, 42-50.
9. Chen S., Zhang F., Sherman M. A., Kijima I., Choa M., Yuan Y., Tomab Y., Osawa Y., Zhoua D., Enga E. T.: Structure-function studies of aromatase and its inhibitors: a progress report. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003, 86, 231-237.
10. Conley A., Corbin C. J., Smith T., Hinshelwood M., Liu Z., Simpson E.: Porcine aromatases: studies on tissue-specific, functionally distinct isozymes from a single gene? *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1997, 61, 407-413.
11. Conley A., Hinshelwood M.: Mammalian aromatases. *Reproduction* 2001, 121, 685-695.
12. Corbin C. J., Graham-Lorence S., McPhaul M., Mason J. I., Mendelson C. R., Simpson E. R.: Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 8948-8952.
13. Corbin C. J., Khalil M. W., Conley A. J.: Functional ovarian and placental isoforms of porcine aromatase. *Mol. Cell Endocrinol.* 1995, 113, 29-37.
14. Fisher C. R., Graves K. H., Parlow A. F., Simpson E. R.: Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of target disruption of the cyp19 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95, 6965-6970.
15. Fürbass R., Kalbe C., Vanselow J.: Tissue-specific expression of the bovine aromatase-encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exons. *Endocrinology* 1997, 138, 2813-2819.
16. Goldamer T., Brunner R. M., Vanselow J., Zsolnai A., Fürbass R., Schwerin M.: Assignment of the bovine aromatase encoding gene CYP19 to 10q26 in goat and 7q24-q31 in sheep. *Cytogenet. Cell Genet.* 1999, 85, 258-259.
17. Goldammer T., Guérin G., Brunner R. M., Vanselow J., Fürbass R., Schwerin M.: Chromosomal mapping of the bovine aromatase gene (CYP19) and an aromatase pseudogene to Chromosome 10 and syntenic group U5. *Mamm. Genome.* 1994, 5, 822-823.
18. Hahn E. F., Miyairi S., Fishman J.: 19-Hydroxylation of androgens in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 2728-2730.
19. Harada N., Ota H., Yoshimura N., Katsuyama T., Takagi Y.: Localized aberrant expression of cytochrome P450 aromatase in primary and metastatic malignant tumors of human liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998, 83, 697-702.
20. Harada N., Sasano H., Murakami H., Ohkuma T., Nagura H., Takagi Y.: Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ. Res.* 1999, 84, 1285-1291.
21. Harada N.: Cloning of a complete cDNA encoding human aromatase: immunochemical identification and sequence analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 156, 725-732.
22. Hinshelwood M. M., Corbin C. J., Tsang P. C. W., Simpson E. R.: Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology* 1993, 133, 1971-1977.
23. Jenkins C., Michael D., Mahendroo M., Simpson E.: Exon-specific northern analysis and rapid amplification of cDNA ends (RACE) reveal that the proximal promoter II (PII) is responsible for aromatase cytochrome P450 (CYP19) expression in human ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1993, 97, R1-R6.
24. Jones M. E. E., Thorburn A. W., Britt K. L., Hewitt K. N., Wreford N. G., Proietto J., Oz O. K., Leury B. J., Robertson K. M., Yao S., Simpson E. R.: Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000, 97, 12735-12740.
25. Kao Y.-C., Higashiyama T., Sun X., Okubo T., Yarborough C., Choi I., Osawa Y., Simmen F. A., Chen S.: Catalytic differences between porcine blastocyst and placental aromatase isozymes. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 6134-6139.
26. Lewis D. F. V., Lee-Robichaud P.: Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998, 66, 217-233.
27. Mahendroo M. S., Mendelson C. R., Simpson E. R.: Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 19463-19470.
28. Means G. D., Mahendroo M. S., Corbin C. J., Mathis J. M., Powell F. E., Mendelson C. R., Simpson E. R.: Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 19385-19391.
29. Okubo T., Mok S. C., Chen S.: Regulation of aromatase expression in human ovarian surface epithelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, 85, 4889-4899.
30. Purohit A., Flanagan A. M., Reed M. J.: Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *Endocrinology* 1992, 131, 2027-2029.
31. Sebastian S., Takayama K., Shozu M., Bulun S. E.: Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of the human CYP19 (aromatase P450) gene that is up-regulated in breast cancer tissue. *Mol. Endocrinol.* 2002, 16, 2243-2254.
32. Simpson E. R., Michael M. D., Agarwal V. R., Hinshelwood M. M., Bulun S. E., Zhao Y.: Expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage. *FASEB Journal* 1997, 11, 29-36.
33. Thompson E. A. Jr., Süiteri P. K.: The involvement of human placental microsomal cytochrome P450 in aromatization. *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 373-378.
34. Valladares L. E., Payne A. H.: Acute stimulation of aromatization in Leydig cells by human chorionic gonadotropin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 4460-4463.
35. Vanselow J., Zsolnai A., Fésüs L., Fürbass R., Schwerin M.: Placenta-specific transcripts of the aromatase encoding gene include different untranslated first exons in sheep and cattle. *Eur. J. Biochem.* 1999, 265, 318-324.
36. Youngblood G. L., Nesbitt M. N., Payne A. H.: The structural genes encoding P450scc and P450arom are closely linked on mouse chromosome 9. *Endocrinology* 1989, 125, 2784-2786.
37. Zsolnai A., Anton I., Fésüs L., Estonba A., Schwerin M., Vanselow J.: Allele distributions of two novel within the sheep Cyp19 gene. *J. Anim. Breed. Genet.* 2002, 119, 402-405.

Adres autora: dr Inga Kowalewska-Łuczak, ul. Doktora Judyma 6, 71-460 Szczecin; e-mail: I.Kowalewska@biot.ar.szczecin.pl