

„Rozmowa receptorów” ER – AhR i epigenetyczna pamięć.

Mechanizm adaptacyjny czy wzrost toksyczności środowiskowych zanieczyszczeń?

Maria Kapiszewska^{1*}

Streszczenie

Wiedza na temat szkodliwości związków chemicznych zawartych we wdychanym powietrzu a także innych ksenobiotyków środowiskowych jest coraz szersza. Skutkuje to wprowadzeniem regulacji prawnych wymuszających ograniczanie emisji zanieczyszczeń do środowiska. Szkodliwość zdrowotną zanieczyszczeń potwierdzają zarówno badania epidemiologiczne, jak i badania laboratoryjne. Bardzo często konsekwencje tego wpływu obserwujemy dopiero po latach. Najlepszym tego przykładem jest wzrost ryzyka chorób dróg oddechowych, będących bezpośrednim efektem narażenia na wysokie stężenia zanieczyszczeń w powietrzu, ale także chorób chronicznych, których ryzyko wydaje się odzwierciedlać wpływ środowiska w okresie płodowym. Do niedawna głównym obszarem badań była ocena wielkości tego ryzyka na podstawie statystycznych analiz zależności przyczynowo-skutkowych. Szybki rozwój biologii molekularnej spowodował, że skoncentrowano się także na zmianach, jakie zanieczyszczenia indukują w szlakach metabolicznych i procesach sygnalizacyjnych w komórce. Pozwoliło to dostrzec nie tylko negatywne skutki zanieczyszczeń, ale także pewne korzystne efekty wynikające z uruchomienia przez organizm procesów adaptacyjnych. Najwięcej uwagi poświęca się interakcji między receptorami aktywowanymi przez zanieczyszczenia środowiska (AhR), a receptorami estrogenowymi (ER) i skutkom, jakie ta „rozmowa receptorów” (ang. *cross-talk*) wywołuje w ekspresji genów docelowych dla tych receptorów. Zanieczyszczenia środowiska mogą wywoływać zmiany w ekspresji genów zaburzając mechanizm dziedziczenia pozagenowego, zwanego dziedziczeniem epigenetycznym. Zmiany te – jeśli wystąpią w bardzo wczesnym okresie życia płodowego – mogą utrzymywać się w kolejnych pokoleniach, dzięki nośnikom pamięci genetycznej, jaką jest np. metylacja DNA. W zależności od tego, w których genach dochodzi do wyciszenia ekspresji, zjawisko to może wpływać na biologiczne funkcje organizmu, zwiększając przystosowanie do zmieniającego się środowiska, ale może także zwiększać wrażliwość na rozwój chorób chronicznych w życiu dorosłym, ustanawiając pewien wzór ekspresji genów na etapie rozwoju zarodkowego.

Słowa kluczowe: zanieczyszczenia środowiska, węglowodorowy receptor arylowy, AhR, receptor estrogenowy, ER, procesy epigenetyczne, metylacja DNA

* Rozdział został sfinansowany w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N N303 2403 33.
1 – Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego.

ER – AhR “receptor cross-talk” and epigenetic memory. Adaptive mechanism vs. the increase in toxicity of environmental pollutants

Abstract:

Knowledge of the harmful effect of air pollution and other environmental xenobiotics is getting broader. This leads to the introduction of mandatory legal regulations limiting the emission of pollutants into the environment. Health harmfulness of pollution is confirmed by both epidemiological and laboratory studies. The consequences of this harmful effect is not only observed almost immediately after the exposure but also after many years. The best example is an increase in the risk of respiratory symptoms which constitute a direct effect of the exposure to high concentration of air pollutants. Chronic conditions occur in adult life can also be caused by the exposure experience during the fetal growth or perinatal period. Until recently, the main area of study was to assess the magnitude of this risk by using statistical analysis. The rapid development of molecular biology allows to focus on the changes that environmental pollution induces in the metabolic pathways and signaling processes in the cell. Therefore, it becomes possible to see not only the harmful effects of pollution, but also certain beneficial effects resulting from the induction of adaptive processes in the body. Most attention is paid to the interaction between the receptors activated by environmental pollution (AhR) and estrogen receptors (ER). The effects of this „cross-talk” between receptors influence the expression of their target genes. Environmental exposure can also influence the gene expression profile due to epigenetic mechanism. These changes if they occur very early in fetal life, may persist in subsequent generations through genetic memory kept by the DNA methylation pattern. This phenomenon can affect the biological functions by increasing adaptation to the environment fluctuation or enhancing susceptibility to the development of chronic diseases in adult life.

Key words: environmental pollution, aryl hydrocarbon receptor, AhR, estrogen receptor, ER, epigenetic processes, DNA methylation

Wprowadzenie

Mechanizmy odpowiedzialne za zaburzenia rozwoju płodu, wyrażające się spadkiem masy urodzeniowej są przedmiotem badań tak endokrynologów, immunologów, bromatologów, jak i toksykologów. Ci ostatni analizują zmiany, jakie zanieczyszczenia środowiska wprowadzają w szlaki metaboliczne. Zainteresowanie wielu ośrodków naukowych budzi zjawisko interakcji, w jakie wchodzi związek zanieczyszczające środowisko, w tym wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), czy polichlorowane bifenyle (PCB), czy dibenzodioksyny ze szlakami metabolicznymi hormonów płciowych (Beischlag & Perdew, 2005; DuSell et al., 2010; Matthews & Gustafsson, 2006). Zanieczyszczenia te, zwane także ksenobiotykami występują w środowisku od milionów lat, chociaż ich stężenie w związku z rozwojem przemysłu czy rosnącym stężeniem spalin samochodowych w ostatnich 100 latach znacznie wzrosło. Ich szkodliwość wymusiła w organizmach rozwój coraz skuteczniejszych mechanizmów adaptacyjnych,

a ewolucyjne mechanizmy najskuteczniejszego ich usuwania są strategią organizmów doskonałą przez pokolenia (Gerber et al., 1999). O mechanizmach tych wiemy jednak ciągle zbyt mało.

Monitorowanie obecności takich zanieczyszczeń oraz uruchomienie ich metabolizowania wymaga istnienia struktur komórkowych, które potrafiłyby je zidentyfikować, ale także sygnalizowały zagrożenia do układu odpowiedzialnego za rozmnażanie. Im większa zdolność adaptacyjna organizmu, tym lepsze dostosowanie do warunków panujących w środowisku, sprzyjające pozostawieniu większej liczby potomstwa. Przeżycie i rozmnażanie są bowiem priorytetem ewolucyjnym. Zanieczyszczenia zagrażające prawidłowemu rozwojowi płodu stanowią presję selekcyjną, w skrajnych przypadkach prowadząc do spontanicznych poronień, upośledzając zdolności reprodukcyjne. Podobnie, jak podczas monitorowania metabolicznych zmian w środowisku endogennym, za monitorowanie i sygnalizację środowiska zewnętrznego odpowiadają receptory. To one łącząc się z ksenobiotykiem uruchamiają cały proces metaboliczny mający chronić komórki, tkanki, organy i w końcu zapewnić całemu organizmowi optymalne funkcjonowanie. Szczególne znaczenie ma to podczas rozwoju płodu (Gluckman et al., 2007).

Niesprzyjające optymalnemu rozwojowi płodu środowisko wpływa na niską masę urodzeniową, która najczęściej jest jedynie zapowiedzią zwiększonego ryzyka rozwoju chorób chronicznych w późniejszym wieku (rozdział Merklinger i Kapiszewska). Zależność taka może oznaczać, że interakcja pomiędzy gospodarką hormonalną – zapewniającą prawidłowy rozwój płodu, a metabolizmem ksenobiotyków wpływa na zmiany fenotypu w wyniku na przykład aktywacji bądź wyciszeniu genów docelowych. Obydwa szlaki metaboliczne aktywowane są poprzez przyłączenie cząsteczki sygnałowej do receptora, który w ten sposób ulega aktywacji. Współzależność pomiędzy szlakami metabolicznymi aktywowanymi przez przyłączenie się ksenobiotyku do receptora AhR, bądź 17β -estradiolu (E2) do receptora ER, zwana także „rozmową receptorów” lub transaktywacją, może całkowicie zmienić szlak transdukcji sygnału, prowadząc do trudnych do przewidzenia konsekwencji. Na podstawie obserwacji, że aktywowany AhR prowadzi do degradacji ER, tym samym hamując transkrypcję ER-zależnych genów, opracowuje się nowe strategie w leczeniu nowotworów piersi.

Innym mechanizmem modulującym ekspresję genów i odgrywającym ważną rolę w prawidłowym rozwoju płodu, a także w kondycji zdrowotnej w życiu dorosłym są cyklicznie występujące zmiany w metylacji DNA. Metylacja DNA determinuje dziedziczenie pozagenowe, nazywane epigenetycznym, a także współuczestniczy w procesach adaptacyjnych, wymuszanych przez zmiany w środowisku. Zaburzenia w jej przebiegu mogą także być przyczyną wzrostu ryzyka rozwoju estrogenozależnych nowotworów piersi. Badania z ostatnich lat wskazują na udział epigenetycznej regulacji w ekspresji ER α -zależnych genów (DuSell et al., 2010; Leu et al., 2004).

Szczególnie zmiany w profilu metylacji DNA w promotorowych obszarach bogatych w CpG, modyfikując strukturę chromatyny, a tym samym blokując dostęp czynnikom transkrypcyjnym, wyciszają transkrypcje genów. Wyniki badań prowadzonych w miastach o dużym natężeniu ruchu ulicznego wskazują, że za zmiany w metylacji DNA może być odpowiedzialna zmiana w puli dostępnych grup metylowych (Baccarelli et al., 2009) sugerując, że podawanie kwasu foliowego może przeciwdziałać szkodliwym skutkom zanieczyszczeń środowiskowych.

W obydwu mechanizmach, na których przebieg wpływ mają czynniki środowiskowe, zmiany w ekspresji genów będą decydowały tak o bezpośredniej, jak i o odległej czasowo odpowiedzi organizmu, determinując jego kondycję zdrowotną i kondycję kolejnego pokolenia, jeśli do narażenia na zanieczyszczenia doszło w okresie życia płodowego.

Udział receptorów AhR i ER w metabolizmie ksenobiotyków i 17 β -estradiolu

Podobieństwo w strukturze chemicznej dioksyn (TCDD), należących do endokrynnych środowiskowych związków rozprzęgających (ang. *endocrine – disrupting chemicals* EDC), czy WWA do struktury hormonów sterydowych – powoduje, że odgrywają one rolę w zaburzeniach funkcji układu rozrodczego, płodności, a także wpływa na wzrost ryzyka zachorowania na nowotwory tego układu (Abbott et al., 1999). WWA stanowią jeden z najczęściej badanych zanieczyszczeń środowiska jako składnik pyłów (ang. *particulate matter*; PM) i generowane są przez spaliny samochodowe, dym papierosowy i wszędzie tam, gdzie dochodzi do niecałkowitego spalania wszystkich węglowodorów. Zawierają one ponad 200 związków o różnej toksyczności, z których benzo[α]piren jest silnym kancerogenem, mającym zdolności przenikania przez łożysko, będąc tym samym ogromnym zagrożeniem dla rozwoju płodu (Mayhew, 2009; Veras et al., 2008). Większość tych hydrofobowych związków po dyfuzji przez błonę komórkową ulega utlenieniu w komórce, stając się związkami hydrofilnymi, znacznie łatwiejszymi do wydalenia z organizmu. Ten szlak metaboliczny uruchamiany jest dzięki przyłączeniu się ksenobiotyków do AhR należącego do klasy receptorów jądrowych, podobnie jak receptory estrogenowe (ER) (Matthews & Gustafsson, 2006). Ksenobiotyki zatem pełnią rolę liganda, cząsteczek sygnałowych, które aktywując receptor czynią go czynnikiem transkrypcyjnym, aktywującym ekspresję genów docelowych po wiązaniu się receptora do specyficznej sekwencji DNA, XRE (ang. *xenobiotic response element*), znajdującej się często w promotorowym obszarze genów odpowiedzialnych za produkcję enzymów metabolizujących ksenobiotyki z rodziny cytochromów P450.

Receptor AhR, kodowany przez gen z superrodziny bHLH-PAS, noszący także nazwę „receptora dioksyn” czy „receptora węglowodorów aromatycznych” należy do najlepiej poznanych i równocześnie najstarszych ewolucyjnie białek obecnych już u wczesnych bezkręgowców (Hahn et al., 2009). U bezkręgowców, w przeciwieństwie do kręgowców, receptor ten nie wiąże dioksyn i związków o podobnej strukturze chemicznej. Może to wskazywać, że jego adaptacyjna rola jest ewolucyjną innowacją w stosunku do pierwotnej roli, jaką wydaje się odgrywał w rozwoju na przykład sensorycznych struktur, neuronów czy w utrzymaniu homeostazy organizmu (Hahn, 2002; Hahn et al., 2006). U ssaków gen AhR, kodujący receptor, ma kluczową rolę w rozwoju, reprodukcji i funkcji immunologicznej (Baba et al., 2005). Bierze on także udział w regulacji produkcji estradiolu w jajnikach poprzez regulację transkrypcji genu CYP19. Ekspresję genu CYP19 indukują ksenobiotyki, takie jak 7,2-dimetylobenzeno[a]antracen (DMBA) czy TCDD aktywując AhR, co z kolei prowadzi do nieplanowanej syntezy E2. Przyłączenie liganda (np. dioksyn lub WWA) do receptora AhR wymusza odłączenie zasocjowanych z nim białek opiekuńczych typu HSP90 (HSP90 chaperon) oraz białka fuzyjnego XAP2 (XAP2 fusin protein), blokujących sygnał lokalizacji jądrowej uniemożliwiający jego przeniesienie do jądra. Następnie zaktywowany receptor wiąże się z jądrowym białkiem translokującym, ARNT (ang. AHRNT – *nuclear translocator*) i wędruje do jądra. Kompleks AhR/ARNT staje się funkcjonalnym czynnikiem transkrypcyjnym, który rozpoznaje w DNA specyficzne motywy sekwencji XRE znajdujące się w wielu genach, na przykład w promotorowym regionie genów cytochromu P450, CYP1A1 i CYP1B1, kodujących enzymy hydroksylacji WWA, ale także w obrębie promotorowego regionu genu E2. Przyłączenie do tej specyficznej sekwencji uruchamia sygnał do rozpoczęcia transkrypcji tych genów, a także transkrypcji wielu innych genów zależnych od AhR. Aktywacja takiej transkrypcji może odbywać się zarówno poprzez aktywację promotora, jak i poprzez oddziaływania białko-białko czy białko-DNA. Oddziaływania te oparte są na współdziałaniu z białkami koaktywatorowymi, korepresorowymi; dużą rolę mogą w nich odgrywać także zmiany struktury DNA, takie jak na przykład metylacja. Regulacja aktywności AhR odbywa się poprzez jego degradację w proteosomach po wyekportowaniu go wraz z ligandem do cytoplazmy. Regulacja zachodzi również w wyniku przyłączenia represorowego białka AHRR (ang. AHR repressor), co dowodzi, że AHRR ogranicza aktywność AhR podczas nieobecności ksenobiotyków. W pewnych warunkach konstytutywnie aktywny AHR, hamując transkrypcję AHRR, może doprowadzić do niekontrolowanej aktywności AHR, co z kolei może zwiększyć ryzyko rozwoju nowotworów w wyniku zwiększenia stężenia toksycznych produktów pośrednich metabolizmu ksenobiotyków (Hahn et al., 2009).

Działanie estrogenu – podobnie jak działanie WWA – zależne jest od związania się z receptorami jądrowymi, kodowanymi przez niezależne geny ER α i ER β ; tak uaktywnione receptory wiążą się do specyficznych sekwencji elementu odpowiedzi na estrogeny

(ERE, ang. *estrogen response element*) obecnych w genach docelowych, uruchamiając ich ekspresję, bądź wiążąc się do białek, takich jak AP-1 i SP-1. Zablokowanie tych czynników transkrypcyjnych skutkuje zahamowaniem szlaku sygnalizacyjnego estrogenu, co często wykorzystywane jest w terapii hormonozależnych nowotworów piersi. Zwykle jednak po krótkim czasie nowotwory stają się odporne na to blokujące działanie leków. Mechanizm tej oporności jest dość złożony, ale jednym z czynników może być epigenetyczne wyciszenie genów (Russo & Russo, 2004).

Związki zanieczyszczające środowisko zwykle działają jak agoniści receptora AhR, wykazując często antyestrogenne działanie, hamując ekspresję genów ER-zależnych. Najczęściej skutkuje to wzrostem metabolizmu E2. Mogą one także wykazywać działanie estrogenopodobne. Wtedy zaktywowany receptor wchodzi w interakcję z niezwiązanym ER α (Ohtake et al., 2003). Ich obecność jest najbardziej niebezpieczna w okresie prenatalnym i wczesnym postnatalnym, ponieważ związki te indukują cytochrom P 4501A1 (CYP1A1), uważany za biomarker zaburzeń rozwojowych. Metabolity, w których powstawaniu pośredniczą te cytochromy nie tylko są związkami bardzo reaktywnymi i mogą indukować uszkodzenia w DNA, ale też – tworząc kompleks z AhR – prowadzić do zakłóceń w gospodarce estrogenowej. Przykładem ich szkodliwego działania w tym okresie życia są efekty do jakich doprowadziło masowe spożycie skażonego dioksynami i PCB ryżu na Tajwanie. W łóżysku kobiet obserwowano 100-krotny wzrost aktywności CYP1A1, skrócenie czasu ciąży i zmniejszenie wagi urodzeniowej noworodków (Boden et al., 1995; Huel et al., 1992; Manchester & Jacoby, 1981; Pereg et al., 2001).

W warunkach laboratoryjnych pokazano także, że ekspozycja szczurów na TCDD powoduje spadek stężenia estrogenu u ciężarnych, natomiast jego wzrost w pierwszym pokoleniu płodów samic prowadzi do bezpłodności. Sądzi się, że skutek łączenia ksenobiotyku z AhR dochodzi do zmniejszenia liczby receptorów estrogenowych ER u płodów i kompensacyjnego wzrostu produkcji E2 spowodowanego zaburzeniami w układzie regulującym oś podwzgórze–przysadka–gonady w okresie prenatalnym, podczas różnicowania układu rozrodczego.

Poziom ekspresji genów CYP1A1 i CYP1B1, niezależnie od zaktywowanego AHR może również regulować E2, gdyż w obrębie promotora tych genów, oprócz XRE, geny te mają także element odpowiedzi na estrogeny ERE (ang. *estrogen response element*). E2, ta najbardziej biologicznie aktywna forma estrogenu, staje się także substratem dla enzymów I fazy metabolizmu kodowanych przez geny CYP1A1 i CYP1B1. Utlenienie E2 prowadzi do powstania aktywnych 2 i 4-hydroksykatecholi. W kolejnych reakcjach te hydroksylowe pochodne mogą być przekształcane do reaktywnych chinonów i semichinonów, a reakcja ta katalizowana jest głównie przez CYP1B1. Ich wzajemna interakcja prowadzi także do powstania reaktywnych form tlenu. Nie tylko E2, ale i pośredni metabolit 4-hydroksykatecholesterogen jako ligand ER, inicjując zmiany profilu ekspresji

szeregu genów stymulujących proliferację komórek wpływa na ich różnicowanie (Russo et al., 2003; Russo et al., 2002).

Zarówno obecność reaktywnych metabolitów estrogenów, jak i ta współzależność metaboliczna – wynikająca z „rozmowy receptorów” – może prowadzić do uszkodzeń DNA poprzez tworzenie tak adduktów, jak i pęknięć nici DNA, przekraczających zdolność naprawczą komórek.

„Rozmowa receptorów” AhR i ER, czyli łączenie się szlaków sygnałowych

Do interakcji między zaktywowanym receptorem, a receptorem, dla którego specyficzny ligand jest nieobecny może dojść przede wszystkim wtedy, gdy wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnału nie są całkowicie niezależne. Rezultatem tej interakcji jest ekspresja genów docelowych dla receptora „bezliganowego”. Oznacza to także, że zahamowanie jednego z tych szlaków usuwane jest przez sygnały, które pochodzą z pokrewnych części szlaków należących do drugiego receptora. Zjawisko takiej komunikacji między receptorami obserwuje się w szlakach sygnałowych uaktywnianych za sprawą estrogenów i ksenobiotyków (Caruso et al., 1999; Matthews & Gustafsson, 2006). Nieobecność jednego z ligandów – na przykład E2 – nie musi oznaczać braku transkrypcji genów docelowych dla E2, może ona być uruchamiana także, w pewnych okolicznościach, obecnością ksenobiotyku. Jest to niezwykle istotne zważywszy, że są to geny odpowiedzialne za rozwój, przeżywalność, proliferację czy migrację komórek. Zaaktywowany AhR może także aktywować ER α pozatranskrypcyjnie, stymulując szereg kinaz białkowych, które fosforylując ten receptor uruchamiają jego estrogeny efekt, nawet w nieobecności E2. AhR, niezależnie od aktywacji transkrypcji genów odpowiedzialnych za metabolizm ksenobiotyków, ma także wpływ na żeński układ reprodukcyjny, głównie jajniki i oocyty. Świadczą o tym zaburzenia w owulacji, zmiany w reprodukcji, problemy z utrzymaniem ciąży, a także spadek kondycji miotu znokautowanych myszy, niezależnie od zmian, które obserwowane są w wątrobie, układzie immunologicznym, sercu i innych organach, których pozbawiono genu kodującego receptor AhR^{-/-} (Hombach-Klonisch et al., 2005; Pocar et al., 2005; Ryan et al., 2007).

Wszystkie te obserwacje oraz fakt, że WWA, jako agonista AhR może wpływać na szlaki sygnalizacji ER, zmieniając transkrypcję ER-zależnych genów, a także, że ligand ten może działać jak antagonistą w zależności od obecności estrogenów, zintensyfikowały badania nad wzajemną interakcją między obydwojma receptorami. Ten typ interakcji nazwano „rozmową receptorów”. Jednym z pierwszych dowodów na taką wzajemną zależność było pokazanie, że długotrwała ekspozycja (2 lata) na TCDD szczurów Sprague Dawley spowodowało spadek liczby zachorowań na nowotwory gruczołu piersiowego tylko wśród samic (Kociba et al., 1978).

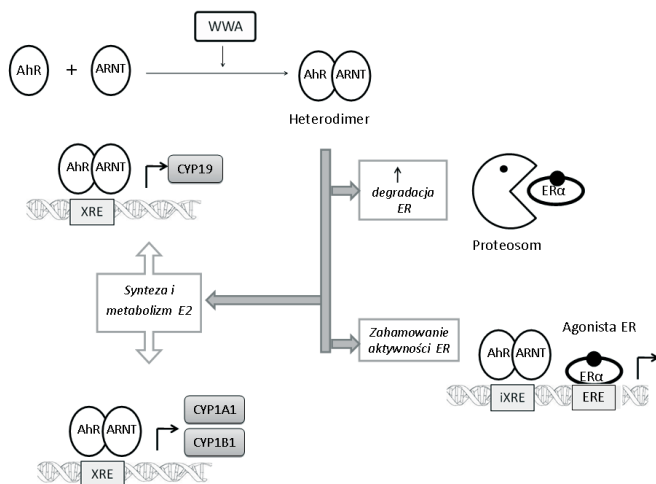
Fakt ten został potwierdzony przez spadek indukowanych DMBA guzów sutka w obecności TCDD (Holcomb & Safe, 1994). Do wyjaśnienia tych obserwacji doszło wiele lat później, kiedy pokazano, że aktywacja AhR przez TCDD wywołuje spadek ekspresji genów docelowych dla E2 (Safe & Wormke, 2003). W obecności E2, AhR aktywowany przez TCDD rekrutuje ER α do regulowanych przez AhR genów, CYP1A1 i CYP1B1 (Matthews et al., 2005). Ta rekrutacja związana jest z bezpośrednim oddziaływaniem typu białko/białko, między obydwoma receptorami (Ohtake, et al., 2003). TCDD indukuje także AhR-zależną degradację ER poprzez aktywację proteosomów. Sugeruje to, że AhR reguluje poziom białka ER, co w konsekwencji może prowadzić do zmienionej regulacji odpowiedzi estrogenowej (Matthews et al., 2005).

Mechanizm opisanych zjawisk nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony chociaż prowadzone są badania nad związkami nietoksycznymi aktywującymi AhR, które mogłyby być zastosowane w chemioterapii nowotworów piersi. Jason Matthews i Jan-Ake Gustafsson (Matthews & Gustafsson, 2006) podsumowując dotychczasowe obserwacje prowadzone w wielu laboratoriach na świecie (Ohtake et al., 2003) (Beischlag & Pardev, 2005) zaproponowali kilka możliwych mechanizmów, które mogą być odpowiedzialne za „rozmowę receptorów” oraz zakłócenia w szlakach sygnalizacyjnych AhR i ER. Zgodnie z ich propozycją AhR hamuje aktywność ER:

- 1) bezpośrednio wskutek wiązania się powstałego kompleksu AhR/ARNT do inhibitorowego XRE (iXRE) obecnego w docelowych genach dla ER;
- 2) deaktywując wspólne dla obydwu receptorów koaktywatory (także ARNT);
- 3) indukując syntezę nieznanych inhibitorowych białek;
- 4) powodując wzrost proteosomowej degradacji ER;
- 5) zmieniając syntezę/metabolizm estrogenu poprzez wzrost ekspresji aromatazy, a także ekspresje cytochromu P450 1A1 i 1B1 (Ryc. 1).

Zjawisko wzajemnej interakcji komplikuje ostatnio odkryty fakt, że zmiany w AhR-zależnej transkrypcji genów są nie tylko ligandowo- i promotorowo-specyficzne, ale także zależą od podtypu ER (ER α i ER β), a ER β ma działanie antagonistyczne na sygnalizację zależną od ER α (Wihlen et al., 2009). WWA może wiązać się z ER α , a powstający kompleks AhR/ER α indukuje transkrypcję genów zależnych od E2. W tym przypadku AhR pełni rolę koregulatora (Ohtake et al., 2003).

Wnioski z prezentowanych badań nie są jednak uniwersalne i wyniki zależą tak od typu środowiskowego liganda i jego antyestrogenowego czy proestrogenowego działania, od zastosowanej do badań linii komórkowej oraz od obecności niezwiązanego receptora estrogenowego.



Ryc. 1. Szlaki sygnalizacji „Rozmowa receptorów” między AhR i ER powoduje: 1) zahamowanie aktywności ER poprzez wiązanie heterodimeru AhR/ARNT do iXRE; 2) wzrost degradacji ER przez proteosomy; 3) zmiany w systemie ER dzięki aktywacji CYP aromatazy; 4) zmiany w metabolizmie przez wzrost ekspresji cytochromu P450 1A1 i 1B1 dzięki przyłączeniu heterodimeru AhR/ARNT do sekwencji XRE (zmodyfikowany rysunek z Matthews & Gustafsson, 2006)

Toksyczne skutki wywołane powstającymi produktami reakcji z udziałem enzymów indukowanych transkrypcją genów CYP1A1 i CYP1B1 można ograniczyć, bądź nawet im zapobiec, sprzęgając je z niskocząsteczkowymi związkami, takimi jak np. grupy siarczanowe czy na przykład metylowe. Reakcje te wymagają obecności aktywnych enzymów fazy II detoksykacji, z grupy transferaz na przykład katecholometylotransferazy (COMT). Enzym ten ma istotne znaczenie w utrzymaniu poziomu S-adenozylometioniny (SAM), będącej donorem grup metylowych niezbędnych do metylacji DNA przy udziale enzymów metylotransferaz DNA (DNMT). Natomiast metylacja DNA ma znaczenie w dziedziczeniu epigenetycznym, czyli pozagenowym, decydując o włączaniu, bądź wyłączeniu całych zespołów genów. Oznacza to, że aktywność tych enzymów, a także dostępność grup metylowych może decydować o ekspresji wielu zespołów genowych. Także aktywność CYP1A1 i CYP1B1 jest zależna od metylacji promotora kodujących je genów. Jeśli zaraz po urodzeniu szczurom podano PCB, to wystąpił nie tylko wzrost ekspresji i aktywności CYP1A1 i 1B1, ale także spadek aktywności COMT z równoczesnym spadkiem poziomu DNMT1 mRNA (Desaulniers et al., 2005). Można sądzić, że zmiany te będą przekładały się na spadek metylacji DNA, często obserwowany w różnych genach komórek rakowych.

Dotychczas zebrane rezultaty wskazują, że komunikacja między receptorami AhR i ER, niezależnie od odrębnej roli, jaką pełnią w fizjologii komórek, czyni je współzależnymi i współodpowiedzialnymi za fenotypowe efekty. Aktywacja AhR musi wpłynąć na aktywację ER, zmieniając metabolizm E2. Może to mieć szczególne znaczenie w metabolizmie katecholowych estrogenów, produktów powstających podczas usuwania E2, a których powstawanie jest zależne do aktywności genów CYP1A1 i CYP1B1, tych samych, w których promotorowym obszarze znajduje się XRE. Można zatem sądzić, że aktywacja AhR przez zanieczyszczenie środowiska, będzie podnosiła poziom potencjalnie kancerogennego katecholu, jakim jest 4-OH E2, zwiększając ryzyko tak inicjacji, jak i promocji nowotworów.

Niedawno zwrócono uwagę na aktywację AhR przez metabolity tamoksifenu, leku z grupy selektywnych modulatorów ER, szeroko stosowanego w terapii, ale także w prewencji nowotworów piersi. Pokazano, że jeden z jego metabolitów, 4-hydroksytamoksifen może indukować ekspresję genów docelowych dla AhR (DuSell et al., 2010).

Zanieczyszczenia powietrza a zmiany w metylacji DNA

Jednym z niezwykle istotnych mechanizmów kontrolujących transkrypcję genów, na który wpływ ma zanieczyszczenie powietrza, a równocześnie modyfikującym sygnalizację ER jest poziom metylacji DNA w obrębie regionów promotorowych genów w dinukleotydowych sekwencjach CpG (Baccarelli & Bollati, 2009; Baccarelli et al., 2009). Metylacja DNA, zmieniając dostępność czynników transkrypcyjnych, koaktywatorów, ale także represorów do promotorów genów, czyni je niezdolnymi do transkrypcji, bądź ją aktywuje. Im wyższy stopień metylacji DNA w sekwencji promotora, tym słabsza ekspresja danego genu. Zmiany w metylacji DNA są znacznie częstsze od zmian mutacyjnych, a równocześnie profile metylacji są dziedziczone w kolejnych pokoleniach. Metylacja jest więc dodatkową, do tej wyznaczonej sekwencją nukleotydów, instrukcją genetyczną decydującą o prawidłowym lub patologicznym funkcjonowaniu komórek. Za te tzw. epigenetyczne zmiany odpowiedzialna jest zmiana w strukturze chromatyny, decydując o dostępności genów. Poza metylacją DNA, zmiany w strukturze chromatyny powoduje także modyfikacja białek histonowych nukleosomów, a także miRNA (Aguilera et al., 2010) Można się spodziewać, że metylacja na przykład w obszarze ERE zaburzy szlaki sygnałowe uruchamiane przez transkrypcję E2-zależnych genów, prowadząc do wyciszenia transkrypcji. Jeśli metylacja zajdzie w genach supresorowych, to może zwiększyć się ryzyko kancerogenezy (Leu et al., 2004). Równocześnie jednak odwracalność tego procesu wskazuje na nowe możliwości terapeutyczne, podobnie jak przywrócenie metylacji w promotorach onkogenów może zahamować wzrost nowotworowych komórek (Luo et al., 2010).

Spadek poziomu globalnej metylacji DNA po ekspozycji na emisję ulicznego zanieczyszczenia powietrza zawierającego węgiel, spaliny z diesli, Ar, Cd, a w szczególności WWA, znajdujące się w cząstkach PM, były przedmiotem wielu badań i to zarówno *in vitro*, jak i na modelach zwierzęcych (Bollati et al., 2007; Mass & Wang, 1997; Nohara et al., 2010). Także badania kohortowe (Baccarelli et al., 2009), pokazały gwałtowny spadek metylacji DNA mierzony bezpośrednio po ekspozycji na wysokie stężenia PM pochodzącego z samochodowego ruchu ulicznego w długich, zwykle mocno zmetylowanych rozproszonych elementach jądrowych (ang. *interspersed nucleotide element*), LINE-1. Poszukując mechanizmu odpowiedzialnego za wystąpienie tego zjawiska stwierdzono, że występuje dodatnia zależność pomiędzy ilością PM i stężeniem homocysteiny w osoczu badanej populacji (Park et al., 2008). Sugeruje to powstanie zaburzeń w metabolizmie jednowęglowych grup odgrywającym zasadniczą rolę w produkcji SAM. Stąd sugestia, że suplementacja kwasem foliowym, witaminą niezbędną do prawidłowego przebiegu metabolizmu grup metylowych, może być stosowana jako czynnik prewencyjny w środowisku o wysokim zanieczyszczeniu powietrza (Nawrot, 2009). Propozycja wydaje się tym bardziej zasadna, ponieważ zauważono, że dodatkowym czynnikiem ryzyka zawałów serca w środowisku o dużym zanieczyszczeniu powietrza są zarówno niedobory folianów, jak i polimorfizm genu MTHFR (reduktazy metyloctetrahydrofolianowej), kodującego enzym biorący udział w metabolizmie folianów. Obydwa te czynniki, zarówno kwas foliowy, jak i aktywność MTHFR są odpowiedzialne za dostarczenie grup metylowych do produkcji SAM, który jest swoistym rezerwuarem grup metylowych do metylacji DNA. Zaburzenia w produkcji SAM mogą odzwierciedlić się w zaburzeniach w metylacji DNA (Baccarelli et al., 2008; Castro et al., 2003).

Metylacja DNA jest mechanizmem zarówno dziedziczenia cech rodzicielskich (piętnowaniem genów), jak i odpowiedzią komórek na zmiany środowiskowe stanowiąc swoistą adaptację, aktywując bądź wyciszając transkrypcję. Od momentu zapłodnienia aż do implantacji zarodka dochodzi do demetylacji większości genów, zwłaszcza pochodzących od ojca, z wyjątkiem tych odpowiedzialnych za genomowe piętno rodzicielskie i repetytywne sekwencje. Po implantacji zarodka rozpoczyna się metylacja *de novo*. W tym okresie środowisko wywiera znaczny wpływ na ostateczny profil metylacji DNA (Reik et al., 2001).

Na przykładzie genu H19, w hodowanych mysich embrionach pokazano, że niedobory aminokwasów powodują znaczny spadek w całkowitej metylacji DNA z równoczesną nieprawidłową ekspresją normalnie wyciszonych genów (Doherty et al., 2000). Tymczasem ekspozycja *in vitro* embrionów mysich na TCDD, a następnie ich implantacja do macicy myszy powodowała, że wzrastała aktywność metylotransferaz, enzymów odpowiedzialnych za wzrost metylacji genów H19 i IGF2, a także obserwowano spadek wzrostu płodu (Wu et al., 2004). Także zmiany metylacji receptora glukokortykoidowego

(GR) korelują ze wzrostem płodu i stanem zaawansowania ciąży (Filiberto et al., 2011). Autorzy sugerują, że metylacja DNA może być czynnikiem krytycznym w rozwoju łożyska, decydując tym samym o warunkach rozwoju płodu. Zmiany we wzroście płodu, związane ze zmianami w genach rodzicielskiego piętna genomowego (zwłaszcza IFG2) odpowiedzialnymi m.in. za wzrost płodu i energetyczną homeostazę, mogą wyjaśniać zwiększoną podatność na choroby metaboliczne, obserwowane w życiu dorosłym u tych, których masa urodzeniowa była niska (Smith et al., 2006). Badania dotyczące wpływu zanieczyszczeń powietrza na rozwój płodu, odzwierciedlającego się między innymi w niskiej masie urodzeniowej, obszernie opisano w rozdziale „Oddziaływanie zanieczyszczeń powietrza na kondycję płodu” (s. 213–226).

Takie „zaprogramowanie płodowe”, jako wyraz adaptacji do środowiska np. stanu odżywienia matek w czasie ciąży, przekładające się na masę urodzeniową noworodka, a następnie na wzrost ryzyka chorób krążeniowych po raz pierwszy dobrze udokumentował Barker (Barker, 1990; Barker et al., 1989; Barker et al., 1993). Pokazał on, że istnieje istotna zależność pomiędzy masą urodzeniową i innymi parametrami antropometrycznymi niemowląt z południowej Anglii (urodzonych około 1900 r.), a wzrostem ryzyka zachorowania na choroby krążeniowe w badanej populacji kilkadziesiąt lat później (Barker, 1991). Na podstawie tych epidemiologicznych danych spekulował on, że wskutek oddziaływań czynników środowiskowych w okresie ciąży musi dochodzić do „zaprogramowania” metabolizmu płodu i „pamięć” ta ma wpływ na rozwój późniejszych chorób. Wiedza na temat modulacji mechanizmów epigenetycznych jest ciągle niewystarczająca, aby zjawisko to jednoznacznie wyjaśnić. Nie ma jednak wątpliwości, że zaburzenia w metylacji DNA we wczesnym okresie płodowym mogą zmienić metabolizm płodu, a ta zmiana nie tylko zostanie zachowana przez całe życie, ale także może znaleźć swój wyraz w rozwoju chorób w wieku dorosłym, a nawet zostać przekazana w kolejnych pokoleniach. Można zatem uznać, że w okresie życia płodowego organizm nabywa zdolności adaptacyjnych do radzenia sobie ze zmianami, jakim będzie musiał sprostać po urodzeniu.

Zmiany w metylacji DNA mogą także być rezultatem zmian w aktywności metylotransferaz, na skutek oksydacyjnych uszkodzeń DNA (Fratelli et al., 2005). Uszkodzenia te zwykle spowodowane są wolnymi rodnikami tlenowymi (Donaldson et al., 2001) powstającymi w reakcjach oksydoredukcyjnych, zachodzących podczas metabolizmu wdychanych pyłów atmosferycznych, zawierających metale z powodu przenikania ich bezpośrednio z płuc do krwioobiegu (Brook et al., 2004). Taki wzrost stresu oksydacyjnego doprowadza zwykle do stanów zapalnych w organizmie. Także niektóre metale (np. kadm zawarty w pyłach PM) hamują metyltransferazy, wiążąc się prawdopodobnie z domeną genu tego enzymu (Takiguchi et al., 2003). Wpływ zanieczyszczeń powietrza na strukturę DNA dobrze ilustruje ilość powstających adduktów DNA, będących często stosowanym wskaźnikiem biologicznej aktywności zanieczyszczeń powietrza pyłami

(Sevastyanova et al., 2008) w zależności od okresu, w jakim przeprowadzane są badania. Ilość adduktów jest znacznie większa w zimie niż w lecie, kiedy w PM znajduje się nawet 10-krotnie większa zawartość WWA (Binkova et al., 2003). Podobnie, embriotoksyczność pyłów zebranych w okresie zimowym była istotnie statystycznie większa niż pyłów zebranych w okresie letnim.

Niezależnie od mechanizmu odpowiedzialnego za zmiany epigenetyczne należy uznać, że zmiany w metylacji DNA mogą być groźne dla zdrowia i życia człowieka oraz że wpływ na nie mają zanieczyszczenia środowiska (Baccarelli & Bollati, 2009).

Podsumowanie

- Oddziaływanie zanieczyszczeń środowiska na organizm człowieka nie ogranicza się do skutków bezpośrednio widocznych, takich jak alergie, astma czy choroby dróg oddechowych. Ich działanie może modyfikować szereg szlaków sygnalizacyjnych, wpływając na ekspresję wybranych genów. Taka zmiana w transkrypcji wielu genów może – poprzez zaburzenie homeostazy organizmu – zapoczątkować procesy chorobowe, ale może także, uruchamiając procesy adaptacyjne, zdecydować o przeżyciu organizmu. Jeśli zmiana ma charakter epigenetyczny, może zostawić ślad w kolejnych pokoleniach.
- Współzależność pomiędzy aktywacją AhR wywołaną zanieczyszczeniami i aktywacją ER wywołaną E2 może wprowadzić zmiany w profilu genetycznym transkrypcji zależnych od nich genów. Zmiany takie, zwłaszcza jeśli zachodzą w okresie procesów rozwojowych, mogą wpływać na rozwój płodu czy podnosić ryzyko procesów nowotworowych.
- Zanieczyszczenia środowiska mogą także zmieniać dziedziczenie epigenetyczne poprzez wprowadzenie zaburzeń w metylacji DNA, a tym samym zmienić transkrypcję genów; taka modulacja w DNA w okresie płodowym może zdecydować o prawidłowej implantacji zarodka, a także zmienić jego podatność na rozwój chorób w dorosłym życiu.

Literatura

1. Abbott, BD, Schmid, JE, Pitt, JA, Buckalew, AR, Wood, CR, Held, GA & Diliberto, J J. (1999). Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*, 155(1), 62–70.
2. Aguilera, O, Fernandez, AF, Munoz, A & Fraga, MF. (2010). Epigenetics and environment: a complex relationship. *J Appl Physiol*, 109(1), 243–251.

3. Baba, T, Mimura, J, Nakamura, N, Harada, N, Yamamoto, M, Morohashi, K, et al. (2005). Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (Dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Molecular and Cellular Biology*, 25(22), 10040–10051.
4. Baccarelli, A & Bollati, V. (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr*, 21(2), 243–251.
5. Baccarelli, A, Cassano, PA, Litonjua, A, Park, SK, Suh, H, Sparrow, D, et al. (2008). Cardiac autonomic dysfunction – Effects from particulate air pollution and protection by dietary methyl nutrients and metabolic Polymorphisms. *Circulation*, 117(14), 1802–1809.
6. Baccarelli, A, Wright, RO, Bollati, V, Tarantini, L, Litonjua, AA, Suh, HH, et al. (2009). Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med*, 179(7), 572–578.
7. Barker, DJ. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ*, 301(6761), 1111.
8. Barker, DJ. (1991). The intrauterine environment and adult cardiovascular disease. *Ciba Found Symp*, 156, 3–10; discussion 10–16.
9. Barker, DJ, Osmond, C, Golding, J, Kuh, D & Wadsworth, ME. (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*, 298(6673), 564–567.
10. Barker, DJ, Osmond, C, Simmonds, SJ & Wield, GA. (1993). The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ*, 306(6875), 422–426.
11. Beischlag, TV & Perdew, GH. (2005). ER alpha–AHR–ARNT protein–protein interactions mediate estradiol–dependent transrepression of dioxin–inducible gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21607–21611.
12. Beischlag TV., PG. (2005). ER–alpha–AHR–ARHT protein–protein interactions mediate estradiol–dependent transrepression of dioxin–inducible gene transcripton. *J Biol Chem*, 280, 21607–21611.
13. Binkova B., CM, Pastorkova A., Jelinek R., Benes I., Novak J., Sram RJ. (2003). Biological activities of organizc compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during th esummer and winter season. *Mutat Res*, 9, 43–59.
14. Boden, AG, Bush, PG, Burke, MD, Abramovich, DR, Aggett, P, Mayhew, TM, et al. (1995). Human placental cytochrome P450 and quinone reductase enzyme induction in relation to maternal smoking. *Reprod Fertil Dev*, 7(6), 1521–1524.
15. Bollati, V, Baccarelli, A, Hou, L, Bonzini, M, Fustinoni, S, Cavallo, D, et al. (2007). Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low–dose benzene. *Cancer Res*, 67(3), 876–880.
16. Brook RD., FB, Cascio W., Hong Y., Howard G., Lipsett M., Luepker R., Mittleman M., et al. (2004). Air pollution and cariovascular disease: a statement for healthcare professionals from the expret panel on population and prevention science of the American Heart Association. *Circulation*, 109, 2655–2671.

17. Caruso, JA, Laird, DW & Batist, G. (1999). Role of HSP90 in mediating cross-talk between the estrogen receptor and the Ah receptor signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*, 58(9), 1395–1403.
18. Castro, R, Rivera, I, Struys, EA, Jansen, EEW, Ravasco, P, Camilo, ME, et al. (2003). Increased, homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clinical Chemistry*, 49(8), 1292–1296.
19. Desaulniers, D, Xiao, GH, Leingartner, K, Chu, I, Musicki, B & Tsang, BK. (2005). Comparisons of brain, uterus, and liver mRNA expression for cytochrome p450s, DNA methyltransferase-1, and catechol-o-methyltransferase in prepubertal female Sprague-Dawley rats exposed to a mixture of aryl hydrocarbon receptor agonists. *Toxicol Sci*, 86(1), 175–184.
20. Doherty, AS, Mann, MR, Tremblay, KD, Bartolomei, MS & Schultz, RM. (2000). Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod*, 62(6), 1526–1535.
21. Donaldson, K, Stone, V, Seaton, A & MacNee, W. (2001). Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: Potential mechanisms. *Environmental Health Perspectives*, 109, 523–527.
22. DuSell, CD, Nelson, ER, Wittmann, BM, Fretz, JA, Kazmin, D, Thomas, RS, et al. (2010a). Regulation of Aryl Hydrocarbon Receptor Function by Selective Estrogen Receptor Modulators. *Molecular Endocrinology*, 24(1), 33–46.
23. DuSell, CD, Nelson, ER, Wittmann, BM, Fretz, JA, Kazmin, D, Thomas, RS, et al. (2010b). Regulation of aryl hydrocarbon receptor function by selective estrogen receptor modulators. *Mol Endocrinol*, 24(1), 33–46.
24. Filiberto, AC, Maccani, MA, Koestler, D, Wilhelm-Benartzi, C, Avissar-Whiting, M, Banister, CE, et al. (2011). Birthweight is associated with DNA promoter methylation of the glucocorticoid receptor in human placenta. *Epigenetics*, 6(5).
25. Fratelli, M, Goodwin, LO, Orom, UA, Lombardi, S, Tonelli, R, Mengozzi, M, et al. (2005). Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13998–14003.
26. Gerber, LM, Williams, GC & Gray, SJ. (1999). The nutrient-toxin dosage continuum in human evolution and modern health. *Quarterly Review of Biology*, 74(3), 273–289.
27. Gluckman, PD, Hanson, MA & Beedle, AS. (2007). Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective. *American Journal of Human Biology*, 19(1), 1–19.
28. Hahn, ME. (2002). Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact*, 141(1–2), 131–160.

29. Hahn, ME, Allan, LL & Sherr, DH. (2009). Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor. *Biochem Pharmacol*, 77(4), 485–497.
30. Hahn, ME, Karchner, SI, Evans, BR, Franks, DG, Merson, RR & Lapsertis, JM. (2006). Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, 305(9), 693–706.
31. Holcomb, M & Safe, S. (1994). Inhibition of 7,12-Dimethylbenzanthracene-Induced Rat Mammary-Tumor Growth by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin. *Cancer Letters*, 82(1), 43–47.
32. Hombach-Klonisch, S, Pocar, P, Kietz, S & Klonisch, T. (2005). Molecular actions of polyhalogenated arylhydrocarbons (PAHs) in female reproduction. *Curr Med Chem*, 12(5), 599–616.
33. Huel, G, Girard, F, Nessmann, C, Godin, J, Blot, P, Breart, G, et al. (1992). Placental Aryl-Hydrocarbon Hydroxylase-Activity and Placental Calcifications. *Toxicology*, 71(3), 257–266.
34. Kociba RJ., KD, Beger JE., Carreon RM., Wade CE., Dittenber DA., KalninsRP., Frauson LE., Park CL., Barnard SD., Hummel RA., Humiston CG. (1978). Results of a 2-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. *Toxicol Appl. Pharmacol*, 46, 279–303.
35. Leu, YW, Yan, PS, Fan, M, Jin, VX, Liu, JC, Curran, EM, et al. (2004a). Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. *Cancer Res*, 64(22), 8184–8192.
36. Luo, J, Li, YN, Wang, F, Zhang, WM & Geng, X. (2010). S-adenosylmethionine inhibits the growth of cancer cells by reversing the hypomethylation status of c-myc and H-ras in human gastric cancer and colon cancer. *Int J Biol Sci*, 6(7), 784–795.
37. Manchester, DK & Jacoby, EH. (1981). Sensitivity of human placental monooxygenase activity to maternal smoking. *Clin Pharmacol Ther*, 30(5), 687–692.
38. Mass, MJ & Wang, L. (1997). Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res*, 386(3), 263–277.
39. Matthews, J & Gustafsson, JA. (2006). Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal*, 4, e016.
40. Matthews, J, Wihlen, B, Thomsen, J & Gustafsson, JA. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: Ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Molecular and Cellular Biology*, 25(13), 5317–5328.
41. Mayhew, TM. (2009). A stereological perspective on placental morphology in normal and complicated pregnancies. *J Anat*, 215(1), 77–90.

42. Nawrot TS., AI. (2009). The detrimental health effect of traffic-related air pollution. *Am J Res Crit Care Med*, 179, 523–527.
43. Nohara, K, Baba, T, Murai, H, Kobayashi, Y, Suzuki, T, Tateishi, Y, et al. (2010). Global DNA methylation in the mouse liver is affected by methyl deficiency and arsenic in a sex-dependent manner. *Arch Toxicol*.
44. Ohtake, F, Takeyama, K, Matsumoto, T, Kitagawa, H, Yamamoto, Y, Nohara, K, et al. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423(6939), 545–550.
45. Park SK., ONM, Vokonas PS., Sparrow D., Spiro A A III, Tucker KL., Suh H., Hu H., Schwartz J. (2008). Traffic-related particles are associated with elevated homocysteine: the VA normative aging study. *Am. J Respir Crit Care Med*, 178, 283–289.
46. Pereg, D, Tampal, N, Espandiari, P & Robertson, LW. (2001). Distribution and macromolecular binding of benzo[a]pyrene and two polychlorinated biphenyl congeners in female mice. *Chem Biol Interact*, 137(3), 243–258.
47. Pocar, P, Fischer, B, Klonisch, T & Hombach-Klonisch, S. (2005). Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Reproduction*, 129(4), 379–389.
48. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532), 1089–93.
49. Russo, J, Hasan Lareef, M, Balogh, G, Guo, S & Russo, IH. (2003). Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 87(1), 1–25.
50. Russo, J, Lareef, MH, Tahin, Q, Hu, YF, Slater, C, Ao, X, et al. (2002). 17Beta-estradiol is carcinogenic in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 80(2), 149–162.
51. Russo, J & Russo, IH. (2004). Genotoxicity of steroidal estrogens. *Trends Endocrinol Metab*, 15(5), 211–214.
52. Ryan, EP, Holz, JD, Mulcahey, M, Sheu, TJ, Gasiewicz, TA & Puzas, JE. (2007). Environmental toxicants may modulate osteoblast differentiation by a mechanism involving the aryl hydrocarbon receptor. *J Bone Miner Res*, 22(10), 1571–1580.
53. Safe, S & Wormke, M. (2003). Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor a cross-talk and mechanisms of action. *Chemical Research in Toxicology*, 16(7), 807–816.
54. Sevastyanova, O, Novakova, Z, Hanzalova, K, Binkova, B, Sram, RJ & Topinka, J. (2008). Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 649(1–2), 179–186.
55. Smith, FM, Garfield, AS & Ward, A. (2006). Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. *Cytogenet Genome Res*, 113(1–4), 279–291.

56. Takiguchi, M, Achanzar, WE, Qu, W, Li, GY & Waalkes, MP. (2003). Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Experimental Cell Research*, 286(2), 355–365.
57. Veras, MM, Damaceno-Rodrigues, NR, Caldini, EG, Maciel Ribeiro, AA, Mayhew, TM, Saldiva, PH, et al. (2008). Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod*, 79(3), 578–584.
58. Wihlen, B, Ahmed, S, Inzunza, J & Matthews, J. (2009). Estrogen Receptor Subtype- and Promoter-Specific Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Transcription. *Molecular Cancer Research*, 7(6), 977–986.
59. Wu, Q, Ohsako, S, Ishimura, R, Suzuki, JS & Tohyama, C. (2004). Exposure of mouse preimplantation embryos to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the methylation status of imprinted genes H19 and Igf2. *Biol Reprod*, 70(6), 1790–1797.