

## Az ösztrogénreceptor működése a legújabb genomikai kutatások tükrében

BOJCSUK Dóra\*, ERDŐS Edina\*, BÁLINT Bálint László



Az emlőrák és a hormonok közötti kapcsolatról 1896-ban *Sir George Beatson* brit sebész számolt be elsőként, amikor is arra a megfigyelésre jutott, hogy azon nők körében, akik petefészket eltávolították, életük további részében sokkal csekélyebb mértékben alakult ki emlőrák (1). E következtetését még évtizedekkel a hormonok, és maga az ösztrogénreceptorok felfedezése előtt tette, majd hetven évvel később *Jack Gorski* és *Elwood V. Jensen* kutatócsoportja azonosította az ösztrogén és a receptor közötti kölcsönhatást, felfedezve így az ösztrogénreceptort (2, 3). Nem sokkal ezután, 1972-ben leírták a receptor-DNS kölcsönhatását is (4), *O'Malley* pedig megfigyelte, hogy az ösztrogénreceptor befolyásolja bizonyos RNS-ek átíródását, ezzel olyan fehérjék szintézisét, melyek hatással vannak a differenciációra és a növekedésre (5).

Az ösztrogénreceptor addigi vizsgálatai csupán a méhre terjedtek ki, majd az 1970-es évek elején azonosították jelenlétét az emlőrákban is, melynek expressziós szintje hatással volt a tumor endokrin terápiára adott válaszára (6). A posztmenopauza, és a szövődményeként fellépő csonttritkulás közötti kapcsolat, ebből adódóan a nemi hormon, az ösztrogén pótlása mint terápia az 1970-es években került a köztudatba (7), annak ellenére, hogy a csontban nem tudtak ösztrogénreceptort kimutatni (8). Az ösztrogénreceptor pontos szerepe 1986-ban vált nyilvánvalóvá, amikor klónozták és azonosították a funkcionális doménjeit (9, 10). Az ER általi szabályozás kiemelt jelentőségű olyan génekre nézve, amelyek meghatározóak az emlőrák kialakulásában és progressziójában (11, 12).

Az ösztrogénreceptor kulcsfontosságú transzkripciós faktor az emlőrák 75%-ában. Megha-

tározza a daganat kimenetelét, a kezelésre adott választ (13), illetve az ösztrogénnek kulcsfontosságú szerepe van az osteoporosisban is. Éppen ezért kiemelt jelentőségű ezen transzkripciós faktor DNS-hez történő kötődéseinek vizsgálata, feltérképezése.

### Az ösztrogénreceptorról

Az ösztrogénreceptor (ER) a magreceptorcsaládba tartozó ligandfüggő transzkripciós faktor. A transzkripciós faktorok olyan fehérjék, melyek egy specifikus DNS-szekvenciához kötődnek, kontrollálva a genetikai információ átíródását. A magreceptorok családjába tartozó transzkripciós faktorok ligandfüggően szabályozzák a célgének átíródását, továbbítva a külső környezet által közvetített információt a genomhoz. A ligand szó a latin *ligare* szóból származik, melynek jelentése: kötni. Farmakológiában és biokémiában a ligand szó egyaránt egy olyan molekulát jelöl, amely képes biomolekulákhoz kötődni, azzal komplexet kialakítani és ezáltal biológiai változásokat és választ előidézni (14).

A magreceptorok ligandjai kisméretű hidrofób molekulák, melyek retinoidok, zsírsavak, koleszterin, lipofil hormonok és vitaminok, illetve antibiotikumok, xenobiotikumok és szintetikus gyógyszerek származékai. Mivel ezek a ligandok képesek átjutni a sejtmembránon és a citoplazmában kapcsolódnak a magreceptorokhoz, a magreceptorok a legnépszerűbb gyógyszercélpontok közé tartoznak. A cukorbetegség, rák és szívbetegség kezelésében is vannak olyan magreceptorok, melyek gyógyszercélpontokká váltak (14–16) (1. táblázat).

*Az ösztrogénreceptor kulcsfontosságú transzkripciós faktor az emlőrák 75%-ában.*

\*E két szerző azonos mértékben járult hozzá a kéziratához.

BOJCSUK Dóra\*, ERDŐS Edina\*, dr. BÁLINT Bálint László (levelező szerző/correspondent)

A rovat vezetői: dr. BÁLINT Bálint László, Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Klinikai Genomikai és Személyresabott Orvoslási Központ; 4012 Debrecen, Nagyerdei krt 98. Pf. 6

E-mail: lbalint@med.unideb.hu

dr. KÓSA János Pál, Semmelweis Egyetem, I. Sz. Belgyógyászati Klinika, Klinikai Kutató és Molekuláris Biológiai Laboratórium; 1083 Budapest, Korányi S. u. 2/a. E-mail: janos.kosa@gmail.com

1. táblázat. Egyes magreceptorok és gyógyszerligandjaik, melyek betegségek kezelése vagy életmód kialakítása során célpontokká váltak

Élettani szerep	Magreceptor	Kezelés/gyógyszerligand
2-es típusú diabetes mellitus	PPAR- $\gamma$	tiazolidindionok/pioglitazon
Emlőrák	ER	tamoxifen
Szívbetegség/cardiovascularis megbetegedés	PPAR- $\alpha$	fenofibrát
Életmód	ER, PR	fogamzásgátló tabletták
Sport	AR	teljesítménynövelő szteroidok

AR: androgénreceptor, ER: ösztrogénreceptor, PPAR- $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR- $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$

Az ösztrogénreceptornak két típusát különböztetjük meg: ER- $\alpha$  és ER- $\beta$ , utóbbit az 1990-es évek közepén azonosították (17). Az ER- $\alpha$ -t az ESR1 gén kódolja a humán kromoszóma 6q24–27 lókusán, az ER- $\beta$ -t pedig az ESR2 gén a 14q21–22 lókuszon. A gének transzkriptjei egyformán kilenc exont tartalmaznak, de a két fehérje eltérő számú aminosavból épül fel: az ER- $\alpha$ -t 590, az ER- $\beta$ -t 530 aminosav alkotja.

A magreceptorcsalád többi tagjához hasonlóan az ösztrogénreceptor hat (A–F) evolúciósan konzervált doménből áll. Az N-terminális domén tartalmazza az AF-1-et, amely lehetővé teszi a más transzkripciós faktorokkal való interakciót, és a célgén-aktivációt. A C-terminális doménen belül helyezkedik el a ligandfüggő aktivációs domén (AF-2), mely aktiválja a transzkripciót. Az AF-1 és AF-2 sejtípus és promoter specifikusan hozzájárul az ER- $\alpha$  aktivitásához (18, 19).

A két receptor között fehérjeszinten jelentős szekvenciahomológia fedezhető fel, ennek ellenére strukturális és funkcionális eltérések megfigyelhetők (1. ábra). Különbség van a ligandfelismerés, a receptoraktiváció és a koregulátorok-

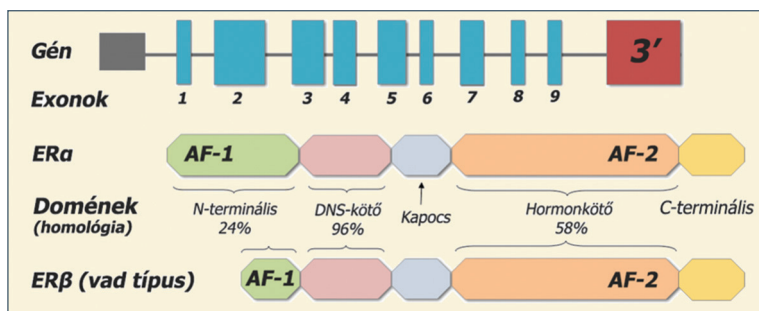
kal való kölcsönhatások tekintetében, mely a cél-gének eltérő készletét fogják szabályozni idő- és szövetspecifikus módon (20, 21).

## Mutációk az ösztrogénreceptorokban

Az ösztrogénreceptoroknak ez idáig variáns formáját azonosították. A *splicing* során egy-egy exon eltűnhet (deléción), de előfordulhat több exon együttes deléciónja is, továbbá beékelődhet újabb exon (inzerción), de akár duplikálódhatnak is, létrehozva ez által egy genomi átrendeződést.

Az ER- $\alpha$  szekvenciáján belül azonosított mutációk legnagyobb része *silent* mutáció, azaz nem okoznak aminosavcsere-t, vagy olyan polimorfizmusok, melyeknek nincs hatása a fehérje szekvenciájára. Ezzel ellentétben egyes mutációk megváltoztatják az ER- $\alpha$  fehérje szekvenciáját. Bár az emlőrákok kétharmada expresszál ER- $\alpha$ -t, annak szekvenciáján belül a mutációk száma viszonylag kevés, azoknak is csak 1%-a van jelen primer tumorokban. Gyakoriságuk a metasztatikus tumorokban magasabb, és korrelál a tamoxifenrezisztenciával, illetve az ösztrogéntől való függetlenséggel.

A teljesség igénye nélkül megemlítendő, hogy a DNS-kötő doménen belüli mutációk általában ösztrogén és tamoxifen által indukált csökkent, vagy hiányzó transzaktivációt eredményeznek, míg egy, a kapocs régió belüli aminosavcsere (a 302 és 303. pozícióban lévő lizin aminosavak argininná, glutaminná vagy alaninná való cserélődése) például megnövekedett ösztrogénindukált transzaktivációt okoz. Az ER- $\alpha$  ligandkötő doménjén belüli mutációk leginkább csökkent ösztrogénkötő affinitást eredményeznek és csökkentik az ösztrogén által indukált transzaktivációt (22). A mutációk azonosítása és funkcionális elemzése segíthet meghatározni, hogy valóban szerepet játszanak-e az emlőrák progressziójában és/vagy a terápia iránti rezisztencia kialakulásában, vagy csupán minden



1. ábra. Az ösztrogénreceptorok szerkezete. A két receptortípus DNS-kötő doménje (fehérjeszinten) 96%-ban egyezik meg, közöttük mégis génexpressziós profilkülönbségek figyelhetők meg. Ezek a funkcionális különbségek az N-terminális AF-1 domén különbözőségéből származtathatóak, amely lehetővé teszi az egyéb transzkripciós faktorokkal történő kölcsönhatást és a target gén aktiválódását. Az ER- $\alpha$  és ER- $\beta$  ligandkötő doménjén szintén fehérjeszinten 58%-ban egyezik meg, és túlnyomóan mindkettő a 17 $\beta$ -ösztradiolt köti. A C-terminális domén mediálja a ligandkötődést, receptordimerizációt és a magi transzlokációt, továbbá itt lokalizálódik az AF-2 ligandfüggő aktivációs domén is (18)

további funkció nélküli elváltozásokról van szó.

## Egynukleotidos polimorfizmusok jelenléte transzkripció kötőhelyekben

Az egynukleotidos polimorfizmusok (SNP-k) a biológiai tulajdonságaink közötti különbségeért felelősek, valamint kapcsolatban állnak számos betegség kialakulásának kockázatával, vagy közvetlenül a betegség létrejöttével. Az ismert SNP-k száma gyorsan emelkedik, számos nemzetközi együttműködésen alapuló program, mint a *HapMap Project* és az *1000 Genome Project* SNP-k millióit genotipizálta több ezer egyénből, így a dbSNP adatbázisában hozzávetőlegesen 52 millió SNP-t tartanak számon, csak humán genom tekintetben. A betegségasszociált polimorfizmusok jelentős része a nem kódoló régiókban lokalizálódik, és úgy gondolják, hogy hatással vannak a gének szabályozására, egy részük pedig befolyásolhatja a transzkripció faktorok kötődését, a kromatinstruktúrát.

A betegségasszociált SNP-k allélikus hatásának azonosítása a transzkripció faktor kötődésben lehetséges megközelítései lehetnének a nem kódoló polimorfizmusok funkcionális szabályozó hatása közvetlen azonosításának. A legtöbb kötőhely vizsgálatra használt CHIP-Seq elemzésből (kromatin-immunprecipitáció mélyszekvenálással kombinálva) származó SNP-k között jelentős számú betegségasszociált variáns található, allélspecifikus kötődésük lehetővé teszi, hogy funkcionális különbséget tegyünk a normál- és kóros haplotípus között (23).

A kötőhelyekben lévő SNP-k (vagy SNV-k, azaz variánsok) egyenként eltérőek lehetnek. Olyan egyéb transzkripció faktorok motívumait bontják meg, mint például a FoxA1, vagy a GATA3, melyek bizonyítottan összefüggésbe hozhatóak az ER<sup>+</sup> emlőrákkal, jelenlétük a kötőesemények során szereppel bír az ER- $\alpha$  DNS-hez való kapcsolódásában. Emlőrákos egyénekben az SNP-k tehát megváltoztathatják az ER- $\alpha$  kötődését, és az adott génexpressziót, ebből adódóan az ilyen polimorfizmusok azonosítása teszi lehetővé az egyedekre jellemző kezelés lehetőségét, hiszen ez esetben az ER- $\alpha$  meghatározza az emlőrák kimenetelét és a kezelésre adott választ (24).

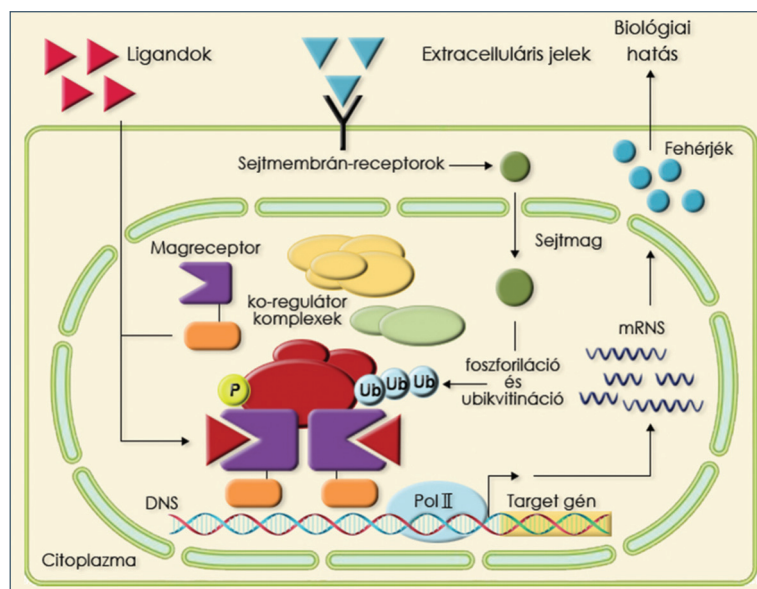
## ER- $\alpha$ általi transzkripció

Az ER- $\alpha$  természetes ligandja az ösztrogén. Az ösztrogének a szteroidhormonok csoportjába

tartozó kis lipofil molekulák, melyek hidroxilcsoportjuk számát tekintve több típusra oszthatóak: az ösztron (E1) egy, az ösztradiol (E2) kettő, míg az ösztriol (E3) három hidroxilcsoportot tartalmaz. Az ösztradiolt (17 $\beta$ -ösztadiol) ösztrogénszerű hatásának erőteljes mértéke különíti el a csoport másik két tagjától, és túlnyomórészt ez az ösztrogén felelős a női reproduktív rendszer szabályozásáért, fejlődéséért, ugyanakkor szerepet játszik a cardiovascularis rendszer, a központi idegrendszer és a csontmetabolizmus szabályozásában is (25). Az ösztradiol a már említett kisméretű lipofil tulajdonságának köszönhetően képes átdiffundálni a sejtmembránon keresztül. A citoplazmában az ER- $\alpha$  chaperonfehérje-komplexhez (hsp90, hsp70, hsp56) kötődve található meg. Amikor az ösztradiol kötődik az ER- $\alpha$ -hoz, az disszociál a chaperon fehérjéről, majd transzlokálódik a sejtmagba, és ott dimerizálódik, végül a kromatinhoz kötődve befolyásolja a transzkripció folyamatokat (2. ábra) (19, 26, 27).

Az ER- $\alpha$  általi transzkripció szabályozás kétféleképpen valósulhat meg. A klasszikus folyamat során az ER- $\alpha$  homodimerként közvetlenül kötődik egy specifikus DNS-szekvencia-motívumhoz, az ösztrogén-válaszadó elemhez (ERE). Az ERE-t 1986-ban a *Xenopus Vitellin* gén promóter régiójában azonosították először egy 13 bázispárnyi, GGTCANNNT-

*A DNS-kötő doménon belüli mutációk általában ösztrogén és tamoxifen által indukált csökkenést, vagy hiányzó transzaktívációt eredményeznek.*



2. ábra. A magreceptorok általi ligandfüggő transzkripció szabályozás sematikus ábrázolása. A ligand kötődése a magreceptorok dimerizációját, illetve a sejtmagba jutását indukálja. A magban a magreceptorok különböző koregulátor komplexekkel specifikus DNS-szekvenciákhoz kötődnek a gén szabályozó régiójában, ahol befolyásolják a célgének átíródását. A külső jelre adott válasz folyamatában a magreceptorok olyan fehérjemódo-sulásai (foszforiláció, ubikvitináció) jöhetnek létre, melyek így meghatározzák a gének kifejeződését, és a biológiai hatást (27)

GACC palindrom szekvenciaként (28, 29). *John W. Schwabe* volt az, aki kristályosította ezt a DNS-szakaszt, felismerve, hogy az ER- $\alpha$  szimmetrikus dimerként kapcsolódik ehhez a palindrom szekvenciához, amely két darab, 6 bp-nyi fél kötőhelyből és az azt összekötő 3 bp-nyi szakaszból áll (29).

A humán genom szekvenciaelemzése alapján körülbelül 70 000 ERE található a genomban, összehasonlítva az egér genomjával, mindösszesen 660, evolúciósan konzervált ERE van (31). Az ilyen *in silico* tanulmányok alapján feltételezzük, hogy nem minden ERE valós ER-kötőhely, illetve azt, hogy a kötődés sokkal több tényezőtől függ, mint maga a DNS-szekvencia.

A másik lehetséges módja a kötődésnek a nem klasszikus útvonal. Ennek során az ER- $\alpha$  indirekt módon kötődik a DNS-hez, más transzkripciós faktorokhoz kapcsolódva, mint például az Sp-1, AP-1 és NF- $\kappa$ B. Ezen útvonal létrejött a transzkripciót az ERE-től független módon szabályozza (26).

Az ösztrogénindukált jelátviteli folyamat kialakulhat a sejtmembránban lokalizálódó ER-től, amikor más membránreceptorok (ioncsatornák, tirozinkináz-receptorok, mGlu) aktivációját eredményezi, és citoplazmatikus jelátviteli kaszkádokat (például proteinkináz kaszkádútvonalak) indítanak be, ezáltal közvetett módon befolyásolják a transzkripciót és a translációt. Ez a folyamat sokkal gyorsabban végbemegy, mint a sejtmagi transzkripciós szabályozás, ezen felül kritikus szerepet játszik a központi idegrendszerben, csontban, májban és egyéb szövetekben. Az ER ligand független módon is aktiválódhat, mely folyamat során a neurotranszmitterek, növekedési faktorok által kiváltott proteinkináz kaszkádútvonalon történő ER- $\alpha$  foszforilációja fogja aktiválni a transzkripciót (19, 32–34). Itt még meg kell említeni az ösztrogén ER-független működését is, amelynek során az ösztrogénnek antioxidáns szerepe van, azaz védi a sejteket az oxidatív stressztől. Ez a szerepe az ösztrogén struktúrájából adódó fenolgyűrűnek köszönhető. Az ösztrogén ilyen protektív hatásának a neuronok esetén van kiemelt szerepe (29).

## Ösztrogén a csontban

Az ösztrogénnek szerepe van számos biológiai folyamatban, mint például a női reproduktív rendszer fejlődésében és fenntartásában, ugyanakkor szerepet játszik a cardiovascularis rendszer, a központi idegrendszer és a csontmetabolizmus szabályozásában is. A menopauzát köve-

tő időszakban a nők esetén jelentősen megnő az osteoporosis kialakulásának esélye. Az osteoporosisra jellemző a csontszövet vesztése, mely az alacsony csonttömeggel jár, illetve sérül a csont mikrostruktúrája, ami növeli a törések valószínűségét (27, 29). Kísérletes osteoporoticus csontfenotípust nőstény rágcsálókban méh és petefészek eltávolításával hoztak létre (35, 36). Genetikai tanulmányok és klinikai megfigyelések alátámasztják, hogy azok a férfi betegek, akiknél hiányzik az ösztrogén bioszintézise, illetve ER- $\alpha$ -funkcióvesztéssel rendelkeznek, az osteoporosis tüneteit mutatják (37, 38). Mindez bizonyítékkal szolgál az ösztrogén oszteoprotektív hatására, mely fontos szerepet játszik a csont homeosztázisának fenntartásában mindkét nem esetében. Az ösztrogénnek védőszerepe van ebben a folyamatban azáltal, hogy szabályozza a csontmetabolizmust, a megnövekedett csontturnover és a csontvesztés gátlása révén. Az ER- $\alpha$  és ER- $\beta$  is expresszálódik csontban, azonban az ösztrogénreceptorok molekuláris szerepe még tisztázatlan az ösztrogén általi protektív folyamatban. Az ER szerepének tanulmányozásához olyan egérmodelleket használnak, ahol kiütik, tehát inaktívválik a vizsgálni kívánt ER gént. Az ER szerepének vizsgálatáról a csontban számos tanulmány jelent meg, melyek eredményeinek összefoglalóját a 2. táblázat tartalmazza (21, 27).

A nőstény ER- $\alpha$ KO (KO = knock out, génkiütött) egerek megnövekedett csonttömeget mutatnak alacsony csontturnoverrel. A petefészek eltávolítását követően csökken a csonttömeg a megnövekedett csontreszorpció miatt, az ösztrogénszintézis kontrolljának elvesztése miatt pedig megnő a szérumszintje, mely az ösztrogén fő prekursora. Hím ER- $\alpha$ KO egerek esetében a csökkent reszorpció következtében növekedett trabecularis csonttömeg figyelhető meg emelkedett tesztoszteronszinttel, ebben az esetben az emelkedett androgénreceptor funkciója kompenzálja a csontban. Az ER- $\beta$ KO egerek esetén némileg csökkent csontreszorpció és megnövekedett szivacsos állomány figyelhető meg, ER- $\alpha$  $\beta$ KO egereknél pedig jelentős csonttömegvesztés emelkedett hormonszinttel – az ER- $\beta$ KO és az ER- $\alpha$ KO egerekhez hasonlóan, mely az ER- $\alpha$  és ER- $\beta$  közötti koordinációra utal az ösztrogén oszteoprotektív működésében. Azáltal, hogy a hagyományos ER kiütése hatással van az egész endokrin rendszerre, létrehoztak egy csontspecifikus osteoclastban kiütött ER- $\alpha$ KO egeret, melyben lehetővé vált az ER szerepének vizsgálata anélkül, hogy azt másodlagos hatások befolyásolnák. Ennek köszönhetően nem látható változás a cirkuláló

*Az ösztrogénnek antioxidáns szerepe van, azaz védi a sejteket az oxidatív stressztől.*

**2. táblázat.** Az ösztrogénreceptorok szerepe a csontban. A táblázat szemlélteti, hogy az egyes ösztrogénreceptorok egyedi, illetve együttes inaktiválása és az osteoclastokban lévő ER $\alpha$  inaktiválása milyen hatással van adott folyamatokra, vagy az egyes keringő nemi hormonok szintjére

	ER $\alpha$ KO		ER $\beta$ KO		ER $\alpha\beta$ KO		OcER $\alpha$ KO	
	Férfi	Nő	Férfi	Nő	Férfi	Nő	Férfi	Nő
Trabecularis BMD fiatalokban	↓	→	→	→	↓	↓	→	↓
Trabecularis BMD idősekben	↑	↑	→	↑	↑	→	→	↓
Corticalis BMD	↓	↓	→	→	↓	↓	→	→
Trabecularis BV/TV	↑	↑	→	↑	↑	↓	→	↓
Csontképződés	↓	↓	→	→	↓	↓	→	↑
Csontreszorpció	↓	↓	→	↓	↓	→	→	↑
17 $\beta$ -ösztradiol	→ / ↑	↑↑	→	→	→	→ / ↑	→	→
Tesztoszteron	↑↑	↑	→	→	↑↑	→ / ↑	→	→

KO: knock out; OcER $\alpha$ KO: inaktivált ER $\alpha$  az osteoclastban; BMD: bone mineral density; BV: bone volume; TV: trabecular volume. Jelmagyarozat: csökkent: ↓, emelkedett: ↑, fokozottan emelkedett: ↑↑, normál: → (39)

nemi hormonok szintjében, viszont jelentős csonttömegvesztés tapasztalható a trabecularis csontban, magas csontturnoverrel a nőstényekben. Az osteoclast-ER- $\alpha$  (OcER- $\alpha$ ) mediálja a csontreszorpció ösztrogénfüggő csökkenését az osteoclastokban a sejthalál-stimuláción keresztül, azaz szabályozza az osteoclastok élettartását és hatást gyakorol az oszteoprotektív folyamatra (21, 27, 39).

Mindezek alapján elmondható, hogy az ER- $\alpha$  fiziológiás és kóros mértékű jelenléte fontos szerepet játszik nemcsak az emlőrák, hanem a posztmenopauza szövődeményeként megjelenő csonttritkulásban is. Mind az ER- $\alpha$  és a vele kooperáló transzkripciós faktorok, továbbá a kötőhelyeikben lévő mutációk feltérképezésének fontossága is abban rejlik, hogy az emlőrák és az

osteoporosis is világszerte a női populáció jelentős hányadát érinti, a ma már rendelkezésünkre álló számos laboratóriumi metodika és bioinformatikai elemzési módszer pedig minden bizonyítást lehetővé tesz a komplexebb kezelési célpontok megalkotására.

#### Köszönetnyilvánítás

Dr. Bálint Bálint László Magyar Zoltán-ösztöndíjként végzi kutatását, mely az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergenciaprogram” című kiemelt projekt keretei között valósult meg.

## Irodalom

1. Beatson GT. On the treatment of inoperable case of carcinoma of the mamma: Suggestions for new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* 1896;2:104-7.
2. Gorski J, Toft D, Shyamala G, Smith D, Notides A. Hormone receptors: Studies on the interaction of estrogen with the uterus. *Recent Prog Horm Res* 1968;24:45-80.
3. Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;59(2):632-8. PMID: PMC224719.
4. Toft D. The interaction of uterine estrogen receptors with DNA. *J Steroid Biochem* 1972;3(3):515-22.
5. O'Malley BW, Aronow A, Peacock AC, Dingman CW. Estrogen-dependent increase in transfer RNA during differentiation of the chick oviduct. *Science* 1968;162(3853):567-8.
6. McGuire WL. Estrogen receptors in human breast cancer. *J Clin Invest* 1973;52(1):73-7. PMID: PMC302228.
7. Avioli LV. Senile and postmenopausal osteoporosis. *Adv Intern Med* 1976;21:391-415.
8. Nutik G, Cruess RL. Estrogen receptors in bone. an evaluation of the uptake of estrogen into bone cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146(1):265-8.
9. Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, et al. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* 1986;24(1):77-83.
10. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986;231(4742):1150-4.
11. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lytle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: Insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 2003;144(10):4562-74.
12. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000;406(6797):747-52.
13. Prat A, Baselga J. The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer

- with co-expression of HER2. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5(9):531-42.
14. Sladek FM. What are nuclear receptor ligands? *Mol Cell Endocrinol* 2011;334(1-2):3-13. PMID: PMC3010294.
  15. Ottow E. Nuclear receptors as drug targets. In: Weinmann H (editor). *Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2008.*
  16. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(12): 993-6.
  17. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(12):5925-30. PMID: PMC39164.
  18. Higa GM, Fell RG. Sex hormone receptor repertoire in breast cancer. *Int J Breast Cancer* 2013;2013:284036. PMID: PMC3845405.
  19. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81(4):1535-65.
  20. Kininis M, Chen BS, Diehl AG, Isaacs GD, Zhang T, Siepel AC, Clark AG, Kraus WL. Genomic analyses of transcription factor binding, histone acetylation, and gene expression reveal mechanistically distinct classes of estrogen-regulated promoters. *Mol Cell Biol* 2007;27(14):5090-104. PMID: PMC1951957.
  21. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. *Trends Mol Med* 2013;19(3):197-209. PMID: PMC3595330.
  22. Herynk MH, Fuqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* 2004;25(6):869-98.
  23. Ni Y, Hall AW, Battenhouse A, Iyer VR. Simultaneous SNP identification and assessment of allele-specific bias from ChIP-seq data. *BMC Genet* 2012;13:46-2156-13-46. PMID: PMC3434080.
  24. Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, Holmes KA, Ali HR, Dunning MJ, et al. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature* 2012;481(7381):389-93. PMID: PMC3272464.
  25. Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Nuclear hormone receptors: Ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol* 1996;3(7):529-36.
  26. Welboren WJ, Sweep FC, Span PN, Stunnenberg HG. Genomic actions of estrogen receptor alpha: What are the targets and how are they regulated? *Endocr Relat Cancer* 2009;16(4):1073-89.
  27. Imai Y, Youn MY, Inoue K, Takada I, Kouzmenko A, Kato S. Nuclear receptors in bone physiology and diseases. *Physiol Rev* 2013;93(2):481-523. PMID: PMC3768103.
  28. Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* 1986;26 46(7):1053-61.
  29. Richardson TE, Yu AE, Wen Y, Yang SH, Simpkins JW. Estrogen prevents oxidative damage to the mitochondria in friedreich's ataxia skin fibroblasts. *PLoS One* 2012;7(4): e34600. PMID: PMC3318005.
  30. Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. *Cell* 1993;75(3):567-78.
  31. Bourdeau V, Deschenes J, Metivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, et al. Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol* 2004;18(6):1411-27.
  32. Levin ER. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol (1985)* 2001; 91(4):1860-7.
  33. Vasudevan N, Pfaff DW. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front Neuroendocrinol* 2008;29(2):238-57.
  34. Hayashi S, Yamaguchi Y. Estrogen signaling pathway and hormonal therapy. *Breast Cancer* 2008;15(4):256-61.
  35. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003;423(6937):349-55.
  36. Harman SM. Estrogen replacement in menopausal women: Recent and current prospective studies, the WHI and the KEEPS. *Gend Med* 2006;3(4):254-69.
  37. Jones ME, Boon WC, Proietto J, Simpson ER. Of mice and men: The evolving phenotype of aromatase deficiency. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17(2):55-64.
  38. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994;331(16):1056-61.
  39. Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S. Minireview: Osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 2010;24(5): 877-85.