

Received: 2016.02.03
Accepted: 2016.11.25
Published: 2017.06.08

Mitochondria jako organelle docelowe dla działania estrogenów

Mitochondria: Target organelles for estrogen action

Małgorzata Chmielewska, Izabela Skibińska, Małgorzata Kotwicka

Katedra i Zakład Biologii Komórki, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Estrogeny należą do grupy hormonów steroidowych, których wielokierunkowe działanie zależy od dwóch typów receptorów: receptora estrogenowego 1 (ESR1) oraz estrogenowego 2 (ESR2). Hormony te mogą wpływać na komórki docelowe na drodze genowej oraz niegenowej. W „klasycznym” genowym mechanizmie działania kompleks ligand-receptor pełni rolę czynnika transkrypcyjnego, który moduluje ekspresję wielu genów docelowych dla estrogenów. Obserwowane w komórkach szybkie, występujące już po kilku sekundach od stymulacji, skutki działania estrogenów wskazują na ich niegenowe działanie. Mechanizm ten jest ciągle słabo poznany i wykazuje znaczne zróżnicowanie, zależne od rodzaju hormonu i typu komórki docelowej. Estrogeny wykazują wielokierunkowe działanie również w obrębie organelli komórkowych. Uważa się, że organellami docelowymi dla estrogenów są prawdopodobnie m.in. mitochondria, które ze względu na dużą zawartość lipidów stanowią swoisty rezerwuár estrogenów komórki. Mechanizm działania estrogenów na mitochondria nie jest w pełni poznany. W wielu komórkach potwierdzono obecność zarówno ESR1 jak i ESR2 (wskazując na ESR2 jako postać dominującą). Podejrzewa się, że w mechanizm, który zarządza migracją ESR w kierunku błony mitochondrialnej są zaangażowane receptory Tom20, Tom70 oraz białka opiekuńcze Hsp70 i Hsp90. Zaobserwowano, że estrogeny egzogenne wpływają na ekspresję genów mitochondrialnych, morfologię mitochondriów oraz poziom obecnych w mitochondriach reaktywnych form tlenu.

Słowa kluczowe: estrogeny • receptory estrogenowe • mitochondria

Summary

Estrogens belong to a group of sex hormones, which have been shown to act in multidirectional way. Estrogenic effects are mediated by two types of intracellular receptors: estrogen receptor 1 (ESR1) and estrogen receptor 2 (ESR2). There are two basic mechanisms of estrogen action: 1) classical-genomic, in which the ligand-receptor complex acts as a transcriptional factor and 2) a nongenomic one, which is still not fully understood, but has been seen to lead to distinct biological effects, depending on tissue and ligand type. It is postulated that nongenomic effects may be associated with membrane signaling and the presence of classical nuclear receptors within the cell membrane. Estrogens act in a multidirectional way also within cell organelles. It is assumed that there is a mechanism which manages the migration of ESR into the mitochondrial membrane, wherein the exogenous estrogen affect the morphology of mitochondria. Estrogen, through its receptor, can directly modulate mitochondrial gene expression. Moreover, by regulating the level of reactive oxygen species, estrogens affect the biology of mitochondria. The considerations presented in this paper indicate the pleiotropic effects of estrogens, which represent a multidirectional pathway of signal transduction.

Keywords: estrogens • estrogen receptors • mitochondria

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1239871
DOI:	10.5604/01.3001.0010.3828
Word count:	3656
Tables:	3
Figures:	–
References:	120

Adres autorki: mgr Małgorzata Chmielewska, Katedra i Zakład Biologii Komórki, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, 60-806 Poznań, ul. Rokietnicka 5d, e-mail: mchmielewska@ump.edu.pl

Wykaz skrótów: **5'UTR** – region niekodujący 5' (5' untranslated region), **ARKO** – nokaut genu kodującego aromatazę (aromatase-knockout), **ATP** – adenozy-5'-trifosforan (adenosine triphosphate), **BAD** – białko proapoptotyczne związane z białkiem Bcl-2 (Bcl-2-associated death promotor), **Bax** – białko proapoptotyczne związane z białkiem Bcl-2 (Bcl-2 associated X protein), **BSA** – surowicza albumina wołowa (bovine serum albumin), **Ca²⁺** – jony wapniowe (calcium ions), **CHO** – komórki jajnika chomika chińskiego (chinese hamster ovary), **COX-1, COX-2, COX-3** – podjednostki oksydazy cytochromu c (cytochrome c oxidase subunits), **COX7RP** – białko związane z podjednostką IV oksydazy cytochromu c (cytochrome c oxidase subunit IV-related protein), **DHHC-7, DHHC-21** – transferaza palmitylowa zawierająca domenę DHHC (palmitoyltransferase containing DHHC domain), **DLD-1** – komórki gruczolakoraka jelita grubego (colorectal adenocarcinoma cells), **DRP1** – dynaminowe białko cytoplazmatyczne (dynamin-related protein), **eNOS** – endotelialna synteza tlenu azotu (endothelial nitric oxide synthase), **ERKO** – nokaut genu dla receptora estrogenowego (estrogen receptor knockout), **ESR** – receptory estrogenowe (estrogen receptors), **ESR1** – receptor estrogenowy typu 1 (estrogen receptor type 1), **ESR2** – receptor estrogenowy typu 2 (estrogen receptor type 2), **FIS1** – białko związane z fragmentacją mitochondrium (mitochondrial fission 1 protein), **HEK-293** – embrionalne komórki nerki (human embryonic kidney 293 cells), **HepG2** – komórki nowotworu wątroby (liver hepatocellular carcinoma cells), **HPIP** – białko wiążące mikrotubule (hematopoietic Pbx-interaction protein), **Hsp70, Hsp 90** – białka opiekuńcze z rodziny białek szoku cieplnego (heat shock protein 70, heat shock protein 90), **MCF7** – komórki nowotworowe gruczołu piersi (human breast adenocarcinoma cell line), **MNAR** – modulator niegenowej aktywności receptorów estrogenowych (modulator of nongenomic action of estrogen receptor), **mRNA** – matrycowe RNA (messenger RNA), **MFN1, MFN2** – mitofuzyna 1, 2 (mitofusin 1, 2), **NO** – tlenek azotu (nitric oxide), **NRF-1** – jądrowy czynnik transkrypcyjny (nuclear respiratory factor 1), **OPA1** – współczynnik zaniku nerwu wzrokowego 1 (optic atrophy factor 1), **p130Cas** – białko adaptorowe (adaptor protein p130Cas), **PAT** – acetylotransferaza palmitylowa (palmitoylacyltransferase), **PELP1** – białko 1 bogate w prolinę, kwas glutaminowy i leucynę (proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein-1), **RNA** – kwas rybonukleinowy (ribonucleic acid), **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species), **rRNA** – rybosomalny RNA (ribosomal ribonucleic acid), **Shc** – białka adaptorowe z rodziny Shc (Shc family adaptor protein), **TOM** – translokaza zewnętrznej błony mitochondrialnej (translocase of the outer membrane), **TPR** – motyw tetratrikopeptydów (tetratricopeptide repeat motif), **tRNA** – transferowy RNA (transfer RNA), **tRNA-met** – inicjatorowy tRNA (initiator tRNA).

WSTĘP

Estrogeny należą do grupy hormonów pleiotropowych, których wielokierunkowe działanie jest zależne od dwóch typów receptorów: estrogenowego 1 (ESR1) oraz estrogenowego 2 (ESR2). W klasycznym genowym mechanizmie działania steroidów kompleks ligand-receptor pełni rolę czynnika transkrypcyjnego, który moduluje ekspresję wielu genów docelowych. Badania opisujące bardzo szybkie, pojawiające się już po kilkunastu sekundach od stymulacji, odpowiedzi komórek stymulowanych hormonami steroidowymi wskazują, że mogą one działać na komórki w mechanizmie niegenowym. Mimo intensywnych badań mechanizm ten jest

ciągle słabo poznany i wykazuje znaczne zróżnicowanie, zależne od rodzaju hormonu i typu komórki docelowej [24,44,99]. W 1998 r. podczas konferencji w Mannheim zaproponowano kryteria, dzięki którym można sklasyfikować niegenowy mechanizm działania steroidów. Jest to praktyczny przewodnik, który pozwala lepiej zrozumieć, ale także scharakteryzować potencjalny mechanizm działania tych hormonów w planowanych doświadczeniach. Zaproponowany wówczas schemat przyjmuje podział na dwie główne grupy: A (bezpośrednie działanie steroidów) oraz B (pośrednie działanie steroidów). W obrębie tych grup wyodrębniono kategorie, które określają swoistość zachodzącej reakcji. Swoisty mechanizm działania, w porównaniu do nieswoistego,

jest zależny od obecności klasycznych receptorów jądrowych lub receptorów nieklasycznych [30].

SZYBKIE EFEKTY DZIAŁANIA ESTROGENÓW

C.M Szego oraz J. Davis już w 1967 r. zaobserwowali, iż po kilku sekundach od podania 17β -estradiol powoduje wzrost stężenia wolnych jonów wapniowych w komórkach macicy szczura [106]. Na podstawie przeprowadzonych badań wynioskowano, iż jest to związane z sygnalizacją błonową. Wyniki kolejnych badań, opublikowane w 1977 r., były potwierdzeniem wcześniejszych doniesień. Szego oraz Pietras wykazali, iż na powierzchni komórek wyizolowanych z endometrium występują miejsca swoistego wiązania estrogenów [85]. Szybkie działanie tej grupy hormonów steroidowych zaobserwowano również w komórkach przyśadki [27], komórkach warstwy ziarnistej otaczającej oocyt kury [75] oraz w dojrzewającym oocyście ludzkim [107]. Późniejsze badania wykazały, iż szybkie działanie estrogenów jest związane z obecnością w błonie komórkowej receptorów estrogenowych. Dwie niezależne grupy badaczy, korzystając z metod immunocytochemicznych, wykazały w obrębie błony komórkowej obecność białka, które zostało zidentyfikowane jako klasyczny receptor jądrowy [77,79]. Badania, w których komórki CHO (chinese hamster ovary) poddano transfekcji plazmidem z wklonowanym genem *ESR1* oraz *ESR2*, wykazały iż ekspresja tych genów daje ten sam transkrypt, zarówno dla receptorów jądrowych jak i błonowych [92]. Zaobserwowano również, iż komórki izolowane od transgenicznych myszy z nokautem genu *ESR1* oraz *ESR2* (myszy ERKO, estrogen receptor knockout) były pozbawione miejsc wiążących estrogeny w obrębie błony komórkowej. W wyniku tej modyfikacji, nie obserwowano szybkiej odpowiedzi komórek stymulowanych estrogenami [1]. Pedram i wsp. wyizolowali błonowe oraz jądrowe frakcje wiążące estrogeny z komórek nowotworowych gruczołu piersi linii MCF7 [83]. Autorzy wykazali, że wyizolowane frakcje błonowe są podobne strukturalnie do klasycznych receptorów jądrowych [82]. Uważa się również, iż regulacja ekspresji wielu głównych genów odpowiedzialnych za prawidłowy rozwój i funkcjonowanie narządów zależy od transdukcji sygnałów estrogenów zarówno przez jądrowy jak i błonowy receptor estrogenów [83].

Dostępne są również publikacje, które kwestionują błonowe umiejscowienie klasycznych receptorów jądrowych [109] i zaznaczają konieczność wykonania badań, które wyjaśnią różnorodność mechanizmów działania estrogenów na poziomie błony komórkowej [115].

BŁONOWE RECEPTORY DLA ESTROGENÓW

Walter i wsp. w 1985 r. zaobserwowali obecność w komórkach linii MCF7, wariantu receptora estrogenowego typu 1 o masie 46 kDa [113]. Wyróżniono dwa główne procesy warunkujące zróżnicowaną ekspresję genu *ESR1*. Okazało się, iż w kontrolę procesu transkrypcji jest zaangażowa-

nych kilka promotorów. Ponadto, w wyniku alternatywnego splicingu, może powstać mRNA różniące się w obrębie regionu flankującego koniec 5' (5'UTR). Poszczególne warianty mRNA powstają w wyniku procesu transkrypcji z użyciem swoistego dla danej postaci promotora [46,48]. Białko o masie 46 kDa zostało ponownie zidentyfikowane w komórkach nowotworu piersi [34] oraz w ludzkich osteoblastach [26]. Powyższa izoforma jest prawdopodobnie związana z błonową transdukcją sygnału [68]. Podobne wyniki uzyskano również w przypadku komórek endotelialnych [61].

Ekspresja wariantu *ESR1*, o masie 36 kDa, zachodzi głównie w komórkach nowotworów piersi, zarówno *ESR1*-pozytywnych, jak i *ESR1*-negatywnych. Wariant ten zidentyfikowano również w nowotworowych komórkach macierzystych/progenitorowych. Prawdopodobnie bierze on udział w szybkiej transdukcji sygnału indukowanego przez estrogeny [25,58,114]. W piśmiennictwie wskazuje się na ciągłe postępy w badaniu struktury, funkcji oraz na potencjalne możliwości wykorzystania tego wariantu receptora estrogenowego typu 1 jako cel terapeutyczny w przypadku nowotworów piersi [89,105].

W strukturze klasycznych receptorów estrogenowych nie wyróżnia się domen transbłonowych, które są charakterystyczne dla błonowych białek receptorowych. Sugeruje się, iż zakotwiczenie ESR jest możliwe dzięki modyfikacjom potranslacyjnym oraz asocjacji z białkami błonowymi [52]. Maksymalnie 5-10% z puli receptorów estrogenowych charakteryzuje się lokalizacją błonową [60,82]. Uważa się, iż aktywowane estrogenami błonowe ESR występują w formie dimerycznej. Zasygerowano, iż jest to preferowana konformacja receptorów, która zapewnia prawidłową transdukcję sygnału. Wykazano, iż stymulowane 17β -estradiolem komórki nowotworu piersi linii MCF7, charakteryzują się błonowym umiejscowieniem głównie form homodimerycznych *ESR1*. Komórki endotelialne są pod tym względem zróżnicowane, ponieważ na ich powierzchni jest obecny zarówno *ESR1*, jak i *ESR2*, który może tworzyć formy homo – bądź heterodimeryczne [94]. Natomiast Chambliss i wsp. wykazali, iż stymulowana 17β -estradiolem aktywacja endotelialnej syntazy tlenu azotu (eNOS, endothelial nitric oxide synthase) nie wymaga dimeryzacji *ESR1* [14].

W dostępnym piśmiennictwie wskazuje się, iż błonowe receptory estrogenowe są umiejscowione głównie w niewielkich wpukleniach błony komórkowej, zwanych kaweolami. Struktury te należą do grupy raftów (tratw) lipidowych. Ich średnica wynosi 50-100 nm, a rdzeń lipidowy wzbogacony jest o cholesterol, sfingolipidy oraz glikolipidy. Kaweole tworzą rusztowanie i zapewniają stabilne zakotwiczenie ESR oraz innych cząsteczek, które biorą udział w transdukcji sygnału związanego z błoną komórkową. Kształt oraz formowanie kaweoli jest zależne od integralnego białka błonowego – kaweoliny [63,80]. Początkowo obecność tych struktur zaobserwowano głównie w komórkach endotelialnych. Kim i wsp.

wykazali, iż zakotwiczony w błonie kaweoli ESR1 pośredniczy w szybkim uwalnianiu tlenu azotu (NO) w komórkach stymulowanych 17 β -estradiolem [51]. Wyniki badań potwierdziły doniesienia innej grupy badaczy, którzy wykazali, iż ESR1 pośredniczy w aktywacji eNOS wywołanej stymulacją 17 β -estradiolem. Nie powiązano wówczas współwystępowania ESR1 oraz eNOS w błonie kaweoli [21]. W następnych latach wykazano, iż w kaweolach komórek endotelialnych eNOS zarówno z ESR1, jak i izoformą o masie 46 kDa tworzy funkcjonalny moduł, który aktywuje wytwarzanie tlenu azotu w bardzo krótkim czasie po stymulacji 17 β -estradiolem [33,53]. Sugeruje się również, iż proces ten może wpływać na zmianę lokalnego stężenia jonów wapniowych [13,50]. Postuluje się, iż ESR2 może w podobny sposób oddziaływać z eNOS i pośredniczyć w niegenowym mechanizmie działania estrogenów w obrębie błony kaweoli komórek endotelialnych [15]. Należy zaznaczyć, iż błonowe umiejscowienie receptorów estrogenowych jest zróżnicowane w zależności od typu komórki [69]. Zaobserwowano, iż ESR2, w porównaniu z ESR1, ulega translokacji w kierunku błony komórek linii HT-22, ale nie tworzy kompleksu z kaweoliną-1 [100]. Komórki gruczolakoraka jelita grubego linii DLD-1 stymulowane 17 β -estradiolem wykazują błonowe umiejscowienie ESR2, który asocjuje z kaweoliną-1 [36]. Podobne wyniki uzyskano w komórkach embrionalnych nerki linii HEK-293, w których zakotwiczenie receptora estrogenowego typu 2 w kaweolach okazało się kluczowe dla prawidłowej transdukcji sygnału [37]. Kolokalizację ESR1 oraz kaweoliny-1 zaobserwowano w obrębie komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz komórek linii MCF-7. Wykazano, iż stymulacja 17 β -estradiolem reguluje ponadto syntezę kaweoliny [91].

Wskazuje się, iż zakotwiczenie receptorów estrogenowych w błonie komórkowej zależy od procesu palmitylacji. Jest to modyfikacja potranslacyjna, której mechanizm polega na przyłączeniu przez enzym PAT (palmitoyltransferase) kwasu palmitynowego do reszt cysteiny w obrębie danego białka. Jedne z pierwszych doniesień miały na celu wyjaśnienie roli procesu palmitylacji w kierowaniu receptorów estrogenowych do błony komórkowej. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej białka ESR1, ESR2 oraz kaweoliny-1 uznano, iż cysteina 477 domeny wiążącej ligand (domena E) receptora estrogenowego 1, cysteina 399 receptora estrogenowego 2 oraz cysteina 133 kaweoliny-1 podlegają palmitylacji. Podkreślono, iż sekwencja aminokwasów otaczających poszczególne cysteiny wymienionych białek wykazuje znaczną homologię [4]. Późniejsze badania potwierdziły, że cysteina 447 ESR1 jest jednym z 9 aminokwasów tworzących motyw poddawany palmitylacji, który jest podstawowy dla prawidłowego przebiegu tego procesu. Ponadto wykazano, iż pula jądrowych ESR nie podlega palmitylacji [2,3,66,84]. Na podstawie obecnych danych wiadomo, iż transferaza palmitylowa DHHC-7 oraz DHHC-21 katalizują reakcję palmitylacji receptorów hormonów steroidowych [81]. Okazuje się również, iż na translokację ESR1 w kierunku błony ma wpływ

fosforylacja kaweoliny-1, która jest skutkiem indukowanym przez 17 β -estradiol [54]. Wykazano błonową lokalizację nie tylko ESR1, ale również ESR2 oraz wpływ 17 β -estradiolu na proliferację komórek nowotworowych za pośrednictwem tych receptorów [67]. Także seryna 522, która korzystnie moduluje interakcje kaweoliny-1 z receptorem, zarządza migracją ESR1 w kierunku błony komórkowej [90]. Zaobserwowano znaczne obniżenie puli błonowych ESR, ale nie jądrowych, w komórkach z wyciszoną ekspresją genu kaweoliny-1 [22,84]. Jak zatem wytłumaczyć, iż maksymalnie 10% receptorów estrogenowych charakteryzuje się błonowym umiejscowieniem skoro motyw ulegający palmitylacji jest obecny w strukturze każdego receptora? Okazuje się, iż proces dimeryzacji receptorów estrogenowych ogranicza pulę dostępnych monomerów, które są jedyną formą poddawaną palmitylacji [59].

Postuluje się również, iż białko szoku cieplnego HSP27 (heat shock protein 27) odgrywa główną rolę w procesie palmitylacji, migracji oraz w funkcjonowaniu receptorów steroidowych jako mediatorów w szybkiej transdukcji sygnału związanej z błoną komórkową [93]. Wyróżnia się ponadto grupę białek, które tworzą rusztowanie dla ESR, wspomagają ich migrację w kierunku błony oraz pełnią rolę transmiterów sygnału. Do grupy tej, poza kaweoliną, należą również białka adaptorowe p130Cas oraz Shc, białko wiążące mikrotubule – HPIP, białko związane z przerzutami nowotworowymi – MTA1 oraz striatyna [9]. W dostępnym piśmiennictwie wskazuje się, iż białko PELP1 (proline-, glutamic acid – and leucine-rich protein-1), wcześniej określane jako MNAR (modulator of nongenomic action of estrogen receptor), pełni ważną rolę w stabilizowaniu kompleksu ESR, ponieważ łączy wyżej wymienione białka w integralną całość, przez co zwiększa skuteczność transdukcji sygnału z receptora błonowego. Uważa się, że białko PELP1 działa wielokierunkowo – pełni rolę koaktywatora ESR w procesie aktywacji transkrypcji oraz moduluje procesy biologiczne zachodzące w komórkach nowotworowych. Regulacja tych procesów odgrywa również istotne znaczenie w komórkach somatycznych, które nie uległy transformacji nowotworowej [35,38,40,110].

ESTROGENY A MITOCHONDRIA

Mitochondria są zdolne do wytwarzania ponad 95% energii komórkowej w procesie oddychania komórkowego. Ponadto pełnią kluczową rolę w procesie apoptozy oraz biorą udział w wielu przemianach biochemicznych komórki, takich jak: regulacja homeostazy jonów wapniowych, synteza hemu, lipidów, aminokwasów, czy też nukleotydów [39]. Na podstawie aktualnego stanu wiedzy należy przyjąć, że estrogeny wpływają w bezpośredni sposób na funkcję mitochondriów [55,101]. Stwierdzono, że do mitochondriów są transportowane estrogeny egzogenne. Sprzyjają temu lipofilne właściwości estrogenów. Wskazuje się, że w komórkach oprócz biernej dyfuzji uczestniczy również szybki mechanizm transportu estrogenów do mitochondriów,

Tabela 1. Umiejscowienie receptorów estrogenowych w obrębie mitochondrium w różnych typach komórek

Mitochondrialna lokalizacja receptorów estrogenowych	Pochodzenie komórek	ESR1	ESR2	Piśmiennictwo
Komórki HepG2	człowiek	+	+	[73]
Komórki MCF7	człowiek	+	++	[18]
Komórki macicy	królik	+	+	[74]
Komórki jajnika	królik	++	+	[74]
Kardiomiocyty	szczur		+	[116]
Komórki hipokampa	szczur	*	+	[45,72,117]
Komórki hipokampa	mysz		+	[117]
Komórki C2C12	mysz	+	+	[71]
Komórki HLE-B3	człowiek	-	+	[10]
Komórki HLE-B3, komórki nabłonkowe soczewki	człowiek	*	+	[11]
Komórki SaOS-2	człowiek	+	+	[88,102]
Komórki HepG2	człowiek	+	+	[88,102]
Plemniki	człowiek	-	+	[103]

(+) potwierdzona ekspresja; (++) potwierdzony wyższy poziom ekspresji (-) potwierdzony brak ekspresji; (*) brak danych

najprawdopodobniej w wyniku endocytozy zależnej od receptora. Ze względu na dużą zawartość lipidów, mitochondria stanowią swoisty rezerwuár estrogenów komórki [31].

MITOCHONDRIALNE RECEPTORY ESTROGENOWE

Mechanizm działania estrogenów na mitochondria nie jest w pełni poznany. Badania potwierdzające obecność w mitochondriach ESR sugerują ich udział w mitochondrialnej transdukcji sygnału estrogenów. Pierwsze badania tego zjawiska dotyczyły znakowanych radioaktywnie ligandów [42,78]. Kolejne wiązały się bezpośrednio z identyfikacją poszczególnych podtypów receptorów estrogenowych (tabela 1). Zastosowane kompleksy złota koloidalnego, BSA (bovine serum albumin) oraz estrogenów pozwoliły w sposób bezpośredni zwiualizować dystrybucję liganda na poziomie błony komórkowej oraz jego translokację w kierunku mitochondrium [73]. Badania immunocytochemiczne potwierdziły obecność ESR w mitochondriach komórek macicy oraz jajnika królika. Zaznaczono, iż w komórkach jajnika ESR1 jest formą dominującą [74]. Inna grupa badaczy zaobserwowała, iż w mitochondriach komórek stymulowanych 17β-estradiolem występuje zarówno ESR1, jak i ESR2, ale receptor estrogenowy typu 2 jest postacią dominującą [18]. ESR2 w mitochondriach zaobserwowano również w szczurzych kardiomiocytach [117] oraz komórkach hipokampa [45,72,117], mysich komórkach hipokampa [117] oraz mięśni szkieletowych [71], a także w ludzkich komórkach nabłonkowych soczewki [10,11], kostniakomięsaka oraz komórkach nowotworowych wątroby [88,102]. Obecność ESR2 wykazano również we wstawkach plemników ludzkich. W tym rejonie plemników są umiejscowione wydłużone mitochondria ułożone w ciasną helisę, która oplata aparat ruchowy plemni-

ków na odcinku wstawki. Silny poziom ekspresji ESR2 w regionie wstawki sugeruje możliwość ich umiejscowienia w mitochondriach plemników. Słuszność hipotezy potwierdzają badania Solakidi i wsp. wykonane z wykorzystaniem swoistego mitochondrialnego markera CMX [103]. Również badania ultrastrukturalne wykonane przez Guido i wsp. potwierdzają obecność ESR2 w mitochondriach plemników ludzkich. Zespół ten w badaniach z zastosowaniem złota koloidalnego potwierdził obecność ESR2 również w głównej części witki (zarówno w osłonce włóknistej jak i we włóknach gęstych zewnętrznych) [41]. Obecność ESR2 w mitochondriach plemników sugeruje ich udział w regulacji ruchu i hiperaktywacji plemników. Badania przeprowadzone przez Guido i wsp. wskazują ponadto, że 17β-estradiol wywołuje w plemnikach skutki lipolityczne. Stwierdzono również jego wpływ na metabolizm glukozy przez aktywację dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej [41]. W plemnikach wykazano również ekspresję ESR1. Wskazywane przez Solakidi i wsp. umiejscowienie ESR1 w równikowym segmencie główki wskazuje na zaangażowanie tego receptora w proces fuzji błony komórkowej plemnika i oocytu [103]. Sugeruje się również, że w błonie komórkowej plemników są obecne różne izoformy ESR1 zachowujące domenę wiążącą hormon typową dla receptorów jądrowych [65].

TRANSLOKACJA RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH W KIERUNKU MITOCHONDRIMUM

Ponieważ białka mitochondrialne są kodowane głównie w genomie jądrowym oraz syntetyzowane w postaci białek prekursorowych, ich translokacja w kierunku mitochondrium odgrywa ważną rolę w biogenezie tych organelli. Proces ten ma na celu wyselekcjonowanie odpowiedniej grupy białek oraz ułatwienie ich skutecz-

nego transportu do mitochondrium, gdzie przez receptory zewnątrz błonowe zostaje rozpoznana N-końcowa presekwencja. Białka, które powyższej presekwencji nie mają, są rozpoznawane za pomocą białek opiekuńczych. Natomiast białka nośnikowe zawierają sekwencję wewnętrzną, która jest sygnałem do transportu w kierunku mitochondrium [32].

W mechanizmie zarządzającym importem białek do mitochondrium główną rolę odgrywają receptory Tom20 oraz Tom70, należące do kompleksu TOM (translocase of the outer membrane), który składa się ponadto z pięciu innych podjednostek: Tom22, Tom 40, Tom5, Tom6 oraz Tom7. Za transport białek zawierających N-końcową presekwencję aminokwasową są odpowiedzialne receptory Tom20 oraz Tom22. W piśmiennictwie wskazuje się, iż receptor Tom20 rozpoznaje presekwencję, dla której charakterystycznym wzorcem aminokwasowym jest motyw LXXLL (L – aminokwas hydrofobowy, X – dowolny aminokwas). Pomimo dużej elastyczności miejsca wiązania motyw ten jest preferowany ze względu na charakter hydrofobowy. Receptor Tom70 jest umiejscowiony w obrębie zewnętrznej błony mitochondrialnej w formie homodimerycznej. Domena cytoplazmatyczna receptora Tom70 zawiera motyw składający się z charakterystycznych powtórzeń tetratrikopetydów (TPR – tetratricopeptide repeat motif), których specyfika wiązania z wewnętrznymi sekwencjami sygnałowymi odpowiada za przyłączanie białek nośnikowych. Motyw jest zaangażowany ponadto w wiązanie cytosolowych białek opiekuńczych z rodziny białek szoku cieplnego – Hsp70, a także Hsp90. Umożliwia to translokację białek prekursorowych, które nie zawierają wewnętrznej sekwencji sygnałowej [28,29].

Dostępne dane literaturowe sugerują wspólne występowanie receptora estrogenowego typu 2, receptora Tom20 oraz białka opiekuńczego Hsp90 w obrębie błony mitochondriów. Translokacja receptora związanego z ligandem odbywa się poprzez kompleks podjednostek Tom20-Tom22. ESR2 w strukturze domeny wiążącej ligand zawiera wcześniej opisane motywy LXXLL, które receptor Tom20 rozpoznaje i umożliwia zakotwiczenie w obrębie błony mitochondrialnej [101]. Sekwencje te pośredniczą w wiązaniu koaktywatorów lub korepresorów, które modulują aktywność receptorów [16]. Ponadto, niezwiązane z ligandem ESR tworzą kompleks z cytosolowymi białkami opiekuńczymi (Hsp70, Hsp90), które odpowiadają za zachowanie odpowiedniej konformacji receptora oraz zapobiegają jego degradacji. Białka Hsp70 oraz Hsp90, wiążąc się z dyneiną bądź cytokeratynami, ułatwiają także translokację ESR2 w kierunku mitochondrium, gdzie następnie poprzez motyw TPR receptor łączy się z podjednostką Tom70 [87]. W piśmiennictwie wskazuje się również, że związanie liganda przez ESR zmienia jego konformację, co w sposób bezpośredni wpływa na sposób transportu do mitochondrium. Podkreśla się, iż stymulacja estrogenami zwiększa pulę mitochondrialnych ESR2 [18].

Podsumowując, w oparciu o powyższe doniesienia, można w komórkach wyróżnić kilka alternatywnych dróg translokacji ESR2 w kierunku mitochondrium, w zależności od konformacji receptora oraz potencjalnego wiązania z cząsteczką liganda.

WPLYW ESTROGENÓW NA MORFOLOGIĘ MITOCHONDRIMUM

Uważa się, że estrogeny egzogenne poprzez obecne w mitochondriach ESR wpływają na morfologię tych organelli [17]. Już w 1982 r. Vic i wsp. badając wpływ stymulacji 17 β -estradiolem na struktury subkomórkowe zaobserwowali zmianę morfologii mitochondriów komórek linii MCF-7. Organelle te po stymulacji estradiolem cechowały się dużym rozmiarem oraz dobrze widoczną strukturą grzebieniastą [112]. Podobne obserwacje odnotowano w badaniach komórek nabłonka gruczołowego endometrium świnki morskiej [5]. Mitochondria mysich kardiomiocytów z nokautem genu *ESR1* charakteryzowały się nieprawidłowym kształtem, utratą typowej struktury grzebieniastej oraz fragmentacją zewnętrzną oraz wewnętrzną błony mitochondrialnej [118]. Badanie mitochondriów kardiomiocytów wyizolowanych od szczurów po chirurgicznym usunięciu jajników wykazało, że podawanie, odpowiednio 17 β -estradiolu lub fitoestrogenów, pomagało zachować właściwą strukturę i funkcje tych organelli [119,120]. U myszy transgenicznych z nokautem genu aromatazy (ARKO, aromatase-knockout) synteza estrogenów endogennych zostaje zablokowana. Morfologicznie, mitochondria komórek śródmiąższowych wyizolowanych od tej grupy myszy charakteryzowały się znacznymi nieprawidłowościami w porównaniu z grupą kontrolną – mitochondria były sferyczne z tubularnymi grzebieniami i elektronowo gęstym matriks [108].

Powyższe badania nie określają jednak jakie białka są zaangażowane w modulowanie morfologii mitochondriów. Mitochondria są organellami, które ciągle podlegają procesom fragmentacji i fuzji. Dynamiczne zmiany, które zachodzą w mitochondriach są odpowiedzią na różnego rodzaju bodźce środowiskowe oraz metaboliczne. Dlatego stan strukturalny mitochondriów jest idealnym wskaźnikiem kondycji komórek [7]. Do białek zaangażowanych w fuzję błon mitochondrialnych należą mitofuzyna 1 i 2 (MFN1, MFN2; mfn1 – mitofusin 1; mfn2 – mitofusin 2) oraz białko OPA1 (optic atrophy factor 1). Natomiast fragmentacja błon tych organelli jest zależna od dynaminowego białka cytoplazmatycznego DRP1 (dynamin-related protein) oraz białka zewnętrznej błony mitochondrialnej FIS1 (mitochondrial fission 1 protein) [43,57]. Badania, w których mysie astrocyty kory mózgowej stymulowano przez 24 godziny 17 β -estradiolem, wykazały znaczny wzrost ekspresji większości genów kodujących białka związane z procesami fuzji i fragmentacji mitochondrium. Nie zaobserwowano takiej zmiany w przypadku mitofuzyny 1. Wyniki dotyczyły komórek wyizolowanych zarówno od samca, jak i od samicy [7]. Znaczne zmiany w strukturze mitochondriów oraz wzrost ekspresji genów kodu-

jących białka procesu fuzji odnotowano w komórkach linii MCF-7 stymulowanych 17 β -estradiolem [97]. Okazuje się, że dynamika mitochondriów nie zależy tylko od stężenia 17 β -estradiolu, ale także od stosunku ilościowego receptorów estrogenowych. Badania wykonane na komórkach pochodzących z trzech różnych linii komórkowych wykazały, iż po 12 godzinach od stymulacji nastąpił wzrost poziomu ekspresji genów *MFN1*, *MFN2*, *OPA1*, a tylko w przypadku komórek MCF7, charakteryzujących się największym stosunkiem ilościowym ESR1:ESR2, nastąpił spadek poziomu ekspresji genu *FIS1*. Zaproponowano, iż mitochondria komórek tej linii mogą charakteryzować się znacznymi uszkodzeniami. Zaznaczono również główną rolę ESR2 w modulowaniu procesów zachodzących w mitochondriach komórek nowotworowych [98]. Na podstawie najnowszych informacji można sądzić, że ligandy swoiste dla obecnego w mitochondrium ESR2 mogą osłabiać skutki uszkodzenia mitochondrium wywołanego przez β -amyloid, co sugeruje, że ten szlak transdukcji sygnału może być wykorzystany jako cel terapeutyczny w chorobie Alzheimera [96].

WPLYW ESTROGENÓW NA EKSPRESJĘ GENÓW MITOCHONDRIALNYCH

W klasycznym, genowym mechanizmie działania estrogenów receptory estrogenowe pełnią rolę czynników transkrypcyjnych, gdzie w sposób bezpośredni lub pośredni, przez wiązanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, oddziałują na geny docelowe. Uważa się, że podobny mechanizm występuje w mitochondriach, w stosunku do ekspresji genów mitochondrialnych. Proces nie jest jeszcze szczegółowo wyjaśniony, ale wykazano, że genom mitochondrialny zawiera sekwencje

identyczne z elementami odpowiedzi na estrogeny. Obecność takich sekwencji odnotowano w genach kodujących pętlę D, podjednostkę COX-2 oksydazy cytochromu c (COX-2, cytochrome c oxidase II), podjednostki rybosomalnego RNA (12S rRNA, 7S rRNA), tRNA inicjatorowe (tRNA-met) oraz białko związane z podjednostką IV oksydazy cytochromu c (COX7RP, cytochrome c oxidase subunit IV-related protein). Sekwencje te zidentyfikowano jako połowiczne palindromy [19,116]. Zaobserwowano, że stymulacja 17 β -estradiolem powoduje wzrost ekspresji genów mitochondrialnych *cox I*, *cox II* oraz *cox III* kodujących podjednostki mitochondrialnego łańcucha oddechowego w komórkach szczurzego guza przysadki [111], w neuronach hipokampa owariotomizowanych szczurów [8], w mysich neuronach rdzenia kręgowego [49] oraz astrocytach kory mózgu [6], czy też w hepatocytach linii HepG2 [20] (tabela 2). Wykazano również, że estrogeny pobudzają syntezę białek mitochondrialnych powstających w wyniku ekspresji genów znajdujących się w genomie jądrowym (tabela 3). Uważa się, że estradiol stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego NRF-1 (nuclear respiratory factor 1), co w sposób pośredni wpływa na ekspresję genów mitochondrialnych [70]. Najnowsze doniesienia wskazują, że estrogeny regulują proces obróbki transkryptów genów mitochondrialnych, wpływając na ilość dojrzałego RNA dostępnego w procesie translacji [95]. Ponadto, poza modulowaniem procesu transkrypcji, estrogeny mogą w sposób bezpośredni oddziaływać na białka mitochondrialne. W piśmiennictwie wskazuje się, że estrogeny wpływają stymulująco na aktywność białek mitochondrialnych, ale również hamująco, np. przez blokowanie podjednostek kompleksu I, II, III i IV łańcucha oddechowego oraz mitochondrialnej syntazy ATP [104].

Tabela 2. Wpływ estrogenów na ekspresję genów mitochondrialnych

Białko mitochondrialne	Komórki	Pochodzenie komórek	Piśmiennictwo
Wzrost ekspresji genu/genów kodującego/kodujących:			
COX-2	GH4C1	szczur	[111]
COX-3	hipokampa	szczur	[8]
podjednostki łańcucha oddechowego	neurony rdzenia kręgowego	mysz	[49]
	astrocyty kory mózgu		[6]
16s RNA			
podjednostkę 1 dehydrogenazy NADH			
COX-1	HepG2	człowiek	[20]
COX-2			
COX-3			
Cyt. b			
COX-1	MCF-7	człowiek	[70]
podjednostkę 1 dehydrogenazy NADH			

Tabela 3. Wpływ estrogenów na ekspresję białek mitochondrialnych kodowanych w genomie jądrowym

Białko mitochondrialne	Komórki	Pochodzenie komórek	Piśmiennictwo
Wzrost poziomu ekspresji białek mitochondrialnych			
podjednostki E ATPazy	HepG2	człowiek	[20]
podjednostki 6 ATPazy			
czynnika transkrypcyjnego Tfam oraz TFB	MCF-7	człowiek	[70]
COX-4			

ESTROGENY A STRES OKSYDACYJNY KOMÓRKI

Estrogeny w sposób bezpośredni wpływają na biologię mitochondriów m.in. przez regulowanie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS, reactive oxygen species). W piśmiennictwie podkreśla się, że estrogeny w sposób jednoznaczny nie wykazują cech pro- czy też antyoksydantów. Zaobserwowano, że hormony tej grupy stymulują syntezę anionorodnika nadadtlenkowego na poziomie łańcucha oddechowego oraz hamują wpływ jonów Ca^{2+} , których stężenie w mitochondrium wzrasta, co również zwiększa syntezę ROS [47]. 17β -estradiol w stężeniu fizjologicznym wykazywał natomiast charakter protekcyjny w komórkach, u których zaobserwowano stres oksydacyjny wywołany nadtlenkiem wodoru. Okazuje się, że działanie estrogenów zależy zarówno od dawki liganda [12], jak i od stosunku ilościowego ESR1:ESR2. Komórki stymulowane genisteiną, w których dominującą postacią był ESR2, charakteryzowały się mniejszą podatnością na stres oksydacyjny [76,86]. Wskazuje się, iż obecny w mitochondrium ESR2 może również brać udział w szlaku transdukcji sygnału związanego z procesem kancerogenezy, który w sposób bezpośredni wiąże się z procesami oksydacyjnymi i metabolizmem komórkowym [62]. Antyoksydacyjny charakter estrogenów obserwowano przede wszystkim w komórkach układu nerwowego. Wykazano, że estrogeny stymulują aktywność mitochondrialnej dysmutazy nadadtlenkowej (MnSOD, manganase superoxide dysmutase) oraz mitochondrialnej tioredoksyny [56,76]. Proponuje się również, iż stymulowany estrogenami mitochondrialny ESR2 pełni rolę antyapoptotyczną przez blokowanie aktywności proapoptotycznego białka BAD (Bcl-2-associated death promoter), co blokuje uwolnienie cytochromu c oraz oligomeryzację białka Bax (Bcl-2 associated X protein) [23,62]. Antyapoptotyczna funkcja mitochondrialnego ESR2 sprawia, że określenie poziomu jego ekspresji może być niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w przypadku licznych nowotworów. Jego znaczenie prewencyjne we wczesnych etapach rozwoju raka może

być większe niż pierwotnie przypuszczano. Jednocześnie jeżeli mitochondrialne ESR2 promują przeżycie komórki i zapobiegają jej apoptozie, to zastosowanie ich antagonistów może się okazać istotnym elementem terapii nowotworów. Sugeruje się również, że antagoniści mitochondrialnych ESR2 mogą być wykorzystywani w terapii endometriozы skutecznie hamując rozrost patologicznych ognisk [62]. Jednocześnie wskazuje się, że to właśnie mitochondrialne ESR2 są istotnym elementem neuroprotekcijnej aktywności estrogenów. Dysfunkcje mitochondriów towarzyszą wielu chorobom neurodegeneracyjnym, zarówno tym o przebiegu ostrym (np. urazy mechaniczne, niedokrwienne udar mózgu), jak i przewlekłym (np. choroba Parkinsona, Alzheimer, Huntingtona, stwardnienie boczne zanikowe). Obserwacja, że kora czołowa kobiet z chorobą Alzheimer wykazuje znamienne niższą ekspresję mitochondrialnych ESR2, czemu towarzyszy obniżona aktywność mitochondrialnej oksydazy cytochromu c i spadek błonowego potencjału mitochondrialnego, nie tylko pozwala pełniej zrozumieć patogenezę choroby, ale określa kierunki opracowania nowych terapii [64].

PODSUMOWANIE

Na podstawie dostępnego piśmiennictwa oraz powyższych rozważań należy założyć, że estrogeny wywierają bezpośredni wpływ na biologię komórki. Obecność receptorów estrogenowych nie tylko na poziomie jądra komórkowego, ale również w obrębie błony komórkowej i mitochondriów wskazuje na plejotropowy zakres działania tej grupy hormonów oraz niejednolity mechanizm transdukcji sygnału. Na poziomie mitochondrialnym estrogeny wpływają na ekspresję genów, aktywność białek, wytwarzanie reaktywnych form tlenu, a także na morfologię tych organeli. Mitochondria pełnią ponadto główną rolę w procesie apoptozy, który w sposób pośredni może być regulowany przez estrogeny. Odpowiedź na poziomie mitochondrialnym jest zatem istotnym ogniwem w procesie transdukcji sygnału wywołanego przez estrogeny.

PÍSMIENICTWO

- [1] Ábrahám I.M., Todman M.G., Korach K.S., Herbison A.E.: Critical in vivo roles for classical estrogen receptors in rapid estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain. *Endocrinology*, 2004; 145: 3055-3061
- [2] Acconcia F., Ascenzi P., Bocedi A., Spisni E., Tomasi V., Trentalancia A., Visca P., Marino M.: Palmitoylation-dependent estrogen receptor α membrane localization: regulation by 17 β -estradiol. *Mol. Biol. Cell.*, 2005; 16: 231-237
- [3] Acconcia F., Ascenzi P., Fabozzi G., Visca P., Marino M.: S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- α functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 316: 878-883
- [4] Acconcia F., Bocedi A., Ascenzi P., Marino M.: Does palmitoylation target estrogen receptors to plasma membrane caveolae? *IUBMB Life*, 2003; 55: 33-35
- [5] Alkhalaf M., Chaminadas G., Propper A.Y., Adessi G.L.: Ultrastructural changes induced by oestradiol-17 β , progesterone and oestrone-3-sulphate in guinea-pig endometrial glandular cells grown in primary culture. *J. Endocrinol.*, 1989; 122: 439-444
- [6] Araújo G.W., Beyer C., Arnold S.: Oestrogen influences on mitochondrial gene expression and respiratory chain activity in cortical and mesencephalic astrocytes. *J. Neuroendocrinol.*, 2008; 20: 930-941
- [7] Arnold S., Victor M.B., Beyer C.: Estrogen and the regulation of mitochondrial structure and function in the brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2012; 131: 2-9
- [8] Bettini E., Maggi A.: Estrogen induction of cytochrome c oxidase subunit III in rat hippocampus. *J. Neurochem.*, 1992; 58: 1923-1929
- [9] Boonyaratanakornkit V.: Scaffolding proteins mediating membrane-initiated extra-nuclear actions of estrogen receptor. *Steroids*, 2011; 76: 877-884
- [10] Cammarata P.R., Chu S., Moor A., Wang Z., Yang S.H., Simpkins J.W.: Subcellular distribution of native estrogen receptor α and β subtypes in cultured human lens epithelial cells. *Exp. Eye Res.*, 2004; 78: 861-871
- [11] Cammarata P.R., Flynn J., Gottipati S., Chu S., Dimitrijevic S., Younes M., Skliris G., Murphy L.C.: Differential expression and comparative subcellular localization of estrogen receptor β isoforms in virally transformed and normal cultured human lens epithelial cells. *Exp. Eye Res.*, 2005; 81: 165-175
- [12] Celojovic D., Petersen A., Karlsson J.O., Behndig A., Zetterberg M.: Effects of 17 β -estradiol on proliferation, cell viability and intracellular redox status in native human lens epithelial cells. *Mol. Vis.*, 2011; 17: 1987-1996
- [13] Chambliss K.L., Shaul P.W.: Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: Evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. *Steroids*, 2002; 67: 413-419
- [14] Chambliss K.L., Simon L., Yuhanna I.S., Mineo C., Shaul P.W.: Dissecting the basis of nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estradiol: role of ER α domains with known nuclear functions. *Mol. Endocrinol.*, 2005; 19: 277-289
- [15] Chambliss K.L., Yuhanna I.S., Anderson R.G., Mendelsohn M.E., Shaul P.W.: ER β has nongenomic action in caveolae. *Mol. Endocrinol.*, 2002; 16: 938-946
- [16] Chang C.Y., Norris J.D., Grøn H., Paige L.A., Hamilton P.T., Kenan D.J., Fowlkes D., McDonnell D.P.: Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors α and β . *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 8226-8239
- [17] Chen J.Q., Cammarata P.R., Baines C.P., Yager J.D.: Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1793: 1540-1570
- [18] Chen J.Q., Delannoy M., Cooke C., Yager J.D.: Mitochondrial localization of ER α and ER β in human MCF7 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2004; 286: E1011-E1022
- [19] Chen J.Q., Eshete M., Alworth W.L., Yager J.D.: Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors α and β to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J. Cell. Biochem.*, 2004; 93: 358-373
- [20] Chen J., Gokhale M., Li Y., Trush M.A., Yager J.D.: Enhanced levels of several mitochondrial mRNA transcripts and mitochondrial superoxide production during ethinyl estradiol-induced hepatocarcinogenesis and after estrogen treatment of HepG2 cells. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 2187-2193
- [21] Chen Z., Yuhanna I.S., Galcheva-Gargova Z., Karas R.H., Mendelsohn M.E., Shaul P.W.: Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J. Clin. Invest.*, 1999; 103: 401-406
- [22] Christensen A., Micevych P.: CAV1 siRNA reduces membrane estrogen receptor- α levels and attenuates sexual receptivity. *Endocrinology*, 2012; 153: 3872-3877
- [23] Ciucci A., Zannoni G.F., Travaglia D., Scambia G., Gallo D.: Mitochondrial estrogen receptor β 2 drives antiapoptotic pathways in advanced serous ovarian cancer. *Hum. Pathol.*, 2015; 46: 1138-1146
- [24] Davis P.J., Lin H.Y., Mousa S.A., Luidens M.K., Hercbergs A.A., Wehling M., Davis F.B.: Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Steroids*, 2011; 76: 829-833
- [25] Deng H., Zhang X.T., Wang M.L., Zheng H.Y., Liu L.J., Wang Z.Y.: ER- α 36-mediated rapid estrogen signaling positively regulates ER-positive breast cancer stem/progenitor cells. *PLoS One*, 2014; 9: e88034
- [26] Denger S., Reid G., Kos M., Flouriot G., Parsch D., Brand H., Korach K.S., Sonntag-Buck V., Gannon F.: ER α gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol. Endocrinol.*, 2001; 15: 2064-2077
- [27] Dufy B., Vincent J.D., Fleury H., Du Pasquier P., Gourdji D., Tixier-Vidal A.: Membrane effects of thyrotropin-releasing hormone and estrogen shown by intracellular recording from pituitary cells. *Science*, 1979; 204: 509-511
- [28] Endo T., Yamano K.: Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1803: 706-714
- [29] Endo T., Yamano K., Kawano S.: Structural insight into the mitochondrial protein import system. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1808: 955-970
- [30] Falkenstein E., Norman A.W., Wehling M.: Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000; 85: 2072-2075
- [31] Felty Q., Roy D.: Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells. *J. Carcinog.*, 2005; 4: 1
- [32] Ferramosca A., Zara V.: Biogenesis of mitochondrial carrier proteins: molecular mechanisms of import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1833: 494-502
- [33] Figtree G.A., McDonald D., Watkins H., Channon K.M.: Truncated estrogen receptor α 46-kDa isoform in human endothelial cells: relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation*, 2003; 107: 120-126
- [34] Flouriot G., Brand H., Denger S., Metivier R., Kos M., Reid G., Sonntag-Buck V., Gannon F.: Identification of a new isoform of the

- human estrogen receptor- α (hER- α) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- α activation function 1. *EMBO J.*, 2000; 19: 4688-4700
- [35] Fox E.M., Andrade J., Shupnik M.A.: Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids*, 2009; 74: 622-627
- [36] Galluzzo P., Caiazza F., Moreno S., Marino M.: Role of ER β palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocr. Relat. Cancer*, 2007; 14: 153-167
- [37] Gilad L.A., Schwartz B.: Association of estrogen receptor β with plasma-membrane caveola components: Implication in control of vitamin D receptor. *J. Mol. Endocrinol.*, 2007; 38: 603-618
- [38] Girard B.J., Daniel A.R., Lange C.A., Ostrander J.H.: PELP1: a review of PELP1 interactions, signaling, and biology. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2014; 382: 642-651
- [39] Goffart S., Wiesner R.J.: Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp. Physiol.*, 2003; 88: 33-40
- [40] Gonugunta V.K., Miao L., Sareddy G.R., Ravindranathan P., Vadlamudi R., Raj G.V.: The social network of PELP1 and its implications in breast and prostate cancers. *Endocr. Relat. Cancer*, 2014; 21: T79-T86
- [41] Grossman A., Oppenheim J., Grondin G., St Jean P., Beaudoin A.R.: Immunocytochemical localization of the [3 H]estradiol-binding protein in rat pancreatic acinar cells. *Endocrinology*, 1989; 124: 2857-2866
- [42] Guido C., Perrotta I., Panza S., Middea E., Avena P., Santoro M., Marsico S., Imbrogno P., Ando S., Aquila S.: Human sperm physiology: estrogen receptor α (ER α) and estrogen receptor β (ER β) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *J. Cell. Physiol.*, 2011; 226: 3403-3412
- [43] Hall A.R., Burke N., Dongworth R.K., Hausenloy D.J.: Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease. *Br. J. Pharmacol.*, 2014; 171: 1890-1906
- [44] Hammes S.R., Levin E.R.: Minireview: Recent advances in extranuclear steroid receptor actions. *Endocrinology*, 2011; 152: 4489-4495
- [45] Herrick S.P., Waters E.M., Drake C.T., McEwen B.S., Milner T.A.: Extranuclear estrogen receptor β immunoreactivity is on doublecortin-containing cells in the adult and neonatal rat dentate gyrus. *Brain Res.*, 2006; 1121: 46-58
- [46] Higuchi T., Gohno T., Nagatomo T., Tokiniwa H., Niwa T., Horiguchi J., Oyama T., Takeyoshi I., Hayashi S.I.: Variation in use of estrogen receptor- α gene promoters in breast cancer compared by quantification of promoter-specific messenger RNA. *Clin. Breast Cancer*, 2014; 14: 249-257
- [47] Horvat A., Petrović S., Nedeljković N., Martinović J.V., Nikezić G.: Estradiol affect Na-dependent Ca $^{2+}$ efflux from synaptosomal mitochondria. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2000; 19: 59-71
- [48] Ishii H., Kobayashi M., Sakuma Y.: Alternative promoter usage and alternative splicing of the rat estrogen receptor α gene generate numerous mRNA variants with distinct 5'-ends. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2010; 118: 59-69
- [49] Johann S., Dahm M., Kipp M., Beyer C., Arnold S.: Oestrogen regulates mitochondrial respiratory chain enzyme transcription in the mouse spinal cord. *J. Neuroendocrinol.*, 2010; 22: 926-935
- [50] Kelly M.J., Levin E.R.: Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2001; 12: 152-156
- [51] Kim H.P., Lee J.Y., Jeong J.K., Bae S.W., Lee H.K., Jo I.: Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor α localized in caveolae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 263: 257-262
- [52] Kim K.H., Toomre D., Bender J.R.: Splice isoform estrogen receptors as integral transmembrane proteins. *Mol. Biol. Cell*, 2011; 22: 4415-4423
- [53] Kim K.H., Young B.D., Bender J.R.: Endothelial estrogen receptor isoforms and cardiovascular disease. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2014; 389: 65-70
- [54] Kiss A.L., Turi Á., Müllner N., Kovács E., Botos E., Greger A.: Oestrogen-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 and its effect on the oestrogen receptor localisation: an in vivo study. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2005; 245: 128-137
- [55] Klinge C.M.: Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *J. Cell. Biochem.*, 2008; 105: 1342-1351
- [56] Kumar S., Lata K., Mukhopadhyay S., Mukherjee T.K.: Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: a perspective. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1800: 1127-1135
- [57] Lee H., Yoon Y.: Mitochondrial fission: regulation and ER connection. *Mol. Cells*, 2014; 37: 89-94
- [58] Lee L.M., Cao J., Deng H., Chen P., Gatalica Z., Wang Z.Y.: ER- α 36, a novel variant of ER- α , is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. *Anticancer Res.*, 2008; 28: 479-483
- [59] Levin E.R.: Extranuclear steroid receptors are essential for steroid hormone actions. *Annu. Rev. Med.*, 2015; 66: 271-280
- [60] Levin E.R.: Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2009; 20: 477-482
- [61] Li L., Haynes M.P., Bender J.R.: Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor α variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 4807-4812
- [62] Liao T.L., Tzeng C.R., Yu C.L., Wang Y.P., Kao S.H.: Estrogen receptor- β in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2015; 1350: 52-60
- [63] Liu P., Rudick M., Anderson R.G.: Multiple functions of caveolin-1. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 41295-41298
- [64] Long J., He P., Shen Y., Li R.: New evidence of mitochondria dysfunction in the female Alzheimer's brain: deficiency of estrogen receptor- β . *J. Alzheimer's Dis.*, 2012; 30: 545-558
- [65] Luconi M., Francavilla F., Porazzi I., Macerola B., Forti G., Baldi E.: Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids*, 2004; 69: 553-559
- [66] Marino M., Ascenzi P.: Membrane association of estrogen receptor α and β influences 17 β -estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids*, 2008; 73: 853-858
- [67] Marino M., Ascenzi P., Acconcia F.: S-palmitoylation modulates estrogen receptor α localization and functions. *Steroids*, 2006; 71: 298-303
- [68] Márquez D.C., Pietras R.J.: Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells. *Oncogene*, 2001; 20: 5420-5430
- [69] Maselli A., Pierdominici M., Vitale C., Ortona E.: Membrane lipid rafts and estrogenic signalling: a functional role in the modulation of cell homeostasis. *Apoptosis*, 2015; 20: 671-678
- [70] Mattingly K.A., Ivanova M.M., Riggs K.A., Wickramasinghe N.S., Barch M.J., Klinge C.M.: Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Mol. Endocrinol.*, 2008; 22: 609-622
- [71] Milanese L., Vasconsuelo A., de Boland A.R., Boland R.: Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor β in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. *Steroids*, 2009; 74: 489-497
- [72] Milner T.A., Ayoola K., Drake C.T., Herrick S.P., Tabori N.E., McEwen B.S., Warriar S., Alves S.E.: Ultrastructural localization of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.*, 2005; 491: 81-95

- [73] Moats R.K., Ramirez V.D.: Electron microscopic visualization of membrane-mediated uptake and translocation of estrogen-BSA:colloidal gold by Hep G2 cells. *J. Endocrinol.*, 2000; 166: 631-647
- [74] Monje P., Boland R.: Subcellular distribution of native estrogen receptor α and β isoforms in rabbit uterus and ovary. *J. Cell. Biochem.*, 2001; 82: 467-479
- [75] Morley P., Whitfield J.F., Vanderhyden B.C., Tsang B.K., Schwartz J.L.: A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology*, 1992; 131: 1305-1312
- [76] Nadal-Serrano M., Pons D.G., Sastre-Serra J., Blanquer-Rosselló M.M., Roca P., Oliver J.: Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ER α /ER β ratio: effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013; 45: 2045-2051
- [77] Norfleet A.M., Thomas M.L., Gametchu B., Watson C.S.: Estrogen receptor- α detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology*, 1999; 140: 3805-3814
- [78] Noteboom W.D., Gorski J.: Stereospecific binding of estrogens in the rat uterus. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1965; 111: 559-568
- [79] Pappas T.C., Gametchu B., Watson C.S.: Membrane labeling estrogen receptors identified by multiple antibody and impeded-ligand binding. *FASEB J.*, 1995; 9: 404-410
- [80] Patel H.H., Insel P.A.: Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009; 11: 1357-1372
- [81] Pedram A., Razandi M., Deschenes R.J., Levin E.R.: DHHC-7 and -21 are palmitoyltransferases for sex steroid receptors. *Mol. Biol. Cell*, 2012; 23: 188-199
- [82] Pedram A., Razandi M., Levin E.R.: Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol. Endocrinol.*, 2006; 20: 1996-2009
- [83] Pedram A., Razandi M., Lewis M., Hammes S., Levin E.R.: Membrane-localized estrogen receptor α is required for normal organ development and function. *Dev. Cell*, 2014; 29: 482-490
- [84] Pedram A., Razandi M., Sainson R.C., Kim J.K., Hughes C.C., Levin E.R.: A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 22278-22288
- [85] Pietras R.J., Szego C.M.: Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*, 1977; 265: 69-72
- [86] Pons D.G., Nadal-Serrano M., Blanquer-Rossello M.M., Sastre-Serra J., Oliver J., Roca P.: Genistein modulates proliferation and mitochondrial functionality in breast cancer cells depending on ER α /ER β ratio. *J. Cell. Biochem.*, 2014; 115: 949-958
- [87] Pratt W.B., Toft D.O.: Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.*, 2003; 228: 111-133
- [88] Psarra A.M., Solakidi S., Sekeris C.E.: The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2006; 246: 21-33
- [89] Rao J., Jiang X., Wang Y., Chen B.: Advances in the understanding of the structure and function of ER- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α . *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2011; 127: 231-237
- [90] Razandi M., Alton G., Pedram A., Ghonshani S., Webb P., Levin E.R.: Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor α at the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 1633-1646
- [91] Razandi M., Oh P., Pedram A., Schnitzer J., Levin E.R.: ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol. Endocrinol.*, 2002; 16: 100-115
- [92] Razandi M., Pedram A., Greene G.L., Levin E.R.: Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Endocrinol.*, 1999; 13: 307-319
- [93] Razandi M., Pedram A., Levin E.R.: Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.*, 2010; 30: 3249-3261
- [94] Razandi M., Pedram A., Merchenthaler I., Greene G.L., Levin E.R.: Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol. Endocrinol.*, 2004; 18: 2854-2865
- [95] Sanchez M.I., Shearwood M.J., Chia T., Davies S.M., Rackham O., Filipovska A.: Estrogen-mediated regulation of mitochondrial gene expression. *Mol. Endocrinol.*, 2015; 29: 14-27
- [96] Sarkar S., Jun S., Simpkins J.W.: Estrogen amelioration of A β -induced defects in mitochondria is mediated by mitochondrial signaling pathway involving ER β , AKAP and Drp1. *Brain Res.*, 2015; 1616: 101-111
- [97] Sastre-Serra J., Nadal-Serrano M., Pons D.G., Roca P., Oliver J.: Mitochondrial dynamics is affected by 17 β -estradiol in the MCF-7 breast cancer cell line. Effects on fusion and fission related genes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2012; 44: 1901-1905
- [98] Sastre-Serra J., Nadal-Serrano M., Pons D.G., Roca P., Oliver J.: The over-expression of ER β modifies estradiol effects on mitochondrial dynamics in breast cancer cell line. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013; 45: 1509-1515
- [99] Schmidt B.M., Gerdes D., Feuring M., Falkenstein E., Christ M., Wehling M.: Rapid, nongenomic steroid actions: a new age? *Front. Neuroendocrinol.*, 2000; 21: 57-94
- [100] Sheldahl L.C., Shapiro R.A., Bryant D.N., Koerner I.P., Dorsa D.M.: Estrogen induces rapid translocation of estrogen receptor β , but not estrogen receptor α , to the neuronal plasma membrane. *Neuroscience*, 2008; 153: 751-761
- [101] Simpkins J.W., Yang S.H., Sarkar S.N., Pearce V.: Estrogen actions on mitochondria – physiological and pathological implications. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2008; 290: 51-59
- [102] Solakidi S., Psarra A.M., Nikolaropoulos S., Sekeris C.E.: Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: Localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum. Reprod.*, 2005; 20: 3481-3487
- [103] Solakidi S., Psarra A.M., Sekeris C.E.: Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ER α in the nucleoli and ER β in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.*, 2005; 1745: 382-392
- [104] Stirone C., Duckles S.P., Krause D.N., Procaccio V.: Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol. Pharmacol.*, 2005; 68: 959-965
- [105] Su X., Xu X., Li G., Lin B., Cao J., Teng L.: ER- α 36: a novel biomarker and potential therapeutic target in breast cancer. *Onco Targets Ther.*, 2014; 7: 1525-1533
- [106] Szego C.M., Davis J.S.: Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1967; 58: 1711-1718
- [107] Tesarik J., Mendoza C.: Nongenomic effects of 17 β -estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995; 80: 1438-1443
- [108] Toda K., Takeda K., Okada T., Akira S., Saibara T., Kaname T., Yamamura K., Onishi S., Shizuta Y.: Targeted disruption of the aromatase P450 gene (*Cyp19*) in mice and their ovarian and uterine responses to 17 β -oestradiol. *J. Endocrinol.*, 2001; 170: 99-111
- [109] Toran-Allerand C.D., Guan X., MacLusky N.J., Horvath T.L., Di-ano S., Singh M., Connolly E.S., Nethrapalli I.S., Tinnikov A.A.: ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 8391-8401

- [110] Vadlamudi R.K., Kumar R.: Functional and biological properties of the nuclear receptor coregulator PELP1/MNAR. *Nucl. Recept. Signal.*, 2007; 5: e004
- [111] Van Itallie C.M., Dannies P.S.: Estrogen induces accumulation of the mitochondrial ribonucleic acid for subunit II of cytochrome oxidase in pituitary tumor cells. *Mol. Endocrinol.*, 1988; 2: 332-337
- [112] Vic P., Vignon F., Derocq D., Rochefort H.: Effect of estradiol on the ultrastructure of the MCF7 human breast cancer cells in culture. *Cancer Res.*, 1982; 42: 667-673
- [113] Walter P., Green S., Greene G., Krust A., Bornert J.M., Jeltsch J.M., Staub A., Jensen E., Scraze G., Waterfield M., Chambon P.: Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985; 82: 7889-7893
- [114] Wang Z., Zhang X., Shen P., Loggie B.W., Chang Y., Deuel T.F.: Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 336: 1023-1027
- [115] Warner M., Gustafsson J.Å.: Nongenomic effects of estrogen: why all the uncertainty? *Steroids*, 2006; 71: 91-95
- [116] Watanabe T., Inoue S., Hiroi H., Orimo A., Kawashima H., Muramatsu M.: Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol. Cell. Biol.*, 1998; 18: 442-449
- [117] Yang S.H., Liu R., Perez E.J., Wen Y., Stevens S.M., Valencia T., Brun-Zinkernagel A.M., Prokai L., Will Y., Dykens J., Koulen P., Simpkins J.W.: Mitochondrial localization of estrogen receptor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 4130-4135
- [118] Zhai P., Eurell T.E., Cooke P.S., Lubahn D.B., Gross D.R.: Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor- α knockout and wild-type mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000; 278: H1640-H1647
- [119] Zhai P., Eurell T.E., Cotthaus R., Jeffery E.H., Bahr J.M., Gross D.R.: Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000; 279: H2766-H2775
- [120] Zhai P., Eurell T.E., Cotthaus R.P., Jeffery E.H., Bahr J.M., Gross D.R.: Effects of dietary phytoestrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in isolated female rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2001; 281: H1223-H1232

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.