



Università della Calabria

Dipartimento di Ingegneria Informatica, Modellistica,

Elettronica e Sistemistica - DIMES

Scuola di Dottorato "Life Science"

***Dottorato di Ricerca in Ambiente Salute
e Processi Ecosostenibili***

XXVI CICLO

Settore scientifico disciplinare CHIM/08

**Caratterizzazione funzionale dell'attività
agonista/antagonista di nuovi ligandi
del recettore estrogenico GPER**

Direttore: Ch.mo. Prof. Marcello Canonaco

Coordinatore: Ch.mo. Prof. Bruno de Cindio

Supervisore: Ch.ma. Prof.ssa Maria Stefania Sinicropi

Dottoranda: Dott.ssa Rosamaria Lappano

Anno Accademico 2012/2013

Capitolo Secondo

<i>Materiali e metodi</i>	32
2.1 Reagenti	32
2.2 Colture cellulari	32
2.3 Plasmidi	33
2.4 Trasfezioni transienti e saggio della luciferasi	33
2.5 Estrazione dell'RNA e RT PCR	36
2.6 Western blotting	37
2.7 Ligand Binding Assays	38
2.8 Molecular Modeling e Docking Simulations	40
2.9 Proliferazione cellulare	41
2.10 Analisi statistica	42

Capitolo Terzo

<i>Risultati</i>	43
3.1 Caratterizzazione funzionale di un nuovo composto (MIBE) in grado di legare ed inibire ER e GPER in cellule tumorali mammarie	43
3.1.1 MIBE lega sia ER α che GPER	44

3.1.2 MIBE inibisce sia la transattivazione di ER che l'espressione genica indotta da E2 in cellule tumorali mammarie ER-positive	46
3.1.3 MIBE previene gli effetti proliferativi indotti da E2 in cellule tumorali mammarie ER-positive	50
3.1.4 MIBE blocca l'attivazione di EGFR e delle ERK mediate da GPER in cellule tumorali mammarie ER-negative	51
3.1.5 MIBE inibisce la trascrizione genica e gli effetti proliferativi mediati da GPER in cellule tumorali mammarie ER-negative	53
3.2 Identificazione di un nuovo derivato idrazino-carbazolico (Carbhydraz) ad attività agonista per GPER	56
3.2.1 Carbhydraz mostra una buona affinità per GPER	56
3.2.2 Carbhydraz induce la fosforilazione delle ERK attraverso GPER in cellule tumorali mammarie ER-negative	58
3.2.3 Carbhydraz non transattiva ER α in cellule tumorali mammarie ER-positive	59

Capitolo Quarto

<i>Discussione</i>	61
--------------------	----

Bibliografia	64
---------------------	----

Abstract

The multiple biological responses to estrogens are mainly mediated by the classical estrogen receptors ER α and ER β , which act as ligand-activated transcription factors and exert a main role in the development of breast cancer. Recently, GPR30/GPER, a member of the seven transmembrane G protein-coupled receptor family, has been implicated in mediating the effects of estrogens in diverse normal and cancer cells. Several ER ligands showed the ability to bind to GPER eliciting promiscuous and, in some cases, opposite actions through the two receptors. In the present study, we investigated the biological properties elicited through ER α and GPER in breast cancer cells of novel synthesized compounds, (ethyl 3-[5-(2-ethoxycarbonyl-1-methylvinyl)-1-methyl-1H-indol-3-yl]but-2-enoate), referred to as MIBE, and two carbazole derivatives. Molecular modeling, binding experiments and functional assays were performed in order to evaluate the biological actions as well as the transduction pathways triggered by these compounds through ER α and GPER in MCF7 and SkBr3 breast cancer cells. In particular, MIBE displayed the ability to act as an antagonist ligand for ER α and GPER as it elicited inhibitory effects on gene transcription and growth effects by binding to both receptors in breast cancer cells. On the contrary, one of the two carbazole derivatives, referred to as Carbohydraz, demonstrated the ability to activate the GPER-mediated pathway in breast cancer cells in a selective manner.

The exclusive antagonistic activity exerted by MIBE on ER α and GPER could represent an innovative pharmacological approach targeting breast carcinomas which express one or both receptors at the beginning and/or during tumor progression. Meanwhile, the characterization of Carbohydraz, identified as a selective GPER agonist, could represent a potential useful tool to advance our understanding of the role of GPER in numerous biological systems as well as in cancer and to differentiate the functions elicited selectively by each estrogen receptor subtype.

Capitolo Primo

Introduzione e scopo del lavoro

1.1 Introduzione

Gli estrogeni, che generalmente influenzano la normale proliferazione, differenziazione e fisiologia di tessuti sensibili, possono anche contribuire in modo determinante all'eziopatogenesi e alla progressione di tumori estrogeno-responsivi come quello mammario ed endometriale (Eisen A. *and* Weber B.L., 1998). È noto che gli estrogeni svolgono queste ed altre funzioni biologiche legando i propri recettori intracellulari (ER α e ER β), i quali agiscono da fattori di trascrizione, legandosi al DNA e regolando l'espressione di geni target. Nel contesto di cellule tumorali, i recettori estrogenici fungono da fattori trascrizionali di geni coinvolti nella progressione neoplastica (Deroo B.J. *and* Korach K.S., 2006; Heldring N. *et al.*, 2007). Per questo motivo, il blocco del sito di legame per gli estrogeni sul proprio recettore è oggi una delle strategie terapeutiche più utilizzate nel trattamento di forme tumorali ER-positive. Il tamoxifene, antagonista parziale del recettore estrogenico, rappresenta uno dei farmaci più utilizzati (Jordan V.C., 2004; Lewis J.S. *and* Jordan V.C., 2005). Tuttavia, non tutti i tumori ER-positivi rispondono al trattamento con tamoxifene. Per spiegare questa mancata risposta, sono state proposte una serie di ipotesi: una espressione eterogenea del recettore estrogenico all'interno della massa tumorale, la formazione di forme recettoriali mutate che hanno una ridotta affinità per gli antagonisti, l'attività di antagonismo parziale di queste molecole e/o la presenza/assenza di cofattori necessari per modulare la funzionalità di ER (Filardo E.J. *et al.*, 2006). Tali ipotesi hanno portato verso il "design" di molecole con una maggiore attività antagonista nei confronti del recettore estrogenico e verso l'individuazione di altri

recettori coinvolti nella risposta agli estrogeni. In questo contesto, molteplici evidenze sperimentali hanno dimostrato che un recettore accoppiato a proteine G di recente identificazione, denominato GPR30/GPER, è capace di mediare segnali rapidi estrogeno-dipendenti, innescando importanti risposte biologiche come la modulazione dell'espressione genica e la proliferazione in cellule tumorali (Revankar C.M. *et al.*, 2005; Albanito L. *et al.*, 2007). Inoltre, GPER è anche in grado di transattivare il recettore ad attività tirosin-chinasica per il fattore di crescita epidermico EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) in vari contesti cellulari, determinando l'attivazione della cascata trasduzionale delle MAPK (Filardo E.J. *et al.*, 2002). La presenza di questo recettore di membrana potrebbe quindi spiegare la responsività agli estrogeni da parte di cellule tumorali mammarie ER-negative (Maggiolini M. *et al.*, 2004). Infatti, GPER media una serie di eventi rapidi di fosforilazione che portano all'up-regolazione di geni target coinvolti in processi fondamentali per la progressione neoplastica (Pandey D.P. *et al.*, 2009). A tal proposito, diversi studi hanno dimostrato che GPER può essere considerato, accanto a ER α , un importante target terapeutico nel trattamento di tumori estrogeno-sensibili, quali il tumore mammario. Una delle maggiori sfide nello studio dei segnali mediati dagli estrogeni è l'identificazione di nuovi composti in grado di differenziare in modo selettivo i pathway trasduzionali mediati da GPER da quelli attivati dai classici recettori estrogenici. Infatti, il 17 β -estradiolo e gli antiestrogeni tamoxifene ed ICI 182,780 esercitano effetti stimolatori come ligandi di GPER in vari contesti cellulari (Filardo E.J., *et al.*, 2000; Vivacqua A., *et al.*, 2006a; Vivacqua A., *et al.*, 2006b; Albanito L., *et al.*, 2008a; Albanito L., *et al.*, 2008b), mentre l'estriolo agisce come antagonista di GPER in cellule di tumore mammario ER-negative (Lappano R., *et al.*, 2010). L'identificazione di ligandi selettivi di GPER (Bologa C.G., *et al.*, 2006; Dennis M.K., *et al.*, 2009; Dennis M.K., *et al.*, 2011; Lappano R., *et al.*, 2010) ha di recente fornito l'opportunità di caratterizzare i segnali molecolari e le risposte biologiche mediate selettivamente da tale recettore.

1.2 Il carcinoma mammario

Il carcinoma della mammella (Fig. 1.1) rappresenta la neoplasia più frequente e la prima causa di morte per malattia neoplastica nel sesso femminile. E' un tumore maligno che origina dalle cellule epiteliali della ghiandola mammaria e può essere distinto in:

- **Carcinoma non infiltrante (o *in situ*):** caratterizzato da una proliferazione di cellule epiteliali maligne che non oltrepassano la membrana basale e che quindi non raggiungono i linfonodi. Questo evento può avvenire a livello del lobulo o del dotto della ghiandola (carcinoma lobulare *in situ* e carcinoma duttale *in situ*, rispettivamente);
- **Carcinoma infiltrante:** caratterizzato dal superamento della membrana basale e quindi dalla presenza di invasione stromale. Il carcinoma infiltrante è quindi invasivo e diffonde a livello linfatico. Anche in questo caso si possono distinguere il carcinoma duttale infiltrante e il carcinoma lobulare infiltrante, a seconda che la patologia primaria sia a carico del dotto o del lobulo.

Il carcinoma infiltrante rappresenta la forma più diffusa e può essere ulteriormente classificata in base alla stadiazione:

- **Stadio I:** la massa tumorale ha piccole dimensioni (minori di 2 cm), è rimovibile e confinata, senza interessamento dei linfonodi;
- **Stadio II:** il tumore ha dimensioni inferiori a 5 cm, ma è esteso ai linfonodi ascellari;
- **Stadio III:** la massa tumorale inizia ad interessare anche i muscoli del petto, oltre a coinvolgere completamente i linfonodi ascellari;
- **Stadio IV:** si ha la presenza di metastasi.

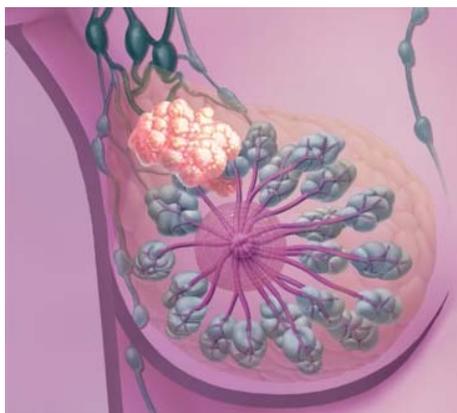


Figura 1.1 Carcinoma mammario

Il carcinoma della mammella rappresenta, nelle donne tra i 35 e i 75 anni, la seconda causa di morte dopo le malattie cardiovascolari (Hortobagyi G.N. *et al.*, 2005) e la sua incidenza è maggiore nei paesi industrializzati: ogni anno ne sono diagnosticati circa 1-2 milioni di casi che colpiscono il 10-12% della popolazione femminile mondiale (Porter P., 2008). In Italia sono diagnosticati circa 37000 casi l'anno (152 ogni 100000 donne). Lo stile di vita e l'ormono-dipendenza sono due tra i maggiori fattori di rischio e rappresentano quindi potenziali siti d'intervento per ridurre la mortalità correlata a questa patologia. La riduzione del tasso di mortalità che è stata osservata negli Stati Uniti negli anni novanta (per poi mantenersi stabile nei decenni successivi), è da correlarsi con l'avvento delle tecniche di diagnosi precoce, come la mammografia, e all'uso di terapie sistemiche (come quella che prevede l'uso del tamoxifene). In particolar modo è stata osservata una mortalità minore nei casi di tumore ER-positivi rispetto a quelli ER-negativi (Peto R. *et al.*, 2000; Jatoi I. and Miller A.B. 2003; Berry D.A. *et al.*, 2005; Jatoi I. *et al.*, 2007).

Il carcinoma mammario è frequentemente correlato all'età: il tasso maggiore di incidenza di questa neoplasia si ha infatti tra i 35 e i 39 anni, per poi rimanere più o meno costante fino agli 80 anni. Tuttavia il tasso di insorgenza tende a diminuire leggermente intorno ai 50 anni, età in cui insorge la menopausa (Anderson W.F. *et al.*, 2005; Benson J.R. *et al.*, 2009). Oltre all'età, altri fattori di rischio sono: storia personale (donne con un precedente tumore in una mammella, presentano un rischio 3-4 volte maggiore di sviluppare un

tumore nella mammella controlaterale, rispetto alle donne che non hanno mai avuto un carcinoma mammario) (Chen Y. *et al.*, 1999); familiarità (Thompson W.D., 1994); precedenti biopsie della mammella, anche se con esito benigno (Armstrong K. *et al.*, 2000); menarca precoce (prima di 12 anni) e/o menopausa tardiva (dopo i 50 anni) (Bernstein L., 2002); gravidanza (una gravidanza portata a termine prima dei 30 anni, rappresenta un fattore di protezione nei confronti del carcinoma della mammella (Hulka B.S. *and* Moorman P.G., 2001); alcool (Singletary K.W. *and* Gapstur S.M., 2001); fumo (Baron J.A. *et al.*, 1996; Marcus P.M. *et al.*, 2000; Egan K.M. *et al.*, 2002); dieta e obesità (Wu A.H. *et al.*, 1999; Byrne C. *et al.*, 2002); precedente radioterapia (Biglia N. *et al.*, 2004); terapia ormonale sostitutiva (Magnusson C. *et al.*, 1999; Ross R.K. *et al.*, 2000; Schairer C. *et al.*, 2000); fattori genetici (mutazioni genetiche a carico dei geni BRCA-1 o BRCA-2 sono alla base della maggior parte dei carcinomi mammari ereditari a trasmissione dominante) (Antoniou A. *et al.*, 2003; Zografos G.C. *et al.*, 2004).

L'esame clinico riveste fondamentale importanza sia nella diagnosi che nella prevenzione del carcinoma mammario. Mediante ispezione e palpazione è infatti possibile valutare eventuali asimmetrie della dimensione, della forma o del colorito delle mammelle. Il tumore si presenta alla mammografia come un nodulo radiopaco a margini irregolari, spesso vi sono alterazioni del parenchima circostante e microcalcificazioni nel contesto del nodulo. L'ecografia trova applicazione soprattutto nelle donne giovani e nella diagnostica delle lesioni benigne della mammella: permette di distinguere le lesioni solide da quelle cistiche a contenuto liquido. La biopsia chirurgica, effettuata sempre più raramente, è utile in caso di lesioni non palpabili, visibili all'ecografia e con esame citologico dubbio.

L'intervento chirurgico è eseguito in base al caso clinico. Anche se la mammografia rileva una massa tumorale molto piccola, che dall'esame citologico appare tuttavia di natura maligna, l'intervento chirurgico diventa necessario. Il tumore mammario infatti presenta un elevato tasso di mortalità proprio grazie al suo alto potere invasivo e metastatico. La tempestività della diagnosi e dell'eventuale intervento hanno dunque importanza fondamentale per la riuscita della terapia. La radioterapia trova applicazione subito dopo l'intervento chirurgico, nel trattamento delle recidive della malattia localmente avanzata, dopo la chemioterapia primaria nelle forme infiammatorie e nella forma metastatica per controllare il dolore da metastasi ossee e cerebrali.

Nelle donne in premenopausa possono essere impiegati sia l'ovariectomia che il trattamento con tamoxifene, mentre nelle donne in postmenopausa il tamoxifene è considerato il trattamento di prima scelta. Nella chemioterapia, i farmaci maggiormente utilizzati sono alchilanti, antimetaboliti, alcaloidi della vinca, antracicline e composti del platino in regime di polichemioterapia.

Il carcinoma mammario è una patologia complessa poiché molteplici fattori intervengono nella sua eziopatogenesi, condizionandone anche la prognosi. Considerata la capacità di ormoni come gli estrogeni e fattori mitogeni (insulino-simile, fattore di crescita epidermico ed altri) di attivare specifiche proteine recettoriali che inducono la trascrizione genica, essi rivestono un ruolo importante nel processo di trasformazione neoplastica della ghiandola mammaria (Dickson R. *and* Lipmann M.E., 1996). Evidenze sperimentali hanno indicato che gli estrogeni, che generalmente influenzano la normale proliferazione, differenziazione e fisiologia di tessuti sensibili, possono anche contribuire in modo determinante all'eziopatogenesi e alla progressione del tumore mammario (Eisen A. *and* Weber B.L., 1998; Ascenzi P. *et al.*, 2006).

1.3 Gli estrogeni

Gli estrogeni esercitano azioni fisiologiche fondamentali per la crescita e la differenziazione di diversi tessuti target. Sono, ad esempio, importanti nel determinare lo sviluppo degli organi sessuali femminili (vagina, utero e tube) e delle caratteristiche sessuali secondarie (mammelle e adipe), ma anche nel favorire processi implicati nella fecondazione e nell'impianto della blastocisti. Oltre ad essere i principali protagonisti dell'attività funzionale dell'apparato riproduttivo femminile, gli estrogeni svolgono diverse azioni anche su altri organi e apparati:

- favoriscono lo sviluppo del sistema scheletrico e riducono il rischio di fratture ossee, in quanto responsabili della chiusura delle epifisi; aumentano il rilascio di vitamina D

nel rene e riducono la velocità di riassorbimento osseo, antagonizzando gli effetti del paratormone (PTH);

- hanno effetti vasodilatatori e cardioprotettivi, in quanto favoriscono il rilascio di molecole vasodilatatorie come il nitrossido (NO) e la proliferazione di cellule epiteliali, impedendo inoltre la formazione delle placche aterosclerotiche e la proliferazione delle cellule muscolari lisce;
- mantengono intatte le normali strutture della pelle;
- aumentano la sintesi epatica di proteine di legame e di trasporto;
- hanno azione neuroprotettiva e influenzano alcuni centri regolatori del cervello, come il centro di controllo della temperatura corporea.

Gli estrogeni sono sintetizzati principalmente nelle donne in età pre-menopausale a livello dell'ovaio, mentre, dopo la menopausa, la sintesi interessa anche tessuti extraovarici (osso, pelle, placenta, tessuto adiposo, fibroblasti, neurone ipotalamici). Infatti, in donne in età post-menopausale il tessuto adiposo rappresenta il sito principale di sintesi degli estrogeni. La sintesi del 17β -estradiolo (E2), il più importante rappresentante di questa classe di ormoni, avviene a partire dal colesterolo (Figura 1.3).

1.4 I recettori estrogenici: ER e GPR30/GPER

1.4.1 Il recettore estrogenico (ER)

Gli effetti biologici degli estrogeni sono mediati dall'interazione con le due isoforme del recettore estrogenico (ER), ER α e ER β , che sono in grado di legare gli estrogeni con la stessa affinità, sebbene abbiano azioni biologiche e distribuzione tissutale diverse. In particolare, ER α risulta prevalentemente espresso nella mammella, nell'utero, nella cervice uterina e nella vagina, mentre ER β è localizzato soprattutto nelle ovaie, nella prostata, nei testicoli, nella milza, nel polmone, nell'ipotalamo e nel timo (Koehler K.F. *et al.*, 2005; Couse J. F. *et al.*, 1997; Hall J. M. *et al.* 2001). ER α e ER β sono due prodotti di geni separati (ESR1 e ESR2), localizzati rispettivamente sul cromosoma 6 e 14. ESR1 e ESR2 comprendono 8 esoni separati da 7 regioni introniche (Enmark E. *et al.*, 1997; Kraus R.J. *et al.*, 2002; Luisi S. *et al.*, 2006; Zhou W. *et al.*, 2006).

ER α è una proteina formata da 595 aminoacidi, con un peso molecolare di 66 kDa; ER β è invece costituita da 530 aminoacidi, con un peso molecolare di 54 kDa. Come gli altri membri appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari, le due isoforme del recettore estrogenico sono proteine costituite da una serie di domini funzionali comuni (A, B, C, D, E ed F), che interagiscono tra loro e formano la proteina funzionale (Figura 1.4) (Nilsson S. *et al.*, 2001; Claessens F. and Gewirth D.T., 2004; Kumar R. *et al.*, 2004).

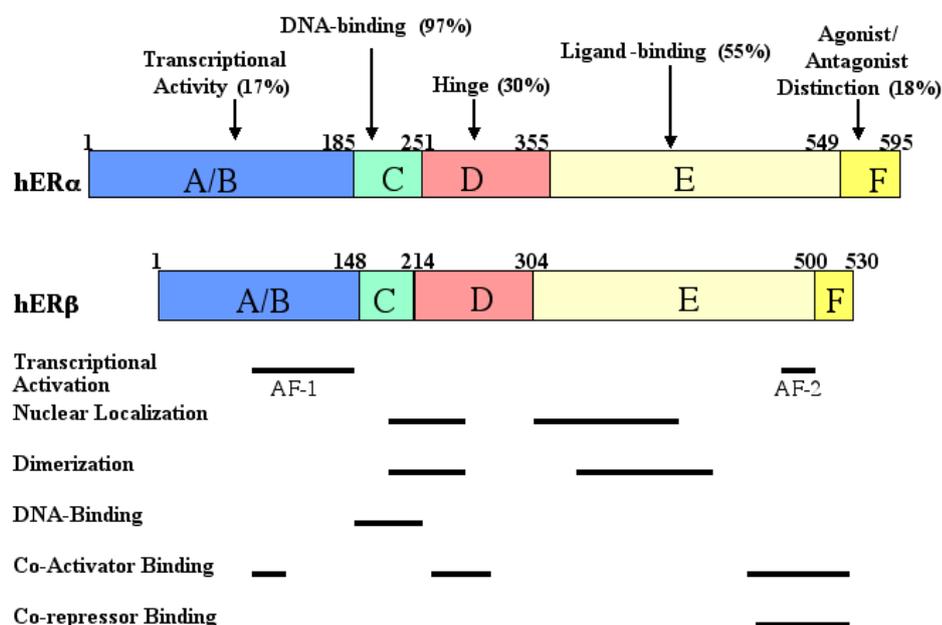


Figura 1.4 Illustrazione dei domini funzionali delle due isoforme del recettore estrogenico

Entrambe le isoforme possono essere suddivise in quattro regioni costituite da uno o più domini funzionali:

- Il dominio di transattivazione amino-terminale (N-terminale) (regioni A/B):** è coinvolto negli eventi di interazione proteina-proteina e di attivazione della trascrizione dei geni target. Questo dominio contiene il sito con funzione di attivazione 1 (*Activation function site 1*, AF-1) e numerosi siti di fosforilazione. (Webb P. *et al.*, 1998; Kumar R. *and* Thompson E.B., 2003). Il sito AF-1 lega, direttamente o attraverso una serie di co-attivatori/co-repressori, alcune delle proteine coinvolte nel processo di attivazione della trascrizione. Sebbene l'attivazione della trascrizione possa avvenire anche quando AF-1 è legato esclusivamente al dominio di legame al DNA (DNA Binding Domain, DBD), l'attivazione completa della trascrizione avviene solo quando il sito AF-1 si trova vicino al sito AF-2, localizzato nel dominio di legame del ligando (Ligand Binding Domain, LBD) (McInerney E. M. *and* Katzenellenbogen B. S, 1996; Kumar R. *and* Thompson E.B., 2003; Kumar R. *et al.*, 2004). I siti AF-1 di ER α e ER β hanno scarsa omologia di sequenza aminoacidica.

- **Il dominio di legame al DNA (DNA Binding Domain, DBD) (regione C):** è coinvolto nel processo di dimerizzazione del recettore e nel legame a specifiche sequenze di DNA responsive agli estrogeni (*Estrogen Responsive Elements*, ERE). La sequenza aminoacidica di questo dominio è molto conservata nelle due isoforme recettoriali. Il dominio di legame al DNA ha una struttura tridimensionale globulare e contiene due α -eliche perpendicolari ad una terza. Queste 3 α -eliche racchiudono il core idrofobico del dominio e le due α -eliche perpendicolari formano due dita, stabilizzate dallo zinco, che legano il DNA (Figura 1.5). Il dominio di interazione con il DNA, inoltre, può essere diviso in due sub-domini: uno prossimale (P-box), coinvolto nella ricognizione del DNA, e uno distale (D-box), coinvolto nella dimerizzazione, DNA dipendente, di due molecole di recettore attivato dal ligando (Ruff M. *et al.*, 2000; Gearhart M.D. *et al.*, 2003; Kumar R. *et al.*, 2004)

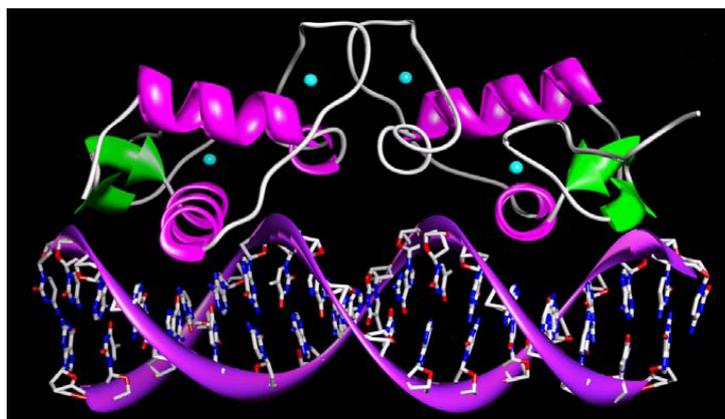


Figura 1.5 Rappresentazione tridimensionale dei DBD dell'omodimero, formato da due molecole recettoriali, legati al DNA

Le α -eliche e i β -foglietti del DBD sono rappresentati in magenta e verde, rispettivamente. Il recettore interpone una di queste α -eliche nel solco maggiore del DNA (rappresentato in viola) e arriva a sfiorare le basi azotate (rappresentate come bastoncini colorati diversamente a seconda del tipo di atomo), riconoscendo specifiche sequenze di DNA. Gli atomi di zinco sono rappresentati come sfere azzurre.

- **Il dominio “cerniera” (regione D):** presenta una serie di siti di acetilazione e la sequenza aminoacidica di questa regione varia molto nelle due isoforme di ER (Ascenzi P. *et al.*, 2006);
- **Il dominio carbossi-terminale (C-terminale) (regioni E/F):** contiene il dominio d’interazione con il ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD), il dominio AF-2 (*Activation function domain 2*) che ha un ruolo fondamentale nell’attivazione della trascrizione in seguito all’interazione con AF-1, il dominio di omo- ed eterodimerizzazione e parte della regione di localizzazione nucleare. Questo dominio è, inoltre, coinvolto nel legame con le *Heat-shock proteins* (Hsp 70 e 90), proteine che hanno la funzione di mantenere il recettore in forma inattiva nel citoplasma quando questo non interagisce con il ligando (Pearce S.T. *and* Jordan V.C., 2004). La struttura tridimensionale del LBD è costituita da una serie di α -eliche (H1-H11) che formano una struttura molecolare a forma di cuneo, con una cavità delle dimensioni opportune per consentire l’alloggiamento del ligando. All’esterno di questa struttura si trovano un foglietto β e un’altra α -elica (H12), che è necessaria per l’attivazione del recettore in seguito all’interazione con il ligando e contiene la sequenza critica per il funzionamento di AF-2. La sequenza aminoacidica del LBD è altamente conservata in entrambe le isoforme del recettore, perciò gli estrogeni sono in grado di legare ER α e ER β con identica affinità (Brzozowski A.M., *et al.*, 1997; Kong E. *et al.*, 2005; Renaud J. *et al.*, 2005; Chao E.Y. *et al.*, 2006; Hsieh R.W., *et al.*, 2006).

Gli effetti biologici degli estrogeni vengono mediati dal recettore estrogenico attraverso l’attivazione di pathway trasduzionali che culminano nella regolazione dell’attività trascrizionale di geni target. Il recettore estrogenico modula la trascrizione genica attraverso meccanismi nucleari genomici ERE-dipendenti ed ERE-indipendenti, ma anche attraverso meccanismi extranucleari non genomici. Inoltre, la regolazione della trascrizione mediata dal recettore estrogenico può avvenire anche in maniera ligando-indipendente, grazie all’attivazione di vie del segnale ad opera di alcuni fattori di crescita. Infatti, esiste un’interazione tra pathway trasduzionali mediati da recettori diversi che convergono nella

regolazione della trascrizione di alcuni geni (Berno V. *et al.*, 2008), confermando l'ipotesi dell'esistenza di un crosstalk funzionale tra estrogeni e fattori di crescita (Figura 1.6).

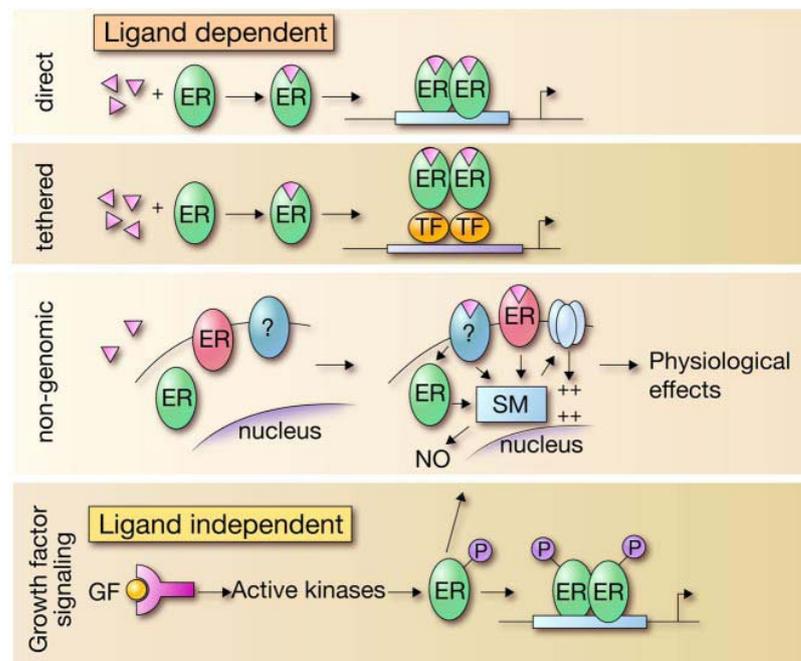


Figura 1.6 Meccanismi di attivazione del recettore estrogenico

Il recettore estrogenico è un fattore di trascrizione e, come gli altri recettori per gli ormoni steroidei, è localizzato nel citoplasma sotto forma di etero-oligomero costituito da due molecole di recettore e due molecole di Heat Shock Proteins (Hsp 90, Hsp70, Hsp 56).

Queste proteine hanno la funzione di mantenere il recettore in forma inattiva con un'alta affinità per il ligando, di preservare il recettore dalla distruzione proteasomica nel citoplasma e di veicolarlo dal citoplasma al nucleo interagendo con le proteine della rete microtubulare (Pratt W. B., 1990).

Il classico meccanismo di attivazione del recettore estrogenico prevede che gli estrogeni, essendo molecole lipofile, entrino nella cellula per semplice diffusione ed interagiscano con ER determinando il distacco delle Heat Shock Proteins e la formazione di omodimeri

che traslocano nel nucleo, dove prendono contatto con specifiche sequenze ERE, localizzate nelle regioni promotrici di geni target (Figura 1.7) (Tsai M.J. *and* O'Malley B.W., 1994).

Le sequenze ERE sono sequenze palindromiche, altamente conservate nella famiglia dei recettori nucleari, costituite da 13 paia di basi, ovvero da due sequenze pentanucleotidiche complementari separate da tre nucleotidi variabili (GGTCAnnnTGACC-3') (Wood J. R., *et al.*, 2001). L'interazione del complesso ligando-recettore con le sequenze ERE e il reclutamento di altri fattori trascrizionali (co-attivatori e co-repressori) determina l'attivazione o l'inibizione della trascrizione (McKenna N. J. *and* O'Malley B. W., 2002). Il sito AF-2 è la porzione della proteina recettoriale deputata al legame con i cofattori, i quali agiscono poi da ponte tra il recettore e l'apparato trascrizionale della cellula.

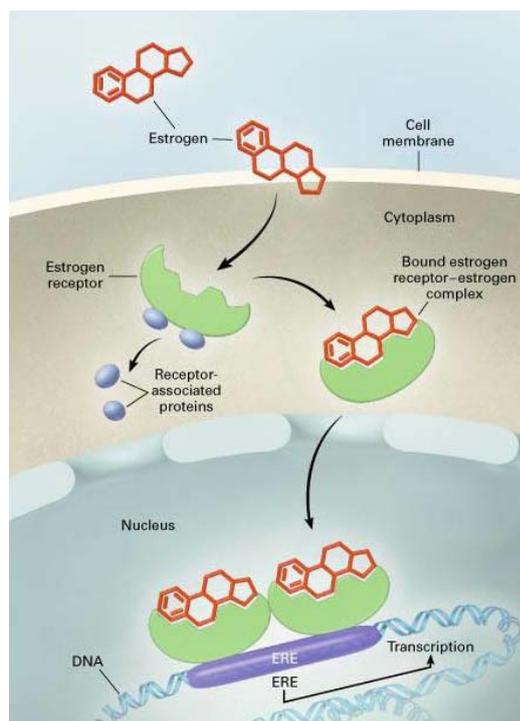


Figura 1.7 Illustrazione del classico meccanismo genomico attraverso cui gli estrogeni attivano la trascrizione genica

Il recettore estrogenico può anche modulare la trascrizione di geni nel cui promotore non sono presenti sequenze ERE o sequenze simili ad esse. Questi promotori hanno bisogno di un secondo fattore di trascrizione in grado di mediare il legame del recettore al DNA. Un esempio di questo meccanismo è l'interazione di ER α con la subunità c-rel del fattore trascrizionale nucleare κ B (NF- κ B) (Ray A. *et al.*, 1994; Galien R. and Garcia T. 1997) (Figura 1.8A). Anche il fattore Sp-1 (Stimulating protein-1) è uno dei principali mediatori dei segnali innescati dal recettore estrogenico in grado di legarsi al DNA. Il legame tra ER e il fattore Sp-1 avviene tramite il DBD del recettore.

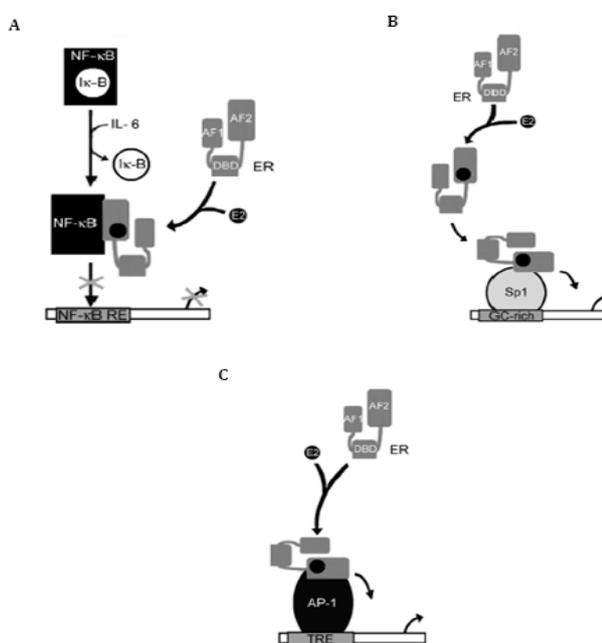


Figura 1.8 Meccanismi ERE-indipendenti attraverso cui ER regola la trascrizione genica

ER è in grado di regolare la trascrizione di alcuni geni che non presentano sequenze ERE nel promotore, interagendo con altri fattori di trascrizione come NF- κ B (A), SP-1 (B) e AP-1 (C).

ER α è in grado di indurre il legame al DNA e quindi la trascrizione di geni target, in maniera sia ormono-dipendente che indipendente (Figura 1.8B) (Porter W. *et al.*, 1997; Marino M. *et al.*, 2003; O'Lone R. *et al.*, 2004). Inoltre, sia ER α che ER β sono in grado di interagire anche con il fattore di trascrizione AP-1 (*Activator protein 1*), eterodimero formato da un membro della famiglia di c-Fos e uno di c-Jun, e stimolare la trascrizione di

geni target tramite il legame di questo fattore a specifiche sequenze sul promotore. In particolare, proprio attraverso il complesso AP-1, l'attivazione di ER α stimola la trascrizione di geni target come la ciclina D, mentre l'attivazione di ER β ne riduce l'espressione (Figura 1.8C) (Prall O.W. *et al.*, 1997; Marino M. *et al.*, 2002; Acconcia F. *et al.*, 2005).

Considerata la correlazione tra l'attivazione del recettore estrogenico e l'insorgenza di neoplasie a carico della ghiandola mammaria e di altri tessuti dell'apparato riproduttivo femminile, negli ultimi anni la ricerca farmaceutica si è orientata verso lo sviluppo di nuove molecole in grado di inibire il legame degli estrogeni al proprio recettore. Sono state sintetizzate una serie di molecole capaci di modulare selettivamente il recettore estrogenico, note con il nome di SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*). Questi composti, a differenza degli estrogeni e degli antiestrogeni, si comportano da agonisti del recettore in alcuni tessuti (osso, fegato e sistema cardiovascolare), da antagonisti in altri (cuore e ghiandola mammaria) e da agonisti parziali nell'utero. Il primo SERM sintetizzato ed usato in terapia è stato il tamoxifene (Figura 1.9). Si tratta di un profarmaco che *in vivo* è metabolizzato in 4-idrossitamoxifene (4-OHT), molecola farmacologicamente attiva (Figura 1.9) (Goetz M.P. *and* Loprinzi C.L., 2003).

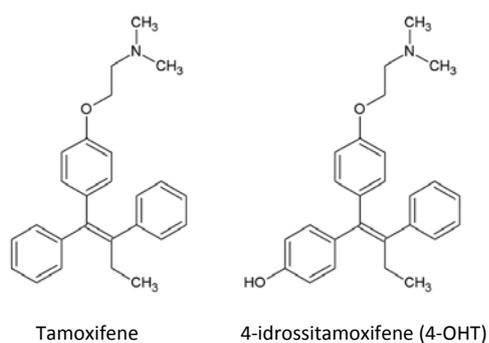


Figura 1.9 Struttura di Tamoxifene e del suo metabolita attivo 4-idrossitamoxifene (OHT).

Il 4-OHT riesce infatti ad entrare nella tasca idrofobica presente nel LBD di ER α e legarsi, ma l'ingombro sterico determinato dalla sua catena laterale previene la ridisposizione spaziale dell' α -elica H12, necessaria per chiudere il ligando all'interno della tasca ed attivare quindi il processo di trascrizione 9 (Lewis J.S. *and* Jordan V.C., 2005).

Il tamoxifene, in pratica clinica, è usato nel trattamento del carcinoma mammario ER-positivo e nella prevenzione della stessa patologia in donne in età post-menopausale. Inoltre, è utilizzato anche per prevenire il rischio di fratture ossee in donne dopo la menopausa (Jordan V.C., 2004; Cuzick J. *et al.*, 2003; Love R.R. *et al.*, 1992). Tuttavia, numerosi studi sperimentali hanno messo in evidenza come la terapia prolungata con il tamoxifene determini effetti cancerogeni a livello dell'endometrio. Questo effetto collaterale potrebbe essere spiegato grazie all'attività di agonista parziale che questo farmaco esercita nell'utero. Inoltre, alcune osservazioni cliniche hanno dimostrato che una paziente su quattro affetta da carcinoma mammario ER-positivo non risponde al trattamento con il tamoxifene, mentre una paziente su sei, con carcinoma mammario ER-negativo, mostra una regressione del tumore dopo trattamento con antiestrogeni (Filardo E.J. *et al.*, 2006).

Queste osservazioni hanno suggerito l'esistenza di un meccanismo d'azione degli estrogeni, diverso da quello classico, che potesse regolare la crescita e la sopravvivenza di cellule tumorali mammarie. Infatti, numerosi effetti degli estrogeni e composti simil-estrogenici non possono essere spiegati con il classico meccanismo che prevede l'interazione ormone-recettore ed il legame del complesso a sequenze di DNA nei geni target.

In tale contesto, molteplici studi hanno evidenziato che il 17 β -estradiolo (E2) (Figura 1.10) è in grado di esercitare anche azioni extranucleari non genomiche.

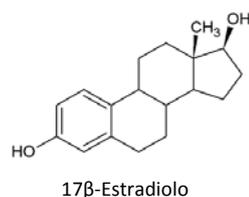


Figura 1.10 Struttura del 17 β -estradiolo.

Tali effetti, infatti, sono troppo rapidi per essere compatibili con la sintesi di RNA e di proteine, dal momento che si verificano entro pochi minuti dalla somministrazione dell'ormone; avvengono in cellule in cui la sintesi di RNA e proteine è assente, come gli spermatozoi, così come in presenza di inibitori della trascrizione o della sintesi proteica;

possono essere riprodotti usando ormoni legati covalentemente a molecole impermeabili alla membrana cellulare (Simoncini T. *et al.*, 2002). Questi effetti non trascrizionali degli estrogeni comprendono la regolazione del flusso cellulare di Ca^{2+} , la modulazione del contenuto citoplasmatico di cAMP, cGMP, IP3, NO (Madak-Erdogan Z. *et al.*, 2008) e la modulazione di recettori associati a proteine G (Kelly M.J. *and* Wagner E.J., 1999). Inoltre, E2 attiva protein chinasi come PKA, PKB, PKC, la chinasi Ca^{2+} /calmodulina-dipendente (CAMK), MAP chinasi (MAPK) e tirosin-chinasi. L'attivazione di queste proteine provoca la fosforilazione di substrati a valle, tra cui fattori di trascrizione e co-attivatori, che possono regolare la trascrizione genica in maniera ERE-indipendente (Coleman K.M. *et al.*, 2003; Björnström L. *and* Sjöberg M., 2005; Fu X.D. *and* Simoncini T., 2008).

Queste azioni sembrano essere mediate da una sottopopolazione del recettore estrogenico localizzato a livello della membrana plasmatica e sembrano coinvolgere una serie di molecole, anch'esse localizzate a livello membranario come proteine G, Src, Ras e Raf (Norman A. W. *et al.*, 2004). Inoltre, alcuni fattori di crescita, come l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), possono, attivando il proprio recettore, indurre la fosforilazione del recettore estrogenico nucleare a livello del residuo di Serina118 (Ser118), causandone l'attivazione in maniera ligando-indipendente. È stato, quindi, possibile ipotizzare la presenza di un crosstalk funzionale tra ER e alcuni recettori per i fattori di crescita, come EGFR, in grado di determinare una completa risposta biologica (Levin E. R., 2001) (Figura 1.11).

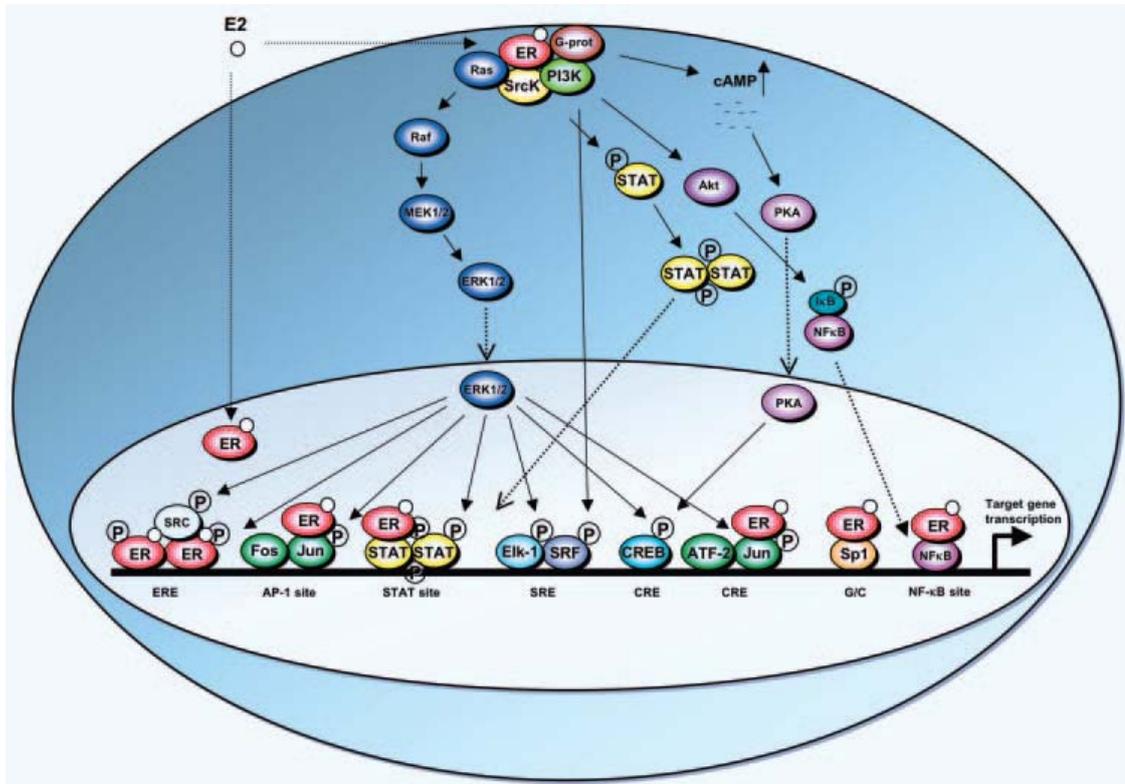


Figura 1.11 Rappresentazione dei pathway genomici e non genomici che mediano il segnale di ER

1.4.2 Il recettore estrogenico di membrana GPR30/GPER

È ormai noto che oltre al classico meccanismo d'azione genomico, molte delle azioni mediate dagli estrogeni coinvolgono la superficie cellulare, attraverso l'attivazione di proteine recettoriali localizzate a livello della membrana plasmatica. Molteplici evidenze sperimentali indicano che, in alcuni tipi cellulari, le azioni estrogeniche rapide avvengono grazie all'attivazione di recettori accoppiati a proteine G (G Protein-Coupled Receptors,

GPCRs) (Thomas P. *et al.*, 2005). I GPCRs sono costituiti da un'unica catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica e trasducono i segnali intracellulari attraverso l'interazione con proteine G eterotrimeriche, costituite da tre subunità (α , β e γ) con attività GTPasica. Quando il recettore interagisce con il proprio ligando, la subunità α si dissocia dal complesso $\beta\gamma$ e regola l'attività di canali ionici e di enzimi associati alla membrana plasmatica (adenilato ciclasi, fosfolipasi C) che generano secondi messaggeri (cAMP, inositolo trifosfato, Ca^{2+}). Il complesso $\beta\gamma$, invece, agisce andando ad attivare altre protein chinasi coinvolte in cascate di segnali intracellulari (Lappano R. *and* Maggiolini M., 2011; Lappano R. *and* Maggiolini M., 2012).

Nell'ambito dei GPCRs, il recettore di membrana denominato GPR30/GPER (Carmeci C., *et al.*, 1997), è ampiamente coinvolto nella mediazione degli effetti rapidi indotti dagli estrogeni attraverso l'attivazione di vie di trasduzione del segnale non genomiche (Prossnitz E.R. *and* Maggiolini M., 2008). GPER è una proteina di 38kDa di recente identificazione (Carmeci C., *et al.*, 1997) che presenta la tipica struttura eptaelica di un recettore accoppiato a proteine G, con un sito di clivaggio all'estremità ammino-terminale e un dominio carbossi-terminale intracellulare (Filardo E.J. *et al.*, 2007). Questo recettore è ampiamente distribuito in tessuti responsivi agli estrogeni come cuore, fegato, intestino, placenta, cervello e ovaio. Inoltre, GPER risulta espresso in molte cellule tumorali quali quelle mammarie, ovariche, endometriali e molte altre ancora, suggerendo un suo coinvolgimento nel mediare gli effetti non genomici degli estrogeni in queste cellule (Owman C. *et al.*, 1996; Takada Y. *et al.*, 1997; O'Dowd B.F. *et al.*, 1998). È stato anche evidenziato come l'espressione di GPER sia positivamente associata con le dimensioni della massa tumorale, con l'espressione di HER2/Neu, recettore con attività tirosin-chinasica appartenente alla famiglia dell'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) e con l'insorgenza di metastasi. Inoltre, l'espressione di GPER è stata correlata con una prognosi negativa nel carcinoma mammario, endometriale ed ovarico (Prossnitz E. *and* Maggiolini M., 2009; Smith H.O. *et al.*, 2007; Smith H.O. *et al.*,; Filardo E.J. *et al.*, 2006). Questi dati hanno suggerito come GPER possa essere considerato un predittore biologico di malignità e aggressività della patologia neoplastica (Prossnitz E.R. *et al.*, 2008). In tale contesto, è stata di recente dimostrata la capacità dell'EGF e dell'IGF-I, attraverso l'attivazione dei rispettivi recettori, di regolare l'espressione di GPER in cellule tumorali mammarie ed

endometriali (Albanito L., *et al.*, 2008; Vivacqua A., *et al.*, 2009; De Marco P., *et al.*, 2012). Inoltre, è stato dimostrato che l'espressione di GPER, indotta da stimolo ipossico in cellule tumorali mammarie ER-negative e fibroblasti tumore-associati (CAFs), è coinvolta nell'up-regolazione del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e di conseguenza nell'angiogenesi tumorale ipossia-dipendente (Recchia A.G., *et al.*, 2010; De Francesco E., *et al.*, 2013).

Numerosi studi sono stati condotti per comprendere l'esatta localizzazione intracellulare di GPER: a seconda del contesto cellulare, GPER è stato localizzato sia a livello della membrana plasmatica (Filardo E.J. *et al.*, 2000; Thomas P. *et al.*, 2005; Funakoshi T. *et al.*, 2006) che del reticolo endoplasmatico (Revankar C.M. *et al.*, 2005; Brailoiu E. *et al.*, 2007; Wang C. *et al.*, 2007). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che in fibroblasti associati al tumore mammario (CAFs) GPER è localizzato a livello nucleare (Madeo A. and Maggiolini M., 2010; Pupo M., *et al.*, 2013).

GPER è in grado di mediare i segnali rapidi indotti dagli estrogeni e da composti con attività simil-estrogenica attivando una proteina Gs a cui è associato. L'attivazione di questa proteina innesca un meccanismo di trasduzione del segnale a cascata che inizia con la sintesi di cAMP da parte dell'adenilato ciclasi e prosegue con una serie di eventi di fosforilazione che portano all'attivazione di bersagli quali le MAP chinasi (MAPKs) (Filardo E.J. *et al.*, 2002).

La trasduzione del segnale estrogenico attraverso GPER si colloca nel contesto di networks intracellulari di segnali interdipendenti, attraverso cui ormoni steroidei, fattori di crescita e composti ad attività simil-estrogenica, sono in grado di promuovere eventi fisiologici e patologici come la proliferazione cellulare e la progressione tumorale.

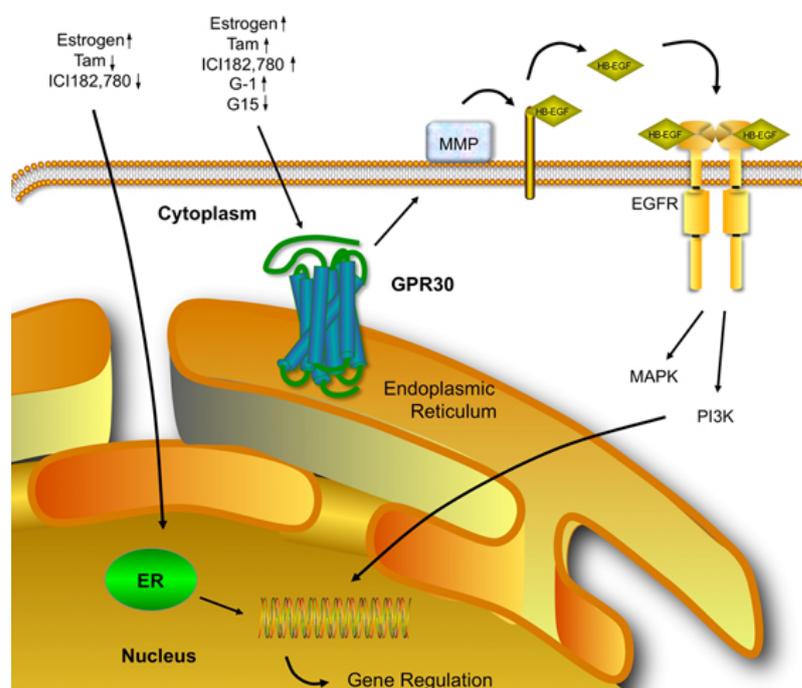


Figura 1.12 Meccanismi di trasduzione del segnale estrogenico attraverso GPER

Le molecole in grado di legare GPER entrano nella cellula e attivano il recettore localizzato principalmente sul reticolo endoplasmatico. L'attivazione del recettore e della proteina G ad esso associata causa l'attivazione delle metalloproteinasi della matrice che operano il clivaggio di pro peptidi a struttura EGF simile (pro HB-EGF) rilasciando HB-EGF. Tali fattori determinano la transattivazione di EGFR, dunque l'attivazione di diversi segnali a valle, tra cui la PI3K e le MAPK. Questi eventi intracellulari possono condurre all'attivazione di proteine nucleari coinvolte nella regolazione della trascrizione genica. Nella figura è anche mostrato il classico meccanismo di trasduzione del segnale ER-dipendente.

Infatti, la stimolazione di GPER determina l'attivazione di metalloproteinasi della matrice (MMP), responsabili della liberazione di peptidi a struttura EGF simile (*Heparin-binding EGF-like growth factor*, HB-EGF) con conseguente attivazione di EGFR (Filardo E.J. *et al.*, 2000; Prossnitz E.R. and Maggiolini M., 2009) (Figura 1.12).

Il recettore di membrana per il fattore di crescita epidermico è coinvolto nei meccanismi di iniziazione e di proliferazione tumorale (Figura 1.13). (Anagnostopoulos K., and Tentes I., 2008). Questa glicoproteina transmembranaria di 170 kDa è classificata nell'ambito dei recettori ErbB ad attività intrinseca tirosin-chinasica che formano sia omo che etero-dimeri con diverse affinità di legame verso EGF e diverse proprietà di trasduzione del segnale.

Queste proteine trans-membrana vengono attivate in seguito ad interazioni con una serie di peptidi e fattori di crescita della famiglia dell'EGF.

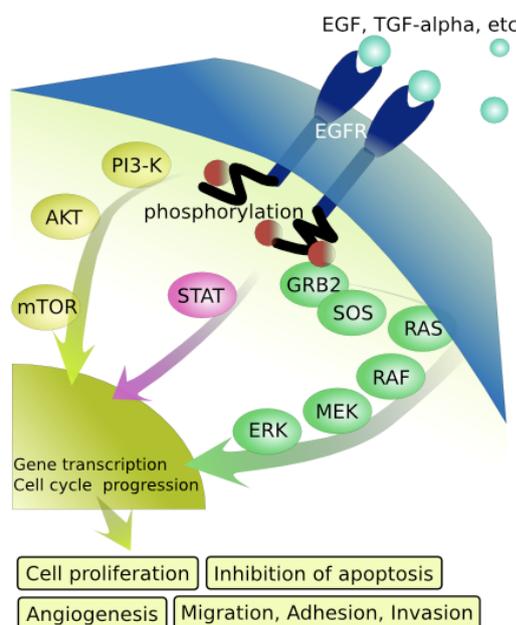


Figura 1.13 Meccanismi di trasduzione del segnale mediati da EGFR

Il fattore di crescita epidermico risulta coinvolto in meccanismi quali la normale crescita e sopravvivenza cellulare e nei processi di rigenerazione epiteliale: è infatti un potente fattore mitogeno in numerose linee cellulari epiteliali e nei fibroblasti, causa divisione delle cellule epatiche *in vivo* ed è in grado di mediare angiogenesi e crescita sia in cellule normali che tumorali. Il legame dell'EGF con il dominio extracellulare dell'EGFR induce un cambiamento conformazionale del recettore che stabilizza le interazioni recettore-recettore. Si ha, quindi, l'omodimerizzazione oppure la eterodimerizzazione del recettore e la stimolazione della sua attività chinasi. In seguito al legame con il ligando, il recettore può autofosforilarsi in cinque residui tirosinici diversi e mediare segnali proliferativi all'interno della cellula. Successivamente, il recettore viene internalizzato attraverso un sistema endocitotico saturabile e può essere riciclato sulla membrana cellulare, oppure può andare incontro a degradazione (down regulation), desensibilizzando le cellule alla

stimolazione da parte del fattore di crescita (Perez-Soler R. *and* Mendelsohn J., 1998; Baselga J. *et al.*, 1996). L'internalizzazione dell'EGFR provocata dall'EGF determina la degradazione del recettore e quindi l'attenuazione della stimolazione iniziale, mentre l'interazione del recettore con il TGF- α , anch'esso ligando di EGFR con un'elevata omologia con EGF, porta a degradazione del ligando, piuttosto che del recettore. Numerosi studi hanno messo in evidenza il coinvolgimento di EGFR, che risulta spesso overespresso in molte cellule tumorali, nella patogenesi e nella progressione di diversi tipi di carcinoma. Infatti, poichè l'overespressione di EGFR è stata associata ad una prognosi non favorevole, diverse strategie sono state sviluppate per inibire questa glicoproteina in modo da arrestare la proliferazione tumorale e migliorare l'esito clinico (Kim E.S., *et al.*, 2001).

L'attivazione del pathway trasduzionale dell'EGFR coinvolge GPER ed innesca una serie di eventi rapidi di fosforilazione a livello di alcune proteine cellulari. I bersagli principali di questi eventi fosforilativi sono delle proteine serina/treonina chinasi che, attivate in seguito a fosforilazione, sono in grado a loro volta di fosforilare altre proteine bersaglio su specifici residui di serina e treonina. L'attività fosforilativa di queste proteine, chiamate MAP chinasi (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPKs), è responsabile della regolazione di importanti processi biologici, quali l'espressione genica, il metabolismo, la proliferazione, la morte programmata, la sopravvivenza e la motilità cellulare. Fra queste proteine con attività chinasi, le ERK1/2, caratterizzate dai classici siti di fosforilazione responsabili dell'attivazione e della trasduzione del segnale (Tyr 185 e Thr 183), rivestono un ruolo di primaria importanza in quanto coinvolte, in particolar modo, nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare. Entrambe le isoforme, in condizioni di riposo, sono localizzate nel citoplasma, ancorate a MEK, una proteina chinasi che ha la funzione di mantenere le ERK in forma inattiva quando è defosforilata; quando essa viene fosforilata da altre proteine a monte determina, attraverso eventi fosforilativi, l'attivazione delle ERK che traslocano nel nucleo, dove regolano l'espressione di una serie di fattori trascrizionali (Chang L. *and* Karin M., 2001) (Figura 1.14).

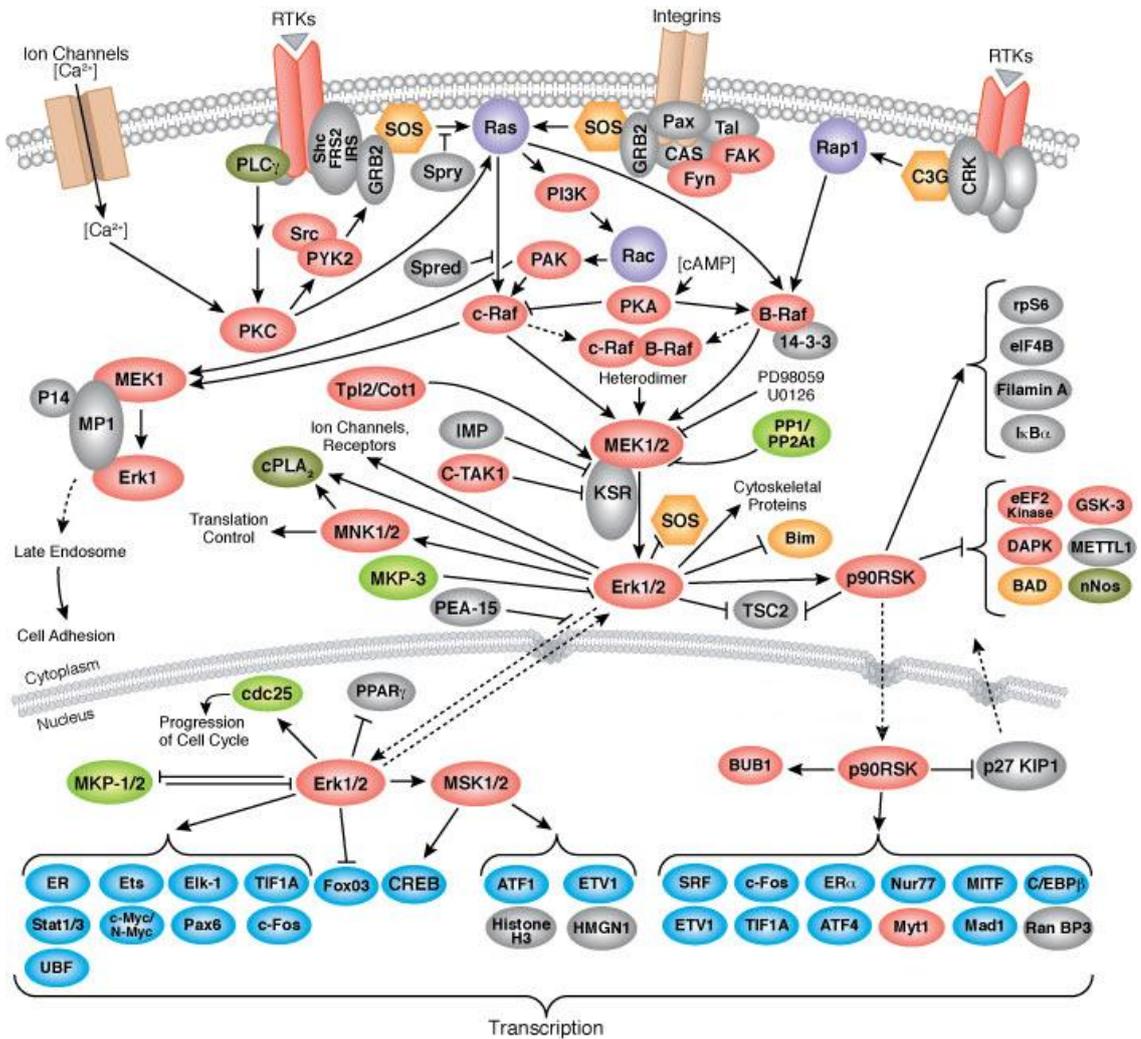


Figura 1.14 Rappresentazione schematica delle vie del segnale mediate dalle MAP Kinasi

In particolare, l'attivazione di EGFR riveste un ruolo importante nell'up-regolazione, indotta dagli estrogeni e dal 4-OHT e mediata da GPER, dell'oncogene c-fos e del gene che codifica per il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) in cellule tumorali estrogeno-sensibili (Maggiolini M. *et al.*, 2004; Vivacqua A. *et al.*, 2006a, b; Pandey D.P., *et al.*, 2009).

Il protooncogene c-fos, localizzato sul cromosoma 12 (Sng J.C.G. *et al.*, 2004), codifica per una proteina nucleare che svolge un ruolo cruciale nei processi di crescita, differenziazione e trasformazione cellulare (Curran T., 1988; Curran T. and Franza B.R. Jr., 1988). c-Fos fa parte degli “*immediate early genes*”, (Treisman R., 1986; Fish T.M. *et al.*, 1987) in quanto la sua espressione è indotta da una serie di stimoli di diversa natura, come ormoni mitogeni e fattori di crescita, in maniera rapida.

La proteina c-fos ha un peso molecolare di 62 kDa (Shaw P. E. *et al.*, 1989) e presenta un dominio di transattivazione nella regione amino-terminale e un dominio di legame al DNA, denominato *leucine zipper domain*. Queste regioni sono altamente conservate e contengono sequenze necessarie per l’interazione con altre proteine e per la localizzazione nucleare (Mölders H. *et al.*, 1987). c-Fos ha la funzione di regolare la trascrizione di una vasta gamma di geni target ed è in grado di interagire altre proteine, dette FAPs (*Fos associated proteins*), tra cui i membri della famiglia Jun (Jun, Jun-B e Jun-D) (Hess J. *et al.*, 2004) (Figura 1.15).

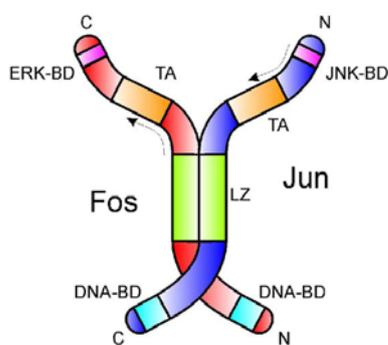


Figura 1.15 Illustrazione dell’interazione tra le proteine c-fos e c-jun che coinvolge il Leucine zipper domain (LZ)

Associandosi con uno dei membri della famiglia Jun, c-fos forma un fattore di trascrizione dimerico in grado di riconoscere e legare con elevata affinità una sequenza asimmetrica formata da sette nucleotidi (TGA(C/G)TCA), denominata AP-1, localizzata nel promotore di numerosi geni (Figura 1.16) (Cohen D.R. *and* Curran T., 1989; Curran T., 1988; Curran

T. and Franza Jr B.R., 1988). Le proteine della famiglia Jun possono formare sia omo- che etero-dimeri, mentre quelle della famiglia Fos (Fos, Fra-1, Fra-2, Fos-B), che non possono formare omodimeri, hanno bisogno di formare dimeri con i membri della famiglia Jun per poter legare il DNA e modulare la trascrizione. Inoltre, il dimero Fos/Jun è in grado di legare anche una sequenza simmetrica costituita da otto nucleotidi TGACGTCA (sequenza CRE, *cAMP responsive elements*), sebbene con affinità molto minore rispetto al sito AP-1 (Chinenov Y. and Kerppola T.K., 2001). Numerosi studi indicano che, oltre ad essere implicato nella normale crescita e differenziamento cellulare e nei processi di trasformazione neoplastica, la proteina c-fos è coinvolta nei processi di invasione di cellule tumorali, quali quelle mammarie (Milde-Langosch K., 2005). Inoltre, dal momento che c-Fos regola la trascrizione di diversi geni *target* coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, la sua *up-regulation* ad opera di stimoli extracellulari potrebbe rappresentare un “sensore molecolare precoce” associato a rilevanti risposte biologiche, tra cui quelle implicate nella proliferazione cellulare (Maggiolini M. *et al.*, 2004).

Il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) è una proteina di secrezione ricca in cisteina con un peso molecolare di 36-38 KDa, descritta per la prima volta nel 1991 (Bradham D.M. *et al.*, 1991). CTGF appartiene a una famiglia di proteine denominate CCN (acronimo di Connective tissue growth factor, Cysteine rich protein-61 e Nephroblastoma over expressed protein) ed è nota anche come il nome di CCN-2 (Bork P., 1993; Brigstock D.R., 2003; Perbal B., 2004). Di questa famiglia fanno parte sei proteine di secrezione e di queste ne sono state ben caratterizzate tre: la proteina ricca in cisteina 61 (Cyr-61 o CCN-1), il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF o CCN-2) e la proteina overespressa nel nefroblastoma (Nov o CCN-3) (Holbourn K.P. *et al.*, 2008). Il gene che codifica per CTGF è localizzato sul cromosoma 6 e contiene 5 esoni e 4 introni: l'esone 1 codifica per un peptide segnale, necessario per la secrezione della proteina, mentre gli esoni 2-5 codificano per i quattro domini funzionali che costituiscono la proteina. Attraverso questi quattro domini, le proteine CCN, ed in particolare CTGF, sono in grado di legare una serie di molecole, come integrine e proteoglicani, che fungono da veri e propri recettori capaci di mediare i segnali mitogeni e di adesione indotti dai fattori di crescita appartenenti a questa famiglia.

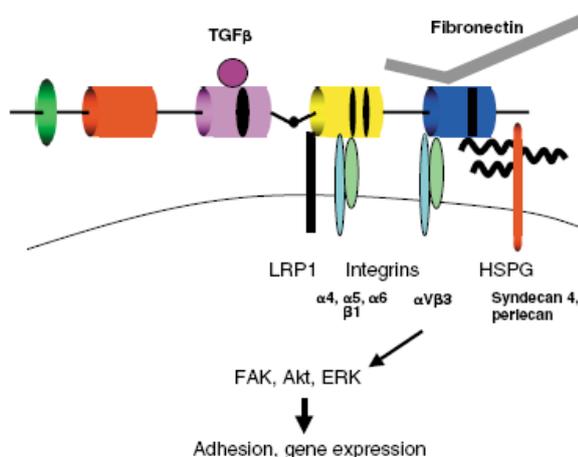


Figura 1.16 Meccanismi di trasduzione dei segnali mediati da CTGF all'interno della cellula

Essendo capace di legare integrine ed altre molecole che costituiscono la matrice extracellulare, uno dei ruoli principali che riveste CTGF è quello di mediare l'adesione delle cellule alla ECM e di rimodellare la stessa matrice (Leask A. *and* Abraham D.J., 2006). Le proteine CCN hanno anche un ruolo molto importante nel mediare la neoangiogenesi, processo di fondamentale importanza nello sviluppo dei tumori e nella guarigione delle ferite. In particolare CTGF è in grado di mediare i processi angiogenici, indotti da altri fattori di crescita attraverso il legame con le integrine $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{6}\beta\text{1}$, ma anche di sopprimere lo stimolo angiogenetico attraverso l'interazione con VEGF. Gli effetti pro o anti-angiogenici dipendono dal contesto cellulare (Lau L.F. *and* Lam S.C., 1999).

Anche la proliferazione cellulare è un processo controllato da CTGF e dalle altre proteine CCN. Infatti inizialmente CTGF fu descritta proprio come una proteina ricca in cisteina in grado di mediare segnali mitogeni. A livello molecolare questi vengono trasdotti attraverso l'attivazione del pathway MAPKs/ERK in seguito al legame del fattore di crescita con alcune integrine (Yosimichi *et al.*, 2001).

Vista la capacità di CTGF di indurre angiogenesi e proliferazione cellulare, di recente questo fattore di crescita è stato associato all'insorgenza di numerose neoplasie. È stata infatti evidenziata la presenza di elevati livelli di espressione di CTGF e di forme tronche della stessa proteina in forme avanzate di tumore mammario, pancreatico e cerebrale.

L'espressione di CTGF e di altre proteine della famiglia CCN è correlabile con l'aggressività e la malignità della forma tumorale. Questo fattore di crescita può quindi essere considerato un marker prognostico negativo della progressione della patologia neoplastica (Planque N. *and* Perbal B., 2003). In particolare CTGF è associato alla proliferazione di cellule tumorali mammarie ed uterine in risposta allo stimolo estrogenico. Infatti gli estrogeni sono in grado di up-regolare CTGF e questo tramite il legame con alcune integrine e l'attivazione delle MAP chinasi è in grado di far proliferare le cellule mammarie. Inoltre CTGF è stato anche associato con la formazione di metastasi ossee spesso correlate con il carcinoma mammario (Xie D. *et al.*, 2001b; Brigstock D.R., 2003). La sintesi dell'mRNA di CTGF è regolata da una serie di fattori di crescita come l'endotelina e il TGF- β oltre che da una serie di stimoli ambientali come l'ipossia e lo stress biomeccanico (Ott C. *et al.*, 2003; Leask A. *et al.*, 2003; Shi-wen *et al.*, 2004; Higgins D.F. *et al.*, 2004). In particolare è stato evidenziato in numerose linee cellulari il meccanismo attraverso cui TGF- β è in grado di indurre CTGF. Questo meccanismo coinvolge eventi rapidi di fosforilazione mediati da alcune proteine chinasi come la proteina chinasi C, le chinasi Ras/MEK/ERK e il fattore di trascrizione SMAD (Chen Y *et al.*, 2002; Stratton R. *et al.*, 2002; Leask A. *et al.*, 2003).

1.4.3 I ligandi di GPER

Una delle maggiori sfide nello studio dei segnali mediati dagli estrogeni è l'identificazione di nuovi composti in grado di differenziare in modo selettivo i pathway trasduzionali mediati da GPER da quelli attivati dai classici recettori estrogenici. Infatti, GPER come il classico ER, lega estrogeni, fitoestrogeni e xenostrogeni (Thomas P. *et al.*, 2005; Rosano C. *et al.*, 2012). In particolare, il 17 β -estradiolo (E2) è in grado di legare con elevata affinità e stereospecificità GPER (Thomas P. *et al.*, 2005). Di recente, in cellule tumorali mammarie ER-negative, è stata evidenziata la capacità dell'estriolo (E3) (Figura 1.17), principale estrogeno prodotto dalla placenta durante la gravidanza, di legare GPER,

sebbene con affinità inferiore rispetto ad E2 e al ligando selettivo G-1, e di agire da antagonista del recettore (Lappano R. *et al.*, 2010). Inoltre, anche ICI 182 780, antagonista puro di entrambe le isoforme di ER (Figura 1.17), e il 4-OHT sono in grado invece di legare e attivare GPER (Filardo E.J. *et al.*, 2000; Revankar C.M. *et al.*, 2005).

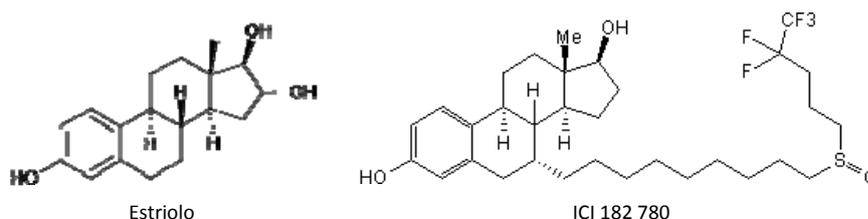
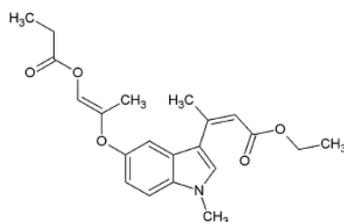


Figura 1.17 Struttura dell'estriolo (E3) e dell'antiestrogeno ICI 182 780

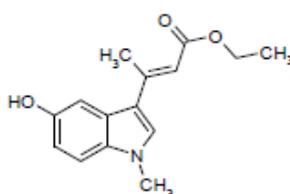
A tal proposito, il fallimento della terapia antiestrogenica basata sull'utilizzo del tamoxifene in tumori estrogeni responsivi potrebbe essere spiegata dalla capacità dell'antiestrogeno di legare e attivare GPER, stimolando in tal modo numerosi geni coinvolti nei fenomeni di proliferazione e migrazione cellulare. L'identificazione di ligandi selettivi di GPER alcuni con attività agonista [Bologna *et al.*, 2006; Lappano R., *et al.*, 2012] altri con attività antagonista (Dennis M.K., *et al.*, 2009; Dennis M.K., *et al.*, 2011) ha fornito l'opportunità di caratterizzare i segnali molecolari e le risposte biologiche mediate selettivamente da tale recettore.

1.6 Scopo della tesi

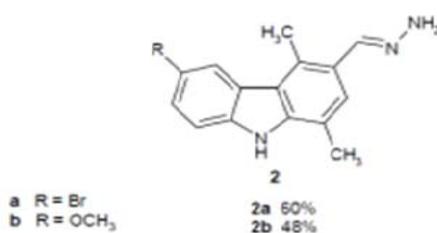
Scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare l'attività funzionale ed i pathway trasduzionali attivati o inibiti da nuovi ligandi del recettore estrogenico GPER in cellule tumorali mammarie ER-positive MCF7 ed ER-negative SkBr3. In particolare sono stati studiati i seguenti composti (Figura 1.18):



Etil 3-[5-(2-etossicarbonil-1-metilvinilossi)-1-metil-1*H*-indol-3-il]but-2-enoato (MIBE)



Etil 3-(5-idrossi-1-metil-1*H*-indol-3-il)but-2-enoato



2a: (6-Bromo-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il-metilen)-idrazino (Carbydraz)

2b: (6-Metossi-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il-metilen)-idrazino

Figura 1.18 Strutture dei composti studiati

Dai risultati preliminari, i composti denominati MIBE e Carbydraz hanno mostrato un'elevata affinità nei confronti del recettore estrogenico GPER e sono stati quindi sottoposti ad approfonditi saggi funzionali in cellule tumorali mammarie, come descritto di seguito in dettaglio.

Capitolo Secondo

Materiali e metodi

2.1 Reagenti

17 β -estradiolo (E2), 4-idrossitamossifene (OHT) e 5 α -dihydrotestosterone (DHT) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia); ICI 182,780 (ICI) (Tocris Chemicals, Bristol, United Kingdom); G-1 (1-[4-(-6-bromobenzol[1,3]diodo-5il)-3a,4,5,9b-tetraidro-3H-ciclopenta[c]quinolin-8il] (MERK KGaA Francoforte, Germania). Tutti i reagenti sono stati solubilizzati in etanolo, eccetto G1, MIBE e Carbydraz dissolti in dimetilsolfossido (DMSO).

2.2 Colture cellulari

- **SkBr3:** cellule tumorali mammarie mantenute in coltura in RPMI 1640, senza rosso fenolo, addizionato di FBS 10% e penicillina/streptomomicina 1%;
- **MCF7:** cellule tumorali mammarie mantenute in coltura in DMEM, addizionato di rosso fenolo, FBS 10% e penicillina/streptomomicina 1%;
- **Hek293:** cellule embrionali renali umane mantenute in coltura in DMEM, addizionato di rosso fenolo, FBS 10% e penicillina/streptomomicina 1%

Le cellule sono state cresciute alla temperatura di 37°C, in ambiente umidificato al 5% di anidride carbonica, in piastre per colture cellulari PETRI del diametro di 10 cm nei rispettivi mezzi di coltura. Prima di essere utilizzate per le diverse tecniche d'analisi, le cellule sono

state trasferite in mezzo senza siero per almeno 24h, allo scopo di evitare eventuali interferenze di fattori di crescita ed ormoni presenti nel siero.

2.3 Plasmidi

- XETL, Gene Reporter del recettore estrogenico (Bunone G., *et al.*, 1996), che contiene le sequenze di riconoscimento e legame per la lucciola (luciferasi), a monte della sequenza contenente l'Elemento di Risposta agli Estrogeni (ERE);
- ARE-luc, Gene Reporter del recettore androgenico (Maggiolini M., *et al.*, 2004), che contiene le sequenze di riconoscimento e legame per la lucciola (luciferasi), a monte della sequenza contenente l'Elemento di Risposta agli Androgeni (ARE);
- GK1, Gene Reporter della proteina di fusione Gal4 (Webb P., *et al.*, 1998);
- pRL-TK, vettore d'espressione per la Renilla reniformis luciferase è stato utilizzato per standardizzare le condizioni e l'efficienza della trasfezione (Promega, Milano, Italia);
- Gal4, proteine chimeriche GalER α e GalER β espresse utilizzando rispettivamente i plasmidi Gal93ER α e Gal93ER β , e costruite trasfettando le sequenze codificanti per il dominio di legame per l'ormone (HBD) di ER α (282-595 aminoacidi) dal plasmide HEG0 (Bunone G., *et al.*, 1996; Tora L., *et al.*, 1989), e per ER β HBD (C-terminale 287aa.) dal plasmide pCMV-hERbeta, nel vettore di espressione psCTEVGal93 (Maggiolini M., *et al.*, 2001);
- HEG0, vettore di overespressione di AR (Lanzino M., *et al.*, 2010);
- shGPR30, short hairpin per GPR30 (Albanito L., *et al.*, 2008).

2.4 Trasfezioni transienti e saggio della luciferasi

La tecnica della trasfezione consente di inserire nella cellula eucariotica materiale biologico esogeno, quali acidi nucleici. La trasfezione è definita transiente quando il materiale genetico inserito resta nella cellula come frammento extracromosomico, cioè non si integra nel genoma cellulare; in questo caso le proprietà indotte dalla trasfezione permangono per breve tempo, di

solito scompaiono prima delle 72 ore. Il problema principale nel trasferimento di acidi nucleici è dato dalla presenza di cariche negative, dovute ai gruppi fosfato nello scheletro delle molecole. A causa di queste cariche il materiale esogeno non riesce a superare la membrana cellulare in quanto intervengono forze elettrostatiche di repulsione. Uno dei metodi di trasfezione più frequentemente utilizzati per mascherare i gruppi anionici del DNA è rappresentato dall'utilizzo di lipidi cationici. La metodica della trasfezione mediata da lipidi cationici si inserisce nel campo delle tecniche chimiche di trasferimento genico ed utilizza delle molecole lipidiche a struttura anfipatica che si associano a formare dei liposomi. Questi, essendo costituiti da lipidi anfipatici a contatto con l'ambiente acquoso formano delle micelle, organizzandosi in un doppio strato fosfolipidico molto simile a quello delle membrane cellulari. I liposomi quindi possono contenere al loro interno molecole cariche, come quelle di DNA, in quanto le loro teste polari sono rivolte verso l'interno della vescicola. Si forma così un complesso lipide-DNA che può fondersi con la membrana plasmatica e portare il materiale esogeno all'interno della cellula. La maggior parte dei lipidi cationici comunemente utilizzati presenta caratteristiche quali alta efficienza, bassa citotossicità, protocolli di rapido e semplice utilizzo ed alcuni possono essere anche utilizzati in presenza di siero.

Nel presente lavoro la tecnica delle trasfezioni transienti è stata utilizzata per il silenziamento di specifici geni, attraverso l'impiego della tecnica di short hairpin RNA (shRNA, *short hairpin RNA*). Gli shRNA sono piccole molecole di RNA a doppio filamento a forma di forcina ("hairpin"). Queste molecole vengono processate da un enzima specifico chiamato DICER, che taglia il doppio filamento di RNA e forma frammenti di RNA a doppio filamento di circa 19-25 nucleotidi. Dopodiché il complesso enzimatico RISC separa i due filamenti e ne veicola uno in prossimità dell' mRNA contenente il gene da silenziare. Questo filamento si appaierà con la sequenza complementare presente sull'mRNA e determinerà il blocco della traduzione o la degradazione dell' mRNA stesso. Le cellule SkBr3 sono state seminate in piastre PETRI da 10 cm con opportuno mezzo di crescita. Il giorno prima della trasfezione sono state mantenute in mezzo privo di siero e poi, prima dei trattamenti, sono state trasfettate in mezzo privo di siero usando FUGENE6 (3µl/µg di DNA), come raccomandato dalla casa costruttrice (Roche Diagnostics, Milano, Italia), e 5µg per piastra di shRNA vector (Short Hairpin di controllo) o di shGPER (Short Hairpin specifico per il silenziamento di GPER).

La tecnica delle trasfezioni transienti è stata inoltre impiegata nel presente studio per la valutazione dell'attività di due plasmidi contenenti le sequenze di riconoscimento e legame per la lucciola (luciferasi) a monte della sequenze contenenti rispettivamente l'Elemento di Risposta agli Estrogeni (ERE) e l'Elemento di Risposta agli Androgeni (ARE) attraverso il saggio della luciferasi. Si tratta di un saggio in cui vengono contemporaneamente espresse e misurate le attività di due enzimi "reporter" e che permette di studiare l'espressione genica e la fisiologia cellulare. L'attività del reporter sperimentale è correlata alle specifiche condizioni di trattamento, mentre l'attività basale cellulare è paragonata a quella del reporter di controllo co-trasfettato (pRL-TK). Confrontando l'attività del reporter sperimentale con l'attività del controllo interno, si normalizza la variabilità sperimentale dovuta a differenze tra numero di cellule ed efficacia della trasfezione. In questo saggio vengono misurate sequenzialmente, da un solo campione, le attività di due luciferasi, quella della lucciola o *firefly* (*Photinus pyralis*) e quella della Renilla (*Renilla reniformis*). Tali luciferasi hanno strutture enzimatiche differenti fra loro e per questo motivo richiedono substrati diversi, in modo tale da consentire di discriminare selettivamente le rispettive reazioni bioluminescenti. L'attività della luciferasi della lucciola è misurata aggiungendo, inizialmente, al lisato cellulare il LAR II (Luciferase Assay Reagent II). Ciò genera un segnale luminoso che è opportunamente quantificato utilizzando il luminometro (modello LUMAT LB 9507, Berthold Technology). In seguito, l'aggiunta nello stesso tubo del reagente Stop & Glo blocca la precedente reazione e contemporaneamente avvia quella della Renilla, anch'essa generante un segnale luminoso. Infine, i valori dell'attività luciferasica sono riportati insieme ai corrispondenti valori della Renilla ed espressi come "unità relative di Luciferasi".

Le cellule sono state piastrate il giorno prima della trasfezione in multiwell da 24 pozzetti, con 500 µl di normale mezzo di crescita. La trasfezione è stata eseguita in mezzo senza siero utilizzando il reagente FUGENE 6, come raccomandato dalla casa costruttrice (Roche Diagnostics, Milano, Italia), con una miscela contenente 0.5µg di plasmide reporter, 0.1µg di plasmide effettore dove utilizzato e 2ng di renilla pRL-TK. Dopo circa 5 ore di trasfezione, le cellule sono state trattate e incubate per 18 ore. Dopo tale periodo, il mezzo è stato rimosso e, in seguito ad un lavaggio con PBS, le cellule sono state lisate con 500 µl di Passive Lysis Buffer 1X e successivamente è stata valutata l'attività luciferasica mediante luminescenza utilizzando il kit Dual Luciferase Reporter Assay (Promega, Milano, Italia). I valori della

Firefly luciferasi sono stati normalizzati con il controllo interno fornito dall'attività della Renilla luciferasi.

2.5 Estrazione dell'RNA e RT Real time PCR

Le cellule MCF7 ed SkBr3, cresciute in piastre PETRI da 10 cm in normale mezzo di coltura, sono state poste in mezzo senza siero 24h prima di essere trattate per i tempi indicati. Da queste è stato poi estratto l'mRNA totale utilizzando una soluzione monobasica difenolo guanidina isotiocianato che permette di isolare l'RNA totale da cellule e tessuti conservandone l'integrità (TRIzol, Life Technologies, Milano, Italia). L'mRNA ottenuto è stato poi convertito in cDNA, da utilizzare per la reazione di PCR, utilizzando l'enzima Reverse Trascrittasi (RT) M-MLV (200 U) (Life Technologies, Milano, Italia) secondo le istruzioni della casa produttrice. Per la valutazione dell'espressione genica è stata utilizzata la Real-Time PCR impiegando Step One (TM) sequence detection system (Applied Biosystems Inc, Milano, Italy). La tecnica da noi utilizzata prevede l'utilizzo di agenti intercalanti che si legano alla doppia elica del DNA ed, emettendo fluorescenza, permettono di seguire l'andamento della reazione e quindi l'incremento di molecole di acidi nucleici in tempo reale. Grazie ad opportuni raggi laser che eccitano il colorante intercalante Sybr Green, ad una specifica lunghezza d'onda e in determinate fasi del processo, è possibile misurare la fluorescenza emessa, la quale sarà direttamente proporzionale alla quantità di acido nucleico a cui è associato il Sybr Green. I saggi sono stati eseguiti in triplicato, secondo le istruzioni della ditta produttrice, ed i valori misurati sono stati usati per calcolare i livelli d'espressione, utilizzando il metodo comparativo $\Delta\Delta C_t$. I primers specifici per i geni d'interesse e per la proteina ribosomale 18S utilizzata come gene di controllo allo scopo di ottenere valori normalizzati, sono stati disegnati utilizzando il software Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems Inc, Milano, Italy): 5'-GTCTGTGCATTTCTGGTTGCA-3' (Cyclin D1 forward) and 5'-GCTGGAAACATGCCGGTTA-3' (Cyclin D1 reverse); 5'-GCCCGTGTACTGTTTCATTCAG-3' (IRS-1 forward) and 5'-AATAACGGACACTGCACAACAGTCT-3' (IRS-1 reverse); 5'-GAGTTGTGAGAGCACTGGATGCT-3' (PR forward) and

5'-CAACTGTATGTCTTGACCTGGTGAA-3' (PR reverse); 5'-GCCCCCGTGAAAGAC-3' (pS2 forward) and 5'-CGTCGAAACAGCAGCCCTTA-3' (pS2 reverse); 5'-CGAGCCCTTTGATGACTTCCT-3' (c-fos forward), 5'-GGAGCGGGCTGTCTCAGA-3' (c-fos reverse); 5'-ACCTGTGGGATGGGCATCT-3' (CTGF forward), 5'-CAGGCGGCTCTGCTTCTCTA-3' (CTGF reverse); 5'-GAGTGGGTCTGTGACGAGGAT-3' (Cyr61 forward) and 5'-GGTTGTATAGGATGCGAGGCT-3' (Cyr61 reverse); 5'-GCCTGCGACATCTGTGGAA-3' (EGR1 forward), 5'-CGCAAGTGGATCTTGGTATGC-3' (EGR1 reverse); and 5'-GGCGTCCCCCAACTTCTTA -3' (18S forward) and 5'-GGGCATCACAGACCTGTTATT-3' (18S reverse), rispettivamente.

2.6 Western blotting

Le cellule sono state incubate nel rispettivo mezzo di coltura, successivamente sostituito con mezzo privo di siero per 24h . Le cellule sono state sottoposte agli opportuni trattamenti e poi lisate aggiungendo per ogni piastra 500 µl di RIPA buffer (costituito da 20mM Tris-HCl, pH 7.5; 100mM NaCl; 0.5% Nonidet P-40; 0.5mM EDTA) con una miscela di inibitori di proteasi (1,7mg/ml aprotinin, 1mg/ml leupeptin, 200mmol/liter Phenylmethylsulfonylfluoride e Na-orto-vanadato, 100mmol/liter Na-fluoride). Il dosaggio delle proteine totali è stato eseguito mediante valutazione colorimetrica con il metodo Bradford, utilizzando come standard una curva ottenuta dall'assorbanza dell'albumina di siero bovino (BSA) a diverse concentrazioni a partire da una soluzione 1mg/ml. Il metodo di Bradford si basa sull'osservazione che il massimo di assorbanza di una soluzione di Comassie Brilliant Blue G250 si sposta da 465 a 595 nm in seguito al legame con le proteine. La quantità di colorante legato dipende dal contenuto di amminoacidi basici nelle proteine in soluzione. Aliquote di lisato cellulare aventi la stessa quantità di proteine totali sono state sottoposte a separazione elettroforetica mediante tecnica riducente SDS PAGE su gel di poliacrilammide al 10%. Dopo la corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa mediante elettrotrasferimento con camera *transblot* in buffer di trasferimento a basso contenuto salino (TRIS 25mM, Glicina 192 mM pH 8.3, SDS 0.1%, Metanolo 20%). Successivamente, la membrana è stata posta in una soluzione di milk no-fat al 5% in TBST

1X (Tris HCL 100 mM pH 7.5, NaCl 1M, Tween 20 all'1%) per un'ora a temperatura ambiente in modo da bloccare tutti i siti non specifici di interazione idrofobica. Il filtro di nitrocellulosa è stato incubato con l'anticorpo primario specifico per la proteina in esame. Gli anticorpi utilizzati sono: Cyclin D1 (M-20), IRS-1 (A-19), c-fos (H-125), CTGF (L-20), GPER (N-15), pEGFR Tyr 1173 (sc-12351), b-actin (C-2), phosphorylated ERK1/2 (E-4) and ERK2 (C-14) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., DBA). Successivamente la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario in TBST e milk al 5%, in grado di riconoscere la porzione costante della IgG utilizzata come anticorpo primario e coniugato con l'enzima perossidasi di rafano. Tra una soluzione e la successiva sono stati effettuati una serie di lavaggi con TBST 1X ed infine la membrana è stata sottoposta a tecnica di immunorivelazione mediante l'utilizzo del Kit ECL System (GE Healthcare, Milano, Italia) in chemiluminescenza. L'enzima perossidasi, coniugato all'anticorpo secondario, è in grado di catalizzare in condizioni basiche l'ossidazione di un substrato chemiluminescente, il luminolo. Questo emette una certa quantità di luce che può essere visualizzata esponendo il filtro trattato ad una lastra fotografica (Hyperfilm ECL).

2.7 Ligand Binding Assays

La capacità di MIBE di competere con [3H]E2 per il legame a ER α è stata valutata utilizzando la proteina ER α umana ricombinante (Pan Vera, Invitrogen S.r.l., Milano; Italia). Il radioreceptor binding assay è un saggio che fa parte delle tecniche di radioanalisi e sfrutta il principio del legame proteico competitivo. Per determinare se un composto funge da agonista di un recettore, si può valutare la capacità del composto in esame di spiazzare il ligando naturale dalla proteina recettoriale. Nel nostro caso, le componenti fondamentali del radioreceptor binding assay sono rappresentate da:

- molecola marcata, cioè E2 triziato (ormone "caldo");
- molecola non marcata, cioè E2 non radioattivo (ormone "freddo"), che funge da competitore per ER;
- MIBE, che funge da competitore per ER.

Abbiamo incubato 2 pM di proteina con 20mM di HEPES, 1.5mM EDTA, 0.5 mM ditiotreitolo e glicerolo al 10%, a pH 7.4, con 1 nM [3H]E2 in presenza di dosi crescenti di E2 o 25HC per 18h a 4°C. I radioligandi, legati e liberi, sono stati separati mediante eluizione in colonnine Sephadex G-25 PD-10. La quantità di [3H]E2 legata al recettore è stata calcolata sempre con un contatore in grado di convertire le emissioni radioattive dei campioni in fotoni di luce visibile. Ciascun campione è stato posto all'interno di una fiala con 4 ml di liquido di scintillazione. La competizione per il legame a ER è stata valutata grazie alla capacità del contatore di convertire le emissioni radioattive dei campioni in fotoni di luce visibile, facilmente rilevabili da un fotomoltiplicatore. Una riduzione della radioattività emessa dal campione (quindi una riduzione della luce emessa), è indice della capacità da parte della molecola in esame di spiazzamento del ligando marcato dai siti recettoriali.

Il ligand binding assay è inoltre stato impiegato per determinare la capacità di MIBE di legare GPER. In questo caso le cellule SkBr3, cresciute in piastre Petri dal diametro di 10 cm, sono state lavate due volte con PBS e trattate con E2 triziato 1nM in presenza e in assenza di concentrazioni crescenti di competitori non marcati (E2 e MIBE). Successivamente al trattamento, le cellule sono state incubate per 2h a 37°C. Le cellule sono state lavate tre volte con PBS a 4°C e lisate con una soluzione di Etanolo (100 %); il lisato è stato raccolto grazie all'azione meccanica esercitata da uno scraper. La radioattività del lisato è stata misurata con un contatore a scintillazione liquida¹.

Ciascun campione è stato miscelato con 4ml di liquido di scintillazione. La presenza di competizione per il legame a GPR30 è stata valutata grazie alla capacità del contatore di convertire le emissioni radioattive invisibile dei campioni in fotoni di luce visibile, facilmente rilevabili da un fotomoltiplicatore. Una riduzione della radioattività emessa dal campione in

¹ I contatori a scintillazione liquida sono usati soprattutto per il conteggio degli emettitori β deboli: 3H, 14C e 35S; il campione è miscelato con una soluzione che contiene uno o più scintillatori ed un solvente. Gli scintillatori sono composti con proprietà di luminescenza: sollecitato da un'azione esterna (luce, calore, radiazioni), questo liquido assorbe e riemette energia sottoforma di luce visibile. In particolare, il liquido di scintillazione contiene un fluoro residuo che emette fluorescenza quando è bombardato con radioattività, permettendo la conversione della radioattività invisibile in luce visibile. Lo strumento conta i bursts di luce registrandoli come conteggi al minuto (CPM).

esame rispetto al campione contenente il solo E2 marcato, e quindi una riduzione della luce emessa, è indice del fatto che la molecola competitorice, MIBE, ha proprietà di spiazzamento.

2.8 Molecular Modeling e Docking Simulations

Il docking molecolare è un metodo bioinformatico utilizzato per studiare interazioni macromolecolari, ed nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato per studiare l'affinità di composti quali E2, MIBE e Carbhydraz per ER α . In generale, le interazioni tra proteine e ligandi sono dettate principalmente dalle caratteristiche di complementarità dei due componenti: ligandi idrofobici legheranno regioni idrofobiche e ligandi carichi saranno attratti da regioni con cariche di segno opposto (complementarità fisico-chimica), e la forma del ligando somiglierà alla forma del sito di binding (complementarità sterica). Inoltre, è da tener presente che le interazioni proteina- ligandi sono di debole energia: legami a idrogeno, forze di Van der Waals, forze elettrostatiche etc. Il docking molecolare è una simulazione “*in silico*” dell'interazione tra due proteine o di una proteina con il suo ligando; quindi prerequisito fondamentale è la conoscenza della struttura tridimensionale della macromolecola bersaglio e del ligando. Esse possono derivare da dati sperimentali o da modeling molecolare. Tappe fondamentali di questo tipo di analisi sono: la definizione della struttura molecolare della molecola bersaglio; la localizzazione del sito di binding e la determinazione del modo di binding. Attraverso il docking si può descrivere l'interazione intermolecolare tra composti biologicamente attivi e minimizzando l'energia totale del complesso è possibile individuare le conformazioni molecolari più stabili che massimizzano l'interazione. Dai risultati ottenuti si può ottenere non solo l'identificazione di inibitori per specifiche proteine target e conseguentemente progettare nuovi farmaci; ma si possono avere indicazioni su opportune modificazioni strutturali di ligandi già noti, al fine di migliorarne le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche.

Quando due molecole interagiscono, le loro struttura possono alterarsi reciprocamente e di conseguenza il numero di gradi di libertà e il numero delle conformazioni possibili possono variare. In molti programmi impiegati per il docking molecolare, allo scopo di ridurre i gradi di libertà del sistema, l'esplorazione del binding mode viene realizzata trattando le due molecole come corpi rigidi, non tenendo conto però dei cambiamenti conformazionali

durante l'interazione. Ciò potrebbe indurre ad errori nell'identificazione del modo di legame. Ciò premesso, si può parlare di docking proteina-proteina se le due molecole vengono trattate come corpi rigidi; di docking proteina-ligando se si introduce la flessibilità del ligando. Quest'ultimo modello di docking consente di definire il binding di un ligando, in termini del suo orientamento nella tasca recettoriale e consente di individuare le interazioni specifiche che esso instaura all'interno del sito tra i suoi gruppi funzionali ed i residui amminoacidici che definiscono la tasca di binding. Per analizzare il complesso recettore-ligando è stato costruito un modello omologo di ER α , utilizzando le coordinate di ER α [PDB:1G50], corrispondente al complesso formato con l'ormone steroideo. La procedura di docking ha stabilito il minimo globale dell'energia di interazione tra il substrato e il recettore, esplorando tutti i possibili gradi di libertà del sistema. I programmi utilizzati per minimizzare l'energia sono stati Discover3 e la sua applicazione InsightII (Accelrys, Inc., San Diego, CA, USA). Le strutture del recettore e dei ligandi sono state disegnate grazie a ADT, Auto Dock tool graphical interface (Sanner et al., 1999).

Come già detto, la tecnica del docking molecolare è stata impiegata per il lavoro di tesi per valutare l'affinità di MIBE e dei derivati carbazolicici Carbydras 2a e 2b per il recettore GPER, utilizzando come riferimento il ligando G-1. Per analizzare l'interazione recettore-ligandi è stato costruito un modello omologo di GPR30, utilizzando come modello le coordinate atomiche della Rodopsina bovina (PDB code 1U19) (Okada et al., 2004), che rappresenta una proteina con il 40% di omologia della sequenza amminoacidica di GPR30. Il programma utilizzato è stato MODELLER (Sali and Blundell, 1993).

2.9 Proliferazione cellulare

Le cellule MC7 e SkBr3 sono state piastrate ad una confluenza di 1×10^4 in piastre da 24 pozzetti nel mezzo di crescita routinario. Il giorno successivo, il mezzo è stato sostituito con mezzo contenente 2,5% CS-FBS e le cellule sono state opportunamente trattate con le molecole in esame, rinnovando il mezzo (ed i trattamenti) ogni due giorni. La proliferazione cellulare è stata valutata mediante test MTT dopo sei giorni di trattamento.

2.10 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'ANOVA, seguita dal test di Newman-Keuls per valutare le differenze delle medie. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

Capitolo Terzo

Risultati

3.1 Caratterizzazione funzionale di un nuovo indol derivato (MIBE) in grado di legare ed inibire ER e GPER in cellule tumorali mammarie

Utilizzando programmi di “docking molecolare” insieme ad un approccio di screening biomolecolare, abbiamo individuato un derivato indolico, etil 3-[5-(2-etossicarbonil-1-metilvinilossi)-1-metil-1H-indol-3-il]but-2-enoato, denominato MIBE, potenzialmente affine sia per GPER che per ER α .

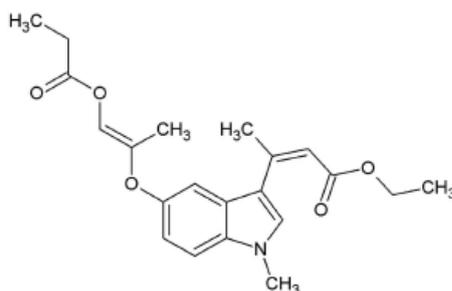


Figura 2.1 Etil 3-[5-(2-etossicarbonil-1-metilvinilossi)-1-metil-1H-indol-3-il]but-2-enoato (MIBE).

3.1.1 MIBE lega sia ER α che GPER

Inizialmente, allo scopo di valutare la potenziale capacità di MIBE di interagire con le tasche di legame sia di ER α che di GPER, abbiamo condotto degli studi di simulazione molecolare computazionale (docking molecolare), confrontando MIBE con i ligandi specifici di entrambi i recettori. Nella simulazione molecolare del ligando naturale di ER α , E2, nella tasca di legame di ER α (in una conformazione chiusa) per l'ormone (Figura 3.1.1.a), abbiamo osservato una “modalità di legame” simile a quella ottenuta nella struttura cristallografica (Eiler S., *et al.*, 2001).

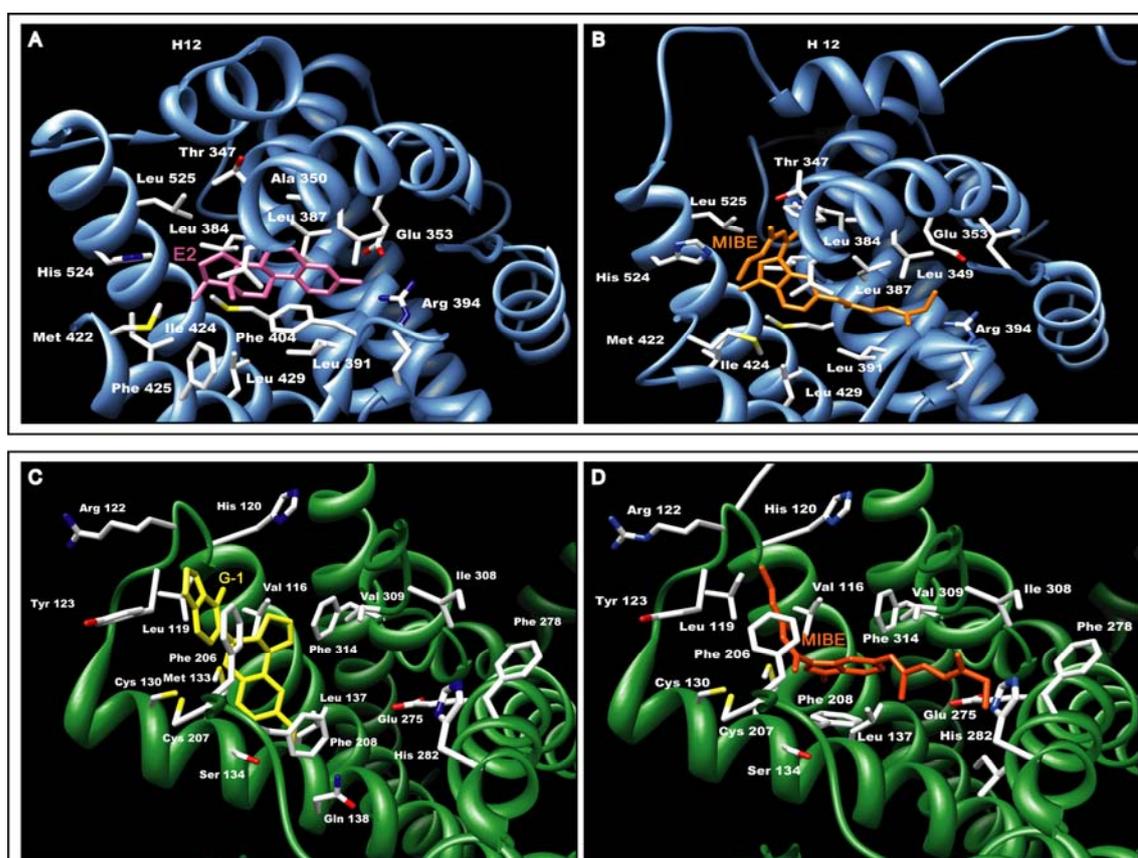


Figura 3.1.1.1 Simulazioni molecolari computazionali. (a-b) Il modello 3D di ER α è riportato schematicamente in azzurro. E2 è riportato schematicamente in porpora (a) e MIBE in arancio (b). (c-d) Il modello di GPER è riportato in verde. G-1 è riportato schematicamente in giallo (c) e MIBE in arancio (d).

Effettuando il docking di MIBE per la stessa tasca di legame di ER α , sia nella conformazione aperta che chiusa, abbiamo osservato una migliore affinità per la conformazione aperta (Figura 3.1.1.1b) e una “modalità di legame” simile a quella adottata dall’antagonista di ER α , OHT, nella struttura cristallografica (Shiau A.K., *et al.*, 1998).

Per quanto riguarda la tasca di legame di GPER, una prima analisi della struttura molecolare del recettore ha dimostrato che la proteina è costituita da due zone cariche diversamente: la parte superiore è principalmente carica negativamente, mentre la parte inferiore è elettrostaticamente positiva. La tasca di legame è una profonda fenditura dove dieci residui idrofobici (V116, Met133, Leu137, Phe206, Phe208, Phe278, Ile308, Val309 e Phe314) e quattro residui aminoacidici polari (Tyr123, Gln138, Asp210 e Glu275) contribuiscono a stabilizzare i ligandi, mediante interazioni di Van der Waals e legami idrogeno, rispettivamente. Usando come target il modello atomico di GPER, simulazioni di docking hanno confermato inoltre, una buona affinità della proteina per il ligando selettivo G-1, come già precedentemente dimostrato (Bologa C.G., *et al.*, 2006), ed hanno evidenziato un’elevata affinità per MIBE (Figura 3.1.1.1c-d).

Sulla base dei predetti dati preliminari, abbiamo condotto diversi saggi di legame allo scopo di valutare l’effettiva capacità di MIBE di legare ER α e/o GPER. Inizialmente, è stato eseguito un saggio di legame utilizzando la proteina purificata di ER α al fine di valutare l’affinità di MIBE per il suddetto recettore. MIBE è risultato in grado di spiazzare in modo dose-dipendente l’E2 marcato ([³H]E2), dimostrando la sua capacità di legare direttamente ER α , sebbene con un’affinità inferiore rispetto ad E2 ed OHT (Figura 3.1.1.2a). Allo scopo poi di valutare se MIBE fosse in grado di legare anche GPER, abbiamo effettuato un saggio di legame in cellule di carcinoma mammario ER-negative e GPER-positive (SkBr3), utilizzando come tracciante l’E2 marcato radioattivamente ([³H]E2), come già precedentemente riportato (Lappano R., *et al.*, 2010). MIBE ha dimostrato la capacità, al pari di due ligandi già noti del recettore G-1 e OHT, di competere con l’estradiolo marcato per il legame a GPER, in accordo con i risultati ottenuti dalle simulazioni molecolari (Figura 3.1.1.2b).

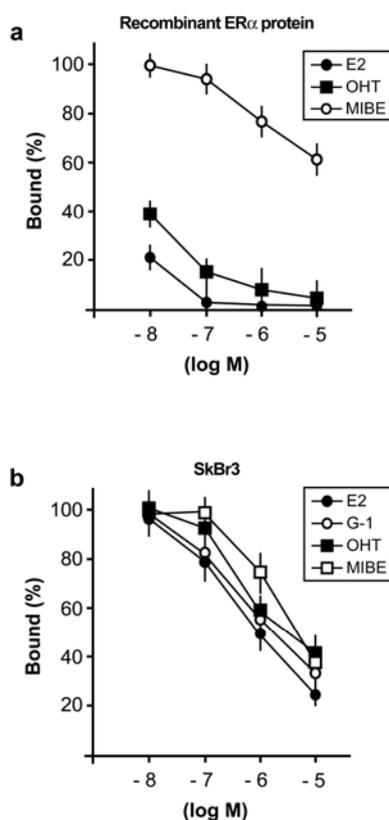


Figura 4.1.1.2 MIBE è un ligando sia di ER α che di GPER. MIBE compete con [3H]E2 per il legame a ER α (a) e a GPER (b). Saggi di competizione sulla proteina purificata di ER α (a) ed in cellule SkBr3 (b) sono stati effettuati utilizzando concentrazioni crescenti di E2, OHT e MIBE (a) o di E2, G-1, OHT e MIBE (b), rispettivamente. Ogni punto dei dati rappresenta la media \pm SD di tre esperimenti condotti in triplicato.

3.1.2 MIBE inibisce sia la transattivazione di ER che l'espressione genica indotta da E2 in cellule tumorali mammarie ER-positive

Sulla base dei risultati fin qui ottenuti, abbiamo eseguito saggi funzionali allo scopo di verificare se MIBE fosse in grado di attivare o inibire i classici recettori estrogenici ER α e ER β . Sono state effettuate delle trasfezioni transienti di un gene reporter di ER in cellule di

tumore mammario (MCF-7) che esprimono $ER\alpha$, ma non $ER\beta$. Il plasmide reporter usato contiene le sequenze firefly luciferasi sotto il controllo di un elemento di risposta agli estrogeni (ERE) a monte del promotore della timidina chianasi. MIBE non ha mostrato alcuna capacità di transattivare $ER\alpha$, mentre è stato in grado di inibire l'attività luciferasica indotta dall'E2, al pari dell'antiestrogeno OHT (Fig. 5.1.2.1a-b).

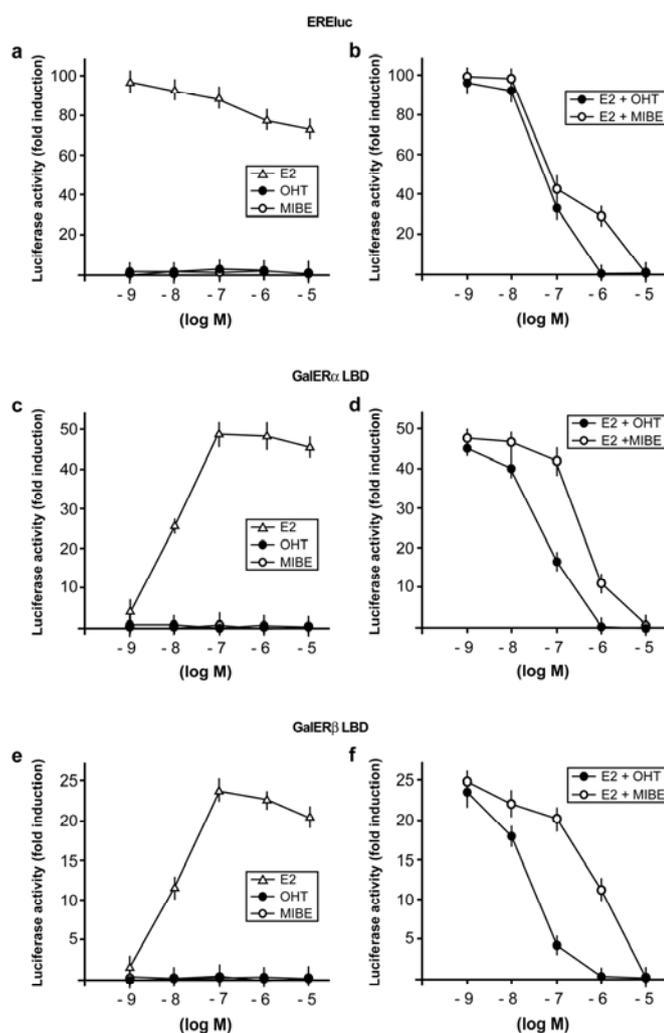


Figura 6.1.2.1 MIBE inibisce la transattivazione di ER indotta da E2. Le cellule MCF7 sono state trasfettate con il gene reporter di ER insieme ad un controllo interno (Renilla Luciferasi) e successivamente trattate con concentrazioni crescenti (scala logaritmica) di E2, OHT e MIBE (a) oppure con 10 nM di E2 in combinazione con concentrazioni crescenti di OHT o MIBE (b). (c, e) Le cellule Hek293 sono state trasfettate con il gene reporter GK1 e le proteine di fusione Gal4 codificanti per il Ligand Binding Domain (LBD) di $ER\alpha$ (GalER α LBD) o $ER\beta$ (GalER β LBD) e trattate con concentrazioni crescenti (scala logaritmica) di E2, OHT e MIBE. (d, f) Le cellule Hek293 sono state trasfettate con il gene reporter GK1 e le proteine di fusione GalER α LBD o GalER β LBD e trattate con 100 nM di E2 in combinazione con concentrazioni crescenti di OHT o MIBE. Ogni punto dei dati rappresenta la media \pm SD di tre esperimenti condotti in triplicato.

Allo scopo di confermare i risultati ottenuti e per esaminare se ER β potesse rispondere al trattamento con MIBE, abbiamo utilizzato un sistema eterologo. Le cellule Hek293 sono state trasfettate con una proteina chimerica composta dal dominio di legame al DNA (DBD) del fattore di trascrizione Gal4 di lievito e dal dominio di legame al ligando (LBD) di ER α o di ER β , insieme al gene reporter GK1. MIBE non ha mostrato alcuna capacità di transattivare le proteine chimeriche ER α e ER β (Fig. 7.1.2.1 c,e), mentre ha inibito la transattivazione delle suddette proteine indotta da E2, mimando l'attività inibitoria mediata dall'antiestrogeno OHT (Fig. 8.1.2.1 d,f).

All scopo inoltre di verificare se MIBE potesse agire attraverso il recettore androgenico (AR), altro membro della famiglia dei recettori steroidei, abbiamo trasfettato le cellule Hek293 con il gene reporter di AR (AREluc) insieme ad un vettore di espressione del recettore (AR). Il diidrotestosterone (DHT), ligando naturale di AR e metabolita biologicamente attivo dell'ormone testosterone, ha confermato la capacità di transattivare il gene reporter, mentre MIBE non è stato in grado né di attivare né di inibire la transattivazione di AR (Fig. 9.1.2.2).

I risultati ottenuti hanno dimostrato che MIBE non ha alcuna capacità di transattivare i classici ERs, mentre è in grado di inibire in maniera specifica l'attivazione di ER indotta da E2.

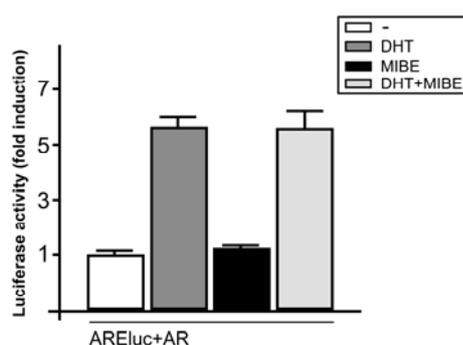


Figura 10.1.2.2 MIBE non attiva né inibisce la transattivazione di AR. Le cellule Hek293 sono state trasfettate con il gene reporter di AR (AREluc) insieme ad un vettore di espressione del recettore (AR) e trattate con DHT e MIBE da soli o in combinazione.

Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo valutato se MIBE fosse in grado di bloccare, nelle cellule ER-positive MCF7, l'espressione di alcuni geni target degli estrogeni, quali Cyclin D1, IRS-1, PR e pS2. Saggi di real-time PCR hanno mostrato che l'up-regolazione di tutti i geni esaminati indotta da E2 è stata inibita dal trattamento con MIBE, al pari del trattamento con OHT (Figura 11.1.2.3b). Allo stesso modo, MIBE è stato in grado di inibire anche l'espressione proteica di ciclina D1 e IRS-1 indotta da E2 (Figura 12.1.2.3b-c).

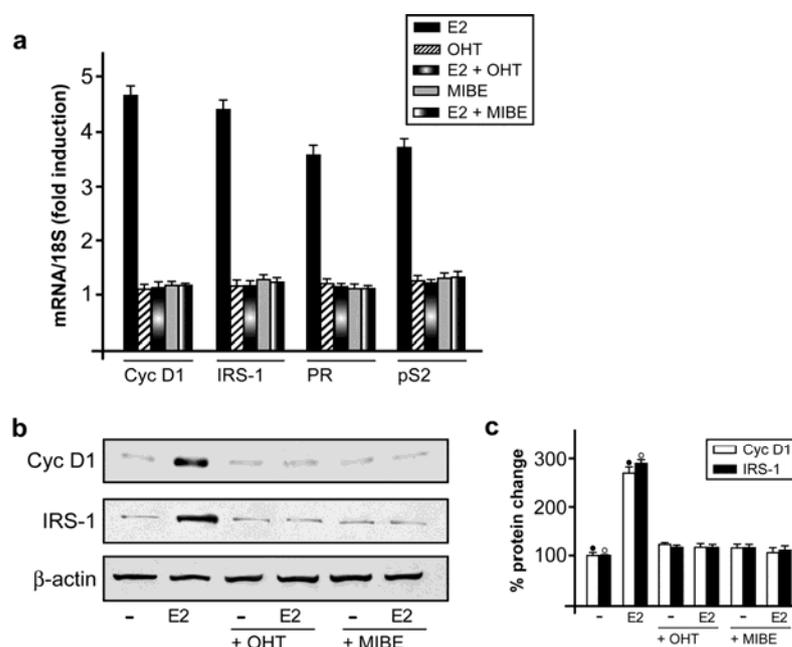


Figura 13.1.2.3 MIBE inibisce l'espressione genica e proteica di geni target degli estrogeni nelle cellule MCF7. (a) Valutazione dell'espressione dei geni Cyclin D1 (Cyc D1), IRS-1, Progesterone Receptor (PR) e pS2 tramite real-time PCR nelle cellule di tumore mammario ER-positive MCF7. Le cellule sono state trattate per 24 h con 10 nM E2, 1 microM di OHT e 10 microM di MIBE da soli o in combinazione. I risultati ottenuti, che derivano da esperimenti eseguiti in triplicato, sono stati normalizzati con l'espressione del gene 18S e mostrati come induzione di espressione dell'RNA se comparata alle cellule trattate con il veicolo. (b) Gli immunoblots rappresentano i livelli proteici di Cyclin D1 (Cyc D1) e IRS-1 in cellule di tumore mammario MCF7. Le cellule sono state trattate per 24 h con 10 nM E2, 1 microM di OHT e 10 microM di MIBE da soli o in combinazione. La β -actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. (c) Analisi densitometriche di tre esperimenti diversi. (●), (○) indicano $P < 0.05$.

3.1.3 MIBE previene gli effetti proliferativi indotti da E2 in cellule tumorali mammarie ER-positivo

Poiché la regolazione dei geni target degli estrogeni è coinvolta nella proliferazione di cellule tumorali mammarie (Altucci L., *et al.*, 1996; Morelli C., *et al.*, 2003), abbiamo valutato una risposta biologica complessa quale la proliferazione cellulare. A conferma dell'azione antagonista esercitata sul signaling di ER α finora evidenziata, MIBE al pari dell'antiestrogeno OHT, non ha stimolato la proliferazione delle cellule MCF7 (Fig. 14.1.3a), mentre ha inibito gli effetti proliferativi indotti da E2 (Fig. 15.1.3b). Sulla base della attività inibitoria esercitata sui segnali mediati da ER, MIBE può essere quindi considerato un antagonista del classico recettore estrogenico.

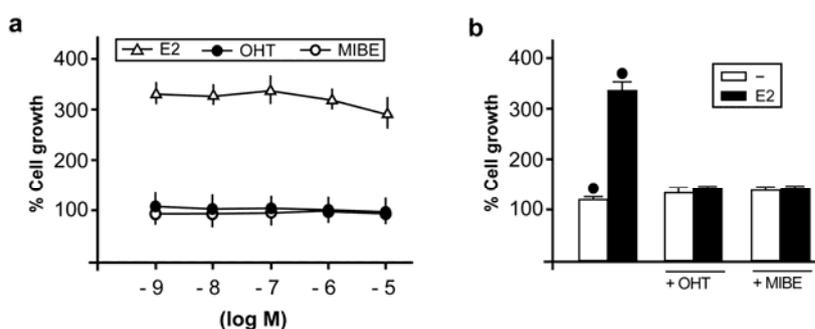


Figura 16.1.3 MIBE inibisce la proliferazione delle cellule MCF7 indotta da E2. (a) Le cellule sono state trattate per 5 giorni con concentrazioni crescenti di E2, OHT e MIBE e contate il sesto giorno. (b) Le cellule sono state trattate per cinque giorni con 10 nM di E2, 1 microM di OHT e 10 microM di MIBE da soli o in combinazione, e la crescita cellulare è stata contata il sesto giorno. La proliferazione delle cellule che ricevono il veicolo è stata fissata al 100% e su tale dato è stata calcolata la crescita cellulare indotta dai trattamenti. Ogni punto di dati è la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. (●), (○) indicano $P < 0.05$.

3.1.4 MIBE blocca l'attivazione di EGFR e delle ERK mediate da GPER in cellule tumorali mammarie ER-negative

Dai risultati ottenuti dai saggi di legame, dai quali è emersa la capacità di MIBE di legare anche GPER oltre che ER α , si è ritenuto necessario valutare la capacità di MIBE di attivare o inibire i segnali intracellulari mediati da GPER. Precedenti studi hanno dimostrato che in cellule tumorali l'attivazione di GPER determina l'attivazione di EGFR, coinvolgendo anche un cross-talk funzionale tra i due recettori (Filardo E.J., *et al.*, 2000; Maggiolini M., *et al.*, 2004; Albanito L., *et al.*, 2008; Vivacqua A., *et al.*, 2009). A tal proposito, abbiamo valutato il ruolo svolto da GPER nella fosforilazione di EGFR in seguito al trattamento con il suo ligando specifico EGF.

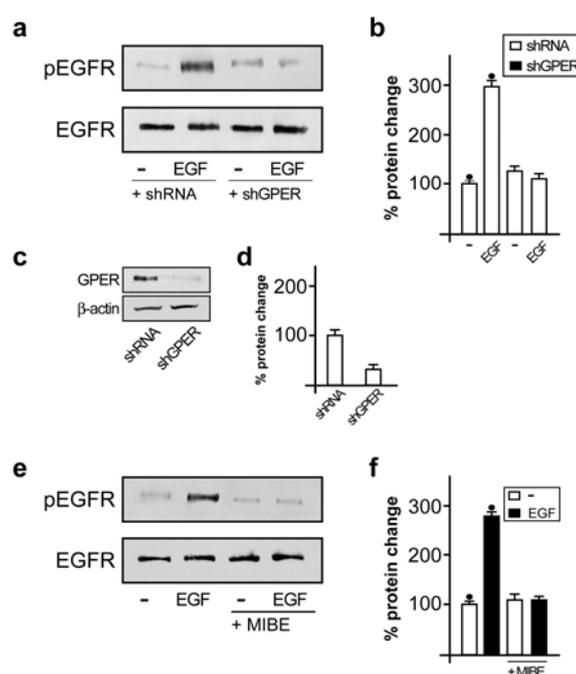


Figura 17.1.4.1 MIBE inibisce la fosforilazione di EGFR. (a) La fosforilazione di EGFR^{Tyr1173} in seguito al trattamento (5 minuti) con 100 ng/ml di EGF nelle cellule SkBr3 trasfettate con shRNA o shGPER. EGFR è stato utilizzato come controllo di caricamento. (b) Analisi densitometriche di tre esperimenti diversi. (c) L'efficacia del silenziamento di GPER è stata valutata tramite immunoblot. La β -actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. (d) Analisi densitometriche di tre esperimenti diversi. (e) La fosforilazione di EGFR^{Tyr1173} in seguito al trattamento con 100 ng/ml di EGF da solo o in combinazione con 10micromM di MIBE nelle cellule SkBr3. EGFR è stato utilizzato come controllo di caricamento. (f) Analisi densitometriche di tre esperimenti diversi. (●), (○) indicano $P < 0.05$.

E' stato interessante notare che nelle cellule SkBr3 l'attivazione di EGFR indotta da EGF è stata inibita in presenza del silenziamento dell'espressione di GPER (Fig. 18.1.4.1a-d) al pari del trattamento con MIBE (Fig. 19.1.4.1e-f), dimostrando la capacità di quest'ultimo di inibire le funzioni mediate da GPER.

A conferma dei suddetti risultati, l'attivazione di EGFR indotta dall'agonista selettivo di GPER, G-1, è stata inibita dal trattamento con MIBE (Fig. 20.1.4.2a-b). Allo stesso modo, MIBE ha mostrato la capacità di inibire l'attivazione delle ERK indotta sia da EGF (Fig. 21.1.4.3a-b) che dagli agonisti di GPER, E2, G-1 e OHT (Fig. 22.1.4.3c-d). I risultati ottenuti indicano che MIBE, agendo da inibitore di GPER, blocca l'attivazione di EGFR e la fosforilazione delle ERK indotta sia da EGF che dagli agonisti di GPER, determinando così un'inibizione del cross-talk funzionale tra GPER e EGFR.

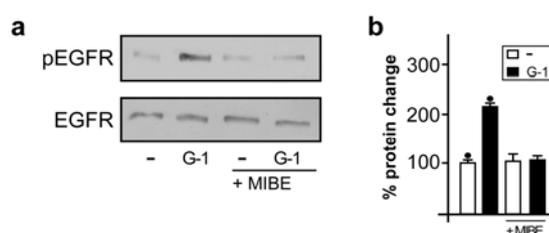


Figura 23.1.4.2 MIBE blocca la fosforilazione di EGFR indotta da G-1. (a) La fosforilazione di EGFR^{Tyr1173} in seguito al trattamento (5 minuti) con 1μM di G-1 da solo o in combinazione con 10μM di MIBE. EGFR è stato utilizzato come controllo di caricamento. (b) Analisi densitometriche di tre esperimenti diversi. (●), (○) indicano $P < 0.05$.

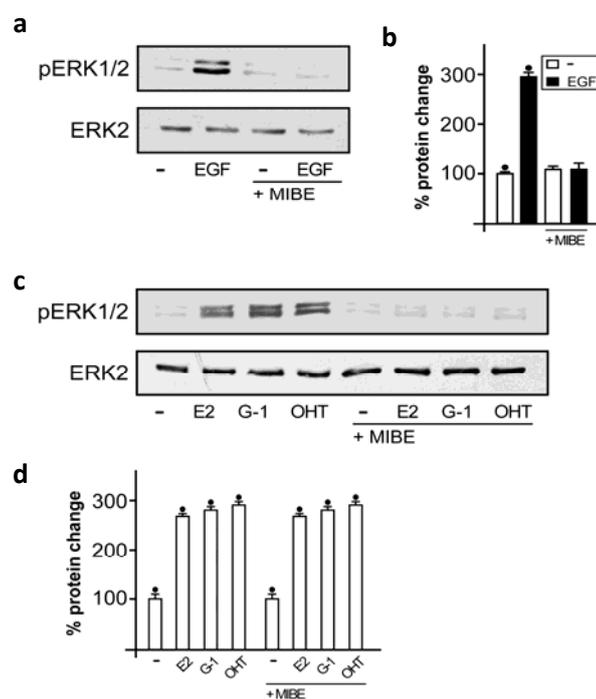


Figura 24.1.4.3 MIBE previene la fosforilazione delle ERK indotta dagli agonisti di GPER. (a) Attivazione delle ERK1/2 nelle cellule SkBr3 trattate per 5 minuti con 100 ng/ml EGF da solo e in combinazione con 10 microM di MIBE. ERK2 è stato utilizzato come controllo di caricamento. (b) Analisi densitometriche di tre esperimenti diversi. (c) Attivazione delle ERK1/2 nelle cellule SkBr3 trattate per 15 minuti con 100 nM di E2, 1 microM di G-1 e 5 microM di OHT da soli o in combinazione con 10 microM di MIBE. ERK2 è stato utilizzato come controllo di caricamento. (d) Analisi densitometriche di tre esperimenti diversi. (●), (○) indicano $P < 0.05$.

3.1.5 MIBE inibisce la trascrizione genica e gli effetti proliferativi mediati da GPER in cellule tumorali mammarie ER-negative

La recente caratterizzazione delle risposte trascrizionali indotte dall'attivazione di GPER ha permesso l'identificazione di una serie di geni target che mediano gli effetti stimolatori indotti

da GPER in cellule tumorali (Pandey D.P., *et al.*, 2009). Abbiamo quindi ritenuto necessario valutare la capacità di MIBE di regolare l'espressione di geni GPER-dipendenti. Saggi di real-time PCR hanno permesso di osservare che MIBE è in grado di inibire l'up-regolazione di c-fos, CTGF, Cyr61 ed EGR1 indotta dagli agonisti di GPER, E2, G-1 e OHT nelle cellule SKBr3 (Fig. 3.1.5a). In linea con questi risultati, MIBE è stato in grado di bloccare l'incremento dell'espressione di c-fos e CTGF anche a livello proteico (Fig. 3.1.5b-c).

Al fine di caratterizzare gli effetti biologici mediati da MIBE in cellule ER-negative, sono stati effettuati saggi di proliferazione cellulare che hanno evidenziato come gli effetti proliferativi indotti da E2, G-1 e OHT nelle cellule SkBr3 sono inibiti da MIBE (Fig. 3.1.5d). I risultati ottenuti mostrano quindi che MIBE è in grado di agire da antagonista sia di ER α che di GPER in cellule tumorali mammarie.

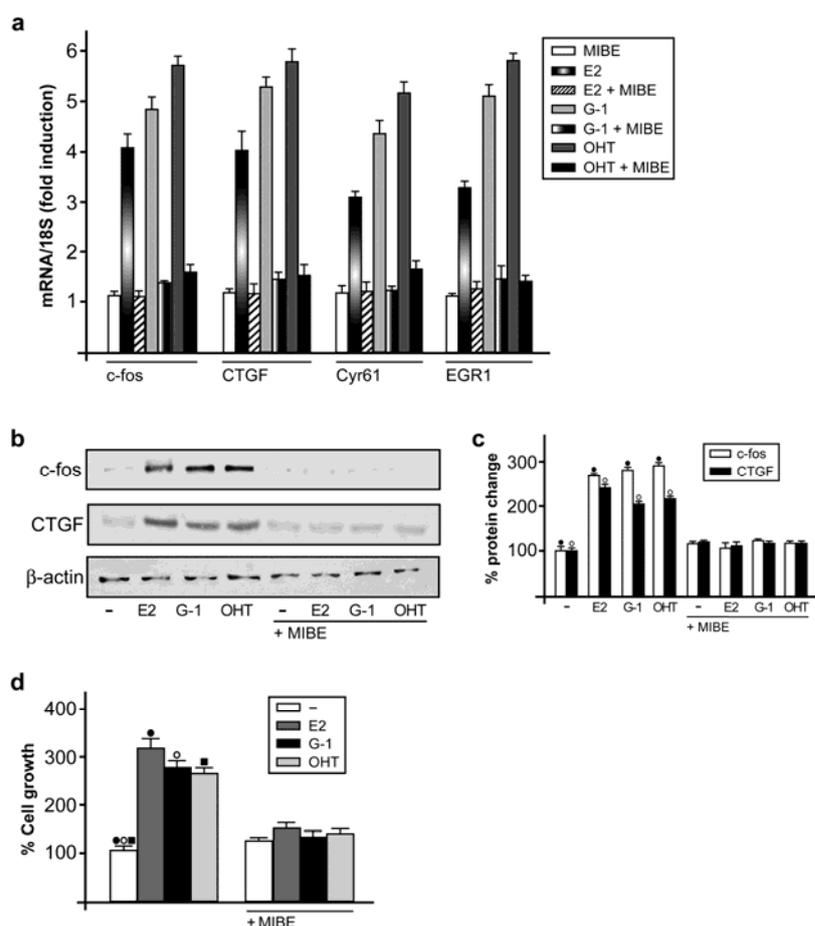


Figura 25.1.5 MIBE inibisce la trascrizione di geni target di GPER e la proliferazione indotta da E2, G-1 e OHT. (a) Valutazione dell'espressione dei geni c-fos, CTGF, Cyr61 and EGR1 tramite real-time PCR nelle cellule di tumore mammario ER-negativo SkBr3. Le cellule sono state trattate per 1 h con 100 nM E2, 1 microM di G-1 e 5 microM di OHT da soli o in combinazione con 10 microM di MIBE. I risultati ottenuti, che derivano da esperimenti eseguiti in triplicato, sono stati normalizzati con l'espressione del gene 18S e mostrati come induzione di espressione dell'RNA se comparata alle cellule trattate con il veicolo. (b) Gli immunoblots rappresentano i livelli proteici di c-fos e CTGF in cellule di tumore mammario SkBr3. Le cellule sono state trattate per 2 h con 100 nM di E2, 1 microM di G-1 e 5 microM di OHT da soli o in combinazione con 10 microM di MIBE. La β-actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. (c) Analisi densitometriche di tre esperimenti diversi. Le variazioni significative rispetto al controllo mediante one-way ANOVA. (d) Le cellule SkBr3 sono state trattate per 5 giorni con 100 nM di E2, 100 nM di G-1 e 100 nM di OHT da soli e in combinazione con 1 microM di MIBE e contate il sesto giorno. La proliferazione delle cellule che ricevono il veicolo è stata fissata al 100% e su tale dato è stata calcolata la crescita cellulare indotta dai trattamenti. Ogni punto di dati è la media ± SD di tre esperimenti indipendenti. (●), (○) indicano P < 0.05. (d)

3.2 Identificazione di un nuovo derivato idrazino-carbazolico (Carbhydraz) ad attività agonista per GPER

L'azione eterogenea ed opposta esercitata dai ligandi di ER α e GPER ha vaste implicazioni nella farmacologia dei segnali e della trascrizione genica mediati dai suddetti recettori. Infatti, una varietà di composti, quali estrogeni, fitoestrogeni, xenoestrogeni ed antiestrogeni, interagisce con entrambi i recettori (Maggiolini M. and Picard D., 2010). Di conseguenza, considerevoli sforzi sono stati compiuti al fine di sviluppare ligandi selettivi per GPER. In tale contesto, nel presente lavoro sono stati sintetizzati due nuovi derivati 3-idrazino-1,4-dimetil carbazolici, differentemente sostituiti in posizione 6 del nucleo carbazolico con un atomo di bromo e un metossile rispettivamente, al fine di valutarne la potenziale capacità di attivare o inibire selettivamente GPER. In particolare, essi sono stati preparati a partire dalle corrispondenti 3-aldeidi con idrazina idrata in etanolo a refluxo (come di seguito riportato).

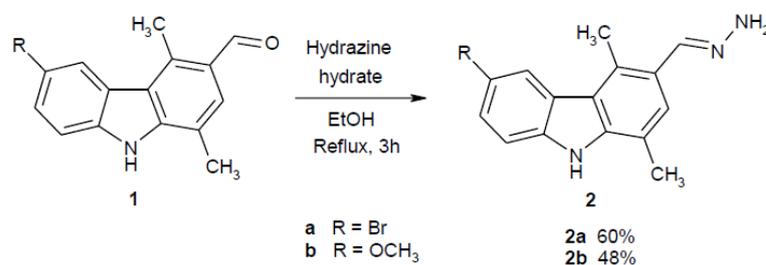


Figura 26.2 Schema di sintesi di Carbhydraz (2a) e 2b.

3.2.1 Carbhydraz mostra una buona affinità per GPER

Allo scopo di valutare la potenziale affinità dei due nuovi derivati idrazino-carbazolici nei confronti di GPER, abbiamo inizialmente condotto degli studi di simulazione molecolare

computazionale (docking molecolare), usando come target il modello molecolare di GPER. Le simulazioni di docking hanno evidenziato come uno dei due nuovi derivati idrazino-carbazolici (denominato “Carbhydraz”) abbia una buona affinità per la tasca di legame di GPER (Fig. 27.2.1.1a,c). In particolare, l’atomo di bromo del suddetto composto è risultato essere posizionato ad una distanza di circa 2.9Å dall’atomo di N del residuo H307 appartenente all’elica transmembrana VII del recettore, il residuo amminico primario interagisce attraverso un legame a idrogeno con il residuo N118 (elica transmembrana II), mentre il gruppo aromatico carbazolico dà luogo ad interazioni idrofobiche con i residui V116, L119, M133, F206 e F208, che contribuiscono a stabilizzare il complesso. Inoltre, il gruppo idrazinico di Carbhydraz è in una posizione favorevole per formare legami idrogeno con il gruppo carbossilico del residuo E115 e con il gruppo idrossilico del residuo C027.

Le simulazioni di docking hanno inoltre evidenziato che la presenza dell’atomo di bromo sul nucleo carbazolico (in posizione 6) di Carbhydraz potrebbe essere strategica per l’affinità nei confronti di GPER. Infatti, la sostituzione con un gruppo metossi (OCH₃) nel composto 2b, potrebbe determinare una rotazione di 180° dell’anello carbazolico e determinare di conseguenza una ridotta interazione con le eliche transmembrana I e VII di GPER (Fig. 28.2.1.1b,d).

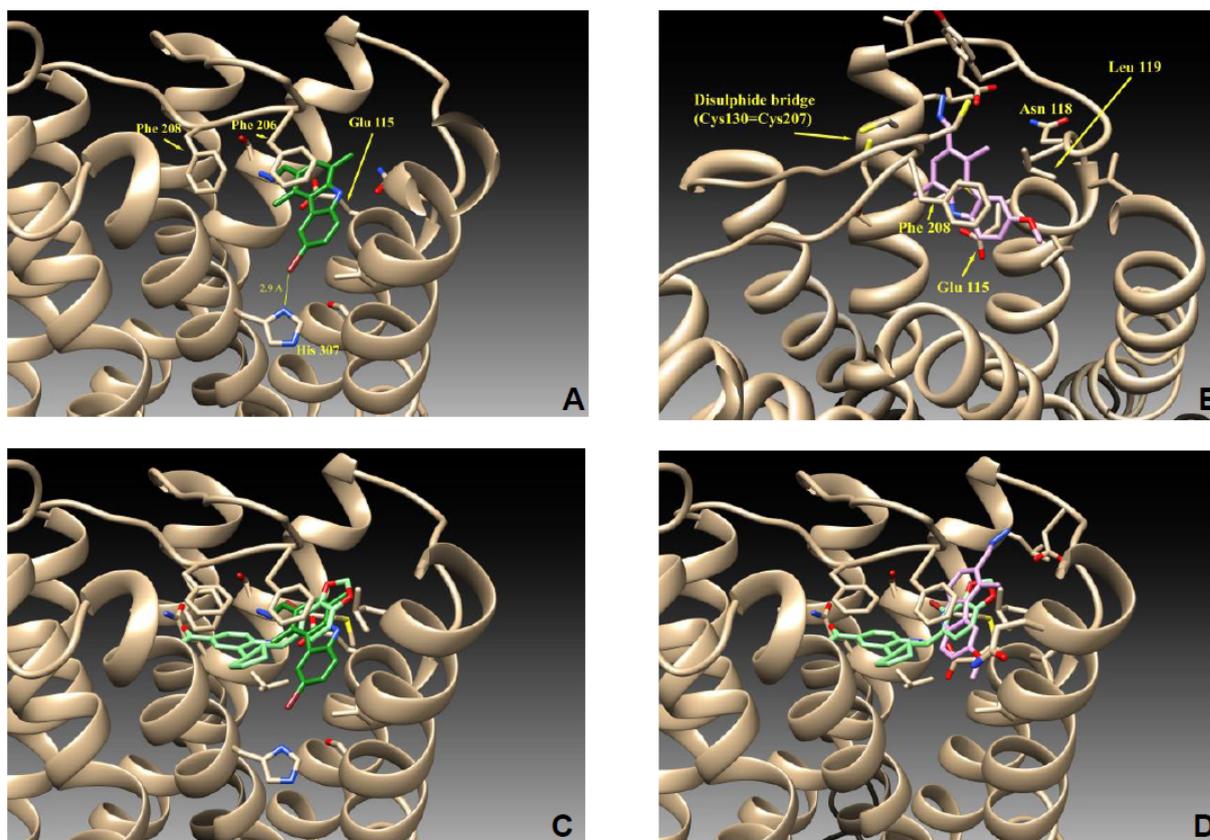


Figura 29.2.1.1 Simulazioni molecolari computazionali. Il modello di GPER è riportato schematicamente in marrone e vengono etichettati i residui coinvolti nel legame con i ligandi (A-B). Carbohydraz è riportato in verde ed il composto 2b in viola. (c-d) G-1 è riportato in verde chiaro e confrontato con Carbohydraz (panel C) e con il composto 2b (panel D).

3.2.2 Carbohydraz induce la fosforilazione delle ERK attraverso GPER in cellule tumorali mammarie ER-negative

Al fine di verificare i risultati ottenuti dalle simulazioni molecolari sulla potenziale capacità dei due nuovi derivati carbazolici di attivare o inibire GPER, abbiamo valutato in cellule di tumore mammario ER-negative SkBr3 la rapida fosforilazione delle ERK. Esperimenti di Western Blotting hanno mostrato che solo Carbohydraz è in grado di indurre l'attivazione delle ERK (Fig. 30.2.2a-b). Il silenziamento dell'espressione di GPER attraverso uno specifico

short hairpin (shGPER) ha abolito la capacità di Carbohydraz di fosforilare le ERK (Fig. 31.2.2c).

I risultati ottenuti dimostrano come Carbohydraz sia in grado attivare il signaling intracellulare mediato da GPER nelle cellule SkBr3.

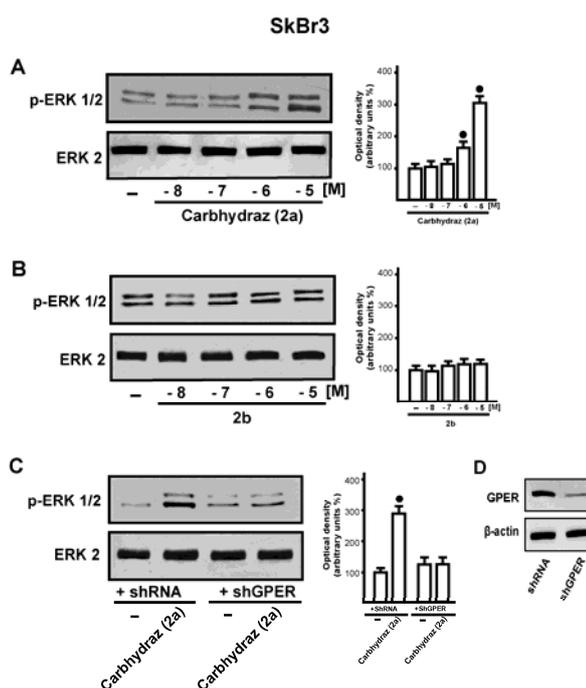


Figura 32.2.2 Carbohydraz attiva le ERK1/2 in modo GPER-dipendente. (A-B) Attivazione delle ERK1/2 nelle cellule SkBr3 trattate per 15 minuti con concentrazioni crescenti di Carbohydraz (2a) o 2b. (C) Attivazione delle ERK1/2 nelle cellule SkBr3 trasfettate con shRNA o shGPER e successivamente trattate per 15 minuti con 10 μ M di Carbohydraz (2a). ERK2 è stato utilizzato come controllo di caricamento. I pannelli laterali mostrano le analisi densitometriche di tre esperimenti diversi. (D) L'efficacia del silenziamento di GPER è stata valutata mediante immunoblotting e β -actin è stato utilizzato come controllo di caricamento (●) indicate $p < 0.05$ for cells receiving vehicle (-) versus treatment.

3.2.3 Carbhidraz non transattiva ER α in cellule tumorali mammarie ER-positive

Allo scopo infine di verificare se i nuovi derivati idrazino-carbazolici fossero in grado di attivare anche il classico ER, le cellule di tumore mammario ER-positive MCF-7 sono state

trasfettate transientemente con il gene reporter di ER. Solo E2 ha mostrato la capacità di transattivare ER α , confermando così la selettività di Carbhidraz per GPER.

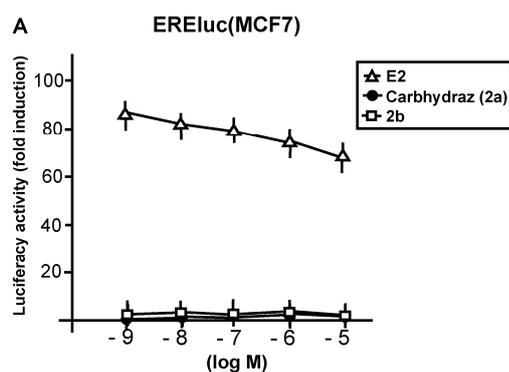


Figura 33.2.3 Carbhidraz (2a) e 2b non attivano ER. Le cellule MCF7 sono state trasfettate con il gene reporter di ER insieme ad un controllo interno (Renilla Luciferasi) e successivamente trattate con concentrazioni crescenti (scala logaritmica) di E2, Carbhidraz (2a) e 2b. Ogni punto dei dati rappresenta la media \pm SD di tre esperimenti condotti in triplicato.

Capitolo Quarto

Conclusioni e prospettive

Il presente lavoro di tesi ha permesso di identificare il primo composto a struttura indolica, denominato MIBE, in grado di legare ER α e GPER e di agire da antagonista di entrambi i recettori, in cellule tumorali mammarie. Attraverso simulazioni computazionali molecolari e saggi di legame, abbiamo dimostrato che MIBE lega ER α e GPER, mentre saggi funzionali hanno evidenziato la capacità del composto esaminato di inibire i pathways intracellulari mediati da entrambi i recettori. In particolar modo, utilizzando come modello sperimentale le cellule di carcinoma mammario ER-positive MCF7 e ER-negative SkBr3, abbiamo caratterizzato l'attività funzionale di MIBE. Il derivato indolico blocca nelle cellule MCF7 la transattivazione di ER indotta da E2, l'espressione di geni target di ER e la proliferazione cellulare estrogeno-mediata. Inoltre, nelle cellule SkBr3 MIBE inibisce le risposte biologiche mediate da GPER, quali la rapida fosforilazione delle ERK, la trascrizione genica e gli effetti proliferativi indotti dagli agonisti del recettore, E2, OHT e G-1. L'esclusiva attività antagonista esercitata da MIBE sia su ER α che su GPER potrebbe rappresentare un innovativo e promettente approccio farmacologico nel trattamento di tumori estrogeno-dipendenti, quali il carcinoma mammario, che esprimono uno solo o entrambi i recettori. I risultati ottenuti nella presente tesi hanno, inoltre, permesso l'identificazione e la caratterizzazione funzionale di un nuovo derivato idrazino-carbazolico, denominato

Carbhydraz, in grado di attivare in maniera selettiva GPER in cellule tumorali mammarie ER-negative. L'identificazione e l'utilizzo della suddetta molecola potrebbe consentire l'acquisizione di nuove conoscenze sui segnali molecolari e cellulari mediati selettivamente da GPER e potenzialmente coinvolti nella estrogeno-sensibilità di tumori ad elevata incidenza, come quello mammario.

Gli interessanti risultati ottenuti risultano di notevole importanza scientifica tenuto conto che il tumore al seno è la neoplasia invasiva più comunemente diagnosticata e la seconda causa di morte per tumore nelle donne (Coughlin S.S. and Ekwueme D.U., 2009). Sebbene la terapia endocrina insieme alla chirurgia, alla chemioterapia, alla radioterapia e alla terapia mirata rappresentino i trattamenti principali per la cura del cancro al seno, in molti casi di carcinoma mammario ER-positivo il trattamento con molecole ad attività antiestrogenica, come il tamoxifene, riduce notevolmente il rischio di recidive ed il numero di decessi (Early Breast Cancer Trialist' Collaborative Group, 2005). Tuttavia, una paziente su quattro affetta da tumore mammario ER-positivo non risponde a tale terapia fin dall'inizio e molte diventano resistenti durante il trattamento (Arpino G., *et al.*, 2004; Arpino G., *et al.*, 2005; Dowsett M., *et al.*, 2006; Linke S.P., *et al.*, 2006; Osborne C.K., *et al.*, 2005). A tal proposito, diversi studi clinici hanno dimostrato che l'utilizzo di inibitori dell'aromatasi, determinando un'inibizione della sintesi degli estrogeni, può dare maggiori benefici rispetto all'utilizzo di antagonisti di ER α (Rugo H.S. 2008). Sebbene i meccanismi coinvolti nel fallimento della terapia con antiestrogeni siano multifattoriali e rimangano ancora da chiarire (Giordano C., *et al.*, 2009), un ruolo fondamentale potrebbe essere svolto dall'attivazione di segnali intracellulari diversi da quelli mediati da ER α . Ad esempio, è stato ampiamente dimostrato che l'overespressione di EGFR o di HER2 contribuisca alla resistenza al trattamento con tamoxifene (Arpino G., *et al.*, 2004; Berry D.A., *et al.*, 2000; Shou J., *et al.*, 2004; Pe' rez-Tenorio G. and Stål O., 2002; Gee J.M., *et al.*, 2001; Nicholson S., *et al.*, 1988; Giltane J.M., *et al.*, 2007; Massarweh S., *et al.*, 2008). Infatti, elevati livelli di EGFR e/o di HER2 sono stati riscontrati in pazienti affette da tumore mammario che non rispondono alla terapia con tamoxifene (De Laurentiis M., *et al.*, 2005; Osborne C.K., *et al.*, 2003) ed in alcune linee cellulari tamoxifene-resistenti (Benz C.C., *et al.*, 1992; Hutcheson I.R., *et al.*, 2003). A conferma, l'utilizzo di inibitori tirosino-chinasici di EGFR/HER2 sono in grado di reversare in tali cellule la resistenza all'antiestrogeno (Giordano C., *et al.*, 2009; Kurokawa H., *et al.*, 2000).

Inoltre, l'esistenza di recettori diversi dai classici ERs in grado di mediare i segnali estrogenici, senza mostrare alcuna sensibilità all'azione inibitoria degli antiestrogeni, potrebbe essere coinvolta nella resistenza alla terapia endocrina. In tale contesto, GPER è stato identificato come mediatore dei segnali rapidi indotti dagli estrogeni in molteplici contesti cellulari tumorali (Maggiolini M. *and* Picard D., 2010). Diversi studi hanno dimostrato che E2 così come gli antiestrogeni tamoxifene e ICI legano e attivano GPER determinando la proliferazione e la migrazione di cellule tumorali (Maggiolini M. *and* Picard D., 2010). Come altri recettori accoppiati a proteine G (GPCRs), l'attivazione di GPER richiede la transattivazione di EGFR (Filardo E.J. *et al.*, 2000; Lappano R. *and* Maggiolini M., 2011), ed inoltre il cross-talk funzionale tra diversi GPCRs e recettori per fattori di crescita contribuisce alla progressione di diversi tumori (Filardo E.J. *et al.*, 2000; Lappano R. *and* Maggiolini M., 2011). A tal proposito, è stata dimostrata di recente una interazione fisica e funzionale tra GPER e EGFR in cellule tumorali ER-negative e positive (Albanito L., *et al.*, 2008; Vivacqua A., *et al.*, 2009).

In accordo a quanto riportato, i risultati ottenuti nel presente lavoro contribuiscono a fornire nuove conoscenze sul cross-talk funzionale esistente tra GPER e EGFR in cellule tumorali. Infatti, i nostri dati dimostrano per la prima volta che l'attivazione ligando-indotta di EGFR è inibita dal silenziamento dell'espressione di GPER e da MIBE, antagonista del recettore, identificato e caratterizzato nel presente studio.

Considerato che l'over-espressione di GPER è associata a minori tassi di sopravvivenza in pazienti affette da tumore endometriale ed ovarico (Smith H.O. *et al.*, 2007; Smith H.O. *et al.*, 2009) e ad un maggiore rischio di sviluppare metastasi in pazienti con tumore mammario (Filardo E.J. *et al.*, 2006), l'identificazione di nuovi composti in grado di bloccare l'azione estrogenica, senza esercitare alcun effetto stimolatorio attraverso nessuno dei recettori estrogenici, può essere considerata quindi un obiettivo di primaria importanza nel trattamento di forme tumorali estrogeno-sensibili.

Bibliografia

Acconcia F., Totta P., Ogawa S., Cardillo I., Inoue S., Leone S., Trentalance A., Muramatsu M., Marino M. *Survival versus apoptotic 17 β -estradiol effect: role of ER α and ER β activated nongenomic signalling.* J. Cell. Physiol. 203: 193–201, 2005.

Albanito L., Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Andò S, Maggiolini M. *G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells.* Cancer Res. 67: 1859–66, 2007.

Albanito L., Lappano R., Madeo A., Chimento A., Prossnitz E.R., Cappello A.R., Dolce V., Abonante S., Pezzi V., Maggiolini M. *G protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells.* Environ Health Perspect 116: 1648–1655, 2008a.

Albanito L., Sisci D., Aquila S., Brunelli E., Vivacqua A., Madeo A., Lappano R., Pandey D. P., Picard D., Mauro L., Ando` S., Maggiolini M. *EGF induces GPR30 expression in estrogen receptor negative breast cancer cells.* Endocrinology 149: 3799–3808, 2008b.

Altucci L., Addeo R., Cicatiello L., Dauvois S., Parker M.G., Truss M., Beato M., Sica V., Bresciani F., Weisz A. *17 β -Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-*

p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. Oncogene 12: 2315-2324, 1996.

Anagnostopoulos K., Tentes I. *Cell signaling in cancer.* J BUON. 13: 17-22, 2008.

Anderson W. F., Jatoi I., Devesa S. S. *Distinct breast cancer incidence and prognostic patterns in the NCI's SEER program: suggesting a possible link between etiology and outcome.* Breast Cancer Res Treat 90: 127–37, 2005.

Antoniou A., Pharoah P. D., Narod S., Risch H. A., Eyfjord J. E., Hopper J. L., Loman N., Olsson H., Johannsson O., Borg A., Pasini B., Radice P., Manoukian S., Eccles D. M., Tang N., Olah E., Anton-Culver H., Warner E., Lubinski J., Gronwald J., Gorski B., Tulinius H., Thorlacius S., Eerola H., Nevanlinna H., Syrjäkoski K., Kallioniemi O. P., Thompson D., Evans C., Peto J., Lalloo F., Evans D. G., Easton D. F. *Average risks Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies.* The American Journal of Human Genetics 72(5): 1117-1130, 2003.

Armstrong K., Eisen A., Weber B. *Assessing the risk of breast cancer.* New England Journal of Medicine 342: 564–571, 2000.

Arpino G., Green S.J., Allred D.C., Lew D., Martino S., Osborne C.K., Elledge R.M. *HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: A southwest oncology group study.* Clin Cancer Res 10: 5670–5676, 2004.

Arpino G., Weiss H., Lee A.V., Schiff R., De Placido S., Osborne C.K., Elledge R.M. *Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer. Association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance.* J Natl Cancer Inst 97: 1254–1261, 2005.

Ascenzi P., Bocedi A., Marino M. *Structure–function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health.* *Molecular Aspects of Medicine* 27: 299–402, 2006.

Baron J. A., Newcomb P. A., Longnecker M. P., Mittendorf R., Storer B. E., Clapp R. W., Bogdan G., Yuen J. *Cigarette smoking and breast cancer.* *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 5: 399–403, 1996.

Baselga J., Mendelsohn J., Kim Ym, Pandiella A. *Autocrine regulation of membrane transforming growth factor α cleavage.* *J Biol Chem.* 271: 3279–3284, 1996.

Benson J. R., Jatoi I., Keisch M., Esteva F. J., Makris A., Jordan V. C. *Early breast cancer.* *Lancet* 373: 1463–79, 2009.

Benz C.C., Scott G.K., Sarup J.C., Johnson R.M., Tripathy D., Coronado E., Shepard H.M., Osborne C.K. *Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu.* *Breast Cancer Res Treat* 24: 85–95, 1992.

Berno V., Amazit L., Hinojos C., Zhong J., Mancini M. G., Sharp Z. D., Mancini M. A. *Activation of estrogen receptor- α by E2 or EGF Induces Temporally Distinct Patterns of Large-Scale Chromatin Modification and mRNA Transcription.* *PLoS ONE* 3(5): e2286, 2008.

Bernstein L. *Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer.* *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 3–15, 2002.

Berry D. A., Cronin K. A., Plevritis S. K., Fryback D. G., Clarke L., Zelen M., Mandelblatt J. S., Yakovlev A. Y., Habbema D. F., Feuer E. J. *Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer.* *N Engl J Med* 353: 1784–92, 2005.

Berry D.A., Muss H.B., Thor A.D., Dressler L., Liu E.T., Broadwater G., Budman D.R., Henderson I.C., Barcos M., Hayes D., Norton L. *HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer.* J Clin Oncol 18: 3471–3479, 2000.

Biglia N., Defabiani E., Ponzone R., Mariani L., Marengo D., Sismondi P. *Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women.* Endocrine-Related Cancer 11: 69–83, 2004.

Björnström L., Sjöberg M. *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes.* Mol Endocrinol. 19(4): 833-42, 2005.

Bologa C. G., Revankar C. M., Young S. M., Edwards B. S., Arterburn J. B., Kiselyov A. S., Parker M. A., Tkachenko S. E., Savchuck N. P., Sklar L. A., Oprea T. I., Prossnitz, E. R. *Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30.* Nat. Chem. Biol. 2: 207–212, 2006.

Bork P. *The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor.* FEBS Lett 327: 125–130, 1993.

Bradham D. M., Igarashi A., Potter R. L., Grotendorst G. R. *Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10.* J Cell Biol 114: 1285–1294, 1991.

Brailoiu E., Dun S. L., Brailoiu G. C., Mizuo K., Sklar L. A., Oprea T. I., Prossnitz E.R., Dun N. J. *Distribution and characterization of estrogen receptor G protein coupled receptor 30 in the rat central nervous system.* J. Endocrinol. 193: 311–321, 2007.

Brigstock D. R., Steffen C. L., Kim G. Y., Vegunta R. K., Diehl J. R., Harding P. A. *Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine*

secretory fluids. Identification as heparin-regulated mr 10,000 forms of connective tissue growth factor The Journal of Biological Chemistry 272(32): 20275-20282, 1997.

Brigstock D. R. *The CCN family: a new stimulus package.* J Endocrinol 178: 169–175, 2003.

Brzozowski A. M., Pike A. C. W., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engstrom O., Ohman L., Greene G. L., Gustafsson J.-A°, Carlquist M. *Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor.* Nature 389: 753–758, 1997.

Byrne C., Rockett H., Holmes M. D. *Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer risk: lack of an association among postmenopausal women with no history of benign breast disease.* Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention 11: 261–265, 2002.

Carmeci C., Thompson D. A., Ring H. Z., Francke U., Weigel R. J. *Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer.* Genomics 45: 607–17, 1997.

Chang L., Karin M. *Mammalian MAP kinase signalling cascades.* Nature 410: 37-40, 2001.

Chao E. Y., Collins J. L., Gaillard S., Miller A. B., Wang L., Orband-Miller L. A., Nolte R. T., Donnell D. P., Willson T. M., Zuercher W. J. *Structure-guided synthesis of tamoxifen analogs with improved selectivity for the orphan ERRγ.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 16: 821–824, 2006.

Chen D., Reierstad S., Lu M., Lin Z., Ishikawa H., Bulun S. E., *Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters.* Cancer Lett. doi:10.1016, 2008.

Chen Y., Thompson W., Semenciw R., Mao Y. *Epidemiology of Contralateral Breast Cancer.* Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 8: 855–861, 1999.

Chen Y., Blom I. E., Sa S., Goldschmeding R., Abraham D. J. and Leask A. *CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC.* *Kidney Int.* 62: 1149-1159, 2002.

Chinenov Y., Kerppola T. K. *Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity.* *Oncogene* 20: 2438-2452, 2001.

Claessens F., Gewirth D. T. *DNA recognition by nuclear receptors.* In: McEwan, I.J. (Ed.), *Essay in Biochemistry: The Nuclear Receptor Superfamily.* Portland Press, London, pp. 59–72, 2004.

Cohen D. R., Curran T. *The structure and function of the fos proto-oncogene.* *Crit Rev Oncog* 1: 65-88, 1989.

Coleman K. M., Dutertre M., El-Gharbawy A., Rowan B. G., Weigel N. L., Smith C. L. *Mechanistic differences in activation of estrogen receptor- α (ER α) and ER β -dependent gene expression by AMP signaling pathway(s).* *J Biol Chem* 278 (15): 12834-45, 2003.

Couse J. F., Lindzey J., Grandien K., Gustafsson J. A., Korach K. S. *Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse.* *Endocrinology* 138 (11): 4613–21, 1997.

Coughlin S.S., Ekwueme D.U. *Breast cancer as a global health concern.* *Cancer Epidemiol.* 33: 315-318, 2009.

Curran T. *The fos oncogene.* In: Reddy EP, Skalka AM, Curran T (eds). *The Oncogene Handbook,* Elsevier, Amsterdam 307-325, 1988.

Curran T., Franza Jr B. R. *Fos and Jun: the AP-1 connection.* *Cell* 55: 395-397, 1988.

Cuzick J., Powles T., Veronesi U., Forbes J., Edwards R., Ashley S., Boyle P. *Overview of the main outcomes in breast cancer prevention trials.* Lancet 361: 296–300, 2003.

Dahlman-Wright K., Cavailles V., Fuqua S. A., Jordan V. C., Katzenellenbogen J. A., Korach K. S., Maggi A., Muramatsu M., Parker M. G., Gustafsson J. A. *Estrogen receptors.* International Union of Pharmacology. LXIV. Pharmacol Rev 58: 773–781, 2006.

Dennis M.K., Burai R., Ramesh C., Petrie W.K., Alcon S.N., Nayak T.K., Bologa C.G., Leitao A., Brailoiu E., Deliu E., Dun N.J., Sklar L.A., Hathaway H.J., Arterburn J.B., Oprea T.I., Prossnitz E.R. *In vivo effects of a GPR30 antagonist.* Nat. Chem. Biol. 5: 421–7, 2009.

Dennis M.K., Field A.S., Burai R., Ramesh C., Petrie W.K., Bologa C.G., Oprea T.I., Yamaguchi Y., Hayashi S., Sklar L.A., Hathaway H.J., Arterburn J.B., Prossnitz E.R. *Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 127: 358–66, 2011.

De Francesco E.M., Lappano R., Santolla M.F., Marsico S., Caruso A., Maggiolini M. *HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs).* Breast Cancer Res 15: R64, 2013.

De Laurentiis M., Arpino G., Massarelli E., Ruggiero A., Carlomagno C., Ciardiello F., Tortora G., D'Agostino D., Caputo F., Cancellò G., Montagna E., Malorni L., Zinno L., Lauria R., Bianco A.R., De Placido S. *A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer.* Clin Cancer Res 11: 4741–4748, 2005.

De Marco P., Bartella V., Vivacqua A., Lappano R., Santolla M.F., Morcavallo A., Pezzi V., Belfiore A., Maggiolini M. *Insulin-like growth factor-I regulates GPER expression and function in cancer cells.* Oncogene 32: 678-88, 2013.

Deroo B. J. Korach K. S. *Estrogen receptors and human disease.* J Clin Invest. 116: 561-570, 2006.

Dickson R and Lippman ME. *Disease of breast Cancer.* Cell 13: 272-273, 1996.

Dowsett M., Houghton J., Iden C., Salter J., Farndon J., A'Hern R., Sainsbury R. Baum M. *Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status.* Ann Oncol 17: 818–826, 2006.

Early Breast Cancer Trialist' Collaborative Group. *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-years survival: an overview of the randomized trials.* Lancet 365: 1687–1717, 2005.

Egan K. M., Stampfer M. J., Hunter D., Hankinson S., Rosner B. A., Holmes M., Willet W. C., Colditz G. A. *Active and passive smoking in breast cancer: prospective results from the Nurses' Health Study.* Epidemiology 13: 138–145, 2002.

Eiler S., Gangloff M., Duclaud S., Moras D., Ruff M. *Overexpression, purification, and crystal structure of native ER α LBD.* Protein Expr Purif 22: 165-173, 2001.

Eisen A., Weber B.L. *Recent advances in breast cancer biology.* Curr Opin Oncol. 10: 486–91, 1998.

Enmark E., Peltö-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjöld M., Gustafsson, J.-A°. *Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 4258–4265, 1997.

Filardo E. J., Graeber C. T., Quinn J. A., Resnick M. B., Giri D., DeLellis R. A., Steinhoff M. M., Sabo E. *Distribution of GPR30, a seven membrane spanning estrogen*

receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res*, 12(21): 6359-66, 2006.

Filardo E. J., Quinn J. A., Bland K. I., Frackelton Jr A. R. *Estrogen induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF.* *Mol Endocrinol* 14: 1649–1660, 2000.

Filardo E. J., Quinn J. A., Frackelton Jr A. R., Bland K. I. *Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor to MAPK signaling axis* *Mol. Endocrinol.* 16 (1): 70–84, 2002.

Filardo E. J., Quinn J., Pang Y., Graeber C., Shaw S., Dong J., Thomas P. *Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma Membrane.* *Endocrinology*, 148: 3236–3245, 2007.

Filardo E. J., Thomas P. *GPR30: a seven-transmembrane spanning estrogen receptor that triggers EGF release.* *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16(8): 362-367, 2005.

Fish T. M., Prywes R., Roeder R. G. *c-fos sequence necessary for basal expression and induction by epidermal growth factor, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate and the calcium ionophore.* *Mol Cell Biol.* 7: 3490-3502, 1987.

Fu X. D., Simoncini T. *Extra-nuclear Signaling of Estrogen Receptors.* *Life.* 60(8): 502–510, 2008.

Funakoshi T., Yanai A., Shinoda K., Kawano M. M., Mizukami Y. *G protein coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 (3): 904–910, 2006.

Galien R., Garcia, T. *Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF- κ B site.* Nucleic Acids Res. 25: 2424–2429, 1997.

Gearhart M. D., Holmbeck S. M. A., Evans R. M., Dyson H. J., Wright P.E. *Monomeric complex of human orphan estrogen related receptor-2 with DNA: a pseudo-dimer interface mediates extended half-site recognition.* J. Mol. Biol. 327: 819–832, 2003.

Gee J.M., Robertson J.F., Ellis I.O., Nicholson R.I. *Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer.* Int J Cancer 95:247–254, 2001.

Giltane J.M., Ryde'n L., Cregger M., Bendahl P.O., Jirstro'm K., Rimm D.L. *Quantitative measurement of epidermal growth factor receptor is a negative predictive factor for tamoxifen response in hormone receptor positive premenopausal breast cancer.* J Clin Oncol 25:3007–3014, 2007.

Giordano C., Cui Y., Barone I., Ando` S., Mancini M.A., Berno V., Fuqua S.A. *Growth factor-induced resistance to tamoxifen is associated with a mutation of estrogen receptor and its phosphorylation at serine 305.* Breast Cancer Res Treat 10.1007/s10549- 009-0334-0, 2009.

Goetz M. P., Loprinzi C. L. *A hot flash on Tamoxifen metabolism.* Journal of the National Cancer Institute 95: 1734-1735, 2003.

Hall J. M., Couse J. F., Korach K. S. *The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling.* J Biol Chem 276: 36869-36872, 2001.

Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Strom A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J. A. *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets.* Physiol Rev 87: 905–931, 2007.

Hess J., Angel P., Schorpp-Kistner M. *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings.* Journal of Cell Science 117: 5965-5973, 2004.

Higgins D. F., Biju M. P., Akai Y., Wutz A., Johnson R. S., Haase V. H. *Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1.* Am. J. Physiol. Renal Physiol. 287: F1223-F1232, 2004.

Holbourn K. P., Acharya K. R., Perbal B. *The CCN family of proteins: structure–function relationships.* Trends in Biochemical Sciences 33(10): 461-473, 2008.

Hortobagyi G. N., Salazar J. G., Pritchard K., Amadori D., Haidinger R., Hudis C. A., Khaled H., Liu M. C., Martin M., Namer M., O'Shaughnessy J. A., Shen Z. Z., Albain K. S. *The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival.* Clin Breast Cancer 6: 391–401, 2005.

Hsieh R. W., Rajan S. S., Sharma S., Guo Y., DeSombre E. R., Mrksich M., Greene G.L. *Identification of ligands with bicyclic scaffolds provides insights into mechanisms of estrogen receptor subtype selectivity.* J. Biol. Chem. 281: 17909–17919, 2006.

Hulka B. S., Moorman P. G. *Breast cancer: hormones and other risk factors.* Maturitas 38: 103–116, 2001.

Hutcheson I.R., Knowlden J.M., Madden T.A., Barrow D., Gee J.M., Wakeling A.E., Nicholson R.I. *Oestrogen receptor-mediated modulation of the EGFR/MAPK pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells.* Breast Cancer Res Treat 81: 81–93, 2003.

Jatoi I., Chen B. E., Anderson W. F., Rosenberg P. S. *Breast cancer mortality trends in the United States according to estrogen receptor status and age at diagnosis.* J Clin Oncol 25: 1683–90, 2007.

- Jatoi I., Miller A. B.** *Why is breast-cancer mortality declining?* *Lancet Oncol* 4: 251–54, 2003.
- Jordan V. C.** *Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer.* *Cancer Cell* 5: 207–213, 2004.
- Kelly M. J., Wagner E. J.** *Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors.* *Trends Endocrinol Metab.* 10: 369-74, 1999.
- Kim E.S., Khuri F.R., Herbst R.S.** *Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225).* *Current opinion in Oncology.* 13: 506-13, 2001.
- Koehler K. F., Helguero L. A., Haldosen L. A., Warner M., Gustafsson J. A.** *Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor β .* *Endocr Rev* 26: 465–478, 2005.
- Kong E., Heldring N., Gustafsson J.-A.^o, Treuter E., Hubbard R. E., Pike A. C. W.** *Delineation of a unique protein–protein interaction site on the surface of the estrogen receptor.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 3593–3598. 2005.
- Kraus R. J., Ariazi E. A., Farrell M. L., Mertz J. E.** *Estrogen-related receptor α -1 actively antagonizes estrogen receptor-regulated transcription in MCF-7 mammary cells.* *J. Biol. Chem* 277 (27): 24826-24834, 2002.
- Kumar R., Johnson B. H., Thompson E. B.** *In: McEwan, I.J. (Ed.), Essay in Biochemistry: The Nuclear Receptor Superfamily.* Portland Press, London, pp. 27–39, 2004.
- Kumar R., Thompson E. B.** *Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions.* *Mol. Endocrinol.* 17: 1–10, 2003.

Kurokawa H., Lenferink A.E., Simpson J.F., Pisacane P.I., Sliwkowski M.X., Forbes J.T., Arteaga C.L. *Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells.* Cancer Res 60: 5887–5894, 2000.

Lanzino M., Sisci D., Morelli C., Garofalo C., Catalano S., Casaburi I., Capparelli C., Giordano C., Giordano F., Maggiolini M., Andò S. *Inhibition of cyclin D1 expression by androgen receptor in breast cancer cells—identification of a novel androgen response element.* Nucleic Acids Res 38: 5351-5365, 2010.

Lappano R., Rosano C, De Marco P, De Francesco EM, Pezzi V, Maggiolini M. *Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells.* Mol Cell Endocrinol. 320: 162-70, 2010.

Lappano R., Maggiolini M. *G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in Cancer.* Nat. Rev. Drug Discov. 10: 47–60, 2011.

Lappano R., Maggiolini M. *GPCRs and cancer.* Acta Pharmacol. Sin. 33: 351–62, 2012.

Lappano R., Rosano C., Santolla M.F., Pupo M., De Francesco E.M., De Marco P., Ponassi M., Spallarossa A., Ranise A., Maggiolini M. *Two novel GPER agonists induce gene expression changes and growth effects in cancer cells.* Curr. Cancer Drug Targets 12: 531–42, 2012.

Lau L. F., Lam S. C. *The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection.* Exp. Cell Res. 248: 44–57, 1999.

Leask A., Abraham D. J. *All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker.* J Cell Sci 119: 4803–4810, 2006.

Levin E.R. *Genome and Hormones: Gender Differences in Physiology Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors.* J Appl Physiol 91: 1860-1867, 2001.

Lewis J. S., Jordan V. C. *Selective estrogen receptor modulators (SERMs): Mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance.* Mutation Research 591: 247–263, 2005.

Linke S.P., Bremer T.M., Herold C.D., Sauter G., Diamond C. *A multimarker model to predict outcome in tamoxifen-treated breast cancer patients.* Clin Cancer Res 12: 1175–1183, 2006.

Lo H. W., Hsu S. C., Hung M. C. *EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization.* Breast Cancer Res Treat. 95(3): 211-8, 2006.

Love R. R., Mazess R. B., Barden H. S., Epstein S., Newcomb P. A., Jordan V. C., Carbone P. P., Demets D. L. *Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer.* N. Engl. J. Med. 326: 852–856, 1992.

Luisi S., Galleri L., Marini F., Ambrosiani G., Brandi M. L., Petraglia F. *Estrogen receptor gene polymorphisms are associated with recurrence of endometriosis.* Fertil. Steril. 85: 764–766, 2006.

Madak-Erdogan Z., Kieser K. J., Kim S. H., Komm B., Katzenellenbogen B., Katzenellenbogen B. S. *Nuclear and Extranuclear Pathway Inputs in the Regulation of Global Gene Expression by Estrogen Receptors.* Molecular Endocrinology doi:10.1210/me.2008-0059, 2008.

Madeo A., Maggiolini M. *Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17beta-estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer-associated fibroblasts.* Cancer Res. 70: 6036-46, 2010.

Maggiolini M., Bonofiglio D., Marsico S., Panno M.L., Cenni B., Picard D., Andò S. *Estrogen receptors α mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells.* Mol Pharmacology 60: 595–602, 2001.

Maggiolini M., Picard D. *The unfolding stories of GPR30, a new membrane bound estrogen receptor.* J Endocrinol. 204: 105-114, 2010.

Maggiolini M., Vivacqua A., Fasanella G., Recchia A. G., Sisci D., Pezzi V., Montanaro D., Musti A. M., Picard D., Andò S. *The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17- β estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells.* J Biol Chem 279: 27008-27016, 2004.

Magnusson C., Baron J. A., Correia N., Bergstrom R., Adami H. O., Persson I. *Breast cancer risk following long-term oestrogen and oestrogen-progestin replacement therapy.* International Journal of Cancer 88: 339–344, 1999.

Marcus P. M., Newman B., Millikan R. C., Moorman P. G., Baird D. D., Qaqish B. *The associations of adolescent cigarette smoking, alcoholic beverage consumption, environmental tobacco smoke, and ionizing radiation with subsequent breast cancer risk (United States).* Cancer Causes and Control 11: 271–278, 2000.

Marino M., Acconcia F., Bresciani F., Weisz A., Trentalance A. *Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17 β -estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D1 gene transcription in HepG2 cells.* Mol. Biol. Cell 13: 3720–3729, 2002.

Marino M., Acconcia F., Trentalance A. *Biphasic estradiol induced AKT-phosphorylation is modulated by PTEN via MAP kinase in HepG2 cells.* Mol. Biol. Cell 14: 2583–2591, 2003.

Massarweh S., Osborne C.K., Creighton C.J., Qin L., Tsimelzon A., Huang S., Weiss H., Rimawi M., Schiff R. *Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function.* *Cancer Res* 68: 826–833, 2008.

McInerney E. M., Katzenellenbogen B. S. *Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation.* *J. Biol. Chem.* 271: 24172–24178, 1996.

McKenna N. J., O'Malley B. W. *Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators.* *Cell* 108: 465–474, 2002.

Milde-Langosch K. *The Fos Family of transcription factors and their role in tumorigenesis.* *Eur J Cancer* 41(16): 2449-61, 2005.

Morelli C., Garofalo C., Bartucci M., Surmacz E. *Estrogen receptor- α regulates the degradation of insulin receptor substrates 1 and 2 in breast cancer cells.* *Oncogene* 22: 4007-4016, 2003.

Mölders H., Jenuwein T., Adamkiewicz J., Müller R. *Isolation and structural analysis of a biologically active chicken c-fos cDNA: identification of evolutionarily conserved domains in fos protein.* *Oncogene* 1(4): 377-85, 1987.

Nicholson S., Halcrow P., Sainsbury J.R., Angus B., Chambers P., Farndon J.R., Harris A.L. *Epidermal growth factor receptor (EGFR) status associated with failure of primary endocrine therapy in elderly postmenopausal patients with breast cancer.* *Br J Cancer* 58: 810–814, 1988.

Nilsson S., Makela S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M., Gustafsson J.-A. *Mechanisms of estrogen action.* *Physiol. Rev.* 81: 1535–1565, 2001.

Norman A. W., Mizwicki M. T., Norman D. P. *Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model.* Nat Rev Drug Discov 3: 27-41, 2004.

O'Dowd B. F., Nguyen T., Marchese A., Cheng R., Lynch K. R., Heng H. H., Kolakowski L. F. Jr, George S. R. *Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes.* Genomics 47: 310–13, 1998.

O'Lone R., Frith M. C., Karlsson E. K., Hansen U. *Genomic targets of nuclear estrogen receptors.* Mol. Endocrinol. 18: 1859–1875, 2004

Osborne C.K., Bardou V., Hopp T.A., Chamness G.C., Hilsenbeck S.G., Fuqua S.A., Wong J., Allred D.C., Clark G.M., Schiff R. *Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer.* J Natl Cancer Inst 95: 353–361, 2003.

Osborne C.K., Shou J., Massarweh S., Schiff R. *Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer.* Clin Cancer Res 11: 865s–870s, 2005.

Ott C., Iwanciw D., Graness A., Giehl K., Goppelt-Struebe M. *Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton.* J. Biol. Chem. 278: 44305-44311, 2003.

Owman C., Blay P., Nilsson C., Lolait S. J. *Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 228: 285–92, 1996.

Pandey DP, Lappano R, Albanito L, Madeo A, Maggiolini M, Picard D. *Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF.* Embo J. 28: 523–32, 2009.

Pearce S. T., Jordan V. C., *The biological role of estrogen receptors α and β in cancer.* Crit. Rev. Oncol. Hematol. 50: 3–22, 2004.

Perbal B. *CCN proteins: multifunctional signaling regulators.* Lancet 363: 62–64, 2004.

Perez-soler R., Mendelsohn J. *Growth factor receptor as target for therapy.* In Roth JA, Cox JD, Hong WK, eds: Lung cancer. 2nd Edition. Malden, MA: Blackwell Science inc., 1998.

Pe´rez-Tenorio G., Stål O. *Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients.* Br J Cancer 86: 540–545, 2002.

Peto R., Boreham J., Clarke M., Davies C., Beral V. *UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20–69 years.* Lancet 355: 1822, 2000.

Planque N., Perbal, B. *A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumourigenesis.* Cancer Cell Int. 3: 15, 2003.

Porter P. *“Westernizing” women’s risks? Breast cancer in lower-income countries.* N Engl J Med 358: 213–16, 2008.

Porter W., Saville B., Hoivik D., Safe S. *Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor.* Mol. Endocrinol. 11: 1569–1580, 1997.

Prall O. W., Sarcevic B., Musgrove E. A., Watts C. K., Sutherland R. L. *Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2.* J. Biol. Chem. 272: 10882–10894, 1997.

Pratt W B. *Interaction of hsp 90 with steroid receptor mediates rapid cell signalling.* Science. 307: 1625-1630, 1990.

Prossnitz E. R., Maggiolini M. *Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30.* Mol Cell Endocrinol. 308: 32-8, 2009.

Prossnitz E. R., Oprea T. I., Sklarb L. A., Arterburnb J. B. *The ins and outs of GPR30: A transmembrane estrogen receptor.* Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 109: 350-353, 2008.

Pupo M., Vivacqua A., Perrotta I., Pisano A., Aquila S., Abonante S., Gasperi-Campani A., Pezzi V., Maggiolini M. *The nuclear localization signal is required for nuclear GPER translocation and function in breast Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs).* Mol Cell Endocrinol. 376: 23-32, 2013.

Ray A., Prefontaine K. E., Ray P., *Down-modulation of interleukin-6 gene expression by estradiol 17 β in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor.* J. Biol. Chem. 269: 12940-12946, 1994.

Recchia AG, De Francesco EM, Vivacqua A, Sisci D, Panno ML, Andò S, Maggiolini M. *The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes.* J Biol Chem. 286: 10773-82, 2011.

Renaud J., Bischoff S. F., Buhl T., Floersheim P., Fournier B., Geiser M., Halleux C., Kallen J., Keller H. J., Ramage P. *Selective estrogen receptor modulators with conformationally restricted side chains. Synthesis and structure–activity relationship of ER α -selective tetrahydroisoquinoline ligands.* J. Med. Chem. 48: 364–379, 2005.

Revankar C. M., Cimino D. F., Sklar L. A., Arterburn J. B., Prossnitz E. R. *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling.* Science 307: 1625–1630, 2005.

Rosano C., Lappano R., Santolla M.F., Ponassi M., Donadini A., Maggiolini M. *Recent advances in the rationale design of GPER ligands.* Curr Med Chem. 19: 6199-206, 2012.

Ross R. K., Paganini-Hill A., Wan P. C., Pike M. C. *Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogens versus estrogen plus progestin.* Journal of the National Cancer Institute 92: 328–332, 2000.

Ruff M., Gangloff M., Wurtz J. M., Moras D. *Estrogen receptor transcription and transactivation: structure–function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors.* Breast Cancer Res. 2: 353–359, 2000.

Rugo H.S. *The breast cancer continuum in hormone-receptor-positive breast cancer in postmenopausal women: evolving management options focusing on aromatase inhibitors.* Ann. Oncol. 19: 16-27, 2008.

Schairer C., Lubin J., Troisi R., Sturgeon S., Brinton L., Hoover R. *Menopausal estrogen and estrogen–progestin replacement therapy and breast cancer risk.* Journal of the American Medical Association 283: 485–491, 2000.

Shaw P. E., Schroter H. Nordheim A. *The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter.* Cell. 56: 563-572, 1989.

Shiau A.K., Barstad D., Loria P.M., Cheng L., Kushner P.J., Agard D.A., Greene G.L. *The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen.* Cell 95: 927-937, 1998.

Shi-Wen X., Leask A., Abraham D. *Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis.* Cytokine Growth Factor Rev 19: 133-144, 2008.

Shou J., Massarweh S., Osborne C.K., Wakeling A.E., Ali S., Weiss H., Schiff R. *Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer.* J Natl Cancer Inst 96: 926–935, 2004.

Simoncini T., Fornari L., Mannella P., Varone G., Caruso A., Liao J. K., Genazzani A. R. *Novel non-transcriptional mechanism for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor α with phosphatidylinositol 3-OH kinase.* Steroids 67: 935-939, 2002.

Singletary K. W., Gapstur S. M. *Alcohol and breast cancer. Review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanism.* Journal of the American Medical Association 286: 2143–2151, 2001.

Smith H.O., Leslie K.K., Singh M., Qualls C.R., Revankar C.M., Joste N.E., Prossnitz E.R. *GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma.* Am J Obstet Gynecol. 196: 386.e 1-9, 386.e 9-11, 2007.

Smith H.O., Arias-Pulido H., Kuo D.Y., Howard T., Qualls C.R., Lee S.J., Verschraegen C.F., Hathaway H.J., Joste N.E., Prossnitz E.R. *GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer.* Gynecol. Oncol. 114: 465–71, 2009.

Sng J. C. G., Taniura H., Yoneda Y. *A tale of early response genes.* Biol. Pharm. Bull. 27(5): 606-612, 2004.

Stratton R., Rajkumar V., Ponticos M., Nichols B., Shiwen X., Black C. M., Abraham D. J., Leask, A. *Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF- β by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway.* Faseb J. 16: 1949-1951, 2002.

Takada Y., Kato C., Kondo S., Korenaga R., Ando J. *Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 240: 737–41, 1997.

Thomas P., Pang Y., Filardo E. J., Dong J. *Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells.* Endocrinology 146: 624–632, 2005.

Thompson W. D. *Genetic epidemiology of breast cancer.* Cancer 74 (Suppl 1): 279–287, 1994.

Tora L., White J., Brou C., Tasset D., Webster N., Scheer E., Chambon P. *The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions.* Cell 59: 477–487, 1989.

Treisman R. *Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors.* Cell. 46: 567-574, 1986.

Tsai M. J., O'Malley B. W. *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members* Ann. Rev. Biochem. 63: 451–486, 1994.

Vivacqua A., Bonofiglio D., Recchia A. G., Musti A. M., Picard D., Andò S., Maggiolini M. *The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells.* Mol Endocrinol. 20: 631-646, 2006a.

Vivacqua A., Bonofiglio D., Albanito L., Madeo A., Rago V., Carpino A., Musti A. M., Picard D., Andò S., Maggiolini M. *17-beta-Estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein coupled-receptor GPR30.* Mol Pharmacol. 70: 1414-23, 2006b.

Vivacqua A., Lappano R., De Marco P., Sisci D., Aquila S., De Amicis F., Fuqua S.A., Andò S., Maggiolini M. *G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells.* Mol. Endocrinol. 23: 1815–26, 2009.

Wang C., Prossnitz E. R., Roy S.K. *Expression of GPR30 in the hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and steroid hormones.* Endocrinology 148: 4853–4864, 2007.

Webb P., Nguyen P., Shinsako J., Anderson C., Feng W., Nguyen M. P., Chen D., Huang S. M., Subramanian S., McKinerney E., Katzenellenbogen B. S., Stallcup M.R., Kushner, P. J. *Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins.* Mol. Endocrinol. 12: 1605–1618, 1998.

Wood J. R., Likhite V. S., Loven M. A. Nardulli A. M. *Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements.* Molecular Endocrinology. 15: 1114–1126, 2001.

Wu A. H., Pike M. C., Stram D. O. *Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and risk of breast cancer.* Journal of the National Cancer Institute 91: 529–534, 1999.

Xie D., Nakachi K., Wang H., Elashoff R. Koeffler H. P. *Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features.* Cancer Research 61: 8917–8923, 2001.

Yosimichi G., Nakanishi T., Nishida T., Hattori T., Takano-Yamamoto T., Takigawa M. *CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK).* European Journal of Biochemistry 268(23): 6058 – 6065, 2001.

Zhou W., Liu Z., Wu J., Liu J. H., Hyder S. M., Antoniou E., Lubahn, D. B. *Identification and characterization of two novel splicing isoforms of human estrogen-related receptor β .* J. Clin. Endocrinol. Metab. 91: 569–579, 2006.

Zografos G. C., Panou M., Panou N. *Common risk factors of breast and ovarian cancer: recent review* Int J Gynecol Cancer 14: 721-740, 2004.