

Università della Calabria

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE
(XXII CICLO)**

**Il Recettore Estrogenico α e IRS-1 (Insulin
Receptor Substate-1) come target dell'azione
del Recettore Estrogenico β**

Dott.ssa Maria Grazia Palma

Docente Tutor

Ch.ma Prof.ssa Maria Luisa Panno

Coordinatore del Dottorato

Ch.mo Prof. Marcello Canonaco

Codice materia MED/04

Anno Accademico 2008-2009

INDICE

Abstract	pag.1
Sommario	pag.3
Introduzione	pag.5
• Estrogeni e tumore mammario	pag.5
• Recettori degli estrogeni: struttura e domini funzionali	pag.7
• Il recettore estrogenico β	pag.13
• Estrogeni e fattori di crescita	pag.16
Metodi	pag.22
• Linee cellulari e condizioni di coltura	pag.22
• Plasmidi	pag.22
• Trasfezioni transienti	pag.23
• Conta cellulare	pag.23
• Citofluorimetria a flusso	pag.24
• Western blotting	pag.24
• Stripping	pag.25
• RT-PCR, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay	pag.25
• Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA)	pag.26
• Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)	pag.28

- Analisi statistica pag.29

Risultati pag.30

- Effetti dell'over-espressione di ER β sulla cinetica proliferativa di una linea cellulare di carcinoma mammario umano pag.30
- Effetti del Recettore Estrogenico β su IRS-1 pag. 33
- Effetti del Recettore Estrogenico β su ER α pag.39
- Interazione tra le proteine nucleari e le sequeze ERE presenti sul promotore di ER α pag.42
- "Recruitment" del corepressore NCoR a livello del complesso molecolare ER β /ERE sul promotore di ER α pag.47

Discussione pag.49

Bibliografia pag.53

Abstract

Estrogen signalling through ER α plays a central role in many diseases such as breast and endometrial cancer, osteoporosis and cardiovascular disease. In 1996 it has been discovered a second estrogen receptor in rat prostate which has been named ER β . Both receptors are co-expressed in many tissues and, surprisingly, ER β was shown to sometimes mediate opposite effects to ER α .

In the human, ER α is encoded at 6q25.1 and ER β at 14q23.2, they have a high degree of homology in the DNA-binding domain (96%), but differ in the ligand-binding domain (53%).

Estradiol is a natural ligand of ER α , while DPN (diarylpropionitrile) is a selective agonist of ER β .

The activation of ER α through estradiol increases cell proliferation and positively influences breast tumorigenesis and cell invasion, on the contrary, ER β , also in the absence of the ligand, appears to oppose the action of ER α , suggesting that the estrogen receptor β could play an important role in carcinogenesis. To better define the action of ER β , we used an estrogen receptor α positive MCF-7 breast cancer cell line overexpressing, through transient transfection, ER β . In these cells the ectopic expression of ER β induces a decrease of cell proliferation and a block of cell cycle in G2/M phase.

Taking into account these data, we focused the attention on two proteins involved in the transduction of mitotic signalings: IRS-1 and ER α . The first one, is the major substrate of the tyrosine kinase activity of IR (Insulin Receptor) and IGF-R (Insulin-Like Growth Factor Receptors). This protein exerts a key role in the functional synergism between the growth factor/insulin and estradiol in the mammary gland. In fact, ER α is important to sustain IRS-1 protein expression. and to transactivate IRS-1 gene.

On the basis of this finding, we wanted to study the possible influence of ER β on IRS-1 by monitoring mRNA and protein contents in MCF-7 breast cancer cells. In this context, our results show that the ectopic expression of ER β is able to negatively regulate the transactivation of IRS-1 promoter thus leading to a decrease of IRS-1 signalling. Further investigations indicate that ER β appears to act as a dominant-

negative regulator of ER α expression in these cells. Indeed, ER β represses the transcriptional activity of ER α gene promoter .

To better investigate the molecular mechanism underlying the negative regulation of ER β on ER α gene, we performed EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) experiments, by using ERE labelled probes present in ER α promoter.

Our results show a decreased binding of the nuclear extracts, obtained from MCF-7 cells overexpressing ER β , to the ERE labelled nucleotide.

In addition, chromatin immunoprecipitation analysis reveals in MCF-7 cells overexpressing ER β , the specific recruitment of the nuclear corepressor NCoR to these ERE sequences of ER α promoter.

The recruitment of this corepressor weakens the binding between ER β and ERE sequence, thus producing a repression of ER α transcriptional activity.

This study is the first evidence to demonstrate that ER β acts as a dominant negative regulator of ER α gene in breast cancer cells. Our data, in agreement with other findings, tend to better justify how Estrogen Receptor β overexpression in many tissues reduces ER α -regulated gene transcription and, in this way, inhibits the proliferative responses in breast cancer cells.

Sommario

Gli Estrogeni attraverso l'interazione con il ER α svolgono molteplici azioni non solo a livello del tratto genitale femminile, ma anche su altri distretti tissutali mostrano effetti benefici come sul sistema cardiovascolare, sul tessuto osseo e sul metabolismo dei lipidi. Tuttavia, sono implicati nella patogenesi del tumore al seno e dell'endometrio. Nel 1996 è stato scoperto un secondo recettore degli estrogeni nella prostata di ratto, che è stato chiamato ER β . Entrambi i recettori sono co-espresi in molti tessuti e, sorprendentemente, è stato dimostrato come il ER β , a volte possa mediare effetti opposti a quelli indotti dal ER α .

Nell'uomo, ER α e ER β sono codificati rispettivamente da due geni posti sul cromosoma 6q25.1 e 14q23.2; i due recettori hanno un elevato grado di omologia nel dominio che lega il DNA (96%), ma si differenziano per il dominio di legame al ligando (53%).

L'estradiolo è il ligando naturale del ER α , mentre il DPN (diarilpropionitrile) è un agonista selettivo del ER β . L'attivazione del ER α attraverso l'estradiolo stimola la proliferazione cellulare e influenza positivamente la tumorigenesi e l'invasività delle cellule nel tumore mammario; al contrario, ER β , anche in assenza del ligando, sembra opporsi all'azione di ER α , suggerendo che il recettore β per gli estrogeni potrebbe svolgere un importante ruolo nella carcinogenesi.

Per meglio definire l'azione di ER β , nel nostro studio abbiamo utilizzato le cellule MCF-7, una linea di tumore mammario umano ER α +, overesprimente, attraverso trasfezione transiente, il ER β . In queste cellule l'espressione ectopica di ER β induce una diminuzione della proliferazione cellulare e un blocco del ciclo mitotico nella fase G2/M.

Tenendo conto di questi primi risultati, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su due proteine coinvolte nella trasduzione del segnale mitotico: IRS-1 e ER α . La prima, è il substrato principale dell'attività tirosino-chinasica di IR (Insulin Receptor) e IGF-R (Insulin-like receptors Growth Factor). Questa proteina esercita un ruolo chiave nel sinergismo funzionale tra fattori di crescita/insulina ed estradiolo nella ghiandola mammaria. La sua espressione è regolata positivamente dagli estrogeni attraverso l'attivazione del Recettore Estrogenico α .

Sulla base di queste evidenze, siamo andati a valutare la possibile influenza di ER β su IRS-1 attraverso il monitoraggio dell'mRNA e del contenuto proteico nelle cellule di tumore mammario MCF-7.

In questo contesto, abbiamo dimostrato che l'espressione ectopica di ER β è in grado di regolare negativamente la transattivazione del promotore di IRS-1 e di indurre, conseguentemente, una diminuzione del contenuto proteico.

Ulteriori indagini hanno indicato che ER β sembrerebbe agire in queste cellule come regolatore negativo dell'espressione di ER α inibendo l'attività trascrizionale del promotore genico.

Per meglio indagare il meccanismo molecolare alla base di questi effetti, abbiamo eseguito esperimenti di EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), utilizzando come sonde "probes" marcati corrispondenti agli ERE presenti sul promotore di ER α .

I nostri risultati mostrano un ridotto legame tra gli estratti nucleari ottenuti da cellule MCF-7 overesprimenti ER β , e gli ERE utilizzati come probes.

Inoltre, esperimenti di ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) rivelano nelle cellule MCF-7 over-esprimenti ER β , uno specifico reclutamento del corepressore nucleare NCoR a livello delle sequenze ERE presenti sul promotore di ER α .

Il "recruitment" di questo corepressore indebolisce il legame di ER β sui siti ERE, inducendo così una repressione dell'attività trascrizionale di ER α .

Questo è il primo studio atto a dimostrare che ER β è in grado di agire come regolatore negativo del gene ER α in cellule di carcinoma mammario.

I nostri risultati, in accordo con altri dati della letteratura, tendono a spiegare il meccanismo attraverso cui l'overespressione del recettore estrogenico β in molti tessuti riduca la trascrizione di alcuni geni ER α -indotta e inibisca la risposta proliferativa in cellule di tumore mammario.

Introduzione

Estrogeni e tumore mammario

Il carcinoma mammario (CM) costituisce ai nostri giorni la più frequente causa di morte per tumore nel sesso femminile, e la prima in assoluto nella fascia di età tra i 35 e i 55 anni.

Il CM è un tumore epiteliale maligno che origina dai dotti galattofori (forma duttale) o dai piccoli dotti terminali (forma lobulare) della mammella.

Oggi, la malattia, come tutte le altre forme di cancro, è considerata essere il risultato finale di numerosi fattori sia ambientali che ereditari:

- Esposizione agli estrogeni.
- Fallimento dell'immunosorveglianza che normalmente blocca i tumori maligni ad una fase precoce della loro storia naturale.
- Anomalia nel segnale dei fattori di crescita nell'interazione fra le cellule connettive e le cellule epiteliali, come ad esempio nel processo dell'angiogenesi necessaria a favorire la crescita di nuovi vasi sanguigni in prossimità dei tumori.
- Difetti nei geni implicati nella riparazione del DNA, come BRCA1, BRCA2 e p53.

In molti casi, questo tipo di patologia, come riportato nel primo punto risulta ormone-dipendente.

Gli estrogeni sono componenti indispensabili per la cellula mammaria che ha subito una trasformazione neoplastica. Lo sviluppo e l'accrescimento della massa tumorale sono stimolati dagli estrogeni (ormoni sessuali femminili), in particolare dal 17- β -estradiolo, che esercitano un'azione mitogena sulle cellule della ghiandola mammaria (Henderson BE., 2000).

Con la produzione di questi ormoni le cellule trasformate iniziano una errata segnalazione verso le cellule circostanti e gli estrogeni prodotti in eccesso sono in grado di indurre un effetto mitogenico sui tessuti che raggiungono.

Gli estrogeni sono una classe di ormoni sessuali steroidei sintetizzati a partire dal colesterolo nelle ovaie con un contributo notevole da parte della placenta, del tessuto adiposo e delle ghiandole surrenali. Il più abbondante e attivo estrogeno endogeno è il 17- β -estradiolo (E_2).

Tale ormone è essenziale per il funzionamento del sistema riproduttivo femminile ed è indispensabile per la proliferazione e la differenziazione dell'epitelio mammario.

E' principalmente responsabile della comparsa di caratteri sessuali secondari femminili, regola il ciclo mestruale e il decorso della gravidanza.

L'ormone ha inoltre effetti benefici sul cuore e sulla struttura ossea dell'organismo umano mantenendo la densità ossea e riducendo il rischio di fratture (Watanabe T., 1997).

La loro importanza nell'organismo di una donna è tangibile al momento della menopausa in cui la mancata produzione ormonale a livello gonadale innesca una serie di gravi patologie quali osteoporosi, morbo di Alzheimer, iperidrosi e incremento delle LDL nel circolo sanguigno (Dechering K., 2000). Pertanto in molti casi è opportuno integrare con una terapia farmacologica a base di estrogeni.

Tuttavia, questi benefici possono essere messi in ombra dai rischi che l'assunzione di estrogeni può comportare.

È ormai ben nota la correlazione esistente tra l'assunzione di estrogeni nel periodo post-menopausale e il rischio di insorgenza del cancro alla mammella e all'utero.

Ci sono molteplici evidenze che mostrano come il cancro alla mammella sia in stretta correlazione con gli steroidi prodotti dall'apparato genitale femminile che hanno un ruolo di fondamentale importanza nello sviluppo e nella progressione delle neoplasie al seno, con il rischio di sviluppare metastasi, sia per l'esposizione ad estrogeni endogeni che esogeni.

Il carcinoma mammario è stato il primo ad essere riconosciuto come una patologia-ormono-dipendente dal medico inglese George Beatson che nel 1896, dimostrò come l'asportazione totale delle ovaie induceva una regressione dei tumori mammari in un gruppo di pazienti nel periodo pre-menopausa. Con il proseguimento degli studi gli estrogeni sono stati individuati come uno dei principali fattori che determinano l'insorgenza e la progressione del tumore mammario. Questi ormoni steroidei, attraverso l'interazione con i propri recettori, sono in grado di stimolare la proliferazione sia delle cellule normali che delle cellule trasformate attraverso

l'induzione di proteine implicate nella sintesi degli acidi nucleici e la conseguente attivazione dei geni che regolano la divisione cellulare. L'aumento della proliferazione cellulare può incrementare le possibilità di errori nella riparazione del DNA con il risultato di un accumulo di mutazioni. Tutto ciò può contribuire alla progressione da una cellula normale ad una cellula iperplastica fino ad arrivare alla cellula neoplastica.

Recettori degli estrogeni: struttura e domini funzionali

Le azioni biologiche degli estrogeni sono mediate dal loro legame con specifici recettori, il recettore per gli estrogeni di tipo α (ER α) e il recettore per gli estrogeni di tipo β (ER β). I geni che codificano per le due proteine recettoriali ER α ed ER β sono localizzati rispettivamente sul braccio lungo del cromosoma 6 e sul braccio lungo del cromosoma 14.

Le due isoforme recettoriali svolgono differenti azioni fisiologiche e, dall'interazione funzionale degli estrogeni con l'una o l'altra delle due isoforme, scaturisce una diversità nella risposta allo stimolo ormonale.

I recettori estrogenici appartengono alla superfamiglia dei fattori di trascrizione nucleari ligando-dipendenti, che determinano la trascrizione di geni "target" attraverso il legame con specifiche sequenze di DNA.

Studi sulla sequenza aminoacidica e sulla funzione hanno mostrato come i ERs, al pari di altri recettori steroidei, siano costituiti da sei domini separabili da un punto di vista funzionale, cioè con attività indipendenti l'una dall'altra.

A partire dalla porzione N-terminale si distinguono:

DOMINIO A/B – fra i domini presenti sui recettori steroidei è quello caratterizzato da una elevata variabilità, sia in funzione dello specifico ormone legante, sia in funzione della specie cui appartiene il recettore. Il suo ruolo è correlato alla modulazione della trascrizione genica operata dai complessi ormone-recettore. A livello di questo dominio è presente una funzione di attivazione della trascrizione AF-1 (*Activated Transcriptional Function 1*).

DOMINIO C – è il dominio maggiormente conservato dal punto di vista strutturale tra tutti i membri della superfamiglia dei fattori di trascrizione ligando-dipendenti.

È costituito da 70/80 aminoacidi, di cui numerose cisteine, ed interagisce direttamente con il DNA (*DNA Binding Domain, DBD*). Le due regioni che permettono tale interazione, comuni a molti fattori di trascrizione, sono strutture altamente conservate, chiamate “zinc fingers”(Fig.1), caratterizzate da quattro legami di coordinazione tra un atomo di zinco e quattro residui di cisteina che danno alla struttura terziaria un aspetto caratteristico a “dita di zinco”(Freedman L. P., 1988).

The estrogen receptor, a zinc finger protein

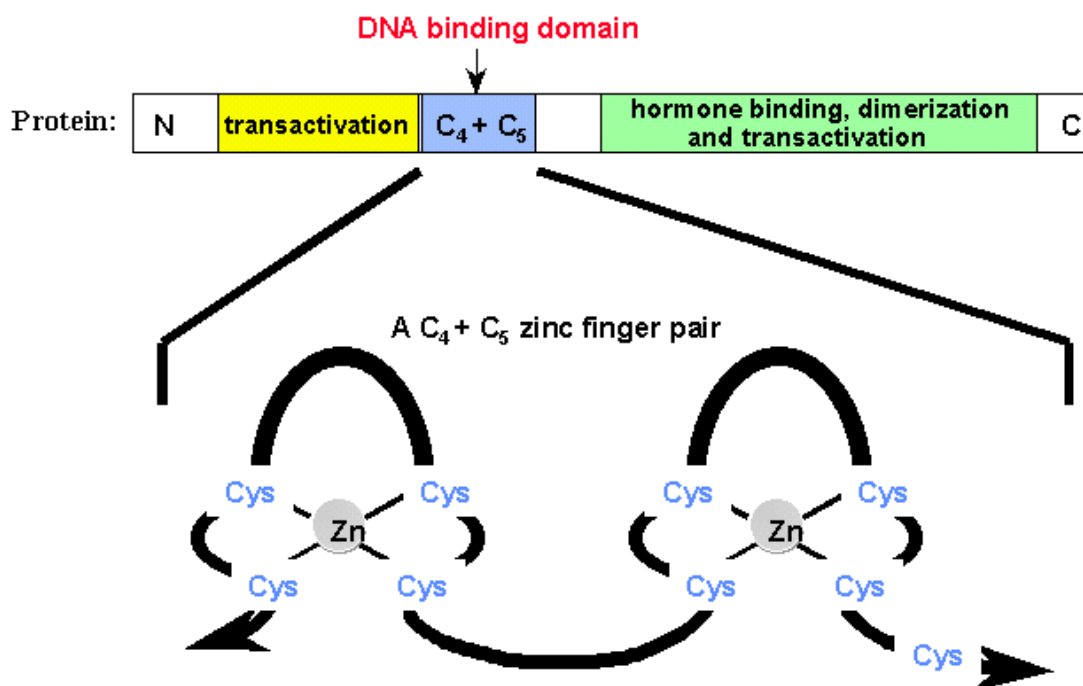


Fig.1: Struttura degli “zinc fingers” presenti nel dominio di legame del recettore estrogenico.

È stato suggerito che il primo di questi zinc finger sia responsabile della specificità di legame con gli ERE presenti sul DNA, mentre il secondo stabilizza tale legame (O’Malley B.,1990).

In assenza dell’ormone, le regioni zinc finger sono legate a proteine accessorie non recettoriali, cariche negativamente, le “Heat shock proteins” che mascherano il sito di legame all’ormone impedendo l’attivazione del recettore.

DOMINIO D – non ha un significato funzionale del tutto chiaro ma sembra essere coinvolto nel controllo dell'espressione genica da parte dei complessi ormone-recettore e nella localizzazione nucleare degli stessi complessi.

DOMINIO E – contiene il sito di legame per il ligando (*Ligand Binding Domain, LBD*) all'interno di una tasca idrofobica la cui sequenza aminoacidica mostra un alto grado di omologia con gli altri recettori steroidei.

DOMINIO F – questo dominio contiene una regione AF-2 (*Activated Transcriptional Function 2*) che, al pari di AF-1, può attivare la trascrizione. Ciò può avvenire indipendentemente dall'azione di AF-1 o sinergicamente ad essa, in maniera promoter e tessuto-specifica (Ali S., 1993).

Il meccanismo di attivazione di ER α , inizia con l'interazione del recettore con il proprio ligando. Tale legame provoca un cambio conformazionale nella struttura del recettore con il conseguente distacco delle proteine stabilizzatrici che si trovano ad esso associate. Il complesso ormone-recettore trasloca nel nucleo ed interagisce con le sequenze "estrogeno-responsive" (ERE, *Estrogen Responsive Elements*). Tali regioni sono sequenze palindromiche, ossia sequenze di DNA di 15 nucleotidi composte da una ripetizione, intorno ad un centro di simmetria, di una stessa sequenza invertita e capovolta. La sequenza riconosciuta è AGGTCAnnnTGACCT, in cui il centro di simmetria è composto da tre nucleotidi (Clementi F., Fumagalli G. 1999).

Le sequenze ERE funzionano da "enhancers" ed amplificano la trascrizione di geni, situati a valle delle palindromi, che codificano per proteine coinvolte in eventi proliferativi fisiologici (duplicazione del DNA, mitosi) o patologici (sviluppo di neoplasie) (Lottering M.L., 1992).

Oltre al classico meccanismo di attivazione ERE-mediato, appena descritto, sono conosciuti altri meccanismi che mediano l'azione degli estrogeni (Fig. 2).

Uno dei meccanismi prevede l'attivazione del recettore estrogenico in maniera ligando-indipendente. Infatti, fattori di crescita quali IGF-I e EGF, sono in grado di attivare un pathway di chinasi intracellulari (MAPK) che inducono la fosforilazione e quindi l'attivazione di ER ligando-indipendente (Hall J.M., 2001).

Il dominio target di questi eventi fosforilativi è quello NH₂-terminale dove la serina 118 risulta spesso fosforilata.

È documentato, inoltre, un meccanismo di attivazione trascrizionale ERE-indipendente per cui l'ER, stabilizzato da interazioni proteina-proteina con fattori nucleari quali AP-1 e Sp1, interagisce con siti presenti sui promotori adiacenti agli ERE (Hall J.M., 2001).

Infine, in alcuni tipi cellulari è stato individuato un recettore estrogenico α di membrana la cui attivazione avviene tramite un meccanismo non genomico. In tal caso, l'E₂ si lega al suo recettore di membrana determinando l'attivazione di complessi pathways trasduzionali e una risposta immediata nei tessuti bersaglio (Hall J.M., 2001).

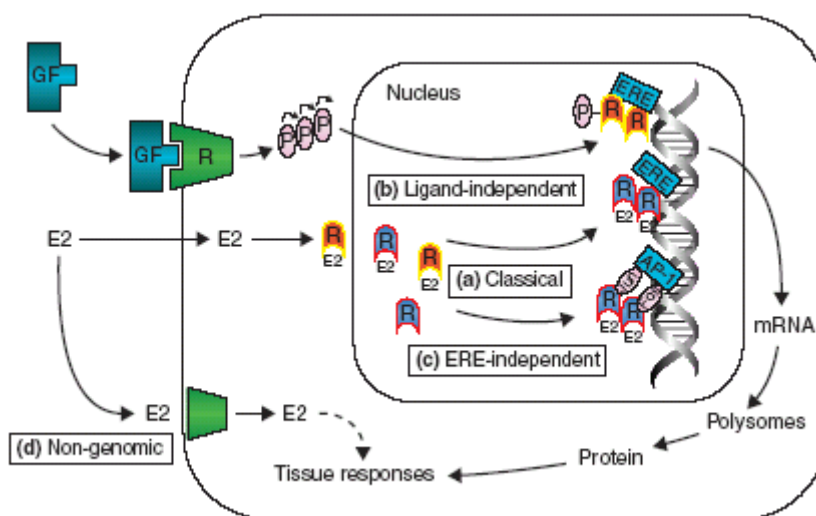


Fig.2: Meccanismo di azione degli estrogeni

L'attività dei recettori per gli estrogeni è modulata da numerosi co-regolatori nucleari che possono produrre effetti sia positivi (coattivatori) che negativi (corepressori).

In particolare, i corepressori sono proteine in grado di reprimere l'attività trascrizionale dei recettori nucleari legandosi al loro LBD. Le proteine inibitorie della trascrizione per essere definite corepressori devono soddisfare quattro criteri: 1) interagire con il recettore non associato al ligando; 2) dissociarsi in seguito al legame del recettore con un ligando in grado di attivarlo; 3) potenziare la repressione del recettore; 4) reprimere la trascrizione dei geni ai quali sono reclutati (Hu, X. 2000).

Fra i corepressori i meglio caratterizzati sono NCoR (*Nuclear CoRepressor*) e SMRT (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors*), due proteine di

circa 270 kDa, che mostrano elevate omologie strutturali e funzionali. Le regioni che interagiscono con i recettori nucleari, (*Interaction Domain 1 e 2, ID1 e ID2*) si trovano nella regione C-terminale di entrambi i corepressori. Una piccola regione presente nel Ligand Binding Domain dei recettori nucleari, chiamata CoR-box, è necessaria per l'interazione con SMRT e NCoR. Una mutazione in questa regione inibisce infatti il legame tra i recettori nucleari e i due corepressori.

NCoR e SMRT hanno all'N-terminale tre domini di repressione, RD1, RD2 e RD3, le cui sequenze non sono omologhe tra loro. Esistono diversi meccanismi di repressione. Il più studiato è quello che prevede il reclutamento, da parte di RD1 e di una regione a valle di RD3, delle deacetilasi degli istoni HDAC1 e HDAC2.

Montano e collaboratori hanno identificato un nuovo corepressore, denominato REA (*Repressor of Estrogen receptor Activity*), che interagisce sia con ER α che con ER β (ma non con altri recettori) (Montano M.1999).

Anche DAX-1 (*Dosage-sensitive sexreversal Adrenal hypoplasia congenital X chromosome*) ed RTA (*Repressor of Tamoxifene Activity*) regolano negativamente l'attività trascrizionale di ER α e di ER β (De Amicis F., 2009).

I due recettori hanno una struttura generale simile (Fig. 3), mostrando un più elevato grado di omologia nel dominio di legame del DNA (identità del 96% a livello aminoacidico) e una moderata conservazione nel dominio di legame del ligando (identità del 53% a livello aminoacidico) (Mosselman S, 1996).

Ciò suggerisce come il ER β sia in grado di riconoscere e legare gli stessi ERE dell'ER α ma che ciascuno dei due recettori abbia un distinto spettro di ligandi. (Gustafsson JA, 2000).

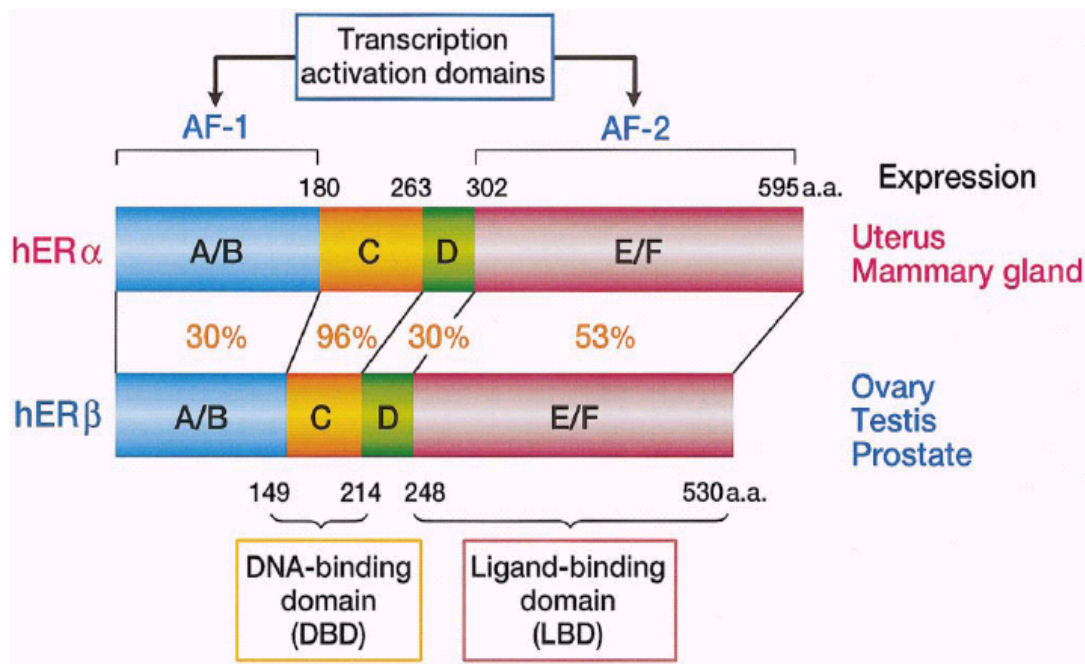


Fig.3: Omologie strutturali tra ER α ed ER β

Sia ER α che ER β legano l'estradiolo e gli antiestrogeni come il tamoxifene ed il 4-idrossi-tamoxifene con affinità molto simile. Contrariamente all'estradiolo, i fitoestrogeni come la genisteina e il cumastrolo, hanno una affinità maggiore per ER β rispetto ad ER α (Kuiper GG, 1997).

Negli ultimi anni sono stati sintetizzati dei ligandi selettivi per i due sottotipi recettoriali. E' stato scoperto che il PPT (propil pirazol triol) è un agonista selettivo del ER α in quanto è in grado di attivare la trascrizione genica solo attraverso questo recettore. Il diaril propio nitrile, invece, è un potente agonista del ER β e mostra una affinità di legame per questo recettore 70 volte superiore rispetto a quella per il ER α (Meyers MJ, 2001).

Le due isoforme recettoriali hanno una diversa distribuzione tissutale (Tab.1), ciò suggerisce che ER α e ER β mediano funzioni biologiche distinte. Per esempio, ER α è l'isoforma più abbondante nell'utero, nell'apparato cardiovascolare, nel cervello e nell'osso, mentre ER β è maggiormente espresso nell'epitelio prostatico, nel midollo osseo e nel colon.

Inoltre, all'interno di uno stesso tessuto, l'espressione di un sottotipo recettoriale può essere limitata ad uno specifico tipo cellulare; per esempio, l'ovaio esprime entrambe

le isoforme, ma ER α è presente nelle cellule della teca, mentre ER β è localizzato sulle cellule della granulosa (Barkhem et al., 2004).

Tessuto target	ER α	ER β
Utero	+	-
Stroma prostatico	+	-
Epitelio prostatico	-	+
Cellule tecali ovariche	+	-
Epitelio mammario	+	+
Stroma mammario	-	+
Osso	+	-
Midollo osseo	-	+
Cervello	+	+
Colon	-	+

Tab.1: Espressione di ER α ed ER β nei diversi tessuti

Il recettore estrogenico β

Il ER β è stato clonato per la prima volta nel 1996 (Kuiper GG, 1996) da una biblioteca di cDNA di prostata di ratto. Successivamente sono state descritte diverse varianti di splicing; alcune hanno un dominio N-terminale più esteso, altre presentano delezioni o inserzioni a livello della regione C-terminale e nel LBD (Moore JT, 1998; Ogawa S, 1998; Vladusic EA, 1998).

In particolare, dopo la clonazione della prima isoforma ER β 1 nella sua forma corta di 485 aminoacidi, ne fu individuata una seconda di 530 aminoacidi che ha preso il nome di ER β 1 nella forma lunga. Questa ultima isoforma è quella che generalmente viene definita wild-type (Matthews J., 2003).

Sono documentate, inoltre, altre varianti di splicing: ER β 2 o ER β cx (identico al ER β 1 negli esoni 1-7 ma non nell'esone 8), ER β 3, ER β 4 ed ER β 5 ((Moore JT, 1998) che differiscono nella porzione COOH-terminale.

Studi condotti su topi $ER\beta^{-/-}$ hanno rivelato il ruolo cruciale che questo recettore riveste in numerosi tessuti quali ovaio, utero, ghiandola mammaria, cervello, sistema immunitario e prostata (Imamov O, 2005).

In effetti, questi topi knockout che mostrano disordini immunitari (Shim GJ, 2003), possono sviluppare la leucemia mieloide cronica (Shim GJ, 2003) e la sindrome dell'ovaio policistico (Imamov O, 2005).

Tra le due forme recettoriali per gli estrogeni $ER\beta$ è dominante nei neuroni della substantia nigra ciò suggerisce che questo recettore possa avere una funzione importante nella patogenesi del morbo di Parkinson (Mittra SW, 2003).

In numerosi tessuti, $ER\alpha$ ed $ER\beta$ formano omodimeri ($ER\alpha/ER\alpha$ ed $ER\beta/ER\beta$) e eterodimeri ($ER\alpha/ER\beta$) funzionali in vitro ed in vivo e, quando le due forme sono coespresse, gli eterodimeri predominano (Matthews J, 2003).

Il ruolo e la funzione degli eterodimeri resta ancora da chiarire principalmente a causa della presenza di numerose varianti di splicing dei recettori presenti nei tessuti proliferanti che potrebbero produrre dimeri eterogenei tra loro.

Questi eterodimeri sono in grado di interagire con il DNA con una affinità simile a quella del $ER\alpha$ ma maggiore rispetto al $ER\beta$ (Cowley SM, 1997).

Recentemente Monroe e coll. (Monroe DG, 2005) hanno riportato che gli eterodimeri $ER\alpha/ER\beta$ sono in grado di attivare la trascrizione di geni che normalmente non sono attivati dagli omodimeri.

Il meccanismo alla base di questo effetto è attualmente sconosciuto e potrebbe coinvolgere differenti cascate del segnale attivate specificamente dalle diverse isoforme.

Gli omodimeri e gli eterodimeri possono legare distinti EREs e conseguentemente attivare specifici patterns di espressione genica nei tessuti target.

In aggiunta, negli eterodimeri formati nei tessuti in cui le due isoforme di recettore sono coespresse, $ER\beta$ manifesta degli effetti inibitori sull'attività trascrizionale di $ER\alpha$ (Matthews J, 2003).

Numerosi studi hanno dimostrato nei tumori del colon, dell'ovaio, della prostata e soprattutto del seno un decremento dell'espressione dell'mRNA e della proteina $ER\beta$ (ovvero un aumento del rapporto $ER\alpha/ER\beta$) rispetto ai tessuti sani (Brandenberger A.W., 1998, Pujol P., 1998, Foley E.F., 2000, Rutherford T., 2000, Campbell-Thompson M., 2001., Roger P., 2001, Fixemer T., 2003).

Il rapporto ER α /ER β aumenta durante la carcinogenesi, ciò suggerisce che i due recettori abbiano ruoli distinti in questo processo (Leygue E., 1998).

In un recente studio, Guerini e collaboratori (Guerini V., 2005), hanno valutato se ER β potesse essere coinvolto nel controllo delle proprietà invasive e metastatiche del carcinoma prostatico.

I risultati riportati da questi autori indicano che l'attivazione funzionale del ER β riduce in modo significativo le proprietà migratorie delle cellule tumorali. Questo effetto è accompagnato da un aumento dell'espressione di E-caderina, una proteina di adesione cellula-cellula i cui livelli sono generalmente correlati in modo negativo con il grado di invasività del tumore.

Ci sono inoltre numerose evidenze sperimentali che dimostrano gli effetti inibitori dell'ER β sulla proliferazione di cellule di tumore mammario e tumore ovarico (Lazennec G., 2001; Bardin A., 2004; Strom A., 2004).

In questo modo, il ER β appare essere in contrapposizione al recettore estrogenico α che media in generale gli effetti proliferativi indotti dall'estradiolo.

La ghiandola mammaria, sia in condizioni normali che in condizioni patologiche (tumore mammario), esprime i due recettori.

Nel tessuto mammario umano, il ER β è la forma recettoriale predominante, mentre nel tumore mammario predomina il ER α

In particolare, nel carcinoma mammario, sono stati osservati livelli molto bassi di ER β rispetto al tessuto mammario sano ed è stato dimostrato che l'espressione di ER α e non di ER β è correlata al grado di malignità del tumore (Hartman J, 2009).

In questa forma tumorale, il ER β è inversamente correlato a Ki67, un marker della proliferazione cellulare (Hartman J, 2009).

Omoto e coll.. hanno trasfettato stabilmente delle cellule di carcinoma mammario umano MCF-7 con ER β wt ed ER β cx e hanno dimostrato che l'espressione costitutiva di queste due isoforme recettoriali riduce la percentuale di popolazione cellulare nella fase S del ciclo cellulare (Omoto Y, 2001).

Quando ER β viene espresso in una linea cellulare di tumore mammario, le T47D, è in grado di indurre un blocco nella fase G1 del ciclo cellulare (Strom A, 2004).

Il trattamento delle stesse cellule con estradiolo o con PTT (propil pirazolo triolo), ligando sintetico di ER α , stimola la proliferazione, mentre l'agonista specifico del ER β , il DPN, la inibisce (Sotoca A.M., 2008).

Inoltre, in una linea cellulare mammaria di topo (HC11), l'estradiolo o il PTT sortiscono risposte proliferative mentre il DPN riduce l'attività mitotica cellulare fino ad indurre apoptosi se il trattamento è prolungato per oltre due giorni (Helguero L.A., 2005).

Paruthiyil e coll. (Paruthiyil S., 2004), hanno mostrato che il ER β in MCF-7 causava un arresto nella fase G2 del ciclo cellulare con la riduzione di c-Myc e l'induzione di p21 e di p27. Questi autori hanno altresì dimostrato che l'espressione costitutiva di ER β in cellule MCF-7 causa in modelli xenograft, la regressione del tumore.

Studi *in vitro* in cellule HeLa hanno messo in evidenza che l'estradiolo attiva la trascrizione del gene della ciclina D1 attraverso il ER α ma la inibisce attraverso il ER β (Liu M.M., 2002).

La ciclina D1 è un fattore chiave nel controllo della transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare e l'aumento dell'espressione della ciclina D1 caratterizza il 50% dei carcinomi mammari estrogeno-responsivi.

Estrogeni e fattori di crescita

La regolazione della crescita, della trasformazione e della sopravvivenza di cellule tumorali mammarie umane è strettamente dipendente dal “cross-talk” tra estrogeni e fattori di crescita (Zhang X., 2000) E' stato dimostrato ampiamente che diversi componenti appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita insulino-simili (*Insulin-Like Growth Factors*) giocano un ruolo importante nella proliferazione non solo di cellule normali, ma anche di cellule tumorali, con evidenti effetti mitogeni e trasformanti (probabilmente attraverso un'azione permissiva), nonché antiapoptotici (Rubin R., 1995). In particolare, gli estrogeni possono stimolare la proliferazione di cellule di carcinoma mammario estrogeno-responsive, aumentando la loro risposta proliferativa all'insulina e ai fattori di crescita insulino-simili (IGFs), attraverso l'attivazione di diversi pathways trasduzionali (Dickson R.B., 1987; 1995). Gli effetti proliferativi degli IGFs sono mediati soprattutto dal recettore per l'*Insulin-Like Growth Factor I* (IGF-IR), il quale è espresso ubiquitariamente nei tessuti umani e sembra essere implicato in numerosi processi biologici, quali la proliferazione, la trasformazione, il differenziamento e la sopravvivenza cellulare (Rubin R., 1995).

Tale recettore appartiene alla superfamiglia dei recettori tirosino-chinasici e la sua sequenza aminoacidica mostra il 70% di omologia con quella del recettore per l'insulina (IR) (Ulrich A., 1986). L'attivazione di IGF-IR avviene in seguito alla sua oligomerizzazione, autofosforilazione ed attivazione dell'attività chinasica, generando un segnale citoplasmatico simile a quello dell'IR.

E' da tempo noto che l'IGF-IR, assieme ai suoi ligandi (IGF-I e IGF-II), svolge un'importante funzione nella biologia della ghiandola mammaria (Dickson R.B., 1995) ed esistono evidenze sperimentali che dimostrano come tale recettore risulti essere altamente espresso nel tumore mammario e positivamente correlato con l'assetto recettoriale estrogenico (Peyrat J.P., 1992).

Sebbene i pathways trasduzionali attivati dai due segnali mitogenici, estradiolo e insulina e/o fattori insulino-simili, siano distinti, numerosi dati sperimentali hanno dimostrato come, tra le due molecole ormonali, esista una evidente cooperatività e un elevato sinergismo (Lee A.V., 1999; Yee D., 2000; Molloy A.C., 2000). Sembra, infatti, che i recettori per entrambe le molecole siano coespressi nelle cellule di tumore mammario ormono-dipendenti, e che si verifichi una reciproca facilitazione dei rispettivi segnali. La presenza di E₂ induce un aumento dell'espressione di IGF-IR ed un'amplificazione a lungo termine dell'espressione e attività dei suoi adattatori intracellulari, IRS-1 e IRS-2 (*Insulin Receptor Substrate 1 e 2*), che risultano anche maggiormente fosforilati in tirosina, mentre diminuiscono i livelli citoplasmatici della IGF-I-BP (*IGF binding protein I*) (Lee A. V., 1999).

Aronica S.M. et al. (1993) hanno evidenziato come in cellule uterine l'attività trascrizionale e l'attività fosforilativa del recettore estrogenico aumentino in presenza di IGF- IR. Più recentemente in cellule MCF-7 è stata documentata una "up-regulation" del recettore estrogenico e della capacità di legame dello stesso in seguito a stimolazione con insulina (Andò S., 1998).

L'interazione tra gli effetti degli IGFs (e/o dell'insulina) e quelli degli estrogeni si manifesta funzionalmente in un aumento della proliferazione cellulare.

La capacità degli estrogeni di incrementare la risposta delle cellule di carcinoma mammario agli IGFs o all'insulina, deriva da una iperespressione di IRS-1, uno dei principali substrati intracellulari dell'attività tirosino-chinasica di IGF-IR e di IR, attività che si realizza in seguito all'interazione del recettore con il proprio ligando.

La trasmissione del segnale insulinico o degli IGFs comporta l'attivazione di una complessa cascata di eventi fosforilativi di diversi substrati proteici, tra i quali IRS-1, una proteina adattatrice del peso molecolare di 130 kDa (180 kDa se fosforilata), che sembra essere principalmente coinvolta nella regolazione dei processi proliferativi cellulari (Myers M.G., 1994; Cheatham B., 1995) (Fig. 4).

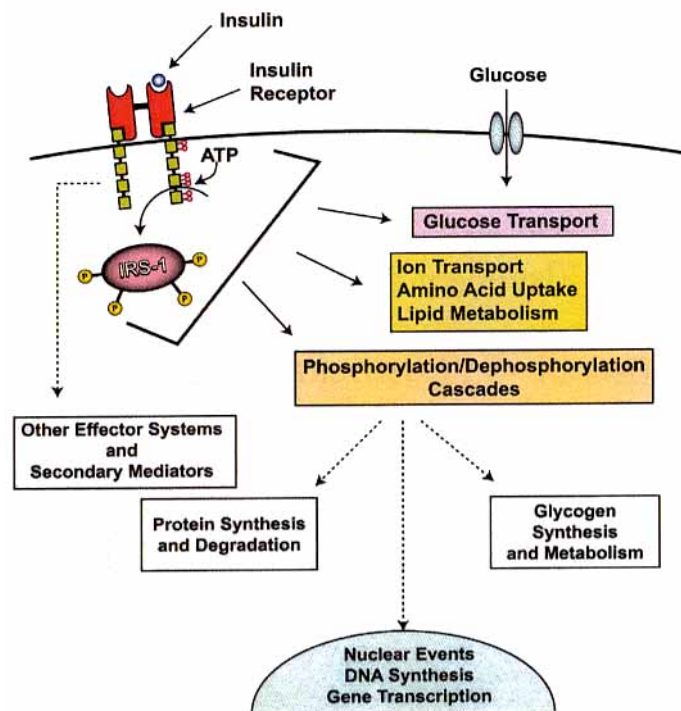


Fig.4: Processi intracellulari insulinico-indotti.

Una delle principali caratteristiche di IRS-1 è la presenza di 20-22 residui di tirosina, potenziali siti di fosforilazione, altamente conservati tra proteine omologhe (IRS-2, -3 e -4). A tali siti è stata attribuita una duplice funzione: rappresentano a) i substrati specifici dell'attività chinasi associata al recettore dell'insulina e dell'IGF-I; b) i siti di interazione con proteine contenenti domini SH-2 (*src-homology 2*).

La fosforilazione di IRS-1 agisce, quindi, come segnale molecolare per l'interazione, durante la stimolazione con insulina o IGF-I, con proteine contenenti domini SH-2, mentre i residui aminoacidici adiacenti ai residui di tirosina ne determinano la specificità.

Diversi studi hanno dimostrato che le proteine contenenti domini SH-2, quali Grb2 (coinvolta nella regolazione dell'oncogene ras), Syp (SH-PTP2, proteina tirosinofosfatasi), p85 α e p85 β (due isoforme della subunità regolatrice PI 3-chinasi) e Nck (proteina contenente anche domini SH-3), si legano preferenzialmente a distinti siti di fosforilazione di IRS-I (Fig. 5) .

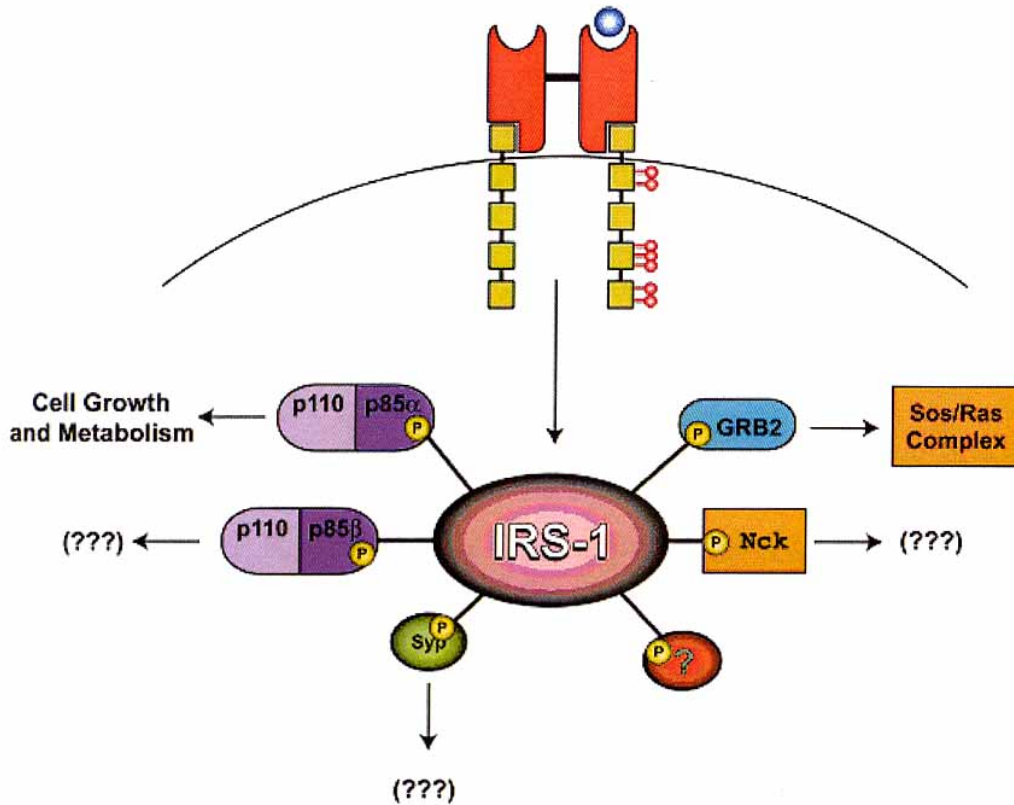


Fig.5: Associazione di proteine contenenti domini SH-2 con i residui tirosinici fosforilati di IRS-1

In aggiunta, IRS-1 contiene più di 30 residui di serina/treonina che rappresentano potenziali substrati della caseina chinasi II, proteina chinasi C (PKC) e A (PKA), chinasi cGMP-dipendente e MAP chinasi (Mitogen Activated Protein Kinase).

Il principale pathway indotto dalla fosforilazione in tirosina di IRS-1 coinvolge la PI-3-chinasi i cui effettori sono le chinasi serina-treonina Akt, p70^{S6}, e alcune isoforme della proteina chinasi C (Shepherd P.R., 1998). La PI-3-chinasi è costituita da una subunità catalitica di 110 kDa (p110) e da una subunità regolatrice di 85 kDa (p85), che contiene due domini SH-2 e uno SH-3 (Fig. 6). L'attivazione di questo enzima sembra essere indispensabile nei processi di mitogenesi e crescita cellulare ed è,

inoltre, coinvolta nella regolazione del metabolismo e nei meccanismi di riarrangiamento del citoscheletro. Il pathway PI-3-K/Akt è stato recentemente riconosciuto come uno dei più importanti segnali implicati nella sopravvivenza cellulare.

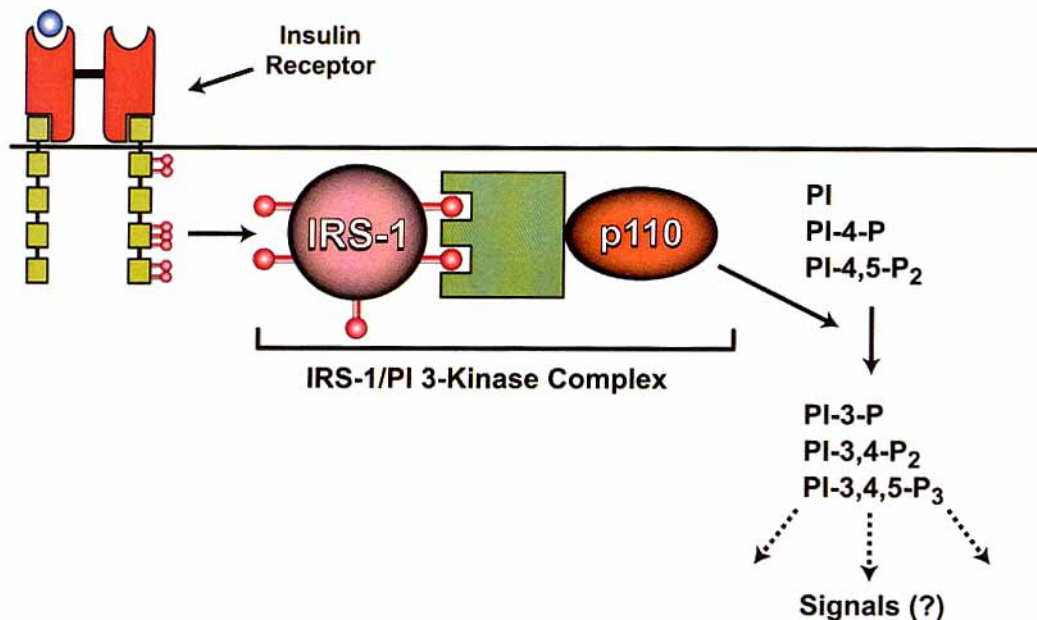


Fig. 6: Associazione della PI-3-chinasi con i residui tirosinici fosforilati di IRS-1

Studi condotti negli ultimi anni, hanno dimostrato che la proteina IRS-1, principale substrato dell'attività tirosino chinasi del recettore insulinico e degli IGFs, è coinvolta nell'amplificazione del segnale insulinico indotto dall'estradolo.

Il meccanismo attraverso cui l'estradolo è in grado di aumentare la risposta delle cellule MCF-7 all'insulina e agli IGFs coinvolge l'over espressione della proteina e dei livelli di mRNA di IRS-1 attraverso l'attivazione del promotore del gene di IRS-1 (Molloy A.C., 2000; Mauro L., 2001).

La sequenza del promotore umano di IRS-1 è attualmente sconosciuta ma numerosi studi documentano un elevato grado di omologia con la sequenza del promotore murino che, invece, è stata definitivamente caratterizzata in cellule CHO (Araki, 1995).

Una analisi approfondita della sequenza del promotore murino di IRS-1, effettuata nel nostro laboratorio, ha permesso l'identificazione di nuovi potenziali siti di regolazione trascrizionale.

In particolare, in una linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7, è stato dimostrato che il promotore del gene IRS-1 viene transattivato dal complesso attivo ER α -E₂; il meccanismo molecolare attraverso cui si esplica tale risposta coinvolge la sequenza 5'-GCTCA(N)₁₂CCGCCC-3' costituita da una emisequenza ERE intervallata da 12 nucleotidi da un sito Sp1 (Panno M.L., 2006).

Infatti, il sinergismo funzionale tra le proteine Sp1 ed ER α è capace di indurre trascrizione genica mediante un meccanismo “non classico” che prescinde dalla diretta interazione con le sequenze palindromiche ERE.

L'E₂ è in grado di attivare la trascrizione genica di IRS-1 mediante l'interazione proteina-proteina tra ER α ed Sp1, seguita dal legame di tale complesso con sequenze nucleotidiche caratterizzate dalla presenza di una emisequenza ERE adiacente ad un sito Sp1, ciò si traduce in una amplificazione del segnale insulinico e insulino-simile e quindi in un effetto proliferativo sulle cellule di carcinoma mammario.

Tale meccanismo di attivazione genica è stato anche identificato in altri promotori genici quali quello della catepsina D, della creatina chinasi B, del c-myc, del recettore alfa dell'acido retinico e dell' hsp27, dove l'emisequenza ERE e l'elemento Sp1 sono separati da un numero di nucleotidi che varia tra 10 e 23 (Porter W., 1997). I dodici nucleotidi, che separano l'emisequenza ERE dal sito Sp1 del promotore di IRS-1, corrispondono circa ad un passo dell'elica del DNA. Ciò permetterebbe ad ER α ed Sp1, legate al DNA, di trovarsi in una configurazione sterica tale da favorire l'interazione proteina-proteina e la conseguente attivazione della trascrizione.

Metodi

Linee cellulari e condizioni di coltura

La linea cellulare MCF-7 deriva da un tipo di tumore mammario umano ER+ (Recettore estrogenico positivo) ed è stata fornita dalla Dott.ssa Eva Surmacz del Kimmel Cancer Institute, Thomas Jefferson University, Philadelphia.

Le cellule sono state mantenute in coltura in un mezzo DMEM/F-12 (1:1) addizionato di siero (FBS, Foetal Bovine Serum) al 10%, Penicillina/Streptomicina (1%) e glutamina (1%) ad una temperatura di 37°C e al 5% di CO₂.

Le cellule ZR-75 derivano da un tipo di tumore mammario umano ER+; la linea cellulare è stata mantenuta in coltura in un mezzo DMEM addizionato di siero (FBS, Foetal Bovine Serum) al 10%, Penicillina/Streptomicina (1%), glutamina (1%) e 2,5 µg/ml di anfotericina, ad una temperatura di 37°C e al 5% di CO₂.

Plasmidi

Il plasmide utilizzato per overesprimere il ERβ nelle cellule MCF-7 e nelle ZR-75 è il pCMV-5-hERβ gentilmente fornito dal Prof. Maggiolini, Università della Calabria; l'inserto inserito nel plasmide è pari a 1460 bp.

Il promotore di IRS-1, p-IRS-1-luc e i frammenti da esso derivati, p-IRS-1A-luc, p-IRS-1B-luc, p-IRS-1C-luc e p-IRS-1D-luc sono stati forniti dalla Dott.ssa Bellizzi, Università della Calabria. Tutti questi costrutti sono stati inseriti nel vettore di espressione pGL2.

Il promotore di ERα è stato invece fornito dalla Prof.ssa S.A.W. Fuqua, Baylor College of Medicine, Breast Center, Houston.

Trasfezioni transienti

Le cellule MCF-7 sono state seminate, il giorno prima della trasfezione in multiwell da 24 pozzetti, con 1 ml di mezzo di coltura, alla concentrazione di 5×10^4 cellule/well, in modo da ottenere, il giorno successivo una densità pari al 70% di confluenza. Un'ora prima della trasfezione il mezzo (DMEM/F12, 10%FBS) è stato sostituito con DMEM w/o Phenol Red (PRF), privo di siero (500 μ l/well). Tutte le trasfezioni sono state effettuate mediante FuGENE 6, secondo il protocollo fornito dalla ditta utilizzando il mezzo privo di siero (50 μ l/well) contenente FuGENE6 in rapporto 1:3 con i plasmidi di interesse ed plasmide per la Renilla pRL-CMV-5 ng/well) necessario per normalizzare l'efficienza di trasfezione. Dopo una incubazione di circa 12 h, le cellule sono state sottoposte ai diversi trattamenti in un mezzo privo di siero e di rosso fenolo rinnovato . Le cellule sono state poi lisate e saggiate per l'attività della luciferasi utilizzando un kit Dual-Luciferase Reporter System (Promega Corp., Madison, WI). In questo saggio vengono misurate sequenzialmente le attività di due sistemi "reporter", uno codificante la luciferasi della lucciola o firefly (*Photinus pyralis*), l'altro quello della renilla (*Renilla reniformis*). Entrambi gli enzimi hanno strutture e richieste di substrati diversi. Queste differenze consentono di discriminare selettivamente tra le loro rispettive reazioni bioluminescenti. I valori di attività della luciferasi sono rapportati ai corrispondenti valori della Renilla ed espressi come unità relative di Luciferasi.

Conta cellulare

Le cellule MCF-7 sono state seminate in numero di 13.000 in piastre Petri da 35 mm e lasciate crescere fino ad ottenere, il giorno successivo una confluenza pari al 70%. Raggiunta tale densità, il mezzo di coltura viene sostituito con DMEM w/o Phenol Red (PRF), privo di siero; tali cellule sono state trasfettate con il vettore vuoto pCMV-5 e con pCMV-5-hER β al fine di over-esprimere il ER β . Dopo 12h di trasfezione, le cellule sono state trattate per 24h e 48h con DPN alla concentrazione di 10^{-7} M. Al termine del periodo di incubazione si può effettuare la

conta cellulare su “camera di Burker” utilizzando il metodo di esclusione del Tripan Blue.

Citofluorimetria a flusso

Le cellule MCF-7, trasfettate per 12h con pCMV-5 e con pCMV-5-hER β , trattate con DPN alla concentrazione di 10^{-7} M, sono state raccolte per l’analisi del ciclo cellulare. Le cellule vengono lavate con PBS, fissate in ghiaccio con etanolo al 70% per 1h. Al termine dell’incubazione le cellule sono state prima centrifugate, poi risospese in 1 ml di una soluzione contenente 10mg/ml RNasi A e 10mg/ml di ioduro di propidio in PBS. I campioni, quindi, si lasciano incubare per 30’ al buio, a temperatura ambiente e successivamente sono stati analizzati al citofluorimetro.

L’analisi citofluorimetrica è stata effettuata tramite il software ModFit LT (Becton Dickinson, NJ) che permette di determinare la distribuzione cellulare in termini percentuali nelle diverse fasi del ciclo.

Western Blotting

I livelli proteici di IRS-1, ER α , ER β e GAPDH nelle diverse condizioni sperimentali, sono stati determinati mediante analisi di Western Blotting.

Le cellule MCF-7, dopo un lavaggio con PBS sono state lisate in 500 μ l di buffer di lisi per piastra (HEPES pH 7.5 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EGTA pH 7.5 10 mM, Glicerolo 10%, Triton 100X 1% e gli inibitori delle proteasi Na₃VO₄ 2 μ M, PMS-F 1 mM, Aprotinina 20 μ g/ml).

Il lisato proteico è stato utilizzato per la corsa elettroforetica su un gel di SDS-poliacrilammide. In seguito, le proteine separate sono state trasferite mediante elettrotrasferimento su un foglio di nitrocellulosa che è stato incubato con l’anticorpo primario specifico per la proteina di interesse alla concentrazione appropriata.

Per poter visualizzare l’interazione tra anticorpo primario e proteina fissata, si fa avvenire una seconda incubazione con anticorpi secondari in grado di riconoscere la porzione costante della molecola di IgG utilizzata come anticorpo primario.

L'anticorpo secondario è, in questo caso, coniugato con Perossidasi di Rafano, la cui reazione permette la rilevazione finale. Tale enzima, infatti, è in grado di catalizzare, in condizioni basiche, l'ossidazione di un substrato chemiluminescente come il Luminolo; questo, passando attraverso uno stato eccitato emette una certa quantità di luce che può essere visualizzata esponendo il filtro trattato ad una lastra fotografica (Hyperfilm, ECL).

Stripping

Mediante l'utilizzo di un opportuno buffer è possibile eliminare l'anticorpo legato alla proteina e riutilizzare lo stesso filtro per una nuova incubazione con un diverso anticorpo.

In particolare, il filtro viene incubato con 100 ml di stripping buffer (Tris pH 6.7, 2% SDS) e 700 µl di β-mercapto-etanolo a 52°C in agitazione per 30 minuti.

Alla fine del periodo di incubazione vengono effettuati tre lavaggi consecutivi di 10 minuti ciascuno con TBST 1X.

Gli steps successivi sono del tutto analoghi a quelli previsti dal Western Blotting.

RT-PCR , Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay

Dalle cellule MCF-7, coltivate in Petri da 60 mm e trattate secondo il protocollo sperimentale, è stato estratto l'RNA cellulare totale usando il reagente TRIZOL (Invitrogen), nei modi indicati dalla ditta produttrice. La purezza e l'integrità dell'RNA sono stati analizzati spettroscopicamente e mediante elettroforesi su gel prima di effettuare le procedure di analisi. La valutazione dell'espressione genica è stata effettuata mediante il metodo semi-quantitativo dell'RT-PCR.

I primer utilizzati sono stati:

IRS-1 *For*: 5'-AGG ATA TTT AAT TTG CCT CGG G-3'; *Rev*: 5'-AAG CGT TTG TGA TGC TCT TG-3' (28 CICLI)

ERα *For*: 5'-AGA TCC AAG GGA ACG AGC T-3'; *Rev*: 5'-TTC TCC AGG TAG TAG GGC A-3' (24 CICLI)

ER β *For*: 5'-CCC TGC TGT GAT GAA TAA CAG-3'; *Rev*: 5'-CCC TCT TTG AAC CTG GAC CA-3' (30 CICLI)

β -ACTINA *For*: 5'-GAT GAT GAT ATC GCC GCG CT-3'; *Rev*: 5'-TGG GTC ATC TTT CTC GCG GTT-3' (20 CICLI)

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

L' Electrophoretic Mobility Shift Assay e' una metodica che permette di identificare le proteine che legano sequenze funzionali sul DNA cellulare.

La metodica viene anche indicata come "gel retardation assay" in quanto è basata sull'osservazione che complessi di proteine/RNA-DNA migrano su un gel di poliacrilammide più lentamente rispetto ai complessi liberi di RNA-DNA.

La prima tappa di tale procedura prevede la preparazione degli estratti nucleari.

Le cellule, nelle opportune condizioni sperimentali sono state raccolte in 1.5 ml di PBS e centrifugate per 30 secondi. Eliminando il surnatante, le cellule sono state risospese in 400 μ l di Buffer A freddo (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF), e incubate in ghiaccio per 15 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 25 μ l di una soluzione di Igepal al 10% e i campioni sono stati vortexati per 10 secondi.

L'omogenato ottenuto è stato centrifugato per 30 secondi. Dopo aver rimosso il surnatante, il pellet nucleare è stato risospeso in 50 μ l di Buffer B freddo (20 mM Hepes pH 7.9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF), agitato per 15 minuti a 4° C e centrifugato per 20 minuti a 13.000 rpm a 4°C.

Dopo aver recuperato il surnatante, la concentrazione delle proteine nucleari è stata determinata mediante il metodo di Bradford.

I probes utilizzati sono stati preparati attraverso l'annealing degli oligonucleotidi (senso e antisenso) e la successiva marcatura con [γ 32 P]ATP in presenza di T4 polinucleotide chinasi. Il probe è stato successivamente purificato usando colonne di Sephadex G50. Le sequenze di DNA corrispondenti ai siti ERE sul promotore di ER α utilizzate come probe sono le seguenti:

Per l'ERE in posizione-885 -860: *For* 5'-CTT TGG TTC GTG ACG TGA GGT TAT GT-3'; *Rev* 5'-ACA TAA CCT CAG GTC ACG AAC CAA AG-3'

Per l'ERE in posizione -858 -832: *For* 5'-TGG TAT GAA AAG GTC ACA TTT TAT AT-3'; *Rev* 5'-ATA TAA AAT GTG ACC TTT TCA TACCA-3'

Come probe mutati, invece, sono state utilizzate le seguenti sequenze oligonucleotidiche:

Per l'ERE in posizione -885 -860: *For* 5'-CTT TGG TTA ACA ACG TGA GGT TAT GT-3'; *Rev* 5'-ACA TAA CCG AGT GTC ACG AAC CAA AG-3'

Per l'ERE in posizione -858 -832: *For* 5'-TGG TAT GAA AAT AGA ACA TTT TAT AT-3'; *Rev* 5'-ATA TAA AAT GTT CTA TTT TCA TACCA-3'

La reazione di binding tra le proteine nucleari e il DNA marcato avviene miscelando in 20µl di buffer (20 mM HEPES pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 10% glicerolo, 1 mg/ml BSA, 50 µg/ml poly (dI-dC)) le proteine nucleari (20 µg per reazione) in presenza di DNA non specifico (poli dI-dC, 5 µg per reazione). Queste sequenze ripetitive costituiscono un eccesso di siti non specifici capaci di adsorbire proteine presenti nel lisato che potrebbero legarsi a qualsiasi sequenza di DNA o RNA.

Alla miscela di reazione viene aggiunto il probe (50.000 cpm per reazione) ed il tutto viene incubato per 20 minuti a temperatura ambiente. Per determinare la specificità del legame prima dell'aggiunta del probe, la miscela di reazione è stata preincubata con l'oligonucleotide non marcato 100 volte in eccesso rispetto a quello marcato. La specificità del legame è stata testata aggiungendo alla miscela di reazione anticorpi specifici (anti-ER α e anti ER β) e utilizzando al posto degli estratti nucleari proteine di sintesi ER α e ER β .

I campioni sono stati, poi, sottoposti ad elettroforesi verticale su gel di poliacrilammide al 6% in TBE 0.5X (0.045 M Tris Borato, 0.001 M EDTA), per circa 3 ore a 150 V. Il gel è stato poi asciugato mediante gel dryer ed esposto ad una lastra autoradiografica a -70 °.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Le cellule MCF-7, piastrate in Petri da 100mm, al termine del periodo di trattamento previsto dal protocollo sono state lavate con PBS e fissate con formaldeide all'1% in PBS a 37°C per 10 minuti.

A questo punto, le cellule sono state nuovamente lavate con PBS fredda, raccolte, risospese in 200 µl di Buffer di lisi (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1) e lasciate in ghiaccio per 10 minuti. Le cellule, poi, sono state sonicate quattro volte per 10 secondi al 30% della potenza massima dello strumento (Fisher Sonic Dismembrator 500) e centrifugate alla temperatura di 4°C per 10 minuti a 14.000 rpm.

I surnatanti sono stati diluiti in 1 ml di Immunoprecipitation buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 16.7 mM NaCl) ed incubati con 80 µl di DNA di sperma di salmone sonicato e coniugato con proteina A-Agarose per 1 ora a 4°C al fine di eliminare eventuali legami aspecifici.

La cromatina così chiarificata è stata immunoprecipitata per 12 ore con l'anticorpo anti-NCoR. In seguito sono stati aggiunti 60 µl di DNA di sperma di salmone/protein A-Agarose e i campioni sono stati incubati per altre 2 ore a 4 °C.

Dopo centrifugazione, i precipitati vengono lavati sequenzialmente a 4°C, per 5 minuti, in agitazione con le seguenti soluzioni: Wash A (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl ph 8.1, 150 mM NaCl), Wash B (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl ph 8.1, 500 mM NaCl) e Wash C (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% NaDeoxycolate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl ph 8.1) e poi due volte con TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Gli immuno-complessi sono stati eluiti con Elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃). Per rompere i legami proteina-DNA (reverse crosslink), i campioni vengono incubati a 65°C per 12 ore in presenza di NaCl 0.2 M e poi digeriti con Proteinasi K 0.5 mg/ml a 45°C per 1 ora.

Il DNA si ottiene mediante estrazione con fenolo/cloroformio/isoamilalcol. Si aggiungono a ciascun campione 2 µl di yeast-tRNA 10 mg/ml e il DNA viene precipitato con EtOH freddo al 95% per 12 ore a -20°C, centrifugato per 30 minuti a 4°C, lavato con EtOH freddo al 70% e infine risospeso in 20 µl di TE buffer.

5 µl di ciascun campione vengono amplificati mediante PCR utilizzando i seguenti primers corrispondenti alle sequenze ERE sul promotore di ERα.

For: 5'-CTA TTT GTT TTT CAT CTG GAT ATT-3'; *Rev*: 5'-CTT CCA CAG GTT GGT TAT GC

I campioni sono stati sottoposti a 34 cicli di PCR:

- 1 ciclo a 94°C per 5 minuti per attivare l'enzima;
- denaturazione a 94°C per 1 minuto;
- annealing a 58°C per 1 minuto;
- estensione a 72°C per 1 minuto;
- final extention a 72°C per 10 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel di agarosio al 2% e visualizzati mediante colorazione con etidio bromuro.

Come controllo di "loading" sono stati caricati sul gel 5 µl di DNA non sottoposti ad immunoprecipitazione e amplificati utilizzando gli stessi primer sopra indicati.

Analisi Statistica

I risultati rappresentano la media di almeno tre esperimenti condotti in triplicato. I dati sono stati sottoposti ad analisi di varianza (ANOVA).

Risultati

Effetti dell'over-espressione di ER β sulla cinetica proliferativa di una linea cellulare di carcinoma mammario umano

Il primo approccio sperimentale è stato quello di analizzare l'effetto dell'overespressione della proteina ER β sulla cinetica proliferativa di una linea cellulare di tumore mammario MCF-7. Le cellule sono state trasfettate transientemente con il plasmide pCMV-5-hER β allo scopo di overesprimere la proteina recettoriale ER β ; su tali cellule nonché su quelle di controllo, trasfettate con l'empty vector di ER β pCMV-5, è stata eseguita la conta cellulare, dopo 24 e 48h di trattamento con il ligando specifico del recettore estrogenico β DPN (diarilpropionitrile). I dati mostrati in figura 7 indicano una significativa riduzione della sopravvivenza nelle cellule overesprimenti ER β (MCF-7/ER β) già dopo 24h di trasfezione anche in assenza del DPN. Un ulteriore decremento è stato ribadito dopo 48h di incubazione (Fig.8).

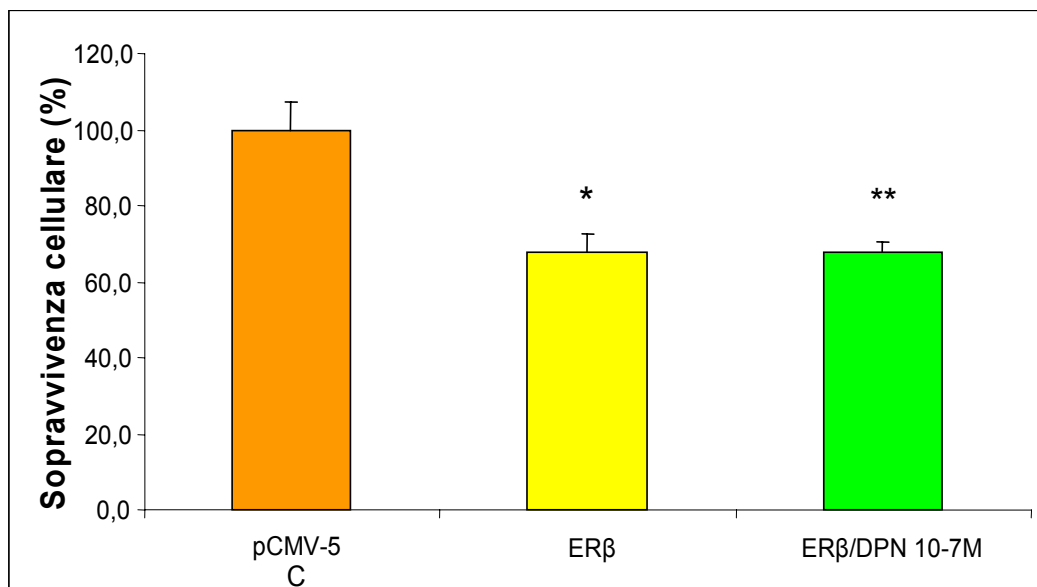


Fig.7: Effetti dell'overespressione di ER β sulla sopravvivenza di cellule MCF-7 dopo 24h di trattamento con DPN alla concentrazione di 10^{-7} M. I dati sono rappresentativi di N=6 esperimenti condotti in triplicato e sono espressi in termini percentuali rispetto al controllo. *p<0,05; **p<0,005.

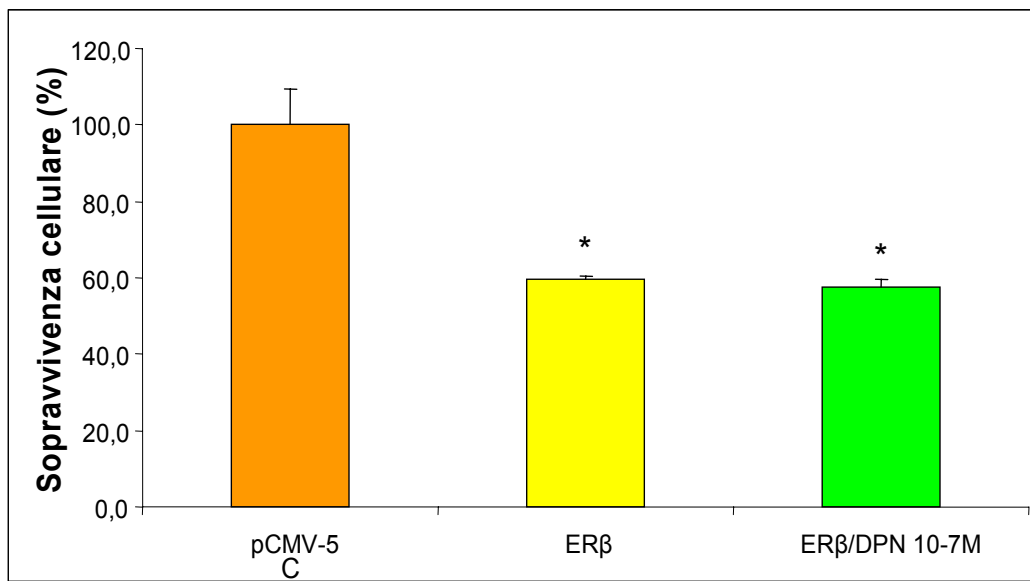
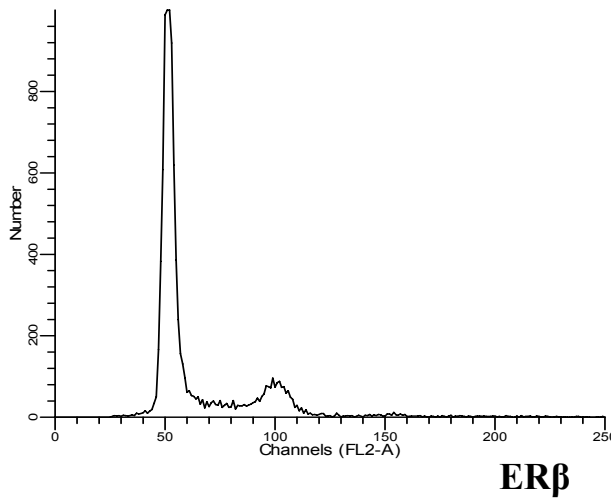


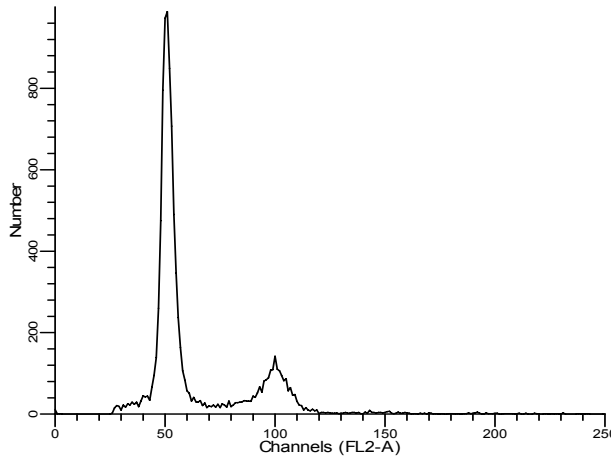
Fig.8: Effetti dell'overespressione di ER β sulla sopravvivenza di cellule MCF-7 dopo 48h di trattamento con DPN alla concentrazione di 10^{-7} M. I dati sono rappresentativi di N=6 esperimenti condotti in triplicato e sono espressi in termini percentuali rispetto al controllo. * $p < 0,001$.

I risultati proliferativi ben si correlano con l'analisi del ciclo cellulare eseguita al citofluorimetro, in cui si evidenzia un blocco in fase G2/M nelle cellule overesprimenti il ER β , sia in assenza che in presenza del ligando DPN (Fig.9).

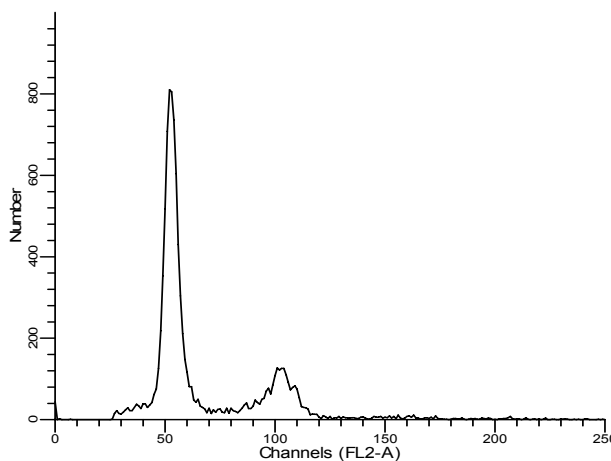
C



Diploid: 100.00%
Dip G0/G1: 76.04%
Dip S: 19.37%
Dip G2/M: 4.59%
% CV: 2.5



Diploid: 100.00%
Dip G0/G1: 77.05%
Dip S: 14.95%
Dip G2/M: 8.00%
% CV: 2.8



Diploid: 91.85%
Dip G0/G1: 75.87%
Dip S: 16.13%
Dip G2/M: 8.00%
% CV: 2.9

Fig.9: Effetti del ERβ sul ciclo cellulare di MCF-7 dopo 48h di trattamento con DPN alla concentrazione di 10⁻⁷M. I dati sono rappresentativi di N=3 esperimenti indipendenti.

Effetti del Recettore Estrogenico β su IRS-1

Sulla base dei precedenti risultati, abbiamo voluto analizzare i probabili effetti della espressione di ER β sul segnale mitogenico insulino-indotto, attraverso la valutazione del principale substrato proteico del recettore insulinico: IRS-1.

Dapprima abbiamo valutato le risposte di transattivazione indotte dall'espressione di ER β sul promotore di IRS-1. A tal proposito le cellule MCF-7 sono state co-trasfettate con i costrutti p-IRS-1-luc, pCMV-5-hER β ed il plasmide reporter PRL-CMV contenente quest'ultimo il gene codificante la renilla luciferasi, la cui attività è necessaria per normalizzare l'efficienza di trasfezione.

Tutti gli studi di trasfezione sono stati effettuati mediante l'utilizzo di FuGENE 6, secondo il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

I dati hanno messo in evidenza come l'espressione ectopica di ER β su cellule MCF-7 induceva un decremento della risposta di transattivazione del promotore genico di IRS-1 (Fig.10). Anche in questo caso, l'effetto è indipendente dal ligando.

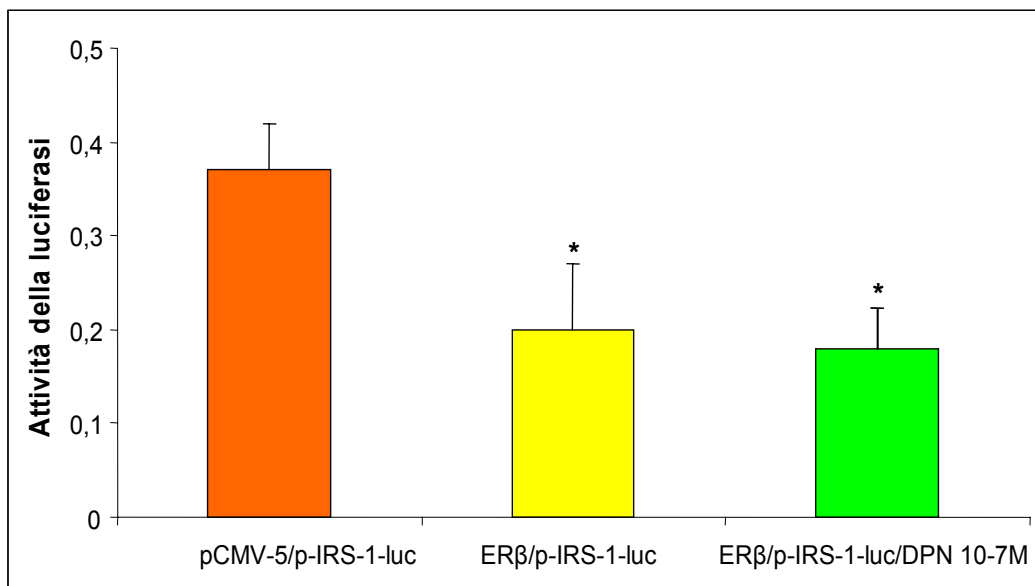


Fig.10: Effetti dell'overespressione di ER β sul promotore di IRS-1(p-IRS-1-luc) in presenza o in assenza del ligando specifico DPN in MCF-7. I risultati sono espressi come unità relative di luciferasi e sono rappresentativi di almeno tre esperimenti ripetuti in triplicato. * $p < 0,001$.

Al fine di identificare i putativi siti di regolazione del ER β presenti su tale regione promotrice, abbiamo riproposto gli esperimenti di trasfezione sui costrutti genici ottenuti per delezione dal full-length del promotore di IRS-1.

I costrutti utilizzati sono:

p-IRS-1A-luc contenente 1 emisequenza ERE, 6 AP-1 e 2 Sp1

p-IRS-1B-luc contenente 3 emisequenze ERE, 10 AP-1 e 3 Sp1

p-IRS-1C-luc contenente 4 emisequenze ERE, 11 AP-1 e 4 Sp1

p-IRS-1D-luc contenente 1 AP-1 e 6 Sp1.

L'analisi a livello dei costrutti ha messo in evidenza una regolazione negativa sull'attività trascrizionale del promotore solo quando si trasfettava il plasmide p-IRS-1D-luc ricco in GC box che ribadiva la stessa risposta del full-length (Fig.11).

I risultati ottenuti indicano che il decremento dell'attività del promotore di IRS-1 ER β -mediato sembrerebbe richiedere la presenza delle emisequenze ERE (presenti sull'intero costrutto) nonché che dei siti Sp1 contenuti nel minimal promoter p-IRS-1D-luc.

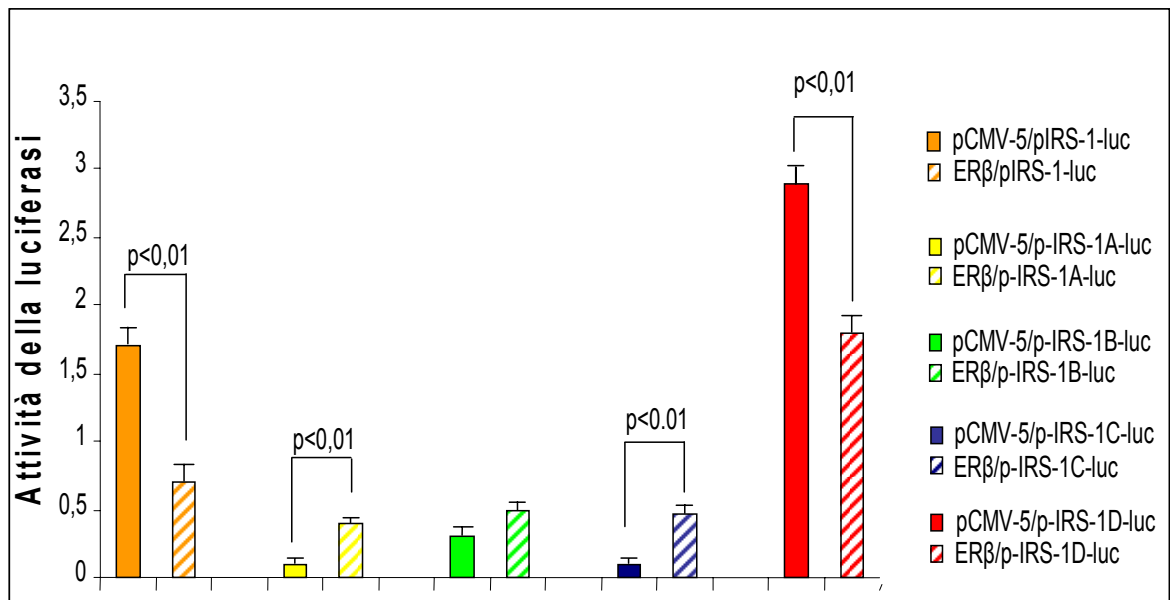
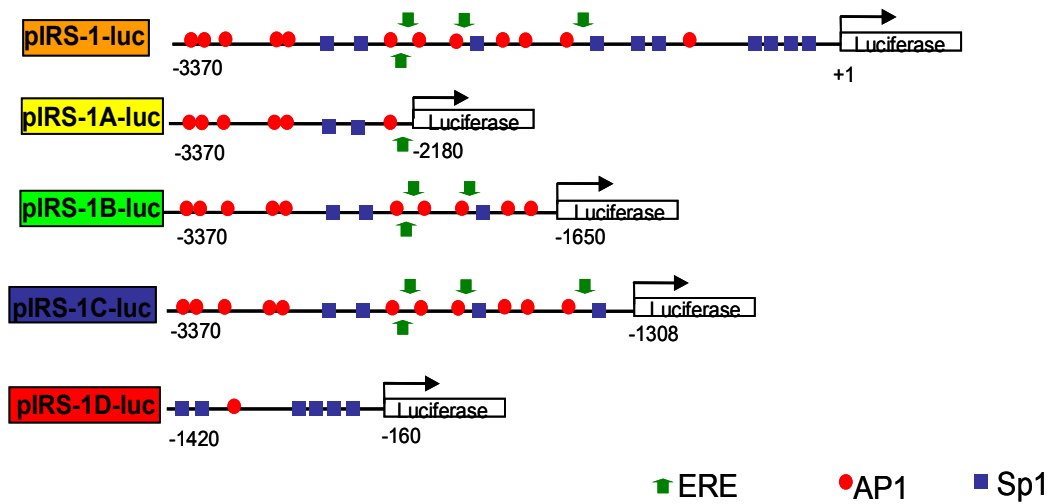


Fig.11: Risposte indotte dal ER β sulla transattivazione dei costrutti p-IRS-1A-luc, p-IRS-1B-luc, p-IRS-1C-luc e p-IRS-1D-luc I risultati sono espressi come unità relative di luciferasi e sono rappresentativi di almeno tre esperimenti ripetuti in triplicato.

Il passo successivo è stato quello di studiare gli effetti del ER β sia sui livelli di mRNA che sul contenuto proteico di IRS-1, attraverso esperimenti di RT-PCR e Western Blotting.

Gli esperimenti di trasfezione transiente sono stati eseguiti utilizzando due diverse quantità di pCMV-5-hER β , 1,5 e 3 μ g, allo scopo di verificare una qualche modulazione dipendente dalla dose di plasmide utilizzata. Le cellule trasfettate sono state trattate e non per 24h con i due ligandi specifici di ER α e ER β , rispettivamente estradiolo e DPN alla concentrazione di 10^{-7} M (Fig.12).

L'overespressione della proteina ER β induce un consistente decremento dell'mRNA di IRS-1 già alla più bassa concentrazione di plasmide utilizzata (1,5 μ g). Tale risultato è indipendente dalla stimolazione delle cellule con il DPN e con l'estradiolo. Come si può osservare, le cellule di controllo, sottoposte a trattamento con estradiolo mostrano un incremento dei livelli di mRNA di IRS-1, confermando in tal caso un effetto positivo dell'ormone, mediato dall'ER α endogeno sul prodotto di trascrizione. Nel pannello centrale della figura 12 sono mostrati i livelli di mRNA del ER β nelle cellule trasfettate con il plasmide pCMV-5-hER β che validano l'efficienza di trasfezione.

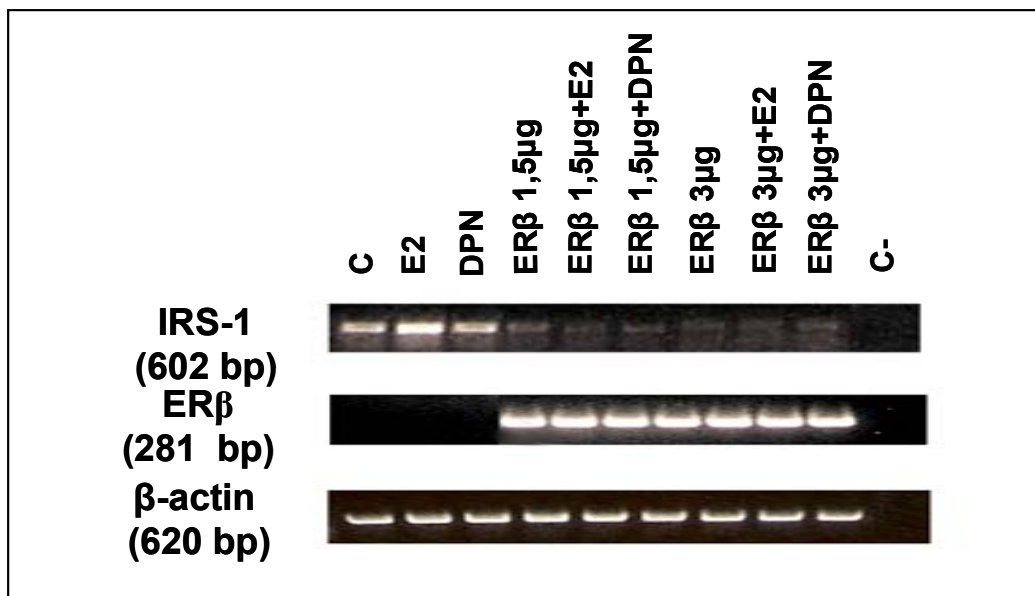


Fig.12: Effetti dell'espressione ectopica di ER β sull'mRNA di IRS-1 in cellule MCF-7 in seguito a trattamento con E $_2$ e DPN alla concentrazione di 10^{-7} M. I livelli di mRNA di ER β sono stati valutati per verificare l'efficienza della trasfezione. La β -actina è stata utilizzata come controllo di "loading" mentre come controllo negativo è stato utilizzato l'RNA senza l'aggiunta della trascrittasi inversa. Questi risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Nelle stesse condizioni sperimentali abbiamo eseguito il Western Blotting per valutare l'espressione proteica di IRS-1 (Fig.13).

I dati ottenuti hanno confermato i precedenti risultati dell'RT-PCR indicando come l'espressione ectopica di ER β , in MCF-7 induca un consistente decremento del substrato proteico IRS-1 (Fig.13).

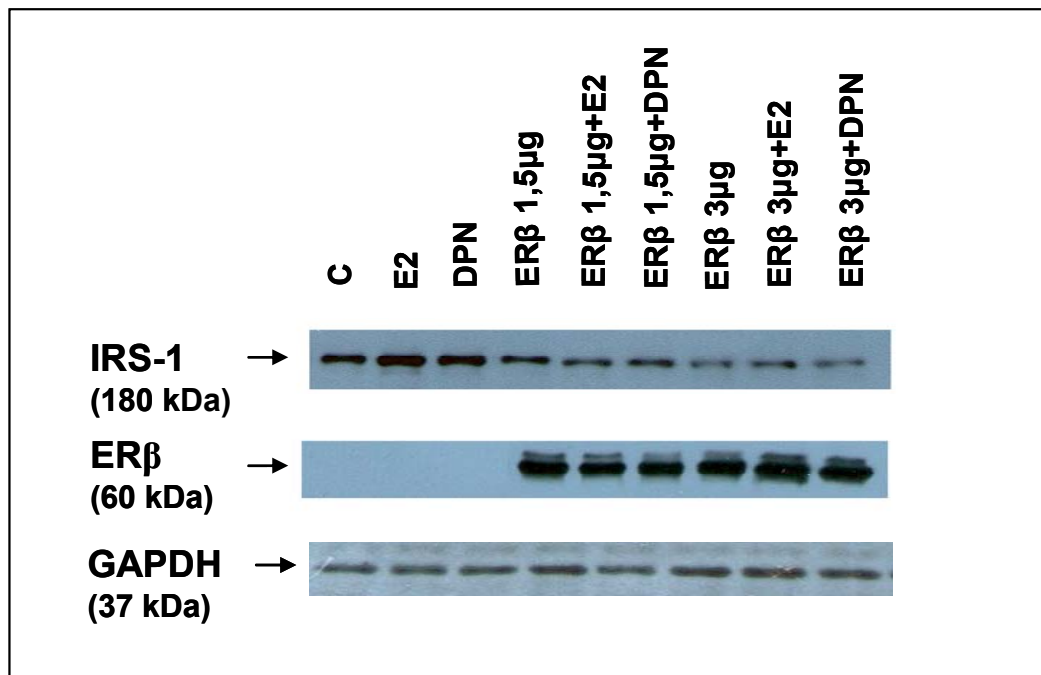


Fig.13: Effetti dell'espressione ectopica di ER β sulla proteina IRS-1 in MCF-7 in seguito a trattamento con E₂ e DPN alla concentrazione di 10⁻⁷M. I livelli della proteina ER β sono stati valutati per verificare l'efficienza della trasfezione. L'espressione del GAPDH è stata utilizzata come controllo di "loading". Questi risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Tale decremento non è legato agli eventi catabolici che regolano il normale turn-over proteico intracellulare ma dipende da una precisa regolazione genica di ER β su IRS-1. Infatti, l'utilizzo dell'inibitore del proteasoma MG-132 incubato per le ultime 2h alla concentrazione di 10 μ M, su MCF-7/ER β riconferma lo stesso decremento ottenuto in sua assenza (Fig.14).

I dati nel complesso mostrano come il ER β , attraverso un meccanismo genomico, sia in grado di down-regolare i livelli di IRS-1 comportando, di conseguenza, una diminuzione del segnale mitogenico indotto dall'insulina/IGF-I a supporto dei dati proliferativi prima illustrati.

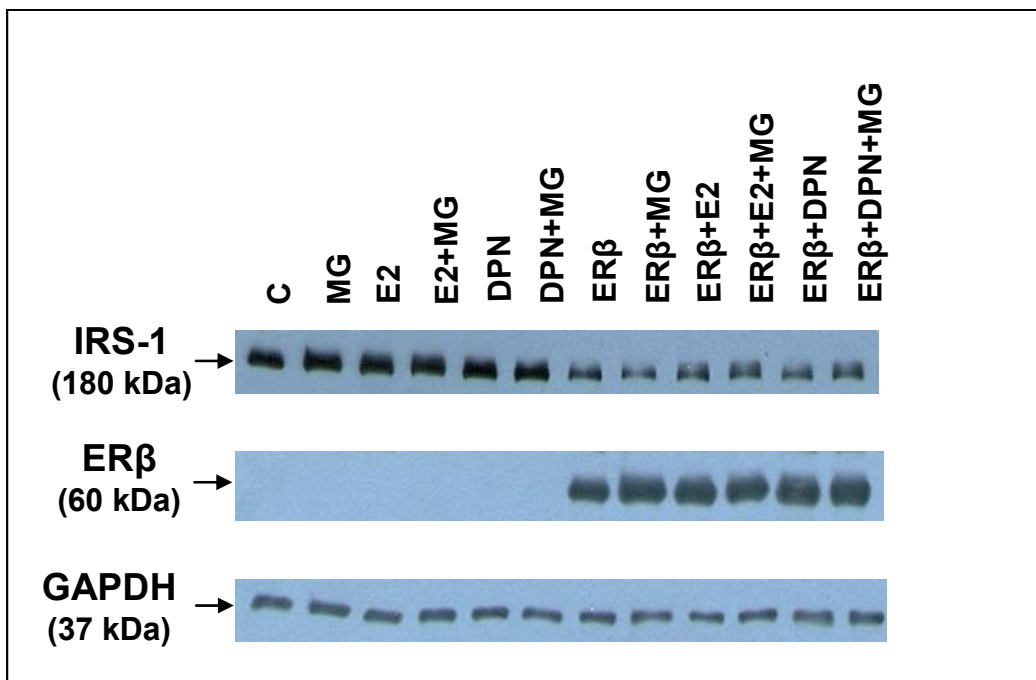


Fig.14: Effetti dell'inibitore del proteasoma MG-132 sulla proteina IRS-1. Le cellule MCF-7 sono state trattate con E₂ e DPN alla concentrazione di 10⁻⁷M per 24h e incubate per le ultime 2h con MG-132 alla concentrazione di 10 μ M. I livelli della proteina ER β sono stati valutati per verificare l'efficienza della trasfezione. L'espressione del GAPDH è stata utilizzata come controllo di "loading". Questi risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Effetti del recettore estrogenico β su $ER\alpha$

Tenendo in considerazione i precedenti risultati che hanno indicato come l'espressione ectopica di $ER\beta$ in MCF-7 comporti una significativa riduzione della proteina IRS-1, contrapponendosi così, alle risposte $ER\alpha$ -indotte sulla stessa proteina, nel prosieguo dell'indagine abbiamo voluto studiare se l' $ER\beta$ di "per sé" potesse avere effetti diretti su $ER\alpha$.

In tale fase, rispettando le stesse tappe sperimentali eseguite per IRS-1, abbiamo condotto su cellule MCF-7 esperimenti di cotrasfezione utilizzando i plasmidi pCMV-5-h $ER\beta$ ed il promotore di $ER\alpha$.

L'over-espressione di $ER\beta$ down-regola la transattivazione del promotore di $ER\alpha$, anche in assenza del suo ligando specifico (Fig.15).

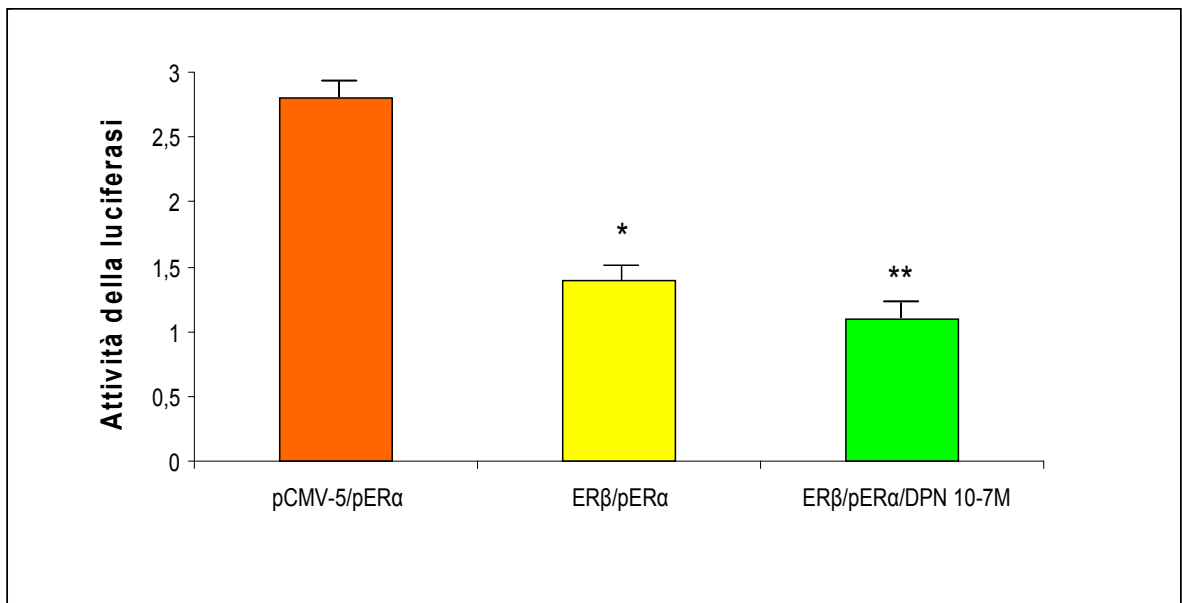


Fig.15: Effetti dell'overespressione di $ER\beta$ sul promotore di $ER\alpha$ (pER α) in presenza o in assenza del ligando specifico DPN in MCF-7.

I risultati sono espressi come unità relative di luciferasi e sono rappresentativi di almeno tre esperimenti ripetuti in triplicato. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$

Conseguentemente, i livelli di mRNA risultano significativamente diminuiti e direttamente correlati con la quantità di plasmide pCMV-5-hER β trasfettato (Fig.16).

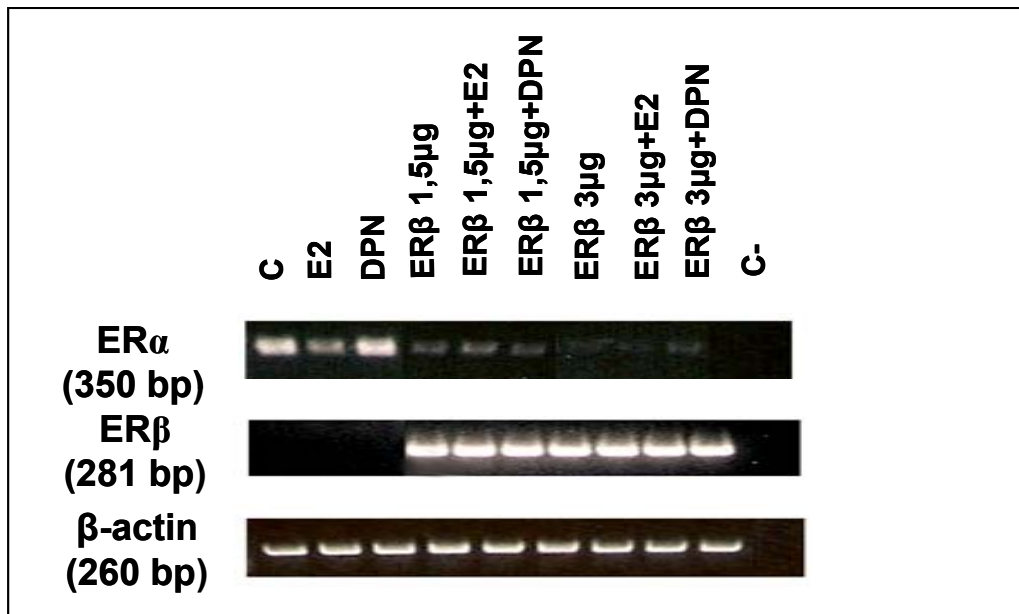


Fig.16: Effetti dell'espressione ectopica di ER β sull'mRNA di ER α in cellule MCF-7 in seguito a trattamento con E $_2$ e DPN alla concentrazione di 10 $^{-7}$ M. I livelli di mRNA di ER β sono stati valutati per verificare l'efficienza della trasfezione. La β -actina è stata utilizzata come controllo di "loading" mentre come controllo negativo è stato utilizzato l'RNA senza l'aggiunta della trascrittasi inversa. Questi risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

La valutazione dei livelli proteici del recettore estrogenico α , eseguita tramite Western Blotting, ci mostra, anche in tal caso, che l'overespressione di ER β in cellule MCF-7 induce un consistente decremento di ER α sia in assenza che in presenza di DPN o di Estradiolo (Fig.17).

La regolazione negativa sottende un meccanismo genico in quanto lo stesso decremento proteico, come mostrato in figura, viene riconfermato anche in seguito ad incubazione con MG-132 (Fig.18).

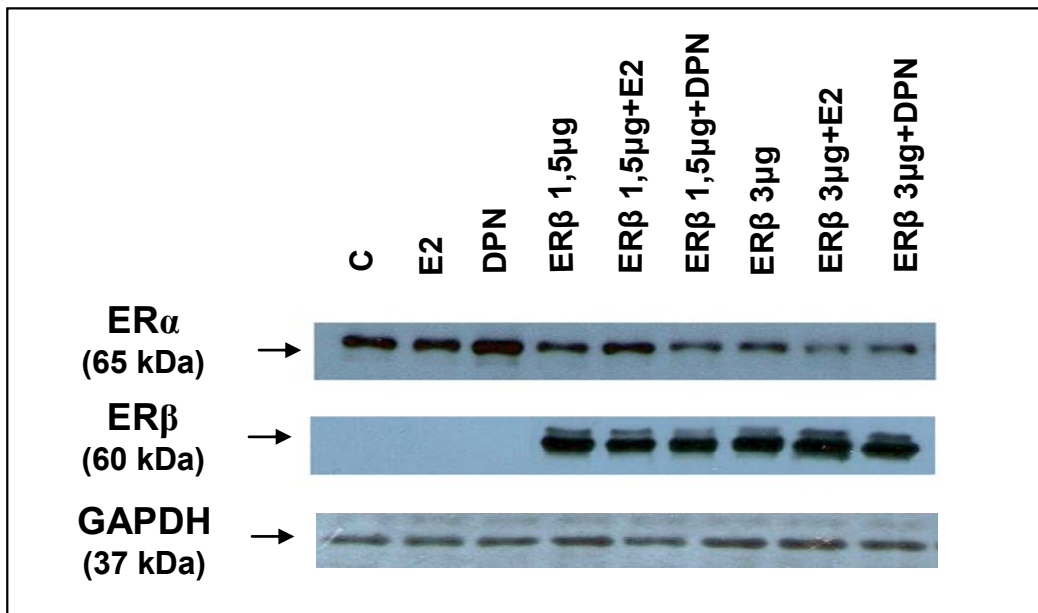


Fig.17: Effetti dell'espressione ectopica di ERβ sulla proteina ERα in MCF-7 in seguito a trattamento con E₂ e DPN alla concentrazione di 10⁻⁷M. I livelli della proteina ERβ sono stati valutati per verificare l'efficienza della trasfezione. L'espressione del GAPDH è stata utilizzata come controllo di "loading" Questi risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

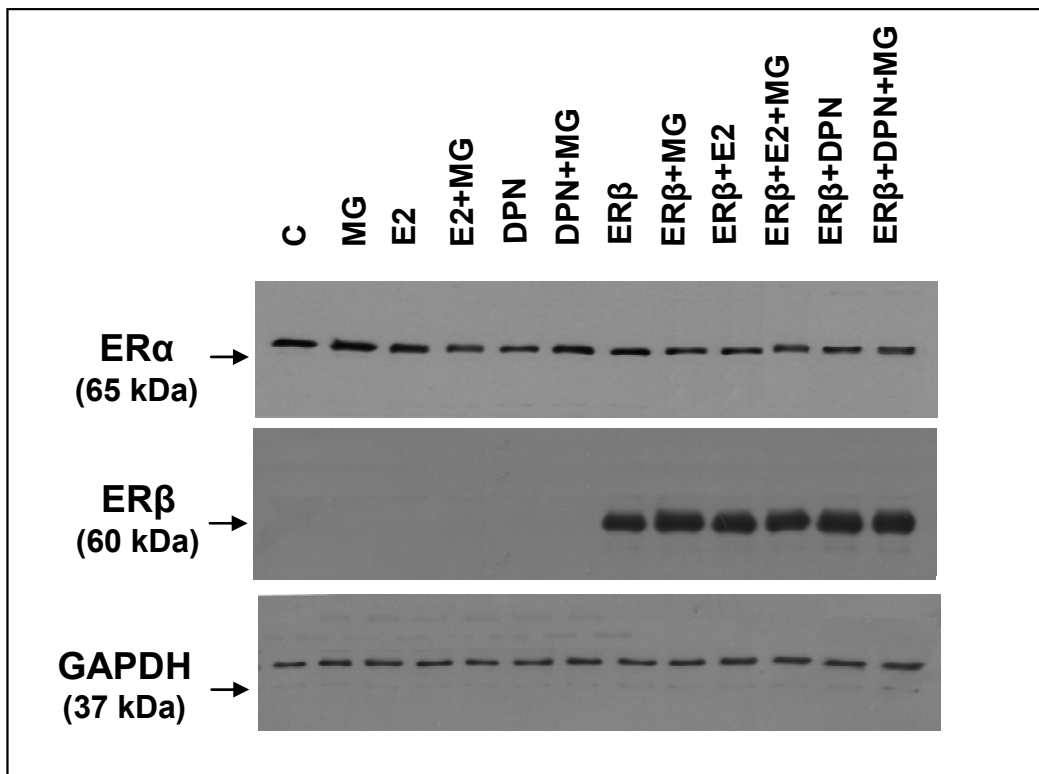


Fig.18: Effetti dell'inibitore del proteasoma MG-132 sulla proteina ER α . Le cellule MCF-7 sono state trattate con E $_2$ e DPN alla concentrazione di 10^{-7} M per 24h e incubate per le ultime 2 h con MG-132 alla concentrazione di 10μ M. I livelli della proteina ER β sono stati valutati per verificare l'efficienza della trasfezione. L'espressione del GAPDH è stata utilizzata come controllo di "loading". Questi risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Interazione tra le proteine nucleari e le sequenze ERE presenti sul promotore di ER α

Una volta stabilito che il ER β è in grado di regolare negativamente a livello genico il recettore estrogenico α , abbiamo voluto investigare il meccanismo molecolare coinvolto in questo evento. Con questo obiettivo, sono stati condotti esperimenti di EMSA (Electroforetic Mobility Shift Assay) focalizzando la nostra attenzione sulle emisequenze ERE presenti sul promotore di ER α come probabili target dell'azione del ER β .

Gli estratti nucleari di cellule MCF-7 sono stati incubati con oligonucleotidi marcati con ^{32}P corrispondenti alla emisequenza ERE in posizione -885 -860 sul promotore di $\text{ER}\alpha$.

La figura 19 mostra la formazione di uno specifico legame tra la sequenza ERE usata come probe e gli estratti nucleari cellulari (linea 1).

Per determinare la specificità del legame, la miscela di reazione è stata preincubata con l'oligonucleotide non marcato 100 volte in eccesso rispetto a quello marcato, che porta alla scomparsa della banda (linea 2).

L'estradiolo, come atteso, è in grado di incrementare il legame tra le proteine nucleari e le emisequenze ERE marcate (linea 4), mentre l'overespressione di $\text{ER}\beta$, decrementa in modo consistente la formazione del complesso DNA-proteina (linea 5).

La specificità del legame è stata testata tramite l'utilizzo degli anticorpi anti $\text{ER}\alpha$ ed anti $\text{ER}\beta$ (linee 7, 8, 9 e 10), che riconoscendo le rispettive proteine recettoriali, inducono la formazione di un complesso molecolare più pesante che migra meno velocemente e dà origine così ad un supershift della banda di legame.

Inoltre, come controllo positivo, sono state utilizzate le corrispettive proteine ricombinanti $\text{ER}\beta$ ed $\text{ER}\alpha$ (linee 11 e 12) che mostrano lo stesso shift degli estratti nucleari di controllo.

Analoghi risultati sono stati ottenuti utilizzando come probe l'ERE in posizione -858 -832 (Fig.20).

Anche in tal caso in MCF-7/ $\text{ER}\beta$, si osserva una riduzione del complesso di legame rispetto agli estratti di controllo.

Gli stessi esperimenti di EMSA sono stati riproposti su un'altra linea cellulare di tumore mammario, le ZR-75, utilizzando come probe l'ERE in posizione -858 -832 (Fig.21).

Analogamente a quanto dimostrato nelle MCF-7, l'espressione ectopica di $\text{ER}\beta$ riduce l'interazione DNA(ERE)-proteine nucleari.

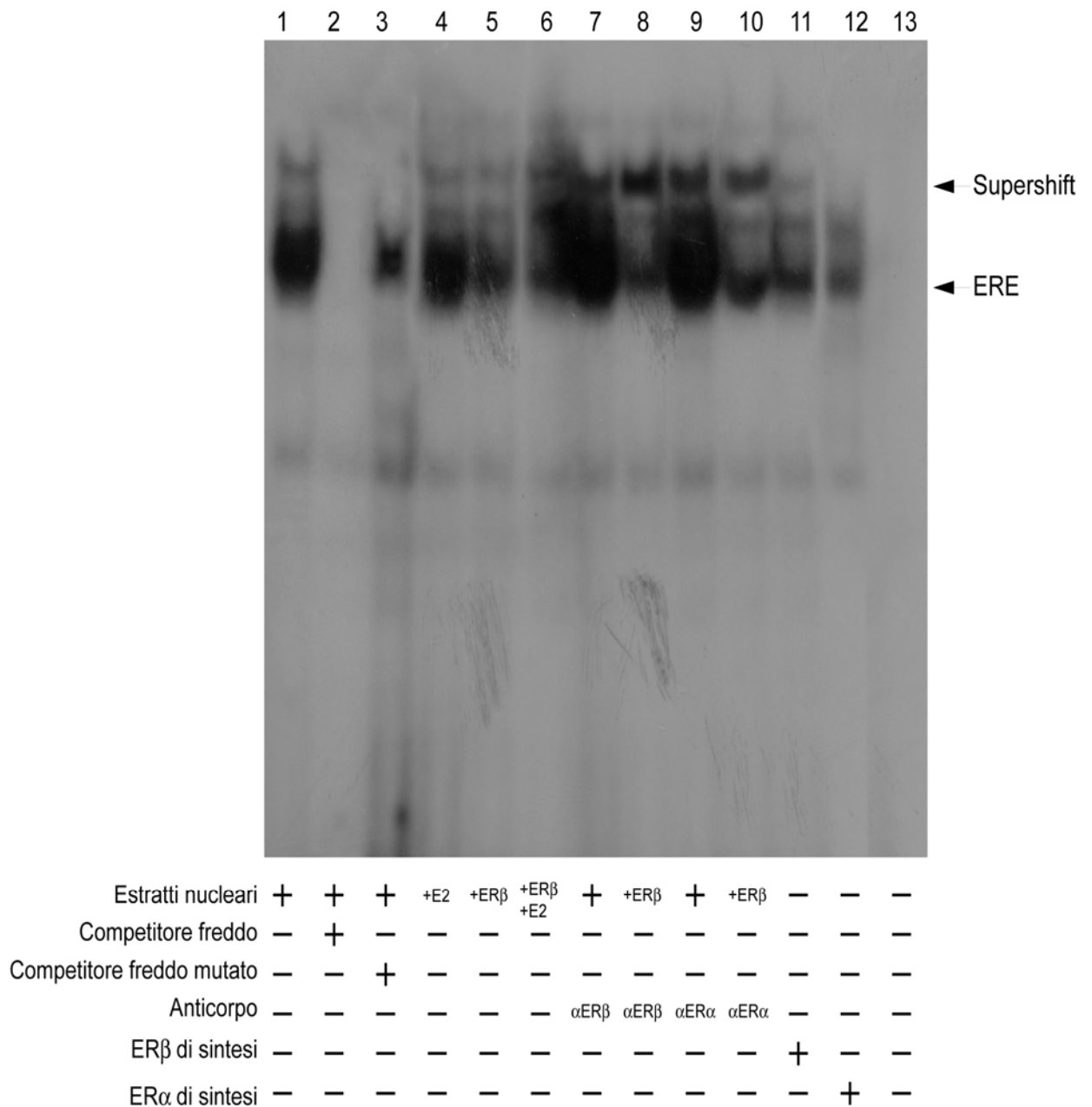


Fig.19: Interazione tra le proteine nucleari e la sequenza ERE in posizione -885 -860 sul promotore di ER α in cellule MCF-7 ed MCF-7/ER β . Le cellule sono state trattate con E₂ 10⁻⁷ M per 24 h. Gli estratti nucleari (linee 1-10) sono stati incubati con oligonucleotidi marcati con ³²P corrispondenti alla emisequenza ERE. Gli esperimenti di competizione sono stati effettuati utilizzando un eccesso di competitore freddo (linea 2) e di competitore freddo mutato (linea 3). La specificità del legame è stata testata tramite l'utilizzo degli anticorpi anti ER β (linee 7 e 8) e anti ER α (linee 9 e 10), nonché delle proteine di sintesi ER β e ER α .(linee 11 e 12). La linea 12 contiene il probe da solo. Questi risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

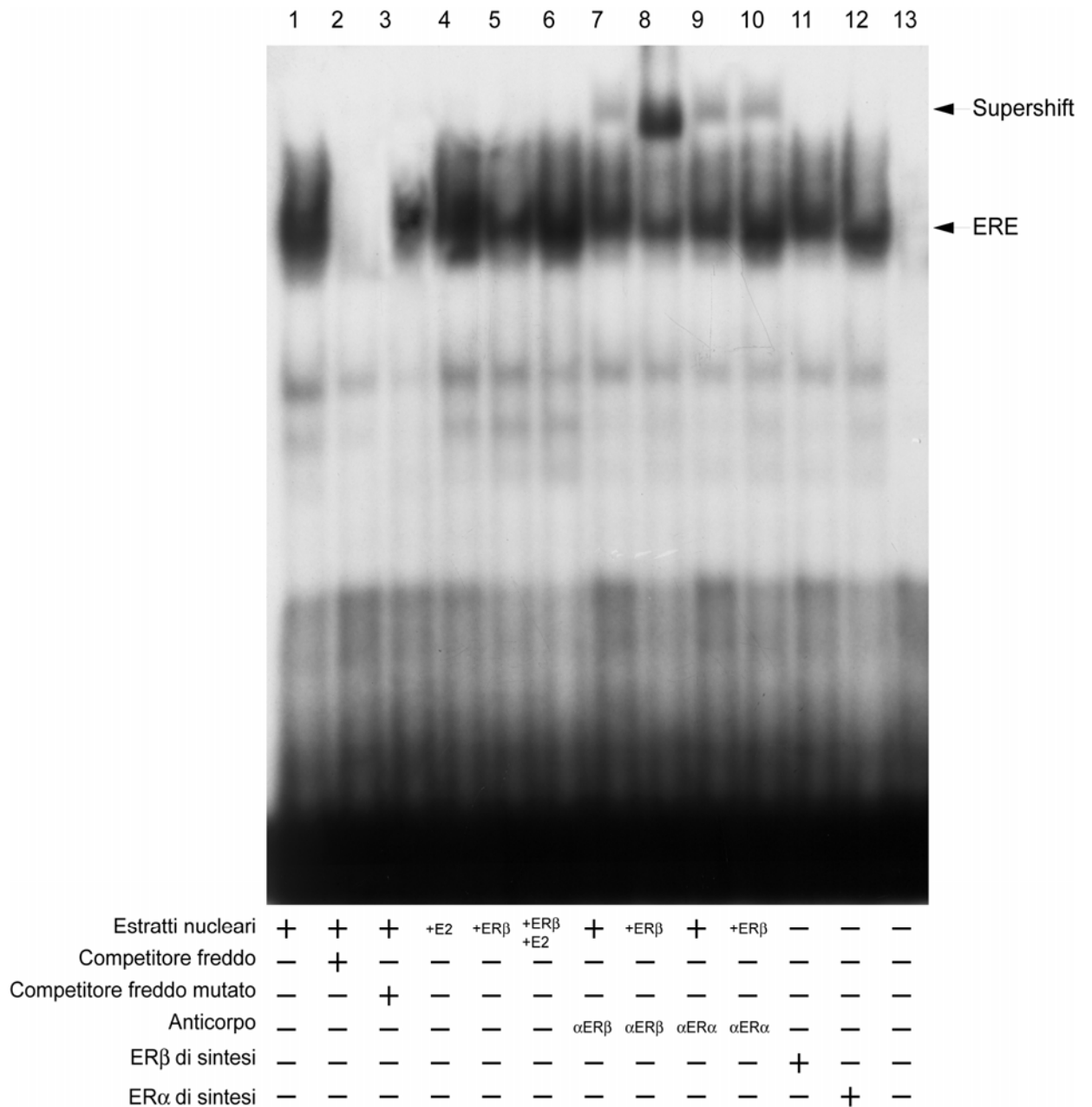


Fig.20: Interazione tra le proteine nucleari e la sequenza ERE in posizione -858 -832 sul promotore di ER α in cellule MCF-7 ed MCF-7/ER β . Le cellule sono state trattate con E₂ 10⁻⁷ M per 24 h. Gli estratti nucleari (linee 1-10) sono stati incubati con oligonucleotidi marcati con ³²P corrispondenti alla emisequenza ERE. Gli esperimenti di competizione sono stati effettuati utilizzando un eccesso di competitore freddo (linea 2) e di competitore freddo mutato (linea 3). La specificità del legame è stata testata tramite l'utilizzo degli anticorpi anti ER β (linee 7 e 8) e anti ER α (linee 9 e 10), nonché delle proteine di sintesi ER β e ER α .(linee 11 e 12). La linea 12 contiene il probe da solo. Questi risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

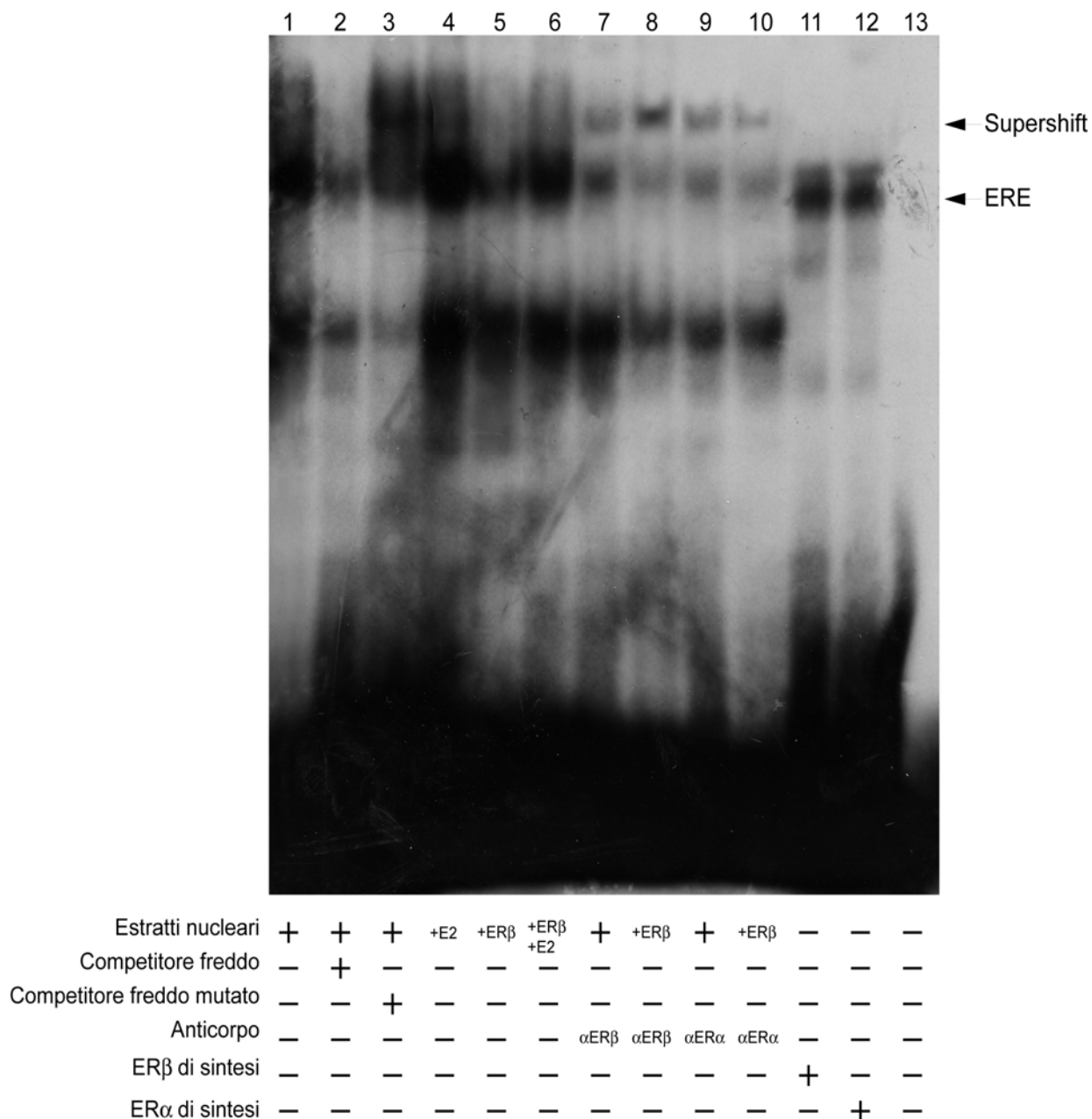


Fig.21: Interazione tra le proteine nucleari e la sequenza ERE in posizione -858 -832 sul promotore di ER α in cellule ZR-75 e ZR-75/ER β . Le cellule sono state trattate con E $_2$ 10 $^{-7}$ M per 24 h. Gli estratti nucleari (linee 1-10) sono stati incubati con oligonucleotidi marcati con 32 P corrispondenti alla emisequenza ERE. Gli esperimenti di competizione sono stati effettuati utilizzando un eccesso di competitore freddo (linea 2) e di competitore freddo mutato (linea 3). La specificità del legame è stata testata tramite l'utilizzo degli anticorpi anti ER β (linee 7 e 8) e anti ER α (linee 9 e 10), nonché delle proteine di sintesi ER β e ER α .(linee 11 e 12). La linea 12 contiene il probe da solo. Questi risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

“Recruitment” del corepressore NCoR a livello del complesso molecolare ER β /ERE sul promotore di ER α

Infine, per valutare se la ridotta interazione tra ER β e le emisequenze ERE sul promotore di ER α fosse dovuta all'intervento di qualche fattore nucleare in grado di indebolire e/o compromettere tale “binding”, abbiamo eseguito esperimenti di ChIP (Chromatin Immunoprecipitation).

Tra i vari fattori nucleari capaci di reprimere l'attività trascrizionale genica, il corepressore NCoR è quello principalmente implicato nella regolazione negativa dei recettori nucleari steroidei.

Partendo da queste premesse l'analisi del ChIP è stata condotta su cellule MCF-7 e MCF-7/ER β stimulate o non con estadiolo e sottoposte a trattamento con formaldeide per consentire e nel contempo preservare il cross-link delle proteine nucleari al DNA. Successivamente i complessi molecolari sono stati estratti ed immunoprecipitati con un anticorpo specifico diretto verso NCoR. Il DNA così ottenuto è stato purificato e opportunamente amplificato utilizzando primers che mappano le sequenze ERE sul promotore di ER α .

I risultati mostrati in figura 22 indicano uno specifico “recruitment” di NCoR in cellule MCF-7 overesprimenti ER β , a livello dei siti ERE. Tale effetto risulta reversato dal trattamento con estradiolo.

Gli input mostrati in figura fungono da controllo di “loading”; in tal caso, 5 μ l di DNA non sottoposti ad immunoprecipitazione sono stati amplificati utilizzando gli stessi primers e caricati sul gel.

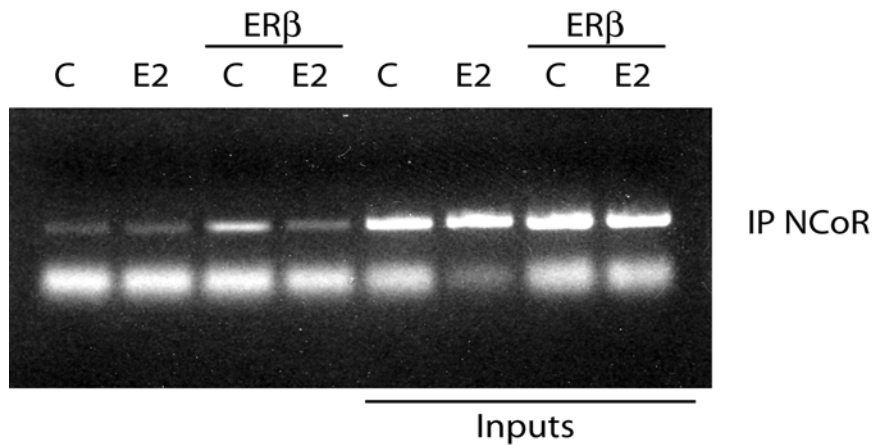


Fig.22: “Recruitment” del corepressore NCoR a livello del complesso molecolare ER β /ERE sul promotore di ER α nelle cellule MCF-7. Le cellule sono state trattate con E₂ 10⁻⁷ M per 2 h., sottoposte a trattamento con formaldeide, lisate e immunoprecipitate con un anticorpo specifico diretto verso NCoR. Il DNA ottenuto, attraverso una estrazione fenolo/cloroformio è stato purificato e opportunamente amplificato utilizzando primers specifici per le sequenze ERE. Questi risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

In base ai dati ottenuti si può postulare un ipotetico meccanismo di regolazione del promotore di ER α da parte del recettore estrogenico β sui siti ERE.

Il legame del recettore estrogenico β alle sequenze ERE verrebbe impedito dal reclutamento del corepressore NCoR, che indurrebbe l’inibizione dell’attività trascrizionale del gene (Fig.23).

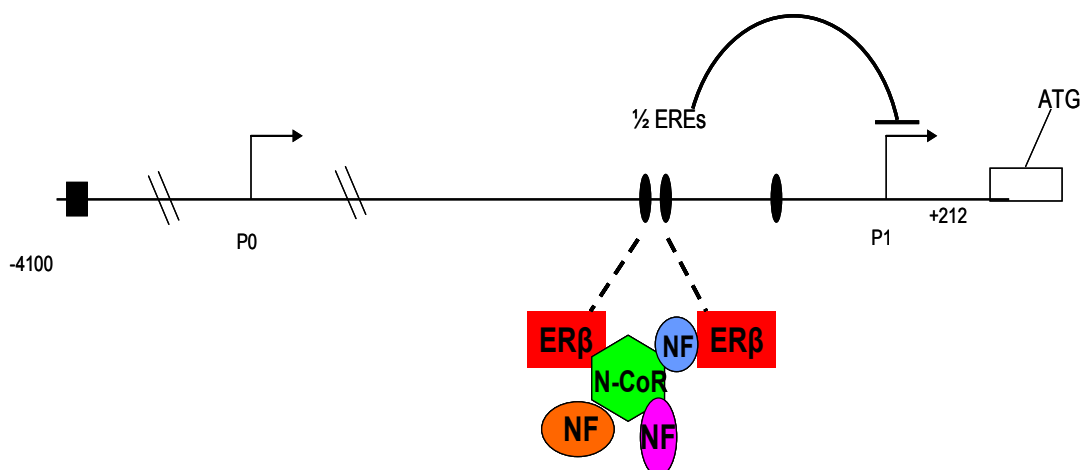


Fig.23: Ipotetico meccanismo di regolazione del promotore di ER α in cellule MCF-7 da parte del recettore estrogenico β sui siti ERE, in seguito al reclutamento di NCoR.

Discussione

La proliferazione della maggior parte dei tumori mammari è regolata da steroidi sessuali, attraverso l'attivazione dei recettori ormonali e da numerosi altri fattori autocrini e paracrini in grado di sinergizzare tra di loro.

E' da tempo documentato come il recettore estrogenico α , attivato dall'estradiolo, e il recettore per il fattore di crescita dell'Insuline-like-Growth-Factor I (IGF-I) (o anche dell'Insulina) interagendo funzionalmente tra loro siano in grado di indurre una iperespressione di molecole segnali che appartengono ad entrambi i pathways trasduzionali (Lee A.V., 1999; Yee D., 2000; Molloy A.C., 2000).

Tra queste possiamo ricordare IRS-1 (*Insuline Receptor Substrate 1*), una proteina trasduttrice del segnale mitogenico insulino-dipendente i cui livelli proteici sono mantenuti dal recettore estrogenico α .

Di contro, l'insulina è in grado di up-regolare i livelli del recettore estrogenico α , determinando così un feed-back loop positivo tra i due segnali.

Nel tumore mammario e in altre forme tumorali quali tumore del colon, dell'ovaio, della prostata, oltre alla presenza del ER α è stato identificato il ER β che contrapponendosi al primo induce risposte antagoniste (Hartman J, 2009).

Proprio in questi fenotipi cellulari trasformati, un aumento del rapporto ER α /ER β è indicativo del grado di malignità del tumore e della sua invasività (Leygue E.H., 1998).

Nel presente studio, abbiamo valutato il ruolo del ER β sulla cinetica proliferativa di una linea cellulare di tumore mammario MCF-7 e sul segnale insulinico, attraverso lo studio del suo principale substrato proteico IRS-1.

I risultati ottenuti in questa prima fase di indagine hanno dimostrato che l'overespressione transiente del ER β in cellule MCF-7 induce una inibizione della crescita cellulare bloccando le cellule nella fase G2/M del ciclo mitotico. Tale inibizione è indipendente dal trattamento con il ligando DPN, specifico per il ER β .

Questi risultati richiamano ulteriori dati della letteratura che hanno mostrato come il ER β in MCF-7 causava un arresto nella fase G2 del ciclo cellulare con la riduzione di c-Myc e l'induzione di p21 e di p27, entrambi inibitori delle cicline. Questi autori hanno altresì dimostrato che l'espressione costitutiva di ER β in MCF-7 causava in modelli xenograft, la regressione del tumore (Paruthiyil S., 2004).

Le risposte indotte da ER β , come da noi evidenziato, sono indipendenti dal ligando. Analogamente a quanto riportato in altri contesti cellulari, in questo processo sembrerebbero coinvolti meccanismi di fosforilazione a livello della porzione aminoterminale dello stesso recettore indotti da chinasi quali le MAPK (Kato S., 1995; Tremblay A., 1999, Ali S., 2002,).

La fosforilazione del dominio AF-1 di ER β favorirebbe il “recruitment” del coattivatore nucleare SRC-1 cui segue l’attivazione trascrizionale (Tremblay A., 1999).

L’overespressione di ER β nelle cellule MCF-7 induce un decremento di IRS-1 sia a livello di mRNA che di proteina.

La diminuzione proteica non è dovuta ad un aumento del turn-over catabolico intracellulare in quanto il decremento persiste anche in presenza dell’inibitore del proteosoma MG-132, tale dato è ulteriormente confermato anche dall’mRNA.

Inoltre, i dati di trasfezione hanno messo in evidenza una modulazione negativa della transattivazione del promotore di IRS-1 da parte di ER β dimostrando altresì una regolazione genica a livello delle emisequenze ERE e dei siti Sp1 presenti sullo stesso promotore.

Questi ultimi risultati, unitamente a quanto già precedentemente pubblicato ((Panno M.L., 2006) dimostrano che IRS-1 è un target elettivo sia dell’azione positiva del ER α che dell’azione inibitoria del ER β .

Sulla scorta di tali dati, possiamo giustificare le risposte negative indotte dal ER β sulla crescita delle cellule MCF-7, in accordo con quanto osservato da diversi autori anche in altri contesti cellulari (Lazennec G., 2001; Bardin A., 2004; Strom A., 2004).

Lindberg e coll. (Lindberg M.K., 2003) hanno riportato come in alcuni tessuti di topo l’espressione di ER β riduca la trascrizione di geni ER α -indotti sottolineando così l’esistenza di un antagonismo funzionale tra i due sottotipi recettoriali.

L’espressione ectopica di ER β in cellule tumorali mammarie come da noi esaminato, altera l’equilibrio funzionale esistente tra ER α e IR/IRS-1.

Sulla base di questi risultati abbiamo voluto analizzare se il recettore estrogenico β potesse “di per sè” influenzare l’attività trascrizionale di ER α .

A tale scopo, in cellule MCF-7/ER β abbiamo eseguito esperimenti di trasfezione transiente utilizzando il promotore di ER α .

L'overespressione di ER β down-regola la transattivazione del promotore di ER α anche in assenza del suo ligando specifico.

Ciò comporta una significativa riduzione dei livelli di mRNA e della stessa proteina. Ad ulteriore conferma di questo effetto genico i nostri risultati hanno messo in evidenza che la riduzione di ER α persisteva pur in presenza dell'inibitore del proteasoma MG-132.

Per la prima volta si dimostra che ER β agisce da dominante negativo dell'attività trascrizionale di ER α .

Sono proprio questi dati che giustificano il meccanismo attraverso cui il ER β è in grado di down-regolare le risposte ER α -indotte.

Infatti in cellule HeLa l'estradiolo, legandosi al recettore estrogenico α , attiva la trascrizione del gene della ciclina D1, mentre la inibisce attraverso il ER β (Liu M.M., 2002).

La ciclina D1 è un fattore chiave nel controllo della transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare e un suo aumento di espressione è stato ritrovato nel 50% dei carcinomi mammari estrogeno-responsivi.

Per mettere in luce il meccanismo molecolare attraverso cui ER β regola ER α , abbiamo eseguito esperimenti di EMSA e di CHIP.

La prima tecnica ha permesso di studiare sul promotore di ER α la probabile interazione tra le emisequenze ERE, utilizzate come probes, e le proteine nucleari.

Nello specifico, i risultati hanno messo in evidenza su cellule MCF-7/ER β , un ridotto livello di coassociazione tra ER β ed emisequenze ERE, rispetto alle MCF-7 wild-type.

Questo risultato, riproposto utilizzando due diverse sequenze ERE, è stato ribadito anche in un'altra linea cellulare di tumore mammario, le cellule ZR-75.

Quest'ultimo dato ci induce ad ipotizzare che un meccanismo generale possa intervenire nella modulazione della regolazione genica presa in esame.

L'utilizzo della metodica CHIP, che si basa sullo studio dell'interazione DNA/proteine nucleari, ha permesso di identificare il co-repressore NCoR quale fattore proteico implicato nella regolazione negativa del promotore di ER α .

Infatti, NCoR risulta fortemente reclutato proprio a livello delle emisequenze ERE sul promotore di ER α nelle cellule MCF-7/ER β .

Tale “recruitment” avviene in assenza di stimolazione estrogenica; l’estradiolo, quando è presente, tenderebbe a legare l’ER α endogeno, favorendo così la trascrizione genica attraverso un mancato reclutamento di NCoR.

Il corepressore preso in esame è uno dei principali fattori di regolazione negativa dei recettori nucleari steroidei, implicato nella inibizione della trascrizione dei geni codificanti per:

- i) il recettore dell’acido retinoico (Weston AD, 2003),
- ii) il recettore dei glucocorticoidi (Hong W, 2009),
- iii) il recettore degli ormoni tiroidei (Astapova I, 2009).

Recentemente sulle cellule MCF-7 e ZR-75 è stato identificato NCoR come fattore reclutato a livello delle sequenze PRE (*Progesterone Responsive Elements*) presenti sul promotore di ER α per inibirne la trascrizione genica (De Amicis F, 2009).

Analogamente, la nostra indagine ha specificato che sullo stesso promotore il corepressore NCoR interviene disturbando l’interazione ERE/ER β in modo da controllare negativamente l’entità di trascrizione.

I risultati conseguiti in questo lavoro contribuiscono a chiarire in che modo l’over-espressione del recettore estrogenico β in cellule tumorali mammarie sia in grado di ridurre la trascrizione genica di ER α .

Lo squilibrio tra ER α /ER β nel tumore della mammella apre un nuovo campo di indagine per la terapia dei tumori ormono-dipendenti.

La ricerca in tal senso è solo agli inizi, considerata la recente scoperta del recettore di tipo β .

Nel complesso, le osservazioni sperimentali indicano che ER β , in virtù delle sue caratteristiche funzionali, può rappresentare un target molecolare importante per un nuovo approccio terapeutico rivolto a contrastare le risposte proliferative e di sopravvivenza delle cellule di carcinoma mammario

Bibliografia

Ali S, Coombes RC (2002) Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*; 2(2):101-12

Ali S., Metzger D., Bomert J .M., Chambon P. (1993). Modulation of transcriptional activation by ligand dependent phosphorylation of the human estrogen receptor A/B regress. *The EMBO Journal*, 12 (3): 1153-1160

Andò S., Panno M.L., Salerno M., Sisci D., Mauro L., Lanzino M., Surmacz E., (1998). Role of IRS-1 signaling in insulin-induced modulation of estrogen receptors in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 253: 315-319

Araki E., Haag III B.L., Matsuda K., Shichiri M., Kahn C.R. (1995). Characterization and regulation of the mouse insulin receptor substrate gene promoter. *Mol. Endocrinol.* 9(10): 1367-1379

Aronica SM, Katzenellenbogen BS. (1993) Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol*; 7(6):743-52

Astapova I, Dordek MF, Hollenberg AN (2009)The thyroid hormone receptor recruits NCoR via widely spaced receptor-interacting domains. *Mol Cell Endocrinol.*; 307(1-2):83-8

Bardin A, Hoffmann P, Boulle N, Katsaros D, Vignon F, Pujol P, Lazennec G. (2004) Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res*; 64(16):5861-9

Barkhem T, Nilsson S, Gustafsson JA (2004).Molecular mechanisms, physiological consequences and pharmacological implications of estrogen receptor action. *Am J Pharmacogenomics.*;4(1):19-28

Brandenberger AW, Tee MK, Jaffe RB. (1998) Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. *J Clin Endocrinol Metab*; 83(3):1025-8

Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res*; 61(2):632-40

Cheatam B., Kahn C.R. (1995). Cys647 in the insulin receptor is required for normal covalent interaction between α and β subunits and signal transduction. *Biol. Chem.* 267: 7108-7115

Clementi F., Fumagalli G. (1999). *Farmacologia generale e molecolare*. UTET

Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. (1997) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem.*; 272(32):19858-62

De Amicis F, Zupo S, Panno ML, Malivindi R, Giordano F, Barone I, Mauro L, Fuqua SA, Andò S. (2009) Progesterone receptor B recruits a repressor complex to a half-PRE site of the estrogen receptor alpha gene promoter. *Mol Endocrinol.* 23(4):454-65

Dechering K., Boersma C., Mosselman S. (2000) Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Current Med Chem.*;7(5):561-76

Dickson R.B, Lippman M.E. (1987). Estrogenic regulation of growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr. Rev.* 8: 29-43

Dickson R.B., Lippman M.E. (1995). Growth factors in breast cancer. *Endocr. Rev.* 16(5): 559-589

Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. (2003) Differential expression of the estrogen receptor beta (ERbeta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma. *Prostate.*;54(2):79-87

Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. (2000) Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* 15;60(2):245-8

Freedman L.P., Luisi B.F., Karszun Z.R., Basavappa R., Sigler P.B., Yamamoto K.R. (1988). The function and the structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA Binding domain. *Nature* 334: 543-546

Guerini V., Sau D., Scaccianoce E., Rusmini P., Ciana P., Maggi A.,Martini PG., Katzenellenbogen BS.,Martini L., Motta M., Poletti A The androgen derivative 5alphaandrostane-3beta,17beta-diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor beta subtype.*Cancer Res.* 2005; 65: 5445-5453

Gustafsson JA, Warner M (2000). Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74(5):245-8

Hall J. M., Couse J.F., Korach K.S. (2001). The multifaceted Mechanism of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *JBC* 5: 36869-36872

Hartman J, Ström A, Gustafsson JA (2009) Estrogen receptor beta in breast cancer-diagnostic and therapeutic implications. *Steroids.* (8):635-41

Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA, Haldosén LA. (2005) Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11.*Oncogene*; 24(44):6605-16

Henderson BE., Bernestein L., Ross RK.(2000) Hormones and the etiology of cancer. In: *Cancer Medicine*, 5th ed., Canada

Hong W, Baniahmad A, Li J, Chang C, Gao W, Liu Y. (2009) Bag-1M inhibits the transactivation of the glucocorticoid receptor via recruitment of corepressors. *FEBS Lett.*; 583(15):2451-6

Hu, X. and M.A. Lazar,(2000) Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 11: p. 6-10

Imamov O, Shim GJ, Warner M, Gustafsson JA. (2005) Estrogen receptor beta in health and disease. *Biol Reprod.*;73(5):866-71

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*; 270(5241):1491-4

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 93(12):5925-30

Kuiper GG, Gustafsson JA. (1997) The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett.* 410(1):87-90

Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. (2001) ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*; 142(9):4120-30

Lee A.V., Jackson J.G., Gooch J.L., Hilsendeck G.S., Coronado- Hinsohn E., Osborne C.K., Yee D. (1999). Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol. Endocrinol.* 10: 787-796

Lee A.V., Jackson J.G., Gooch J.L., Hilsenbeck G.S., Coronado-Hinsoh E., Osborne C.K., Yee D. (1999). Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol. Endocrinol.* 10: 787-796

Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. (1998) Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res.*; 58(15):3197-201

Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C. (2003) Estrogen receptor ER-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol.*; 17(2):203-8

Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH Jr, Pestell RG, Kushner PJ. (2002) Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression *J Biol Chem.*; 277(27):24353-60

Lottering M.L., Haay M., Seegers J.C. (1992). Effect of 17- β - E2 metabolites on the events of cell cycle on MCF-7 cells. *Cancer Research* 52: 5926-5932

Matthews J, Gustafsson JA. (2003) Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv.*; 3(5):281-92

Mauro L., Salerno M., Panno M.L., Bellizzi D., Sisci D., Miglietta A., Surmacz E., Andò S. (2001). Estradiol increases IRS-1 gene expression and insulin signaling in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 288 (3): 685-689

Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. (2001) Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem.*; 44(24):4230-51

Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE. (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*; 144(5):2055-67

Molloy A.C., May E.B., Westley B.R. (2000). Insulin Receptor Substrate-1 expression is regulated by estrogen in MCF-7 human breast cancer cell line. *Journal of Biology* 275: 12565-12571

Molloy A.C., May E.B., Westley B.R. (2000). Insulin Receptor Substrate-1 expression is regulated by estrogen in MCF-7 human breast cancer cell line. *Journal of Biology* 275: 12565-12571

Monroe DG, Secreto FJ, Subramaniam M, Getz BJ, Khosla S, Spelsberg TC (2005) Estrogen receptor alpha and beta heterodimers exert unique effects on estrogen- and tamoxifen-dependent gene expression in human U2OS osteosarcoma cells. *Mol Endocrinol.*; 19(6):1555-68

Montano MM, Ekena K, Delage-Mourroux R, Chang WR, Martini P, Katzenellenbogen B.S, (1999).An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci*; 96(12):6947-52

Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Klier SA, Lehmann JM, Willson TM. (1998) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*; 247(1):75-8

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*; 392(1):49-53

Myers Jr. M.G., Sun X.J., Cheatam B., Jachna B.R., Glasheen E.M., Backer J.M., White M.F. (1993). IRS-1 is a common element in insulin and IGF-1 signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology* 132: 1421-1430

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. (1998) Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res.*; 26(15):3505-12

O'Malley B. (1990). The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol. Endocrinol.* 4(3):363-369

Omoto Y, Inoue S, Ogawa S, Toyama T, Yamashita H, Muramatsu M, Kobayashi S, Iwase H. (2001) Clinical value of the wild-type estrogen receptor beta expression in breast cancer. *Cancer Lett.*;163(2):207-12

Panno ML, Mauro L, Marsico S, Bellizzi D, Rizza P, Morelli C, Salerno M, Giordano F, Andò S. (2006) Evidence that the mouse insulin receptor substrate-1 belongs to the gene family on which the promoter is activated by estrogen receptor alpha through its interaction with Sp1. *J Mol Endocrinol*; 36(1):91-105

Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. (2004) Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res.*;64(1):423-8

Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC (2004) Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res*; 64(1):423-8

Peyrat J.P., Bonneterre J. (1992). Type 1 IGF receptor in human breast diseases. *Breast Cancer Res. Treat.* 22 (1): 59-67

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

Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, Maudelonde T. (1998) Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.*; 58(23):5367-73

Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. (2001) Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res*; 61(6):2537-41

Rubin R., Baserga R. (1995). Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity. *Lab. Invest.* 73(3): 311-331

Rutherford T, Brown WD, Sapi E, Aschkenazi S, Muñoz A, Mor G. (2000) Absence of estrogen receptor-beta expression in metastatic ovarian cancer. *Obstet Gynecol*; 96(3):417-21

Shepherd P.R., Withers D., and Siddle K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: The key switch mechanism in insulin signaling. *Biochem. J.* 333: 471-490

Shim GJ, Wang L, Andersson S, Nagy N, Kis LL, Zhang Q, Mäkelä S, Warner M, Gustafsson JA. (2003) Disruption of the estrogen receptor beta gene in mice causes myeloproliferative disease resembling chronic myeloid leukemia with lymphoid blast crisis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 100(11):6694-9

Sotoca AM, van den Berg H, Vervoort J, van der Saag P, Ström A, Gustafsson JA, Rietjens I, Murk AJ. (2008) Influence of cellular ERalpha/ERbeta ratio on the ERalpha-agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. *Toxicol Sci*;105(2):303-11

Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA (2004) Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci*;101(6):1566-71

Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA. (2004) Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci*; 101(6):1566-71

Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguère V. (1999) Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell.*; 3(4):513-9

Ulrich A.K., Parker J. (1986). Strains overproducing tRNA for histidine. *Mol Gen Genet*; 205(3):540-545

Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, Lupu R. (1998) Expression of estrogen receptor beta messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Res.*; 58(2):210-4

Watanabe T., Inoue S., Sumito O. (1997) Agonistic effect of tamoxifen independent on cell type, ERE-promoter context, and estrogenreceptor subtype: functional difference between estrogen receptors α and β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 236:140-145

Weston AD, Blumberg B, Underhill TM. (2003) Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more. *Cell Biol* ;161(2):223-8

Yee D., Lee A.V. (2000). Cross-talk between the insulin-like growth factors and estrogens in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5(1): 107-115

Zhang X., Yee D. (2000). Tyrosine Kinase signalling in breast cancer. Insulin-like growth factors and their receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2: 170-175

Pubblicazioni

Panno ML, Giordano F, Mastroianni F, Morelli C, Brunelli E, Palma MG, Pellegrino M, Aquila S, Miglietta A, Mauro L, Bonofiglio D, Andò S. (2006) Evidence that low doses of Taxol enhance the functional transactivatory properties of p53 on p21 waf promoter in MCF-7 breast cancer cells. *FEBS Lett.*; 580(9):2371-80

Mauro L, Pellegrino M, Lappano R, Vivacqua A, Giordano F, Palma MG, Andò S, Maggiolini M. (2009) E-cadherin mediates the aggregation of breast cancer cells induced by tamoxifen and epidermal growth factor. *Breast Cancer Res Treat.* Jul (Epub ahead of print)

Panno ML, Giordano F, Palma MG, Bartella V, Rago V, Maggiolini M, Sisci D, Lanzino M, De Amicis F, Andò S.(2009) Evidence that bergapten, independently of its photoactivation, enhances p53 gene expression and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets*; 9(4):469-81

Partecipazioni a congressi

Panno M.L., Giordano F., Mastroianni F., Palma M.G., Aquila S. e Andò S. Effetti del bergaptene nella inibizione della cinetica proliferativa e nella induzione della apoptosi in una linea cellulare di tumore mammario umano; *Erbe mediche: dalla ricerca di base alle possibili applicazioni in terapia*. Parghelia (VV) 8 luglio 2005

Panno M.L., Giordano F., Mastroianni F., Palma M.G., Pellegrino M., Salerno M., Miglietta A., Bartella V., Andò S. Taxol activates p21 waf promoter, via p53, in MCF-7 breast cancer cells; *XXVIII Congresso Nazionale SIP 2006*. Pavia, 19-22 settembre 2006

Panno M.L., Giordano F., Palma M.G., Bartella V., Mastroianni F., Rago V., Aquila S., Catalano S., Bonofiglio D., Lanzino M., Sisci D., Pezzi V., De Amicis F., Casaburi I., Andò S.; Bergapten affects cell survival and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Apoptosis world 2008. From mechanisms to applications*. Lussemburgo, 23-26 febbraio 2008

Panno M.L., Giordano F., Rago V., Bartella V., Palma M.G., Bonofiglio D., De Amicis F., Cione E., Andò S. Evidences that Bergapten is an antitumoral agent that enhances p53 gene expression independently of its photoactivation.; *XXIX National Congress Italian Society of Pathology Rende, Cosenza, Italy, 10-13 settembre 2008*