

Tesi doctoral

**Anàlisi de l'expressió i dels mecanismes
d'acció del receptor d'estrògens beta
en el càncer de pròstata**

Antoni Hurtado Rodríguez

3.1.3. Conservació i manteniment de les línies cel·lulars.....	58
3.2. MÈTODES.....	58
3.2.1. Cultius bacterians.....	59
3.2.1.1. Creixement i conservació dels cultius bacterians.....	59
3.2.1.2. Obtenció de bacteries competents.....	59
3.2.1.3. Transformació bacteriana per xoc tèrmic.....	59
3.2.1.4. Expressió i purificació de proteïnes recombinants en bactèria.....	60
3.2.2. Mètodes d'anàlisi del DNA.....	60
3.2.2.1. Purificació del DNA plasmídic.....	60
3.2.2.2. Digestió del DNA plasmídic amb enzims de restricció.....	61
3.2.2.3. Aïllament de fragments de DNA en gel d'agarosa.....	61
3.2.2.4. Lligació de productes de PCR.....	62
3.2.2.5. Lligació de fragments de DNA digerits.....	62
3.2.2.6. Construcció de vectors.....	63
3.2.3. Mètodes d'anàlisi amb el RNA.....	63
3.2.3.1. Extracció de RNA.....	64
3.2.3.2. Expressió gènica per RT-PCR semiquantitativa.....	64
3.2.3.3. Anàlisi de seqüències.....	65
3.2.4. Mètodes d'anàlisi de les proteïnes.....	66
3.2.4.1. Extracció de proteïna.....	66
3.2.4.2. Western blot.....	67
3.2.4.3. Immunohistoquímica en seccions de teixit en parafina.....	68
3.2.4.4. Immunofluorescència en línies cel·lulars.....	69
3.2.4.5. Disseny i obtenció d'un anticòs de la isoforma d'ER [?] 2.....	70
3.2.4.6. Síntesi de la proteïna recombinant GST-ER [?] 2.....	70
3.2.5. Mètodes de les línies cel·lulars.....	71
3.2.5.1. Transfecció transitòria.....	71

3.2.5.2. Disseny i transfecció transitòria amb oligonucleòtids antisentit...	72
3.2.5.3. Anàlisi per citometria de flux i separació cel·lular.....	72
3.2.5.4. Sincronització de la línia cel·lular LNCaP.....	73
3.2.5.5. Fraccionament subcel·lular.....	73
3.2.5.6. Transfecció transitòria i determinació de l'activitat luciferasa.....	74
3.2.5.7. Lectura de l'activitat luciferasa.....	75
3.2.5.8. Cicle cel·lular amb Hoescht 33342, sorter i determinació de l'activitat luciferasa.....	76
3.2.5.9. Detecció de la incorporació de BrdU en cèl·lules LNCaP transfectades transitòriament amb ER? 1 per microscopia confocal.....	76
3.2.5.10. Detecció de la incorporació de BrdU en cèl·lules LNCaP transfectades transitòriament amb ER? 1 per citometria de flux.....	77
3.2.5.11. Assaig de co-immunoprecipitació.....	78
3.2.6. Anàlisi estadístic.....	78
4. RESULTATS.....	81
4.1. EXPRESSIÓ I LOCALITZACIÓ DELS RECEPTORS NUCLEARS EN TEIXIT I EN LÍNIES DE PRÒSTATA HUMANA.....	83
4.1.1. Expressió del missatger de les isoformes d'ER? ?en teixit i en línies cel·lulars de pròstata humana.....	83
4.1.1.1. Expressió del missatger de la isoforma d'ER? ?	
4.1.1.2. Expressió del missatger de la isoforma d'ER? ?	
4.1.1.3. Expressió de la isoforma d'ER? 503 humana.....	84
4.1.2. Expressió i localització de la proteïna d'ER? 1 en teixit i en línies cel·lulars de pròstata humana.....	88
4.1.2.1. Expressió de la proteïna d'ER? 1 per western blot.....	88
4.1.2.2. Determinació de l'especificitat de l'anticòs PA1-313 i de la	

banda de 64 kDa.....	89
4.1.2.3. Localització de la proteïna d'ER? ?	?
4.1.2.4. Determinació de l'especificitat de l'anticòs PPG5/10.....	92
4.1.3. Expressió i localització de la proteïna d'ER? en teixit i en	
línies cel·lulars de pròstata humana.....	93
4.1.3.1. Expressió de la proteïna d'ER? ?	?
4.1.3.2. Determinació de l'especificitat de l'anticòs d'ER? 2.....	94
4.1.4. Expressió d'ER? d'AR en mostres i en línies cel·lulars de	
pròstata humana.....	95
4.1.4.1. Expressió d'ER? ?	?
4.1.4.2. Expressió d'AR.....	96
4.1.5. Expressió i localització de l'enzim P450 aromatasa en mostres i en	
línies cel·lulars de pròstata humana.....	97
4.1.5.1. Expressió del missatger del gen CYP19.....	97
4.1.5.2. Expressió i localització de la proteïna P450 aromatasa.....	98
4.2. EXPRESSIÓ I FUNCIÓ D'ER? EN EL CICLE CEL·LULAR.....	99
4.2.1. Anàlisi de l'expressió d'ER? en cada fase del cicle cel·lular.....	99
4.2.1.1. Separació per citometria de flux.....	99
4.2.1.2. Sincronització en fase G0/G1 del cicle cel·lular.....	101
4.2.2. Localització subcel·lular d'ER? en cada fase del cicle cel·lular.....	103
4.2.3. Activitat transcripcional d'ER? en la línia cel·lular LNCaP.....	104
4.2.3.1. Activitat transcripcional de les isoformes d'ER? 1 i d'ER? 2 sobre les seqüències ERE.....	104
4.2.3.2. Activitat transcripcional d'AP1 i de NF-kB modulada per ER? ?????	
4.2.4. Efecte de la sobre-expressió d'ER? 1 sobre la progressió del	
cicle cel·lular.....	107
4.2.4.1. Anàlisi de la incorporació de BrdU en cèl·lules transfectades amb EGFP-ER? ?	?

4.2.5. Mecanisme d'acció d'ER α 1 en la progressió de la fase G1 del	
cicle cel·lular.....	109
4.2.5.1. Anàlisi de la incorporació de BrdU en cèl·lules transfectades	
amb el mutant EGFP-ER α 1 EG167/168AA.....	109
4.2.5.2. Inhibició d'EGFP-ER α ? ??	
4.2.5.3. Regulació del factor de transcripció AP1 i expressió de la	
ciclina D1 en cèl·lules sobre-expressades	
amb ER α ? ??	
5. DISCUSSIÓ.....	115
5.1. EXPRESSIÓ I LOCALITZACIÓ DELS RECEPTORS NUCLEARS	
EN TEIXIT I EN LÍNIES DE PRÒSTATA HUMANA.....	117
5.1.1. Determinació de l'especificitat del senyal detectat amb els	
anticossos d'ER α ??	
5.1.2. Expressió dels receptors nuclears en pacients amb carcinoma	
de pròstata.....	118
5.1.3. Expressió dels receptors a les línies de càncer de pròstata.....	121
5.2. EXPRESSIÓ I FUNCIÓ D'ER α EN EL CICLE CEL·LULAR.....	122
6. CONCLUSIONS.....	129
7. BIBLIOGRAFIA.....	133

ABREVIATURES

AAH:	Hiperplàsia Adenomatosa Atípica	LNCaP:	Línia de Càncer de Pròstata procedent de Node Limfàtic
AF-1/AF-2:	Domini de la Funció Activadora 1/2	LUC:	Luciferasa
AP1:	Proteïna Activadora 1	MAPK:	Proteïna Cinasa Activadora de la Mitosi
AR:	Receptor d'Andrògens	N-CoR:	Corepressor Nuclear
BrdU:	Bromodeoxiuridina	NF-κB:	Factor Nuclear IκB
CARM1:	Proteïna Arginina N-metiltransferasa	5'UTR:	Exó 5' no Transcrit
CDK:	Cinases Dependents de Ciclina	P450:	Enzim Aromatasa
CGH:	Hibridació Genòmica Comparada	PAP:	Fosfatasa Àcida Prostàtica
CYP19:	Gen codificant de l'enzim aromatasa	PC3:	Línia Cel·lular de Càncer de Pròstata
C-jun:	Factor de transcripció	PZ-HPV-7:	Línia Cel·lular de Pròstata Humana
DES:	Dietilelbestrol	PCR:	Reacció de la Cadena de la Polimerasa
DBD:	Domini d'Unió al DNA	PIN:	Neoplàsia Intraepitelial Prostàtica
DNMT:	DNA metiltransferasa	PKA:	Proteïna Cinasa A
BSA:	Sèrum d'Albúmina Boví	PKC:	Proteïna Cinasa C
E2F:	Factor de transcripció	PSA:	Antigen específic de pròstata
EGF:	Factor de Creixement Epidèrmic	PSS:	Esfínter Pre-Prostàtic
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immunosorben Assay</i>	PAP:	Proteïna Associada al Pàncrees
ERE:	Element de Resposta a Estrògens	PSA:	Antigen Sèrum Prostàtic
EGFP:	Proteïna de Fluorescència Verda	PSS:	Esfínter Pre-Prostàtic
ER? ?	Receptor d'Estrògens alfa	PTEN:	Fosfatasa i Homòleg de la Tensina delecionat en el cromosoma 10
ER? ?	Receptor d'Estrògens beta	PVDF:	Diofluoridat de Polivinidilè
EpRE/ARE:	Element de Resposta a Enzims Electròfils i Antioxidans	Rb:	Proteïna Retinoblastoma
FACS:	Fluorescence Activated Cell Sorting	RAR1:	Receptor Àcid Retinoic
FAS:	Estroma Fibromuscular	PAGE:	Gel d'Electroforesi de Poliacrilamida
FCS:	Sèrum de Vedella Fetal	SHBG:	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i>
HAT:	Histona Acetilasa	SMRT:	Silenciador Mediator del Recetor Tiroïdal
HADAC:	Histona Deacetilasa	SP-1:	Factor de Transcripció
HBP:	Hiperplàsia Benigna de Pròstata	TAE:	Tampó Tris -Acètic-EDTA
ICI 182,780	Inhibidor del Receptor d'Estrògens	TAF:	Factors Activadors de la Transcripció
IP:	Iodur de Propidi	TBP:	Proteïna d'unió a caixes TATA
JNK:	N-Terminal Jun cinasa	TGF? ?	Factor de Creixement Transformant alfa
LB:	Lúria Bertrani	TIF:	Factor Intermediari de la Transcripció
LBD:	Domini d'Unió al Lligand	TNM:	Tumor Node-Limfàtic Metàstasi

Figura 26:	Expressió de la proteïna d'ER? 1 en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata.	89
Figura 27:	Determinació de l'especificitat de l'anticòs PA1-313.....	90
Figura 28:	Localització de la proteïna d'ER? 1 en teixit de pròstata humana.....	91
Figura 29:	Localització de la proteïna d'ER? 1 en la línia LNCaP.....	92
Figura 30:	Determinació de l'especificitat de l'anticòs PPG5/10.....	93
Figura 31:	Expressió de la proteïna d'ER? 2 en mostres humanes i en les línies cel·lulars de pròstata.....	94
Figura 32:	Determinació de l'especificitat de l'anticòs d'ER? 2.....	95
Figura 33:	Expressió d'ER? en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata.....	96
Figura 34:	Expressió d'AR en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata.....	97
Figura 35:	Expressió del missatger del gen CYP19 en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata.....	98
Figura 36:	Expressió de la proteïna P450 aromatasa en línies cel·lulars de pròstata.....	98
Figura 37:	Localització de l'enzim P450 aromatasa en teixit de pròstata humana.....	99
Figura 38:	Separació de cèl·lules LNCaP en les diferents fases del cicle cel·lular per la tècnica de citometria de flux.....	100
Figura 39:	Expressió d'ER? durant el cicle cel·lular en cèl·lules LNCaP separades per citometria de flux.....	101
Figura 40:	Representació gràfica del percentatge de cèl·lules LNCaP sincronitzades en les fases G0/G1, S i G2/M analitzades per citometria de flux.....	102
Figura 41:	Expressió d'ER? durant el cicle cel·lular en cèl·lules LNCaP sincronitzades.....	103
Figura 42:	Localització subcel·lular de les isoformes d'ER? en les fases del cicle cel·lular.....	104
Figura 43:	Activitat transcripcional d'ER? sobre les seqüències ERE en la línia cel·lular LNCaP105	
Figura 44:	Activitat transcripcional de les isoformes d'ER? 1 i d'ER? 2.....	106
Figura 45:	Regulació de l'activitat transcripcional d'AP1 i de NF-kB de l'estradiol a través d'ER? en la línia LNCaP.....	107
Figura 46:	Efecte de la transfecció amb EGFP sobre el cicle cel·lular de les cèl·lules LNCaP.....	107
Figura 47:	Efecte de la sobre-expressió d'ER? 1 sobre la progressió del cicle cel·lular.....	108
Figura 48:	Efecte de la sobre-expressió del mutant d'ER? 1 EG167/168AA sobre la progressió del cicle cel·lular.....	109

Figura 49:	Efecte de la inhibició del receptor sobre-expressat sobre la progressió del cicle cel·lular.....	110
Figura 50:	Regulació de l'activitat transcripcional d'AP1 a través de les isoformes d'ER? sobre-expressades en les cèl·lules LNCaP.....	112
Figura 51:	Co-immunoprecipitació de FLAG-ER?1 en cèl·lules LNCaP.....	112
Figura 52:	Expressió de la ciclina D1 en cèl·lules transfectades amb EGFP-ER? 1.....	113

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1:	Condicions de la PCR.....	66
Taula 2:	Relació d'anticossos, dil·lucions i tipus de membrana emprats per western blot.....	67

1. INTRODUCCIÓ

1.1 LA PRÒSTATA HUMANA

1.1.1 Estructura anatòmica i desenvolupament embrionari

La pròstata és un òrgan d'estructura glandular i fibromuscular que es situa en la base de la pelvis, per sota de la bufeta urinària i travessant longitudinalment la uretra (Fig. 1).

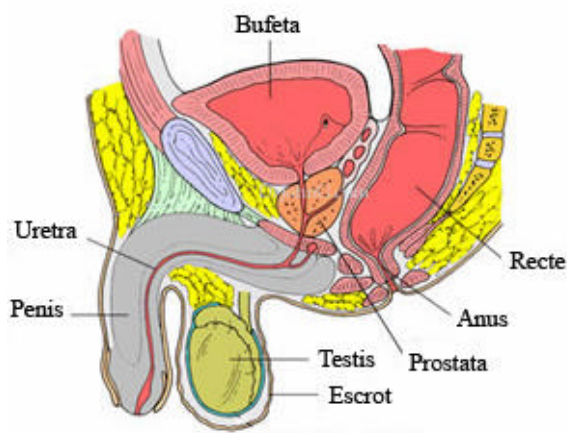


Figura 1. Localització anatòmica de la pròstata.

Anatòmicament, a la pròstata es distingeixen tres zones: perifèrica (ZP), central (ZC) i de transició (ZT). La ZT, representa el 20 % de la part glandular i està formada per un petit conjunt de conductes que procedeixen d'un mateix punt d'unió entre els segments proximal i distal de la uretra. La ZC, és la part menys abundant de la pròstata, representa un 5 % de la massa glandular i envolta els conductes ejaculadors. La ZC conté glàndules amb característiques morfològiques i histològiques que són absents en les altres dues zones: 1) la longitud dels seus conductes són superiors i 2) els citoplasmes de les cèl·lules secretores són molt més granulars i foscos, i el nuclis que són relativament més llargs, es disposen a diferents alçades entre les diferents cèl·lules que formen la glàndula (McNeal, 1968). La ZP, és la més abundant de la pròstata i conté el 75 % del teixit glandular (Fig. 2).

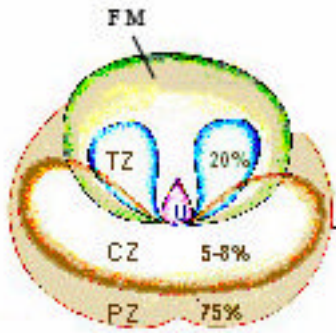


Figura 2. Tall transversal de la pròstata. Estroma fibromuscular (FM), zona de transició (TZ), uretra (U), zona central (CZ), zona perifèrica (PZ).

A part del compartiment glandular, existeixen altres dos compartiments en la pròstata humana: l'estroma fibromuscular anterior (FAS) i l'esfínter pre-prostàtic (PPS). El FAS és una capa gruixuda de teixit connectiu que cobreix la cara anterior de la pròstata i que envolta la part de la uretra pròxima al coll vesical. El PPS és una zona petita molt complexa que actua com esfínter en el moment de l'ejaculació, evitant el reflux del fluid seminal cap a la bufeta. El principal component del PPS és un esfínter cilíndric de musculatura llisa que envolta la uretra prostàtica. A l'interior d'aquest cilindre es detecten les glàndules periuretrals, que representen el 1% de la massa glandular prostàtica.

La pròstata s'origina, estimulada pels andrògens, a partir del mesénquima que es situa en la part inferior i posterior del sinus urogenital, i que alhora envolta el conducte de Wolf. La zona mesenquimal situada per la part superior del conducte de Wolf origina la pròstata cranial o zona de transició. Per contra, en la zona mesenquimal inferior del conducte de Wolf s'origina la zona caudal de la pròstata o zona perifèrica. Finalment, es creu que la zona central s'origina a partir del conducte de Wolf, degut a que el teixit glandular adult presenta característiques morfològiques molt semblants a les de les vesícules seminals, originades a partir del conducte Wolfià.

1.1.2 Histologia

Des d'una visió histològica, la pròstata també consta d'una zona glandular i d'una no glandular que es troben fusionades i es situen a l'interior de la càpsula prostàtica.

La part glandular està constituïda per un epitelí glandular que forma acins i conductes prostàtics. En la zona epitelial es poden distingir les capes basal i luminal. La capa basal conté les cèl·lules basals i neuroendocrines. Les cèl·lules basals, que posseeixen una activitat proliferant i una expressió de la telomerasa elevada, són androgen independents. Es pensa que aquest tipus cel·lular és el responsable de renovar l'epitelí prostàtic. Quant a les cèl·lules neuroendocrines, les seves funcions són poc conegudes. La capa luminal conté les cèl·lules secretores diferenciades, les quals, a diferència de les basals, són androgen dependents i expressen el receptor d'andrògens (Garraway, 2003). Els acins i conductes prostàtics estan submergits en una matriu tissular d'estroma, teixit fibromuscular, vascular i connectiu. A l'estroma trobem dos tipus cel·lulars: els miofibroblastes i les cèl·lules musculars llises (Fig. 3).

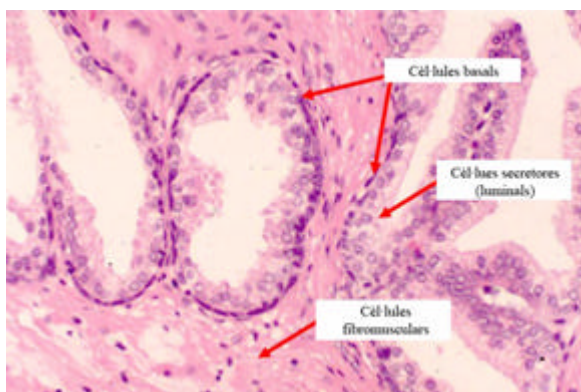


Figura 3. Tall histològic d'una glàndula prostàtica.

En l'actualitat, continua sent desconegut com les cèl·lules de l'epiteli prostàtic es diferencien en les cèl·lules basals, neuroendocrines i secretores luminals. Dues hipòtesis han descrit el mecanisme de diferenciació (Garraway, 2003): 1) una cèl·lula mare pluripotent originaria les *androgen sensitive transient amplifying basal cells* o també conegudes com cèl·lules intermèdies, i aquestes donarien origen a les cèl·lules secretores diferenciades i 2) les cèl·lules dels compartiments basal i luminal tindrien les seves pròpies cèl·lules mare.

1.1.3 Funció

La funció de la pròstata és la síntesi i l'acúmul del fluid prostàtic, que s'expulsarà en el moment de l'ejaculació conjuntament amb la resta de fluids seminals. El fluid prostàtic el fabriquen les cèl·lules secretores dels acins i conductes de la regió glandular. Els principals components del fluid prostàtic són: la proteïna PSA i l'enzim PAP, produïts per cèl·lules secretores de totes les zones de la pròstata, el Pepsinogen II i l'activador del plasminogen tissular, produït normalment per la ZC (Reese, 1986 i Reese, 1988) i la lactoferrina, que és produïda específicament per la ZC tot i que també pot ser secretada per altres zones de la pròstata amb inflamació (Reese, 1992).

1.2 PATOLOGIA PROSTÀTICA

1.2.1 Hiperplàsia Benigna de Pròstata (HBP)

La HBP és la patologia prostàtica més freqüent entre els homes d'edat avançada. Específicament, el 50% dels homes d'edats compreses entre 51 i 60 anys pateixen aquesta patologia i als 80 anys i la pateixen el 90% (Berry, 1984). La HBP es

caracteritza per un augment en el nombre i en el volum de les cèl·lules epitelials de la ZT, generant una obstrucció de la uretra urinària.

1.2.2 Lesions precursors del carcinoma de pròstata

Es considera que existeixen dues lesions precursors del càncer de pròstata: la hiperplàsia adenomatosa (AAH) i la neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN).

La AAH és una lesió poc freqüent, i es creu que s'origina en la ZT perquè les característiques histològiques i citològiques d'aquesta lesió són intermèdies entre la hiperplàsia benigna de pròstata i el carcinoma ben diferenciat. La AAH és caracteritza per la formació de noves estructures microglandulars amb una capa de cèl·lules basals incompleta i per mostrar diferents graus d'atípia nuclear i/o nucleolar (Gaudin i Epstein, 1994).

El PIN és una afectació freqüent en la patologia prostàtica. Existeixen diferents graus de PIN segons el nivell de malignitat: el d'alt grau (HG-PIN) i el de baix grau (LG-PIN). Es creu que el HG-PIN és una lesió precursora del càncer de pròstata de la ZP (Bostwick i Brawer, 1987). Existeixen diverses evidències que recolzen aquesta hipòtesi (Bostwick, 1987): 1) la coexistència de totes dues lesions en la pròstata, 2) la pèrdua en les dues lesions de la capa de cèl·lules basals, de marcadors de diferenciació de cèl·lula secretora, de nuclis i nuclèols normals, 3) l'augment de la proliferació, l'augment de la densitat de microvesícules, la variació en el contingut del DNA i la pèrdua al·lèlica en les cèl·lules epitelials de les dues lesions i 4) l'augment dels nivells de col·lagenasa IV en les dues lesions. Aquest tipus de PIN és el que presenta un pitjor pronòstic, es detecta a l'edat de 40 anys i la freqüència d'aparició augmenta fins a un 63% en homes entre 61 i 70 anys (Sakr, 1993).

1.2.3 Càncer de pròstata hormonodepenent

La majoria dels càncers de pròstata provenen del compartiment epitelial de la glàndula prostàtica de la ZP. No es coneix quin tipus cel·lular origina el càncer de pròstata, però hi ha evidències que suggereixen que qualsevol dels tres tipus cel·lulars del compartiment epitelial el desencadenaria. L'expressió d'AR, PSA i PAP en les cèl·lules d'adenocarcinoma suggereix que el càncer provindria d'una cèl·lula diferenciada del compartiment luminal (Isaacs i Coffey, 1989 i Arnold i Isaacs, 2002). Per contra, el fet que les cèl·lules canceroses també posseeixin propietats de les cèl·lules basals i una ràtio elevada de proliferació i expressió del gen de la telomerasa, suggeriria la possibilitat que el càncer s'originés a partir d'una cèl·lula del compartiment basal (Sommerfeld, 1996). També s'ha suggerit que el càncer s'originaria a partir d'una cèl·lula intermèdia (Arnold i Isaacs, 2002).

El mecanisme molecular que desencadena el càncer de pròstata no es comprèn completament. Les alteracions genètiques en el càncer de pròstata han estat extensament estudiades. Utilitzant la tècnica d'Hibridació Genòmica Comparada (HGC) s'ha detectat que la majoria de carcinomes primaris de pròstata presenten canvis genètics que afecten almenys a una regió cromosòmica (Visakorpi, 1995). Una característica del càncer de pròstata en etapes inicials és que les pèrdues de cromosomes són més freqüents que els guanyos o les amplificacions. Aquest fet ha suggerit que la pèrdua de gens supressors de tumor hauria de ser més important que el guany d'oncògens en el desenvolupament inicial del càncer de pròstata (Visakorpi, 1995). Les regions cromosòmiques que es perden amb més freqüència en el càncer de pròstata d'estadis inicials i en el PIN són la 8p i la 13q (Elo i Visakorpi, 2001).

No es coneixen tots els gens candidats responsables de l'inici del càncer de pròstata en aquestes regions cromosòmiques. En la regió 8p21 existeix un gen conegut amb el nom de gen *homeobox NKX3.1*, l'expressió del qual es perd en un 20% de les lesions PIN i en un 78% de les metàstasis (Bowen, 2000). El ratolí *knockout* heterozigot per aquest gen presenta lesions de tipus PIN (Bhatia-Gaur, 1999). Altres gens supressors de tumors que s'han implicat substancialment en aquest tipus de càncer són p53 i PTEN. La inactivació de p53 s'ha detectat en un 10-20 % dels carcinomes de pròstata no invasius (Visakorpi, 1995 i Brooks, 1996) i en un 50 % de les metàstasis (Meyers, 1998). El gen PTEN, localitzat en la regió 10q23, s'ha trobat mutat en un 5-27 % dels tumors no invasius de pròstata, i en un percentatge superior al 60 % en carcinomes avançats (Elo i Visakorpi, 2001). D'altra banda, el gen de la E-cadherina habitualment es troba inactivat en carcinomes avançats de pròstata i s'associa a un pitjor pronòstic de la malaltia (Umbas, 1994).

Aquests gens acostumen a estar inactivats en estats avançats de la malaltia. Els mecanismes d'inactivació d'aquests gens poden consistir en la deleció dels cromosomes que els contenen o bé en el silenciament per metilació de la seva regió promotora.

1.2.4 Càncer de Pròstata Hormonoindependent

Els pacients que pateixen aquest tipus de tumor són aquells que deixen de respondre a la teràpia hormonal. Actualment no existeixen teràpies efectives per aquest estadi de la malaltia degut a l'elevada agressivitat d'aquests tumors.

Existeixen dues teories que expliquen la progressió del càncer de pròstata androgen dependent a hormonorefractari. La primera deriva de la idea que un grup de cèl·lules hormonoresistents del tumor primari creixen descontroladament degut a la

selecció exercida per la privació d'andrògens. Aquesta teoria prové de les observacions obtingudes en ratolins portadors de injerts de tumor hormonodepenent en els que després de la castració es detectava el creixement de cèl·lules tumorals (Craft, 1999). La segona teoria suggereix que el creixement d'un tumor hormonorefractari és conseqüència de la elevada inestabilitat cromosòmica a la que es troba sotmès aquest tumor (Bruchowsky, 1990). Degut a la dificultat de disposar d'aquest tipus de mostres, les alteracions genètiques no s'han pogut estudiar amb tant detall com en els tumors hormonodepenents. Malgrat aquest fet, s'ha constatat que la mitjana d'aberracions cromosòmiques en tumors de pròstata recurrents és tres vegades superior a les dels tumors que no ho són (Visakorpi, 1995 i Koivisto, 1995). Els canvis cromosòmics habitualment detectats en tumors recurrents són guanys de les regions 7p, 8q i Xq i pèrdues del 10q i 16q. Totes aquestes alteracions, exceptuant el guany de Xq, són detectades també en metàstasis (Visakorpi, 1995 i Nupponen, 1998).

La transició d'un tumor hormonosensible a un hormonosistent també podria ser deguda a alteracions en la via de senyalització del receptor d'andrògens (Visakorpi, 2000) així com a l'activació autocrina de varies vies de transducció de senyal (Djakiew, 2000).

1.2.5 Estadi clínic del carcinoma de pròstata

El sistema que classifica l'estadi clínic del carcinoma de pròstata és el TNM (Tumor - Node Limfàtic - Metàstasis) i valora els següents aspectes: l'estadi local del tumor, l'afectació dels nòduls limfàtics i la presència de metàstasis. L'estadi local es pot classificar en quatre nivells segons la detecció del carcinoma: T1 (no detectable per tracte rectal), T2 (palpable per tracte rectal), T3 (carcinoma localment avançat) i T4 (afectació de àrees annexes a la pròstata). Els nòduls limfàtics poden estar (N1) o no

(N0) invadits. I finalment, el pacient pot presentar metàstasi (M1) o no presentar-la (M0).

1.2.6. Grau histològic del carcinoma de pròstata

El sistema de Gleason és el mètode de classificació histològica dels tumors de pròstata. La classificació seguint aquest sistema considera el grau de diferenciació glandular i el patró de creixement de l'estroma del tumor. La graduació pot oscil·lar des de tumors ben diferenciats (grau 1) fins a poc diferenciats (grau 5) i el valor final de Gleason és la suma dels dos patrons majoritaris identificats en el tumor (Fig. 4).

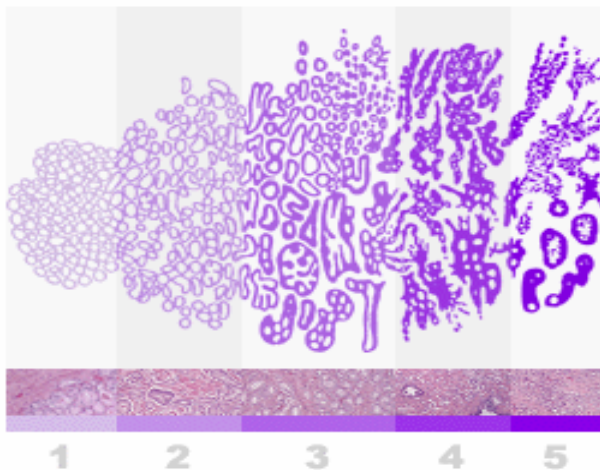


Figura 4. Graus de Gleason. Esquema representatiu dels diferents graus de diferenciació d'un tumor de pròstata.

1.3 ESTRÒGENS I LA GLÀNDULA PROSTÀTICA

Els andrògens són essencials per la diferenciació de la pròstata, el manteniment de les cèl·lules luminals de l'epiteli i participen en el desenvolupament de les patologies prostàtiques (Taplin, 2001). Tot i que els estrògens poden regular els nivells d'andrògens indirectament via l'eix hipotàlem-hipofisari-gonadal (Cook, 1998), existeixen evidències que els estrògens també poden actuar directament sobre la

glàndula prostàtica: 1) Els receptors d'estrògens alfa (ER α) i beta (ER β) s'expressen a la pròstata (Lau, 1998), 2) el tractament amb estrògens a baixes dosis durant la gestació del ratolí augmenta la mida de la pròstata i els nivells del receptor d'andrògens (AR) en l'etapa adulta (vom Saal, 1997), 3) l'exposició d'estrògens a dosis elevades en l'etapa postnatal de les rates induïx en la vida adulta una supressió del creixement prostàtic, una disminució de la resposta als andrògens i una hiperplàsia epitelial (Jarred, 2000) i 4) l'estrogen sintètic DES induïx parada mitòtica i apoptosi en les cèl·lules epitelials tumorals de la pròstata (Hartley-Asp, 1985). Aquests estudis suggereixen que l'efecte dels estrògens sobre la pròstata poden ser estimuladors o inhibidors del creixement. És possible que els efectes dels d'estrògens depenguin, en part, del tipus de receptor al que s'uneixin (ER α o ER β) i a la presència d'isoformes dels mateixos receptors.

Els estrògens són sintetitzats per l'enzim P450 aromatasas. Aquest enzim està codificat pel gen CYP19 i es localitza en la regió q21.2 del cromosoma 15 (Simpson, 1994). El gen s'expandeix al llarg de 120 Kb i la regió codificant, al llarg de 30 Kb (Simpson, 1997). Conté nou exons que codifiquen la proteïna i cinc exons no traduïts (UTR) associats a promotors d'ús alternatiu que regulen l'expressió tissular específica del gen (Simpson, 2005) (Fig. 5). Les diferents isoformes del gen codifiquen una proteïna de pes molecular de 55 KDa (Turner, 2002).

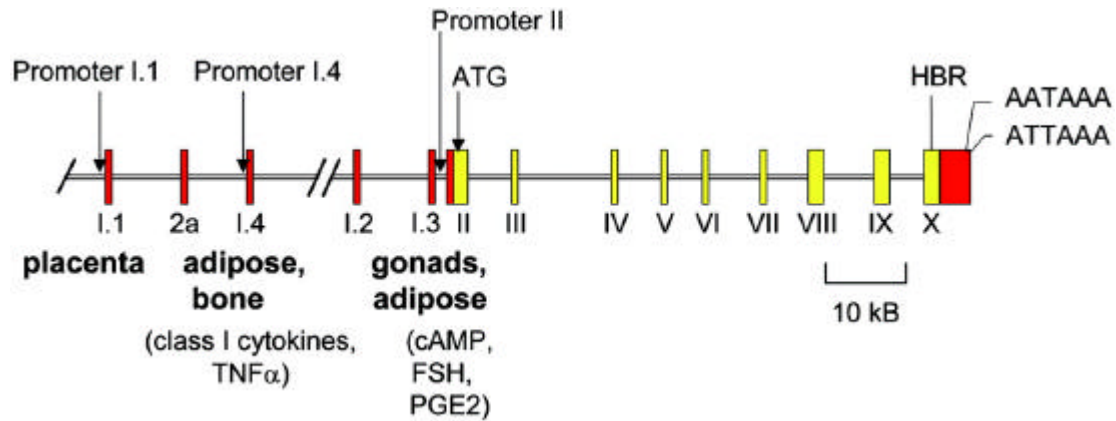


Figura 5. Diagrama del gen humà de l'aromatasa (CYP19) mostrant l'ús de promotors teixit específics (Simpson, Endocr Rev 2005;26:322-330).

La màxima activitat de l'enzim P450 aromatasa es localitza en els teixits femenins de l'ovari i la placenta (Harada, 1993). També es poden sintetitzar estrògens en els teixits extragonadals femenins i masculins. S'ha comprovat que en l'home adult existeix una producció d'estrògens a les glàndules adrenals, testicle i teixit adipós (Farnsworth, 1999 i Simpson, 2003).

La pròstata, que també expressa l'enzim P450 aromatasa, pot reduir la testosterona a estradiol (Labrie, 1997 i Ellen, 2004). Existeix un altre lligand estrogènic a la pròstata, conegut com 3[?]A-diol, i que és sintetitzat a partir de dihidrotestosterona (DHT) per l'enzim 3[?]-hidroxiesteroiddeshidrogenasa.

1.4 EL GEN D'ER?

1.4.1 Estructura gènica

El primer receptor d'estrògens identificat, anomenat ER α es va clonar l'any 1986 (Green, 1986) i, deu anys més tard, es va clonar el segon receptor, anomenat

ER α (Kuiper, 1996). Aquests dos receptors no representen variants de *splicing* sinó que estan codificats per gens diferents. ER α es localitza en la regió q25.1 del cromosoma 6 i ER β en la regió q23.2 del cromosoma 14 (Fig. 6 i 7).

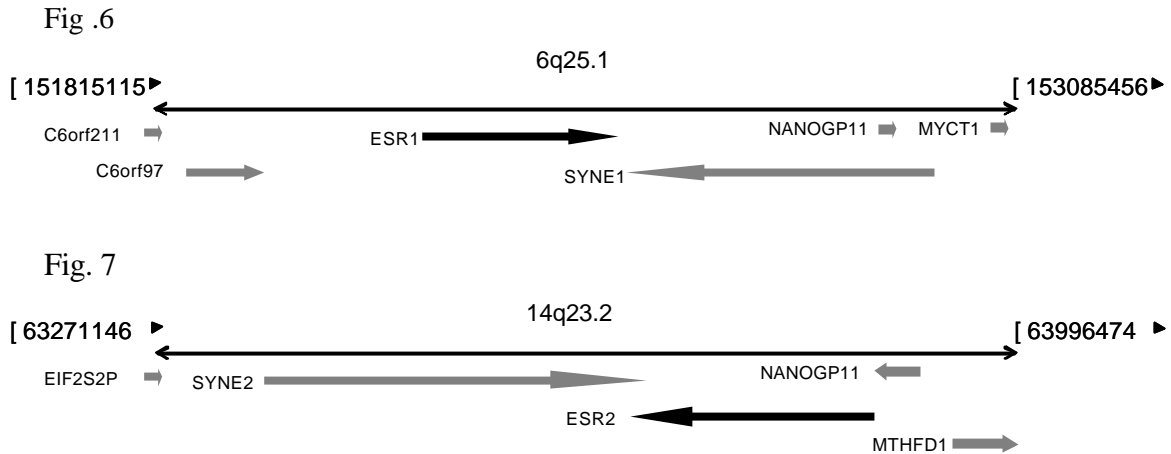


Figura 6 i 7. Localització i orientació dels gens ER α o ESR1 (Fig. 6) i ER β o ESR2 (Fig. 7) en els cromosomes 6 i 14 respectivament. Context cromosòmic amb els gens que es localitzen en aquestes regions (representats per les fletxes gruixudes grises i negres) delimitades pels nucleòtids representats amb una clau i una fletxa negra.

El gen d'ER α consta de 19 exons, dels quals només 10 codifiquen per proteïna i la resta són exons no traduïts (UTR) (Fig. 8).

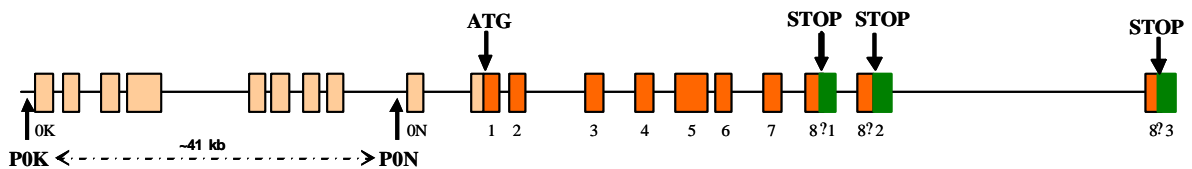


Figura 8. Estructura gènica del gen d'ER α mostrant els exons que codifiquen per les proteïnes (vermell), els exons 5'UTR (crema) i els 3'UTR (verd). Els dos promotors d'ER α es mostren com P0N i P0K separats amb una distància de 41 kb.

1.4.2 Isoformes d'ER α

La majoria d'isoformes del gen d'ER α s'han identificat en diversos teixits normals i tumorals. Segons el mecanisme pel qual s'originen, es poden classificar en quatre grups: 1) per splicing alternatiu de l'últim exó codificant del RNA missatger, 2) per deleccions d'exons intermedis (*skipping*), 3) per insercions de regions intròniques en la seqüència del missatger madur i 4) per *splicing* d'exons alternatius en la regió 5'UTR.

1.4.2.1 *Splicing* alternatiu de l'últim exó codificant

Existeixen cinc isoformes d'ER α generades per aquest mecanisme. Són variants de *splicing* que comparteixen els exons del 1 al 7 i difereixen perquè cadascuna conté un exó 8 diferent (Moore, 1998 i Poola, 2005). Aquestes isoformes es coneixen amb el nom d'ER α 1, d'ER α 2, d'ER α 3, d'ER α 4 i d'ER α 5. Les tres primeres isoformes contenen els exons 8 α 1, 8 α 2 i 8 α 3, respectivament. Per contra, les isoformes d'ER α 4 i d'ER α 5 contenen exons 8 amb diferents fragments de l'intró 7 i de l'exó 8 α 1 (Fig. 9).

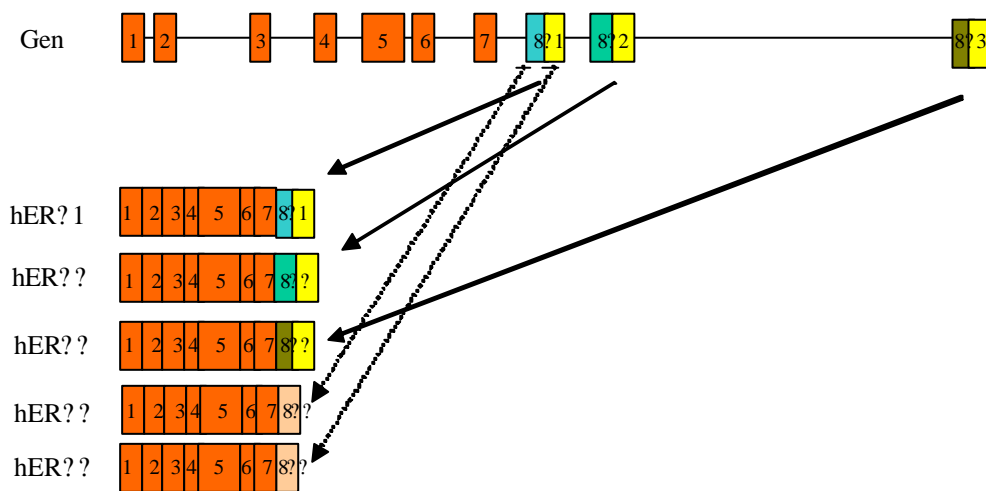


Figura 9. Isoformes d'ER α generades per splicing alternatiu de l'últim exó.

1.4.2.2 *Skipping* d'exons

S'han descrit diverses isoformes generades per deleccions d'exons. La deleció de l'exó 2 és la més comuna entre els *splicings* d'ER α . Aquesta s'associa freqüentment a la deleció dels exons 5 ó 6. La pèrdua d'aquest exó altera el marc de lectura de la proteïna i en conseqüència genera una proteïna truncada (Poola, 2002). La deleció de l'exó 3 no altera el marc de lectura, sinó que genera la pèrdua del segon dit de Zinc del domini d'unió al DNA del receptor (Poola, 2002). Tal com l'exó 3, la pèrdua de l'exó 4 no afecta al marc de lectura de la proteïna, sinó que afecta al senyal de localització nuclear, fet que impedeix l'entrada del receptor al nucli (Poola, 2002). La falta de l'exó 5 genera una proteïna truncada. La proteïna resultant, tot i que és de localització nuclear, no és transcripcionalment activa (Poola, 2002). Aquesta isoforma actua com a dominant negatiu sobre l'activitat transcripcional d'ER α i d'ER β de manera dosi dependent (Inoue, 2000). La deleció de l'exó 6 també és freqüent en ER α i dóna lloc a una proteïna truncada (Poola, 2002). Finalment, la deleció de l'exó 7 en ER α és poc freqüent i genera una proteïna truncada (Poola, 2002) (Fig. 10).

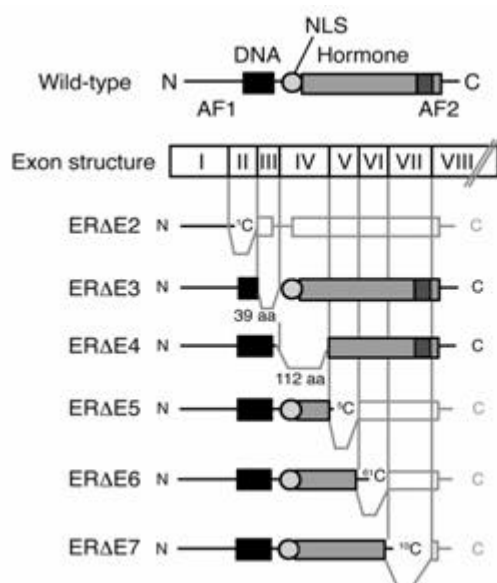


Figura 10. Isoformes d'ER α generades per delecció d'exons interns. Domini d'unió al DNA (DNA), senyal de localització nuclear (NLS), domini d'unió al lligand (Hormone). (Deroo, J. Clin. Invest. 2006; 116:561-570).

1.4.2.3 ER β 503

Tres grups d'investigadors diferents han identificat una isoforma d'ER β a ratolí i a rata que conté una part de l'intró (entre els exons 5 i 6) en el RNA missatger madur i que no altera el marc de lectura de la proteïna. La proteïna resultant conté 18 aminoàcids addicionals insertats en el domini d'unió al lligand de la proteïna (LBD) i s'ha batejat amb el nom d'ER β 503 (Chu, 1997; Hanstein, 1999 i Petersen, 1998). Alguns autors han descrit que aquesta isoforma no uneix estradiol (Maruyama, 1998) i d'altres que sí presenta aquesta capacitat, tot i que l'afinitat d'unió és de l'ordre de 1000 vegades inferior a la d'ER β (Petersen, 1998 i Hanstein, 1999). Malgrat aquesta discrepància, tots els treballs coincideixen a dir que aquesta isoforma pot unir-se a seqüències ERE i heterodimeritzar amb ER α i ER β per tal d'actuar com un dominant negatiu de l'activació transcripcional d'aquests receptors.

1.4.2.4 Exons alternatius de la regió 5'UTR

S'han descrit diversos primers exons 5'UTR generats per *splicing* alternatiu en el gen d'ER β i únicament, s'han descrit dos per ER β . S'ha demostrat que els exons 0N i 0K regulen l'expressió gènica d'ER β (Hirata, 2001). Mentre que l'exó 0N s'ha detectat en un ampli rang de teixits i tipus cel·lulars com espermatozous, endometri uterí i leucòcits perifèrics, l'exó 0K es detecta predominantment en espermatozous (Hirata, 2001). És important destacar que la seqüència de l'exó 0K és idèntica a la del primer exó 5'UTR de la isoforma β 2 del receptor d'estrògens i que la seqüència del RNA missatger d'ER β 2 publicada per Ogawa al 1998 (AB0065892) conté un total de sis exons 5'UTR que es situen *upstream* del promotor 0N d'ER β (veure figura 8).

1.4.2.5 Mutacions puntuals identificades en mostres de teixit humà

Malgrat l'elevat nombre de variants de *splicing* d'ER? identificats, han estat descrites poques mutacions puntuals. En nens obesos s'ha identificat un canvi de nucleòtid G250S. També s'han descrit diverses mutacions silencioses tant en nens obesos com amb nens amb dèficit de pes (Rosenkranz, 1998).

1.5. METILACIÓ DEL GEN D'ER? ?

La metilació del DNA consisteix en l'addició de grups metil en el carboni 5 de les citosines de les illes CpG localitzades en les regions promotores dels gens per l'enzim DNA metiltransferasa (DNMT). La metilació d'aquestes illes s'associa a la pèrdua d'expressió del gen. La majoria dels gens que es troben metilats són els gens supressors de tumors i els que es troben implicats en processos cel·lulars que inclouen la reparació del DNA, resposta hormonal, invasió, metàstasi i control del cicle cel·lular (Long-Cheng, 2004). Es postula que la hipermetilació de les illes CpG dels gens supressors de tumors podria jugar un paper en la carcinogènesi (Esteller, 2005). Quant a ER?, s'ha demostrat la pèrdua d'expressió del gen per metilació (Long-Cheng, 2000, Nojima 2001 i Zhu, 2004) i que la metilació del promotor s'associa positivament amb la progressió del càncer de pròstata (Long-Cheng, 2000; Sasaki, 2002 i Zhu, 2004). La metilació es centra en dues illes CpG que es localitzen en la regió del promotor 0N i en el propi exó 0N (Zhu, 2004) (Fig. 11).

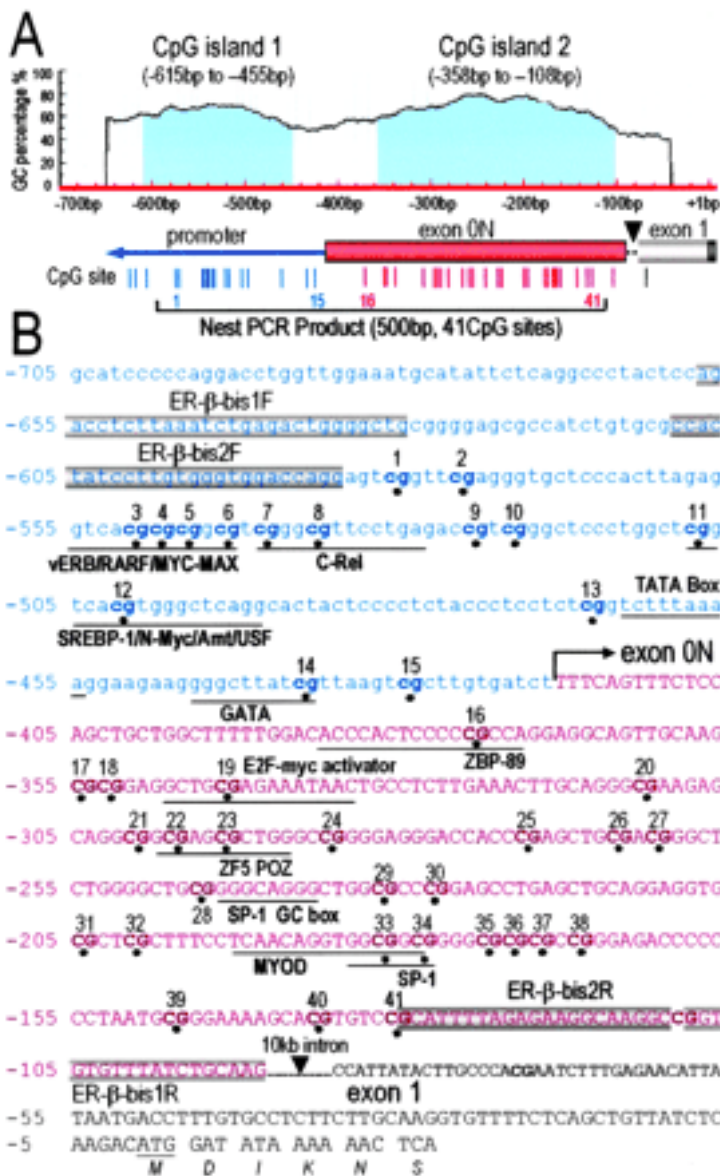


Figura 11. Regió promotora del gen d'ER β (AF191544). (A) Localització de les dues illes CpG (illa 1, del nucleòtid -615 al -455; illa 2, del -362 al -108). Les illes CpG s'identifiquen amb les línies verticals (de la 1 a la 41). L'intró entre els exons 0N i 1 s'indica amb la fletxa negra. (B) Seqüència promotora d'ER β , exó 0N i exó 1. L'inici de transcripció s'indica com +1 i l'exó 0N amb la fletxa negra doblegada. S'indiquen els potencials llocs d'unió d'alguns factors de transcripció.

1.6 ESTRUCTURA PROTEICA DELS RECEPTORS D'ESTRÒGENS

ER α i ER β pertanyen a una superfamília de receptors nuclears que s'organitzen en quatre dominis estructuralment diferents. Des de l'extrem N-terminal fins al C-terminal del receptor trobem: 1) la regió A/B, 2) la regió C que conté el domini d'unió al DNA (DBD), 3) la regió D o regió frontissa i 4) la regió E/F que conté el domini d'unió al lligand (LBD). La figura 12 mostra els dominis estructurals d'ER α (Green, 1986) i la figura 13 els d'ER β (Ogawa, 1998). La homologia entre ambdós receptors és

d'un 96% pel domini DBD i d'un 53% pel LBD. La resta de dominis no es troben conservats entre tots dos receptors. En addició als dominis estructurals, ER α i ER β contenen dos dominis funcionals coneguts amb el nom de dominis de transactivació funcional AF-1 i AF-2.

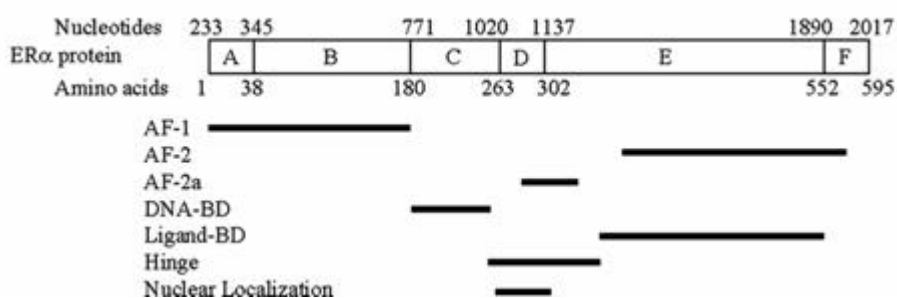


Figura 12. Dominis d'ER α . Els dominis estructurals del receptor nomenats A-F. Els nombres dels nucleòtids corresponents als inicis de cada domini (dalt) i dels aminoàcids (sota). Les posicions relatives d'alguns dels coneguts dominis funcionals del receptor són representats amb una barra negra i sòlida. (Herrynk, Endocrine Reviews 25, 2004).

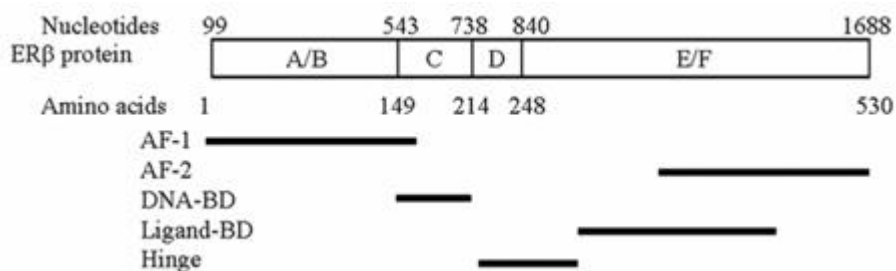


Figura 13. Dominis d'ER β . Els dominis estructurals del receptor nomenats A-F. Els nombres dels nucleòtids corresponents als inicis de cada domini (dalt) i dels aminoàcids (sota). Les posicions relatives d'alguns dels coneguts dominis funcionals del receptor són representats amb una barra negra i sòlida. (Herrynk, Endocrine Reviews 25, 2004).

1.6.1 La regió A/B

La regió A/B conté un domini coregulador, en el que s'uneixen diversos coactivadors i corepressors que modulen l'activitat transcripcional del receptor d'estrògens. El domini AF-1 es localitza en aquesta regió i s'activa independentment de lligand. El domini funcional AF-1 d'ER α pot ser activat per AMPc, dopamina, vanadat i factors de creixement com EGF i IGF (Kato, 1995; Smith, 1998 i Martin, 2000). ER α no presenta activitat transcripcional AF-1 (Delaunay, 2000 i Cheung, 2003).

1.6.2 La regió C

La regió C conté el DBD que és responsable de la unió als elements de resposta a estrògens (ERE). Els ERE són seqüències de nucleòtids palindròmiques i invertides (5'-GGTCAnnnTGACC-3') que es repeteixen al llarg de les regions promotores dels gens que responen a estrògens (Klein-Hitpass, 1988 i Driscoll, 1998). Exemples de gens que contenen seqüències ERE funcionals serien: 1) el gen de la vitellogenina AI i B1 de *Xenopus* (Wahli, 1989), 2) el gen apo-VLDLII de pollastre (Hache, 1983), i 3) gens humans que codifiquen les proteïnes pS2 (Jelstch, 1987), oxitocina (Richard, 1990), c-fos (Weisz, 1990), c-myc (Weisz, 1988), TGF- β (El-Ashry, 1996), lactoferrina (Teng, 1992), prolactina (Berwaer, 1994), receptor de progesterona (Kraus, 1994), catepsina D (Augereau, 1994) i el complement 3 (Fan, 1996).

El DBD conté nou cisteïnes i altres residus que són altament conservats entre tots els receptors nuclears i que són necessaris per a la unió amb elevada afinitat al DNA. Estructuralment, aquest domini està format per: 1) dos dits de Zinc que ocupen aproximadament uns 60-70 aminoàcids i 2) una extensió carboxi-terminal que conté les caixes T i A. Cada dit de Zinc conté quatre cisteïnes organitzades en un tetrahedre amb un ió de Zinc al centre. Els aminoàcids necessaris per reconèixer la seqüència de DNA

es localitzen en la base del primer dit de Zinc i concretament, en una regió coneguda com a caixa P. En el segon dit de Zinc es localitzen altres aminoàcids que formen la caixa D i estan implicats en la dimerització del receptor (Fig. 14).

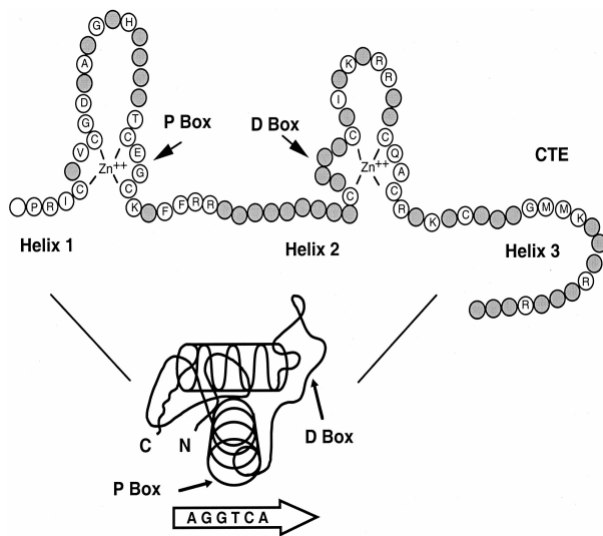


Figura 14. Domini d'unió al DNA (DBD). Diagrama dels dos dits de Zn⁺⁺ i l'extensió C-terminal (CTE). L'hèlix 1 conté la caixa P (P box) i l'hèlix 2 la caixa D (D box). La cua CTE conté les caixes T i A. La part inferior de la figura mostra com les hèlix 1 i 2 formen un angle recte per formar el cor del DBD que reconeix l'element de resposta a la hormona. (Aranda, *Physiological Reviews* 81, 2001).

1.6.3 La regió D

La regió D o frontissa conté part del domini de transactivació dependent de lligand AF-2a (en el cas d'ER?) i una porció del senyal de localització nuclear (Norris, 1997 i Picard, 1990).

1.6.4 Les regions E i F

Les regions carboxi-terminal E i F contenen el LBD (Norris, 1997). Tots els LBD estan formats per dotze regions hèlix ? molt conservades (H1-H12) i per una cadena ? també conservada que es situa entre l'hèlix 5 i 6. Aquest domini està organitzat en tres làmines antiparal·leles i un cor central que s'empaqueta entre dues

capes addicionals que construeixen una cavitat on pugui acomodar-se el lligand (Fig. 15).

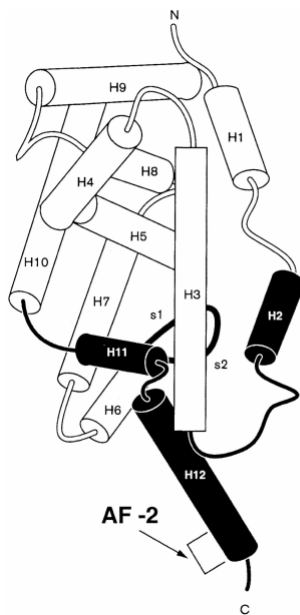


Figura 15. Domini d'unió del lligand (LBD). Estructura del LBD sense la unió del lligand. Els cilindres representen les hèlixs (H1-H12). L'hèlix 12, que conté el domini funcional AF-2 canvia de posició quan el lligand s'uneix. (Aranda, *Physiological Reviews* 81, 2001).

Malgrat ER α i ER β presenten una identitat del 56% en el LBD, difereixen únicament en dos residus de la cavitat d'unió del lligand altament conservada. El primer aminoàcid resideix per sota de l'anell butxaca D de la cavitat d'unió i és una Metionina a ER β i una Isoleucina a ER α . El segon aminoàcid es localitza en el mateix anell butxaca D i és una Leucina a ER β i una Metionina a ER α . Malgrat aquests dos aminoàcids diferents, els residus de les dues cadenes ocupen el mateix volum i posseeixen la mateixa hidrofobicitat. La regió E i F també es troba implicada en la dimerització del receptor, la unió de proteïnes coreguladores i de les *heat shock proteins* 70 i 90 (Tamarazi, 2002).

Tal i com s'ha mencionat en l'apartat 1.4.2 les isoformes d'ER β difereixen únicament en l'últim exó, el qual codifica la cua carboxi-terminal de la proteïna. Totes les isoformes contenen des de la hèlix 3 fins a la 10 (Leung, 2006). En comparació amb ER β 1, la resta d'isoformes contenen les hèlix 11 i 12 amb longituds variables (Fig.

16A). La hèlix 12 d'ER? 1 s'empaqueta contra les hèlix 3, 5/6 i 11 per formar un espai favorable a la unió del lligand (Leung, 2006). Únicament l'extrem C-terminal d'ER? 2 forma una hèlix ? amb hidrofobicitat semblant a la d'ER? 1, però amb orientació completament diferent deguda a que les hèlix 11 i 12 són més curtes, dificultant així l'accés del lligand (Fig. 16B). En el cas de les isoformes d'ER? 4 i d'ER? 5, l'aparició d'un codó de parada abans de finalitzar l'exó 8 genera unes proteïnes amb l'hèlix 11 truncada i l'absència de l'hèlix 12 (Fig. 16A) (Leung, 2006).

A

		Helix 11		
ERβ1	420	DSSRKL A H L L N A V T D A L V W V I A K S G I S	S Q Q Q S M R L A N L L M L L S H V R R A S N K G M E H L L N M K	480
ERβ2	420	DSSRKL A H L L N A V T D A L V W V I A K S G I S	S Q Q Q S M R L A N L L M L L S H V R R A R	472
ERβ4	420	DSSRKL A H L L N A V T D A L V W V I A K S G I S	S Q Q Q S M R L A N L L M L L S H V R R A R	479
ERβ5	420	DSSRKL A H L L N A V T D A L V W V I A K S G I S	S Q Q Q S M R L A N L L M L L S H V R R A R	469

		Helix 12		
ERβ1	481	C K N V V P V Y D L L L E M L N A H V L R G C K S S I T G S E C S P A E D S K S K E G S Q N P Q S Q		530
ERβ2	473	A S Q T T S F G M R M E T L L P E A T	--- M E Q	495
ERβ4	480	E S	---	481
ERβ5	470		--- Y A P	472

B

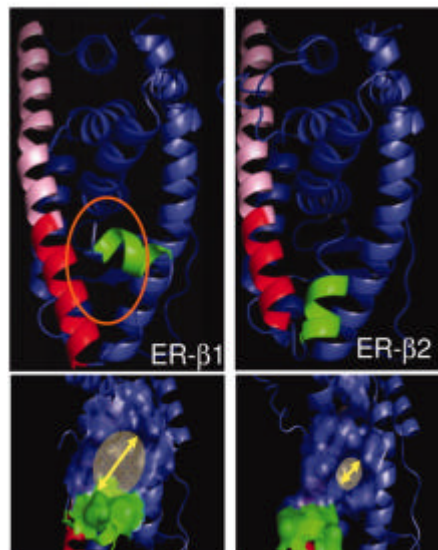


Figura 16. Anàlisi de les seqüències proteïques i modelatge molecular de les isoformes d'ER?. (A) Longitud de les hèlix 11 i 12 de les diferents isoformes d'ER?. (B) L'hèlix 11 (vermell) i l'orientació de l'hèlix 12 (verd) per ER?2 és diferent d'ER?1, que adopta la forma necessària per la unió del lligand (cercle taronja). El lloc d'unió dels coactivadors s'indica amb la fletxa groga (panel inferior) (Leung, 2006 PNAS 103, 13162-13167).

El domini AF-2 es localitza en aquesta regió i depèn del lligand per a ser activat (Tora, 1989). L'activitat AF-2 d'ER α i d'ER β és completa (Delaunay, 2000 i Cheung, 2003).

Finalment, el domini de dimerització és discontinu entre les regions C i E.

1.7 INTERACCIÓ DEL RECEPTOR D'ESTRÒGENS AL DNA

Durant molt de temps s'havia pensat que els estrògens afectaven la transcripció gènica a través dels seus receptors (ER α o ER β), per la unió directa d'aquests a les seqüències gèniques ERE situades als promotors dels gens diana. Actualment, es coneix que tant ER α com ER β poden regular l'expressió d'aquests gens sense unir-se directament al DNA. Aquesta regulació resulta de la interacció d'aquests receptors nuclears amb d'altres factors de transcripció. Concretament, es entès que el receptor d'estrògens pot regular l'activitat de quatre factors de transcripció: NF-kB, AP-1, Sp-1 i EpRE/ARE.

Es coneix que ER α interacciona amb la subunitat *c-rel* del complex NF-kB i que aquesta interacció afavoreix la unió al promotor de la interleucina-6, activant la seva expressió (Galien, 1997). Recentment, s'ha comprovat que ER α pot interferir en la via de senyalització de NF-kB. Concretament s'ha observat que la inhibició del receptor activa la via de NF-kB (Leung, 2006).

L'activitat del complex AP-1, format pels factors de transcripció *c-fos* i *c-jun*, també pot estar regulada pel receptor d'estrògens. En aquest sentit, s'ha descrit que ER α i ER β poden mostrar efectes oposats sobre l'activitat transcripcional d'AP-1 depenent del lligand unit al receptor (Paech, 1997; Webb, 1995 i Webb, 1999). En el cas d'ER α , l'estradiol, l'estrogen sintètic DES i fins i tot l'antagonista tamoxifè funcionen com activadors d'AP-1 i l'antagonista raloxifè, com activador parcial. En el cas d'ER β ,

l'estradiol i DES funcionen com inhibidors de la via i, els antagonistes tamoxifè, raloxifè i l'inhibidor pur ICI 182,780 com activadors (Paech, 1997). L'anàlisi del mecanisme de l'estimulació de l'activitat transcripcional d'ER α unit a l'agonista en seqüències AP-1 ha revelat que: 1) són necessàries les funcions AF-1 i AF-2 d'ER α , 2) l'estimulació de l'activitat AP-1 es produeix mitjançant la interacció amb els coactivadors de la família p160 i 3) el domini DBD d'ER α és essencial per aquest fenomen. Quant a l'activació de la via AP-1 per ER α unit als seus antagonistes s'ha constatat que també es requereix que el domini DBD estigui intacte i que aquesta activació és independent de les funcions AF-1 i AF-2 del receptor. Es postula que el DBD d'ER α segregaria corepressors que inhibirien l'activitat d'AP-1, facilitant l'activitat transcripcional d'AP1 (Webb, 1999).

Un tercer cas d'acció indirecta del receptor d'estrògens seria amb el factor de transcripció Sp1. Es coneix que ER α interacciona amb Sp1 (Batistuzzo de Medeiros, 1997; Porter, 1996 i Qin, 1999) i que aquesta interacció és independent de la unió de la hormona (Porter, 1996). Es coneix que tant ER α com ER β poden activar la transcripció del receptor de l'àcid retinoic (RAR1), presumiblement per la unió indirecta d'aquests receptors a les seqüències Sp1 de la regió promotora del gen (Sun, 1998). S'ha constatat que l'activació de RAR1 per ER α es produeix en presència de l'antagonista tamoxifè i de l'inhibidor ICI 182,780 i, que aquest efecte es bloqueja en presència d'estradiol (Zou, 1999).

L'element de resposta electroforètic/antioxidant (EpRE/ARE) és un altra seqüència del DNA on ER α i ER β actuen de manera diferent.

1.8 PROTEÏNES CORREGULADORES D'ER α ?

ER?, tal com la resta de receptors nuclears, interacciona amb proteïnes coreguladores que es situen entre el receptor activat i la maquinària de transcripció. La finalitat d'aquesta interacció és la formació i l'activació del complex d'inici de la transcripció, que està format per: la proteïna d'unió a caixes TATA (TBP), factors associats a aquesta proteïna i la RNA polimerasa II.

Existeixen dos tipus de coreguladors: els coactivadors i els corepressors. Els coactivadors o també anomenats els factors intermediaris de la transcripció (TIF), són molècules pont que mitjancen les interaccions entre els factors de transcripció i faciliten l'accés de la maquinària basal transcripcional. Els corepressors són molècules que s'uneixen als receptors nuclears i impedeixen la formació dels complexos activadors de la transcripció. Aquestes proteïnes coreguladores també poden alterar l'estructura de la cromatina degut a que poden presentar activitat ATPasa, histona acetilasa (HAT) o histona desacetilasa (HDAC). L'acetilació d'histones neutralitza la càrrega positiva de la cua N-terminal de la histona, debilitant la seva interacció al DNA i facilitant l'accés de la maquinària transcripcional. Contràriament, la desacetilació de la cua de les histones facilita la interacció amb el DNA reprimint l'activació transcripcional (Hu i Lazar, 2000).

1.8.1 Coactivadors

Els coactivadors que s'uneixen als receptors d'estrògens es denominen de la següent manera: 1) p160 degut a que tenen un pes molecular de 160 KDa i 2) proteïnes associades al receptor tiroïdal (TRAPs) (Fondell, 1999).

Els diferents membres dels coactivadors de la família p160 (SRC-1, SRC-2 i SRC-3) posseeixen en la regió central un domini d'interacció amb els receptors nuclears

que s'anomena caixa-NR i conté tres lisines altament conservades (LXXLL). Aquesta caixa és necessària per l'associació dels coactivadors al seu receptor (Torchia, 1997). En el cas dels receptors d'estrògens s'ha detectat una segona caixa-NR (Chen, 1995). Els coactivadors SRC-2 i SRC-3 presenten també dos dominis d'activació de la transcripció coneguts com AD-1 i AD-2. El AD-1 es troba implicat en la unió amb el coactivador CBP/p300 i l'acetiltransferasa PCAF, i el AD-2 uneix la proteïna amb activitat metiltransferasa CARM1 (Chen, 1999). L'afinitat d'unió d'ER α pel coactivador SRC-3 és superior a la d'ER β (Suen, 1998) i la interacció d'ER α amb SRC-1 *in vitro* és independent de la unió del lligand (Cowley, 1999).

El complex format per les proteïnes coactivadores TRAP/DRIP també connecta els receptors d'estrògens amb la maquinària basal de la transcripció (Ito, 1999). L'eficiència d'unió de TRAP/DRIP *in vitro* és major per ER α que per ER β (Mckenna, 1999).

Els dos complexos de coactivadors presenten activitat acetilasa, el que significa que poden acetilar les proteïnes histones, desorganitzant el nucli del nucleosoma i en conseqüència descompactar la cromatina. El que no es coneix és si tots dos complexos actuen seqüencial o independentment després de la unió als receptors d'estrògens (Fig. 17) (Freedman, 1999).

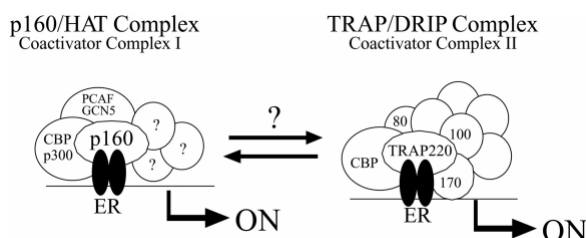


Figura 17. Complexos coactivadors d'ER α de la transcripció.

1.8.2 Corepressors

Existeixen tres corepressors coneguts: 1) una proteïna de 207 kDa coneguda amb el nom de corepressor nuclear (NCoR) (Horlein, 1995), 2) la proteïna RIP-13 (Seol, 1996) i 3) el silenciador mediador del receptor hormonal de les hormones retinoïdes o tiroïdals (SMRT) (Chen, 1995).

Originalment, es van identificar els corepressors com proteïnes associades a un receptor nuclear no unit al lligand que inhibia la seva activitat transcripcional (Horlein, 1995). Aquest seria el cas del receptor de l'àcid retinoic (RAR) i el de les tiroïdals (TR) que, quan no uneixen el lligand, tenen l'activitat transcripcional inhibida degut a la unió de corepressors i del rescat de proteïnes HDACs. Contràriament, els receptors esteroïdals no reprimeixen la transcripció en absència de lligand (Hu i Lazar, 2000). Concretament pel receptor d'estrògens, el canvi des de l'activació a la repressió es produeix quan el receptor s'uneix a l'antagonista, moment en el que s'associa a corepressors i HDACs (Shang, 2002).

1.9 ACTIVACIÓ L·LIGAND DEPENDENT D'ER??

L'anàlisi de l'activitat transcripcional de les diferents isoformes d'ER? ha revelat que únicament la isoforma d'ER?1 és capaç de transactivar en les seqüències ERE dels promotors gènics (Ogawa, 1998 i Leung, 2006). Recentment, el grup de Leung i col·laboradors ha avaluat l'activitat transcripcional d'ER?1 en homo i heterodimerització amb la resta d'isoformes del receptor. Els resultats han revelat que ER?1 era més actiu si heterodimeritzava amb les altres isoformes del receptor que si s'unia a la seva pròpia isoforma (Leung, 2006).

Existeixen dos models que expliquen el mecanisme d'acció lligand dependent del receptor d'estrògens. El primer es basa en el que el receptor uneix el lligand en el citoplasma i el segon en el nucli de la cèl·lula. En tots dos models és necessari l'entrada de la hormona a l'interior cel·lular. Existeix un model que explica el transport de l'estrogen a través de la membrana plasmàtica. Aquest model es basa en que l'estrogen circulant per la sang unit a la proteïna de transport SHBG, entra al citoplasma travessant la membrana citoplasmàtica amb un mecanisme que implica la unió a proteïnes del citoesquelet com la Fibulina i Filamina (Ng, 2006). Un cop l'estrogen ha entrat al citoplasma, pot unir-se al receptor localitzat al citoplasma o bé entrar al nucli. Existeixen també dos models que explicarien el transport de l'estradiol al nucli: el primer seria per difusió a través dels porus nuclears i el segon per transport actiu mediat entre les senyals de localització nuclears del receptor d'estrògens i la proteïna hsp 90 (Guiochon-Mantel, 1996). El receptor d'estrògens, quan no té unit el lligand, forma un complex amb la proteïna hsp-90 (Pratt, 1997), que proporciona estabilitat al receptor fins que l'estradiol s'uneixi. La unió de l'estradiol al receptor d'estrògens indueix un canvi de conformació que facilita la dimerització i el transport al nucli si està localitzat en el citoplasma. A partir d'aquest moment s'uneix a les seqüències ERE dels promotors de gens regulats per estrògens i inicia el rescat de proteïnes coactivadores com SRC-1 i les acetilases p300 i PCAF (McKenna, 1998). L'activitat histona acetilasa dels coactivadors acetila els residus lisina de les histones H3 i H4 del nucleosoma, modificant la cromatina i facilitant la incorporació de la maquinària d'inici de transcripció (Fig. 18).

Per a que la RNA polimerasa II iniciï la transcripció, els factors de transcripció basals TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF i TFIIH han de formar un complex amb el cor del promotor (Greenblatt, 1997). El TFIID, és una proteïna d'unió a la caixa TATA

(TBP) del promotor associat amb un mínim de vuit factors més (TAF) (Verrijzer, 1996).

ER? interacciona directament amb el factor basal de la transcripció TFIIB i, a través d'aquest, amb el TBP i diversos TAF del TFIID (Fig. 18).

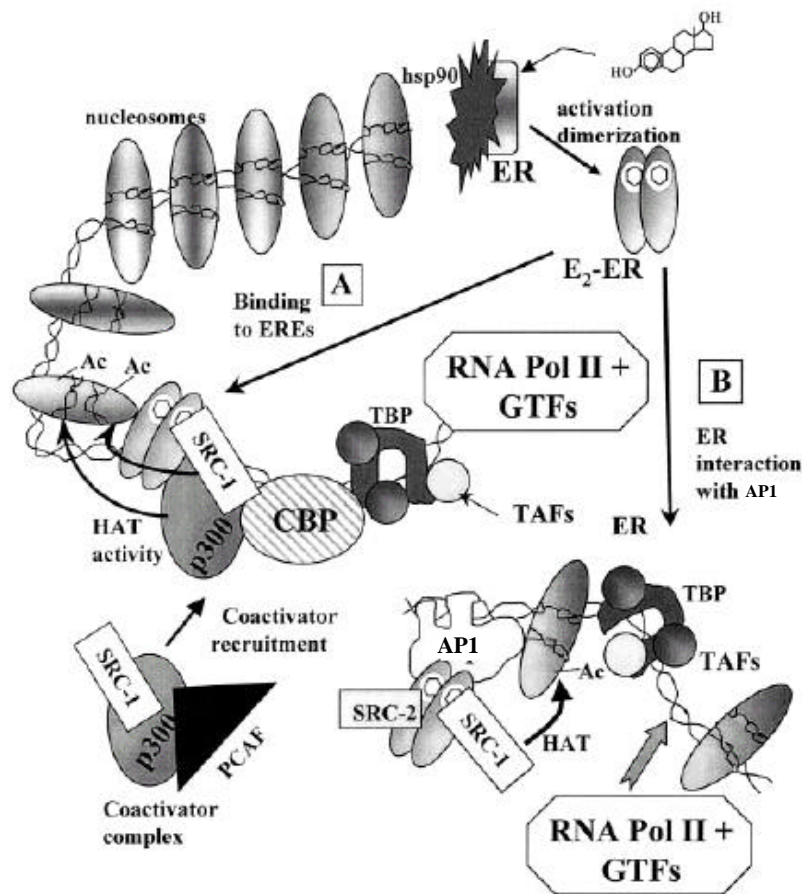


Figura 18. Diagrama esquemàtic dels mecanismes d'acció del receptor d'estrògens en el nucli cel·lular. (A) Via clàssica: unió a seqüències ERE dels promotors. (B) Via no clàssica: interacció i regulació de la transcripció del factor AP-1. (Modificat de Klinge i col., *Steroids* 65, 2000).

1.10 ACTIVACIÓ LLIGAND INDEPENDENT D'ER?

Els receptors d'estrògens es poden activar en absència de lligand. El mecanisme que implica l'activació del receptor és la fosforilació (Weigel, 1996).

Per ER α , nombrosos estudis han analitzat la fosforilació del receptor. La fosforilació en aquest receptor pot ser activada per: 1) reguladors generals de l'estat de fosforilació cel·lular com la proteïna cinasa A (PKA) (Aronica, 1993; Bunone, 1996 i Ince, 1994) o la proteïna cinasa C (PKC) (Ignar-Trowbridge, 1996; Patrone, 1998; Lahooti, 1998 i Le Goff, 1994) i 2) senyals extracel·lulars com factors de creixement, citocines o neurotransmissors (Chalbos, 1994). Els efectors de la fosforilació d'ER α poden ser la MAPK (Kato, 1995) i reguladors del cicle cel·lular com el complex CDK2/Ciclina A (Trowbridge, 1997).

Per ER α , es coneix que el factor de creixement EGF indueix a que la MAPK fosforil·li les serines 106 i 124 del receptor, estimulant la interacció amb el cofactor SRC-1 (Tremblay, 1999).

1.11 EXPRESSIÓ I FUNCIÓ DELS RECEPTORS D'ESTRÒGENS A LA PRÒSTATA HUMANA

1.11.1 Expressió durant el període de desenvolupament i a la pròstata adulta

Existeix un únic treball que analitza l'expressió d'ER α i d'ER β durant el desenvolupament de la pròstata humana (Adams, 2002). Aquest estudi mostra com l'expressió d'ER α es manté en la totalitat dels nuclis de les cèl·lules epitelials i en la majoria de les cèl·lules de l'estroma de la pròstata durant les etapes fetal, neonatal i prepuberal del desenvolupament. Per contra, en l'etapa puberal i durant l'etapa adulta, l'expressió del receptor es restringeix principalment a l'epiteli basal. L'inici de l'expressió d'ER α en el desenvolupament es produeix a la meitat de la gestació i coincideix amb l'augment de la proliferació de l'epiteli cel·lular i una elevació dels nivells d'estrògens en la glàndula.

Pel que fa a ER?, no es detecta la proteïna en cap de les cèl·lules epitelials o de l'estroma de la pròstata durant el desenvolupament fetal. En canvi, al mes del desenvolupament postnatal i durant l'etapa adulta es detecta exclusivament en el nucli de les cèl·lules de l'estroma circulant dels acins de la pròstata (Adams, 2002).

1.11.2 Expressió en càncer de pròstata

L'expressió d'ER? a les mostres de carcinoma de pròstata ha estat un tema força controvertit a la literatura. Mentre alguns treballs han demostrat la disminució o l'absència de l'expressió (Pascuali, 2001; Pascuali, 2001; Horvath, 2001 i Latil, 2001), d'altres han confirmat l'expressió i fins i tot un augment respecte el teixit no tumoral (Royuela, 2001 i Torlakovic, 2002). Malauradament, la majoria d'aquests estudis no discriminen entre les diferents isoformes del receptor, dificultant la interpretació del resultats. En aquest sentit, s'han realitzat alguns estudis emprant anticossos dirigits contra regions de la proteïna exclusives de cada isoforma o bé amb *primers* específics de PCR que permetien distingir-les. Concretament, els treballs que han analitzat l'expressió de la isoforma d'ER? 1, conclouen que el receptor s'expressa en els nuclis de l'epiteli tumoral (Leav, 2001; Fujimura, 2001 i Torlakovic, 2002). La discrepància entre aquests treballs resideix en quina és l'evolució de l'expressió que el receptor segueix en la progressió tumoral. Alguns treballs observen una disminució de l'expressió associada a un augment del grau de malignitat tumoral (Leav, 2001 i Fujimura, 2001) i un altre treball obté resultats oposats (Torlakovic, 2002). Altrament, en metàstasis prostàtiques en ós, ER? 1 s'expressa abundantment (Zhu, 2004 i Lai, 2004).

Quant a la isoforma ER α 2, es coneix que el receptor també s'expressa en els nuclis de les glàndules de l'epiteli tumoral i que augmenta amb el grau de malignitat del tumor (Fujimura, 2001).

L'expressió d'ER α a la pròstata no ha comportat tanta discrepància entre els diferents autors. En general s'ha acceptat que aquest receptor s'expressa principalment a l'estroma circulant de l'epiteli maligne i benigne de la pròstata tumoral (Leav, 2001; Horvath, 2001; Latil, 2001 i Linja, 2003). Quant al grau d'expressió, alguns treballs observen menor expressió en carcinoma respecte a la pròstata no tumoral (Leav, 2001 i Latil, 2001) i un altre no detecta diferències d'expressió entre la pròstata no tumoral i els tumors homodepenents i refractaris (Linja, 2003).

1.11.3 Fenotip de la pròstata en els Ratolins *knockout* dels receptors d'estrògens

Els estudis de ratolins *knockout* d'ER α conclouen que aquest receptor mitjança els efectes dels estrògens sobre la diferenciació epitelial de la pròstata (Imamov, 2004). D'altres estudis conclouen també que els estrògens a través d'ER α exerceixen un efecte inhibidor de la proliferació prostàtica (Ho, 2004 i Chang, 1999).

Els estudis de ratolins *knockout* d'ER α conclouen que l'absència d'aquest receptor durant l'etapa del desenvolupament fetal determina l'aparició de lesions de PIN en els ratolins adults (Prins, 2001 i Omoto, 2005).

1.12 EL CICLE CEL·LULAR

La proliferació de les cèl·lules eucariotes es produeix mitjançant el cicle cel·lular. La tasca fonamental del cicle cel·lular és assegurar que el DNA es repliqui

amb fidelitat i que còpies idèntiques de cromosomes es distribueixin equivalentment en les dues cèl·lules filles (Heichman i Roberts, 1994). L'entrada en el cicle cel·lular és un procés que respon a factors de creixement, hormones, citocines i interaccions entre les cèl·lules o amb la matriu extracel·lular (Assoian, 1997). Aquestes senyals externes convergeixen en els factors promotors del cicle cel·lular, coneguts com les cinases dependents de ciclins (CDKs) encarregades d'activar i regular la progressió normal del cicle cel·lular (Morgan, 1997). Existeixen diferents CDKs que actuen de forma seqüencial a través de les diferents fases del cicle donat que estan regulades per diverses proteïnes ciclins que s'expressen en moments concrets del cicle cel·lular. La unió de les CDKs a les ciclins és imprescindible per a la seva funció, que resideix en la fosforilació de proteïnes que participen en el cicle cel·lular.

El cicle, es divideix en quatre fases: 1) Fase G1a, en la que la cèl·lula integra les senyals extracel·lulars que indueixen la iniciació del seu creixement i del programa del cicle cel·lular. És en aquest moment en el que la cèl·lula pren la decisió de sortir de cicle per diferenciar-se o de continuar-lo per proliferar, en aquest últim cas, la cèl·lula progressa a la fase G1b, 2) Fase S, en la que la cèl·lula duplica el material genètic i citoplasmàtic, 3) Fase G2, en la que la cèl·lula es prepara per la mitosi i 4) Mitosi, en la que la cèl·lula reparteix el material genètic i el contingut citoplasmàtic entre les dues cèl·lules filles.

1.12.1 Regulació de la progressió del cicle pels complexos ciclina/CDK

La regulació de les CDKs es produeix a diversos nivells per: 1) la síntesi i degradació de les ciclins durant les diferents fases del cicle, 2) la formació dels complexos CDK4-6/ciclina D, CDK2/ciclina E, CDK2/ciclina A i CDK1/ciclina B, 3) les fosforilacions activadores per la cinasa CAK en les treonines 160 i 161, residus que poden ser defosforil·lats per la fosfatasa Kap1, 4) les fosforilacions inhibidores per les

cinases Wee1 i Myt1 en els residus tirosina, residus que poden ser defosforil·lats per la fosfatasa cdc25, 4) la unió a proteïnes repressores de les famílies ink4 (p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} i p19^{Ink4d}) i Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) i 5) la localització intracel·lular.

El cicle cel·lular comença quan els factors de creixement de la via Ras/Raf/MEK/ERK1,2 indueixen la transcripció de la ciclina D1 (Lavoie, 1996), i els de la via PI3K/PKB/GSK3 augmenten la seva vida mitjana (Diehl, 1998). En la fase G1a, es forma el complex CDK4-6/Ciclina D1 i té com a funció la fosforilació de la proteïna retinoblastoma (Rb) (Lundberg i Weinberg, 1998). La proteïna Rb, és una proteïna supressora de tumors que en estat d'hipofosforil·lació manté segrestats els factors de transcripció de la família E2F. La hiperfosforil·lació de la proteïna Rb per les CDKs de la fase G1a permet l'alliberament del factor de transcripció E2F que activa l'expressió de gens necessaris per a l'inici i la progressió de la fase S. Aquests gens són els següents: 1) gens implicats en la replicació del DNA (PCNA, DNA polimerasa i ribonucleòtid reductasa) i 2) proteïnes reguladores del cicle cel·lular (ciclina A, ciclina E i cdc25) (Grana, 1998 i Lavia i Jansen, 1999). Una altra funció del complex CDK4-6/ciclina D seria la unió a proteïnes de la família Cip/Kip, com la p27^{Kip1} i la p21^{Cip1}, dos potents inhibidors de la CDK2 (Sherr i Roberts, 1995). Aquesta unió té dues funcions, la primera és l'estabilització del complex CDK4-6/ciclina D i facilitar la seva localització nuclear sense inhibir l'activitat cinasa de la CDK (Cheng, 1999) i la segona, deixar lliure el complex CDK2/ciclina E per a que actui durant la fase G1b del cicle. D'aquesta manera, el complex CDK2/ciclina E, continua fosforil·lant la proteïna Rb i activa el origen de replicació del DNA (Jallepalli i Kelly, 1997). Durant la fase S es forma el complex CDK2/ciclina A, que, a més de continuar fosforil·lant la proteïna Rb, activa també alguns enzims de la replicació del DNA. Durant la fase G2, es forma el complex CDK1/ciclina A i durant la mitosi el complex CDK1/ciclina B. Aquest últim

complex fosforil·la la lamina B, la histona H1, proteïnes associades als microtúbuls i d'altres proteïnes de la mitosi, permetent el trencament de la coberta nuclear, la condensació dels cromosomes i la formació del fus mitòtic (Morgan, 1997 i Patra, 1999). L'activitat CDK1 també és important per la fosforilació del complex promotor de l'anafase (APC) i desencadenar la sortida de la mitosi. El complex APC és un proteïna E3 ligasa d'ubiquitina que indueix la degradació de proteïnes que impedeixen la segregació de les cromàtides germanes i de la pròpia ciclina B, inactivant la CDK1 (Nasmyth, 1999) (Fig. 19).

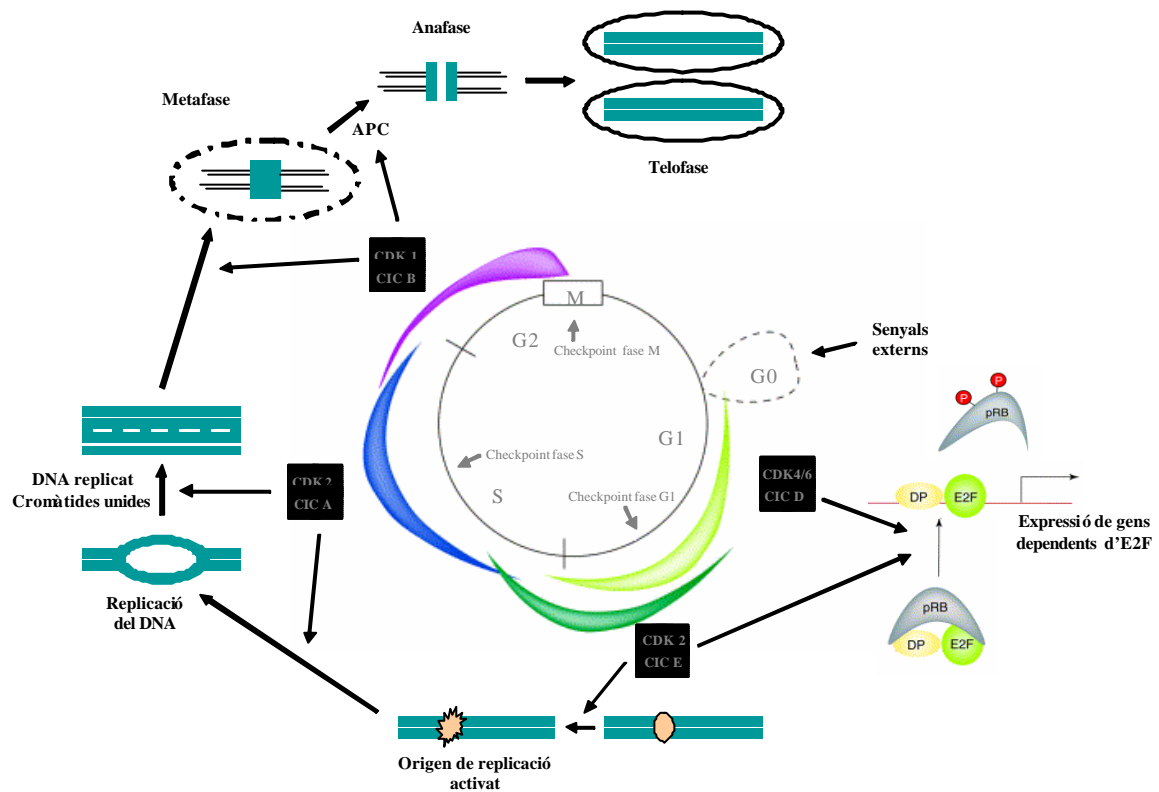


Figura 19. Esquema de les funcions de les CDK en les diferents fases del cicle. Es representen les fases G0, G1, S, G2 i Mitosi (M), els corresponents nivells d'activitat dels complexos CDK-ciclina i els processos que regulen en el cicle cel·lular.

1.12.2 Sistemes de vigilància o de *checkpoint*

Les cèl·lules eucariotes han desenvolupat mecanismes de vigilància intracel·lular o *checkpoints* que controlen que els processos del cicle cel·lular funcionin correctament. Si els processos del cicle cel·lular no es produeixen correctament, aquest s'atura per corregir els defectes i en el cas que no sigui possible la correcció, s'inicia el programa de mort cel·lular (Elledge, 1996).

Els mecanismes de vigilància intracel·lulars que controlen la progressió del cicle cel·lular són: 1) el de la entrada al cicle cel·lular (fase G1), 2) el del dany o replicació del DNA (fase S), on diverses proteïnes sensores de la família ATM i ATR detecten talls i/o DNA de cadena senzilla (Weinert, 1998) i 3) de fus mitòtic (fase M), on la proteïna Mad2 detecta una gran varietat de defectes del fus mitòtic.

1.12.3 El cicle cel·lular i càncer

El descontrol de la proliferació cel·lular és el principal pilar on resideix el càncer, i els gens de les cèl·lules tumorals que habitualment adquireixen lesions són els que regulen directament el cicle cel·lular. La major part de les alteracions de la maquinària reguladora del cicle cel·lular són d'origen genètic. Les alteracions genètiques més freqüents en càncers humans són les que afecten a la maquinària reguladora de les fases G1 i S, degut a que són les fases més sensibles a les senyals externes. Les dues grans rutes que operen en aquestes dues fases són les que regulen: 1) l'activitat de la proteïna Rb que actua sobre l'expressió dels gens necessaris per a la progressió de la fase G1 i en la que participen les proteïnes p16^{INK4a}, CDK4/6 i ciclina D, i 2) l'activitat CDK2 que es troba implicada en l'inici i la progressió de la síntesi del DNA i en la que participen les proteïnes p21^{Cip1}, p27^{kip1}, ciclines E i A.

Les proteïnes del cicle cel·lular Rb, p21^{Cip1}, p27^{kip1}, ciclina D1 i ciclina E estan implicades en la tumorigenesis prostàtica.

La pèrdua de la proteïna Rb en tumors humans és freqüent i correlaciona amb un pitjor pronòstic de la malaltia (Brooks, 1995 i Theodorescu, 1997). En la línia LNCaP, la inactivació de Rb és suficient per induir una proliferació androgen independent (Greenberg, 1995 i Masumori, 2001). La pèrdua de funció d'aquesta proteïna en cultius primaris epitelials de pròstata, sobrepassa la senescència cel·lular (Jarrard, 1999). Aquestes dades impliquen la proteïna Rb com un mediador crític de la proliferació del càncer de pròstata. L'acció en part seria deguda a la impossibilitat de reprimir la transcripció de la ciclina A (Knudsen, 1998), contribuint a la seva expressió desregulada i a l'activació de la CDK2.

L'anàlisi de l'expressió de ciclina D1 en càncer de pròstata ha produït resultats contradictoris. Mentre alguns estudis han reportat sobreexpressió de ciclina D1 (Han, 1998 i Shiraishi, 1998), altres han reportat que no es produeix (Gumbiner, 1999 i Drobnjak, 2000). Per contra, la sobreexpressió de ciclina D1 en les cèl·lules LNCaP indueix un augment de la proliferació i una tendència a la androgen independència (Chen, 1998). Un augment dels nivells de ciclina D1 desencadenaria una hiperfosforil·lació de Rb i una major estimulació de la transició de les fases G1-S del cicle cel·lular.

No existeixen publicacions que impliquin l'expressió de la ciclina E en el càncer de pròstata humà. Estudis realitzats en la línia LNCaP suggereixen que l'activitat del complex CDK2/ciclina E no està exclusivament regulada per l'expressió de la ciclina sinó també per la pèrdua de p27^{kip1} (Knudsen, 1998 i Friburg, 2000). La pèrdua de la proteïna p27^{kip1} en el càncer de pròstata s'associa a un pitjor pronòstic de la malaltia

(Macri i Loda, 1998 i Fernández, 1999). Per contra, el ratolí *knockout* de p27^{kip1} indueix tan sols hiperplàsia a la pròstata (Cordon-Cardo, 1998).

1.12.4 Estrògens i cicle cel·lular

L'expressió i l'activació de les proteïnes reguladores del cicle cel·lular que governen la transició de les fases G1-S són induïdes per estímuls mitogènics. En el teixit mamari, els estrògens també augmenten la proliferació cel·lular per un mecanisme independent de les vies clàssiques d'actuació del receptor (Lukas, 1996). Els estrògens indueixen la proliferació de la línia cel·lular de càncer de mama estrògen-dependent MCF-7 estimulants la transició G1-S com a conseqüència de l'augment de l'expressió de c-myc, de ciclina D1, de l'activació del complex CDK4/ciclina D1 i la fosforilació de la proteïna Rb (Carroll, 2000). A més, els estrògens poden estimular la progressió del cicle cel·lular per la pèrdua dels inhibidors p21^{Cip1} (Cariou, 2000 i Lai, 2001) i p27^{kip1} (Cariou, 2000). En conclusió, els efectes dels estrògens sobre el cicle cel·lular es focalitzen en els processos que controlen la entrada, la progressió i la sortida de la fase G1 del cicle cel·lular.

2. OBJECTIUS

En aquesta tesi doctoral s'han plantejat dos objectius principals:

1. Analitzar l'expressió dels receptors d'estrògens, andrògens i de l'enzim P450 aromatasas en la pròstata humana.
 - 1.1. Demostrar l'expressió d'ER α 1 i ER α 2 en els teixits de pròstata humana (sana i tumoral) i en les línies cel·lulars.
 - 1.2. Analitzar la localització de les isoformes ER α 1 i ER α 2 en la pròstata humana (sana i tumoral) i en la línia cel·lular LNCaP.
 - 1.3. Identificar la seqüència de la isoforma humana ER α 503 i analitzar l'expressió en la pròstata humana.
 - 1.4. Analitzar l'expressió d'ER α i AR en la pròstata humana (sana i tumoral) i en les línies cel·lulars.
 - 1.5. Analitzar l'expressió de l'enzim P450 aromatasas en la pròstata humana (sana i tumoral) i en les línies cel·lulars.
 - 1.6. Analitzar la localització de l'enzim P450 aromatasas en la pròstata humana (sana i tumoral).
2. Demostrar el paper d'ER α en la inhibició de la proliferació cel·lular en la línia cel·lular LNCaP.
 - 2.1. Analitzar l'expressió i localització d'ER α 1 i ER α 2 en les diferents fases del cicle cel·lular.
 - 2.2. Avaluar la funció d'ER α 1 sobre la progressió del cicle cel·lular.
 - 2.3. Determinar els mecanismes d'acció d'ER α 1 en les diferents fases del cicle cel·lular.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 MATERIAL

3.1.1 Mostres de próstata humana

En aquest estudi s'ha inclòs dos tipus de pacients, uns amb carcinoma de pròstata en l'estadi T2/T3N0M0 sotmesos a una prostatectomia radical i altres pacients amb càncer de bufeta sotmesos a una cistoprostatectomia radical. Les mostres de pròstata procedents de prostatectomia radical que van arribar al patòleg es van analitzar morfològicament, i es van separar parts de teixits morfològicament sanes de parts de teixit morfològicament tumorals. Les mostres de teixit prostàtic procedents de cistoprostatectomia radical es van utilitzar com a control de pròstata no tumoral. Es va separar teixit de cada una d'aquestes parts per a l'extracció del RNA total i de la proteïna. Aquests teixits es van congelar a -80°C fins el moment de l'extracció.

3.1.2 Línies cel·lulars

En aquest estudi s'ha treballat amb les següents línies cel·lulars de pròstata humana: LNCaP-FGC, PC3, i PZ-HPV-7. El clon de la línia cel·lular LNCaP-FGC prové d'una metàstasi de node limfàtic d'un home d'origen caucàsic de 50 anys amb diagnòstic confirmat de carcinoma de pròstata metastàtic. L'estimulació amb DHT modula el creixement i la producció de fosfatasa àcida en aquest tipus cel·lular. La línia PC3 prové d'una metàstasi òssia de grau IV d'un adenocarcinoma de pròstata d'un individu caucàsic de 62 anys. Aquesta línia presenta escassa activitat fosfatasa i 5-alpha reductasa. Finalment, la línia cel·lular PZ-HPV-7 deriva de cèl·lules epitelials cultivades a partir de teixit de zona perifèrica d'una pròstata normal procedent d'un individu caucàsic de 70 anys. Les condicions de cultiu per a les línies cel·lulars han estat: una temperatura de 37°C i una atmosfera al 5% de CO_2 . Es va utilitzar el medi RPMI 1640

(PAA Laboratoris) per les LNCaP i les PC3, i medi Keratinocyte-SFM (Invitrogen-Life Technologies) per a les PZ-HPV-7. El medi RPMI es complementa amb 50000 U de Penicil·lina, 50 mg d'Estreptomicina (Pen-Strep Solution, Biological Industries), 10mM de Piruvat Sòdic (Biological Industries), 29.2 mg/ml de L-glutamina (incorporat en el medi RPMI 1640), 5 ml d'aminoàcids no essencials (PAA Laboratoris) i un 10 % de Sèrum de Vedella Fetal (FCS) (PAA Laboratoris). El medi Keratinocyte-FSM es complementa amb 2.5 µg del Factor de Creixement Epidèrmic (EGF) (Invitrogen-Life Technologies), i 25 mg d'extracte de pituitària bovina (Invitrogen-Life Technologies).

3.1.3 Conservació i manteniment de les línies cel·lulars

La línia cel·lular LNCaP-FGC (passes 10-14) i la PC3 (passes 15-18), es van mantenir en flascons T75 amb medi complet RPMI fins a una confluència màxima del 90%. La línia cel·lular PZ-HPV-7 (passes 3-7), es va mantenir en medi complet Keratinocyte-FSM en les mateixes condicions que les altres dues línies cel·lulars. Per tal de subcultivar les línies es van separar les cèl·lules de la placa amb tripsina i es van centrifugar durant 5min a 1500 rpm. El subcultiu es va realitzar a una dil·lució 1:3. Les línies es van conservar en alíquotes de 1.5×10^6 cèl·lules en medi complementat amb un 10% de DMSO en nitrogen líquid. La congelació va ser progressiva; primer congelant les cèl·lules a -70°C tota la nit i a l'endemà següent en nitrogen líquid. Per descongelar, una alíquota de cèl·lules es va descongelar ràpidament submergida en un bany d'aigua a 37°C i sembrada en un flascó T-30. Després de 24 hores per les línies PC3 i PZ i 48 hores per la línia LNCaP es van passar les cèl·lules a flascons T-75.

3.2 MÈTODES

3.2.1 Cultius bacterians

3.2.1.1 Creixement i conservació dels cultius bacterians

El medi de creixement Luria-Bertani (LB) va ser utilitzat pel creixement bacterià. El medi LB conté 10g/l bacotrypton, 5g/l d'extracte de llevat i 5g/l de NaCl en aigua bidestil·lada. Per tal de produir un medi sòlid es van afegir 15g/l d'agar. Els cultius bacterians van ser crescuts a 37°C en presència de l'antibiòtic requerit (ampicil·lina a 50? g/ml o kanamicina a 30? g/ml) i en agitació en el cas de cultius líquids. Els cultius es van conservar en una solució al 30% de glicerol a -80°C.

3.2.1.2 Producció de bactèries competents

Les bactèries competents van ser produïdes utilitzant el mètode de CaCl₂ en gel. Es va utilitzar tampons freds i centrifuga refrigerada segons el mètode de Sambrook (Sambrook i col., 1989), de manera que 3 ml d'un cultiu crescut durant tota la nit va ser incubat en 200 ml de medi LB a 37°C i en agitació fins a una OD600 de 0.6 unitats. Després d'una centrifugació de 15 min a 4000 rpm, les cèl·lules centrifugades es van resuspendre amb precaució en 20 ml de NaCl a 10 mM i amb 100 ml de CaCl₂ a 100 mM. La suspensió cel·lular es va centrifugar en les condicions indicades abans. El precipitat es va resuspendre de nou en 80 ml de CaCl₂ a 100 mM i es va incubar en gel durant 30 min. Es van centrifugar les cèl·lules i es van resuspendre de nou en 20 ml de CaCl₂ a 100 mM. Finalment, després d'una incubació de 3-4 hores en gel, la suspensió cel·lular es va barrejar amb glicerol estèril fins arribar al 30%. Les preparacions de cèl·lules es van congelar a -80°C.

3.2.1.3 Transformació bacteriana per xoc tèrmic

Les cèl·lules competents es van incubar en gel durant 30 minuts amb una quantitat de 5- 30 ng de DNA plasmídic. Transcorregut el temps van ser sotmeses a un xoc tèrmic a 42°C durant 45 segons i immediatament 3 minuts en gel. A continuació es van incubar les cèl·lules amb 0.5 ml de medi LB calent a 37°C durant 1 hora i a 220 rpm. Seguidament es van sembrar les cèl·lules en medi LB sòlid i l'antibiòtic requerit i finalment, es van incubar a 37°C entre 14-16 hores.

3.2.1.4 Expressió i purificació de proteïnes recombinants en bactèria

Es va expressar la proteïna recombinant GST-ER²/cx en la soca bacteriana d'*E. Coli* BL21. Es va dil·luir 3 ml d'un cultiu (crescut tota la nit) de BL21 transformat amb el constructe GST-ER²/cx en un volum de 500 ml de medi nou i es va deixar créixer en agitació a 37°C fins a una OD600 de 0.8-1. En aquest moment es va induir l'expressió de la proteïna recombinant amb IPTG a una concentració final de 0.4 mM. El cultiu es va incubar en agitació durant 4h a 37°C. Les cèl·lules bacterianes es van separar del medi per centrifugació durant 15 minuts, a 4°C, i a 4000 rpm i es va congelar el precipitat cel·lular a -80 °C. Les bactèries es van resuspendre en 10 ml de medi NETN fred (100 mM NaCl, 1mM EDTA, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.5% NP-40 (v/v), 1 mM DTT). La lisi bacteriana es va portar a terme per sonicació en gel en 4 cicles de 10 segons. Els *debris* insolubles es van separar per centrifugació durant 30 min, 4°C, i a 13000 rpm. La purificació de la proteïna de fusió GST-ER²/cx es descriu en el capítol 3.2.4.5.

3.2.2.Mètodes d'anàlisi del DNA

3.2.2.1 Purificació del DNA plasmídic

Per tal d'obtenir DNA plasmídic es van realitzar *minipreps* a partir de cultius crescuts tota la nit en presència de l'antibiòtic requerit. El DNA utilitzat per a clonatges *in vitro*, digestions i reaccions de PCR es va obtenir utilitzant el kit d'extracció WizardPLUS miniprep DNA (PROMEGA). El DNA per a les transfeccions en cèl·lules eucariotes, es va obtenir utilitzant el NucleoBond plasmid mini kit (BD). En tots dos casos, l'extracció està basada en el mètode modificat de la lisi alcalina (Sambrook i col., 1989) combinat amb una purificació del DNA en columnes d'una matriu de resina. Es va procedir a l'extracció seguint les respectives instruccions de cadascuna de la cases comercials. El DNA es va conservar a -20°C en aigua bidestilada estèril o en tampó TE (10 mM Tris/HCl pH 7.6, 1 mM EDTA). La concentració es va mesurar amb l'espectrofotòmetre Genequant (Amersham Pharmacia Biotech) a 260 nm.

3.2.2.2 Digestió del DNA plasmídic amb enzims de restricció

Es van utilitzar endonucleases de restricció del tipus II de la casa New England Biolabs per tal de digerir el DNA plasmídic. Les condicions de les digestions podien ser seqüencials o simultànies, depenent del tampó requerit per a cada enzim. En el cas de reaccions seqüencials es va digerir primer 1 μg de DNA plasmídic en presència de 2000 unitats de l'enzim de restricció i en un volum final de 50 μl . En la segona digestió es va afegir també 2000 unitats del segon enzim i es va incrementar el volum de la reacció fins a 80 μl . Totes les reaccions es van realitzar en presència de BSA al 0.1% (v/v).

3.2.2.3 Aïllament de fragments de DNA per electroforesi en gel d'agarosa

Per tal de separar fragments de DNA procedents de digestions (vectors i inserts) o productes de PCR es van sotmetre aquests productes a una electroforesi en gel

d'agarosa. El DNA migrat a través de la matriu d'agarosa (1-1.5 % en TAE 1x- 0.4 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0, 5 µg/100 ml de bromur d'etidi) a 5V/cm longitud del gel es va separar per la mida. Per purificar els fragments de DNA dels gels, el fragment o fragments desitjats es van visualitzar en un UV-transiluminador a 365nm i es van retallar amb l'ajuda d'una ganiveta. El DNA es va extreure del fragment de gel d'agarosa utilitzant el ConcertTM Rapid Gel Extraction kit (Gibco BRL) seguint les indicacions del protocol de la casa comercial. Finalment, el DNA es va eluir amb H₂O bidestil·lada estèril.

3.2.2.4 Lligació de productes de PCR

Per a clonar els productes de PCR purificats de gels d'agarosa es va utilitzar el TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen- Life Technologies). Aquest kit facilita la lligació del DNA purificat en el vector TOPO, i la posterior transformació en cèl·lules d'*E. Coli*. El kit aprofita la capacitat de la Taq polimerasa no termoestable d'afegir una deoxiadenosina (A) en els extrems 3' dels productes de PCR. Així poden lligar-se aquests productes al vector facilitat per aquest Kit, que posseeix un residu deoxitimidina (T) als seus extrems 3'.

3.2.2.5 Lligació de fragments de DNA digerits

La DNA ligasa catalitza la unió d'enllaços fósfor-diéster 3'-hidroxil i 5'-fosfat en presència de magnesi i ATP (Ausubel, 1989). Aquesta reacció s'utilitza pel clonatge de fragments de DNA digerits i purificats del gel d'agarosa. Es van utilitzar quantitats de l'ordre de 50 ng de DNA es van utilitzar per lligar un insert en un vector (ràtio 1:3) utilitzant 100 unitats d'enzim T4 DNA ligasa (New England Biolabs) en un volum de

10 μ l a 16°C durant tota la nit. El control de la lligació sense insert es va realitzar en cada ocasió. Després de la lligació, uns 5 μ l de la reacció es van transformar en bactèries competents i es van realitzar digestions per tal de verificar quines colònies contenien el vector amb l'insert. Finalment, es va seqüenciar l'insert clonat per garantir que aquest no presentava mutacions.

3.2.2.6 Construcció de plasmidis

Es va clonar la seqüència codificant de la forma llarga d'ER β 1 en els vectors d'expressió pEGFP-C3 (Clontech, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) i pFLAG-CMVTM-6a (Sigma). També es va clonar la forma llarga del receptor β 1 amb dues mutacions puntuals en el domini d'unió al DNA (EG167/168AA) en els mateixos vectors d'expressió que la proteïna nativa. Aquests mutants han estat publicats prèviament (Björnström, 2002). També es va clonar la seqüència codificant de la proteïna llarga de la isoforma β 2/cx del receptor d'estrògens en el vector d'expressió pCMV-HA (Clontech).

Els fragments de cDNA de les isoformes d'ER β 1 i d'ER β 2/cx es van generar per PCR a partir d'una llibreria de cDNA de testicle (Marathon-ReadyTM, Clontech). El cDNA del mutant d'ER β 1 es va construir per mutagènesi dirigida utilitzant el QuickChange kit (Stratagene). Aquests fragments es van insertar en pauta de lectura després de l'epítip. Tots els constructes es van seqüenciar per tal de confirmar que els cDNA s'havien insertat en pauta i que les seqüències no presentaven mutacions.

3.2.3 Mètodes d'anàlisi del RNA

3.2.3.1 Extracció de RNA

El RNA total es va extreure de les línies cel·lulars i de mostres de pròstata humana utilitzant el RNeasy Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), seguint les instruccions subministrades per la casa comercial. La retrotranscripció es va realitzar amb 4 µg i 1 µg del RNA de les línies cel·lulars i dels pacients, respectivament. El RNA es va retrotranscriure a partir de *Random Primers* (Invitrogen, Carlsbad, CA), en un volum total de 20 µl, utilitzant la retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen) amb 200U per reacció, 25 mM Tris-HCl, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10 mM ditiotretol, 0.5 mM de cada dNTP, 100 ng de *Random Primers*. La retrotranscripció es va portar a terme en un termociclador MiniCyclerTM (MJ Research) en les següents condicions: 5 minuts a 65°C, 10 minuts a 25°C, 50 minuts a 42°C, 15 minuts a 70°C, i 4°C a temps indefinit.

3.2.3.2. Expressió gènica per RT-PCR semiquantitativa

Un µl del cDNA resultant es va amplificar en 25 µl de reacció en presència de 1 unitat de Taq polimerasa (Ecogen, Barcelona, Espanya), 0.05 mM MgCl₂, 0.2 mM de la barreja dels quatre dexositrinucleòdids i 0.1 µM de la parella de *primers*. A la taula 1 s'indiquen les seqüències dels *primers* emprats, així com els cicles i la temperatura d'*annealing*. El gen ribosomal S18 es va utilitzar com a control d'expressió. La reacció va consistir en una desnaturalització inicial a 94°C durant 5 minuts, seguida d'un període de cicles (variable en nombre per a cada gen amplificat) de desnaturalització a 94°C durant 20 segons, d'*annealing* durant 30 segons i una extensió a 72°C durant 45s. Finalment es va realitzar una extensió a 72°C de 10 minuts. Els productes de PCR es van separar en gel d'agarosa al 1.5% i les bandes obtingudes van ser quantificades utilitzant un sistema d'anàlisi d'imatge (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules,

California). Els productes amplificats es van purificar amb el Qiaquick Gel Purification Kit (QIAGEN), es van clonar amb el sistema TOPO TA Cloning (Invitrogen) i es van seqüenciar amb l'analitzador genètic ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Taula 1: Condicions de la PCR

Gens	Primers	Cicles	T ^a aneling	Producte (bp)
ERβ1	Forward 5'-AACGCCGTGACCGATGCTTTGG-3' Reverse 5'-ACGTGGGCATCAGCATCTCC-3'	39	59	206
ERβ2	Forward 5'-GCCACAGCTGACCACACAATCC-3' Reverse 5'-GCCACAGCTGACCACACAATCC-3'	39	58.7	576
ER? 503 E1-I	Forward 5'-TTGGAGAGCTGTTGGATGGAGG-3' Reverse 5'-TTGGGGCATCACTCTTCATCTG-3'	39	59.4	856
ER? 503 E5-I-E7	Forward 5'-TTGTTCTGGACAGATCATCA -3' Reverse 5'-CATGGCCTTGACACAGAGATA -3'	38	58.5	168
ERa	Forward 5'-CTGTITGGATGCTGAACCGCCC-3' Reverse 5'-GCTGAAGTGGAGCTGGTGGTGG-3'	38	58	271
CYP 19	Forward 5'-TGCTCCTCACTGGCCTTTTTCTC3' Reverse 5'-TGCCGAATCGAGAGCTGTAATG3'	38	57.2	267
AR	Forward 5'-ACGACAACAACCAGCCCGACTCC-3' Reverse 3'-CTCTCTCGCAATAGGCTGCACGG -5'	38	61	551
S18	Forward 5' GATGGGCGGCGGAAAAT-3' Reverse 5' CTTGTACTGGCGTGGATTCTGC-3'	30	*	120

3.2.3.3 Anàlisi de seqüències

La seqüenciació es va realitzar mitjançant el procediment de Sanger, utilitzant didesoxinucleòtids derivatitzats amb fluorocrom (Big Dye, Applied Biosystems). Les reaccions es van portar a terme a partir de 500 ng del DNA plasmídic. Es va utilitzar el

primer M13 per seqüenciar els vectors de TOPO o *primers* específics dels inserts clonats en els vectors d'expressió d'ER?. La reacció es va realitzar seguint el següent esquema de seqüenciació cíclica: desnaturalització inicial a 94°C durant 3 min i 25 cicles a 96°C durant 10 s, *annealing* entre 50-55°C durant 5 s, i una extensió a 60°C durant 4 min. Els productes es van analitzar per electroforesi capil·lar en un seqüenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

3.2.4. Mètodes d'anàlisi de proteïnes

3.2.4.1 Extracció de proteïna

Es va extreure proteïna de les línies cel·lulars i de les mostres de pròstata humana. En el cas dels cultius, les cèl·lules tripsinitzades es van rentar dues vegades amb PBS fred i el precipitat cel·lular es va resuspendre en 100 µl de tampó RIPA fred (150 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 1% SDS, 1% NP-40 and 0.5% Sodium Deoxycolate), complementat amb un còctel d'inhibidors de proteases (Sigma, St Louis, MI). En el cas de les pròstates humanes, es van pulveritzar amb morter en presència de nitrogen líquid. Uns 50 mg de teixit es van resuspendre en 250 µl de tampó RIPA fred i es va agitar durant 30 minuts en fred. A continuació, les cèl·lules i el teixit es van disgregar fent-los passar diverses vegades a través d'una xeringa. Finalment, es van centrifugar els llisats a 19,000 x g a 4°C durant 5 minuts. La concentració de la proteïna es va mesurar amb el kit Biorad-Dc-Protein-Assay(r) (Biorad). La intensitat del color es va quantificar en plaques d'ELISA de 96 pous *Wittaker microplate Reader 2001* (Innogenetics, Ghent, Belgium) a 690 nm i es va determinar la quantitat de proteïna amb l'ajuda d'una recta patró de BSA.

3.2.4.2 Western blot

La mateixa quantitat de proteïna de cada llisat de les línies i mostres humanes va ser sotmesa a una electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). Els extractes proteïcs es van desnaturalitzar durant 3 min a 100°C en presència del tampó de càrrega (10 mM Tris/HCl pH 6.8, 20% Glicerol, 3% SDS (w/v), 1 mM DTT, 0.6% de blau de bromofenol). Les proteïnes separades en el gel es van transferir a membranes de difluoridat de polivinidilè (PVDF) o de nitrocel·lulosa, depenent de l'anticòs primari utilitzat. Cada membrana va ser incubada durant 1 hora a temperatura ambient en solució de bloqueig (TBS-Tween 0.1% vol/vol , 3% de llet desnatada m/vol) i a continuació amb el corresponent anticòs primari dissolt en la solució de bloqueig durant tota la nit a 4°C. La relació d'anticossos, dilucions i tipus de membrana emprats es mostra a la taula 2.

Taula 2: Relació d'anticossos, dilucions i tipus de membranes emprats per western blot

Anticòs	Dil·lució	Tipus de membrana	Casa comercial
ER α 1 PA1-313	1 μ g/ml	PVDF	Afinity Bioreagents (Golden, CO)
ER α 2/cx IBBp9	1:200	PVDF	Sevei de Producció d'Anticossos – IBB Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Espanya)
P450 aromatasas	1:150	PVDF	Acris (GMBH, Germany)
AR N-20	10 μ g/ml	PVDF	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
Actina	1:400	PVDF	Santa Cruz Biotechnology
FLAG	1:2000	PVDF	Sigma (St. Louis, MO)
HA	1:1000	PVDF	Roche (Switzerland)
EGFP	1:1000	PVDF	Santa Cruz Biotechnology

Ciclina D1	2 µg/ml	Nitrocel·lulosa	Santa Cruz Biotechnology
Ciclina A	1:1000	PVDF	Santa Cruz Biotechnology
Ciclina B	1:1000	PVDF	Cell Signalling (Danvers, MA)
N-JNK	1:2000	Nitrocel·lulosa	Cell Signalling
c-jun	1:1000	Nitrocel·lulosa	Ab-cam

Les bandes immunoreactives es van visualitzar amb anticossos secundaris anti-conill, anti-ratolí o anti-rata conjugats amb HRP (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). El revelat es va dur a terme amb els reactius West Dura reagent (Pierce, Etten-Leur, The Netherlands) o ECL (Amerham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK). Les bandes específiques es van quantificar amb l'ajuda d'un sistema d'anàlisi d'imatge (BioRad).

3.3.4.3 Immunohistoquímica en seccions de teixit parafinat

Es van utilitzar seccions de 5 µm de pròstates humanes parafinades. Els talls es van desparafinar en xilè, 3 vegades durant 15 min i es van rehidratar en una sèrie decreixent d'etanols (100%, 96%, 70%, 50%, 0%). L'exposició de l'epítot es va realitzar amb EDTA (1mM) o tampó citrat a pH 6.8 (Dako Cytomation) en un microones, entre 70-94°C, durant 20 i 15 min, respectivament. Després de rentar els talls de teixit amb TBS 3 vegades durant 10 min, es van bloquejar les peroxidases endògenes amb la solució de bloqueig de la peroxidasa (Dako Cytomation) durant 10 min en una cambra humida i en la foscor. Seguidament, es van rentar els talls amb TBS 3 vegades durant 10 min i es van bloquejar les unions inespecífiques de l'anticòs amb la solució de bloqueig (Dako Cytomation). Es van emprar els següents anticossos primaris: anti-ER α 1 (mouse monoclonal PPG5/10; Serotec) i anti-P450 aromatasa

(mouse monoclonal CYP 19; Acris). Tots dos anticossos primaris van ser dissolts en la solució de bloqueig (dil·lució 1:20 per tots dos) i es van incubar durant tota la nit a 4°C. Després de la incubació amb l'anticòs primari es van rentar els talls amb TBS 3 vegades durant 5 min. La incubació amb l'anticòs secundari es va mantenir durant 30 min a temperatura ambient utilitzant el sistema EnVision HRP (Dako Cytomation). Després de 3 rentats amb TBS de 5 min cadascun, es va revelar el senyal amb diaminobenzidina dissolt en el seu diluent a 6.3 µl/ml (Dako Cytomation). Els talls es van contratenyir amb hematoxilina i es van deshidratar amb una bateria creixent d'alcohols (70%, 96%, 100%) durant 3 min i finalment, en xilè (3 incubacions de 5 min). Les seccions es van muntar amb DPX (BDH Laboratories, England) i es van analitzar amb un microscopi òptic. Els controls negatius es van realitzar incubant les mostres en la solució de bloqueig sense l'anticòs primari.

3.2.4.4 Immunofluorescència en línies cel·lulars

Per l'anàlisi de la localització d'ER α 1 en les línies cel·lulars, es van sembrar 300.000 cèl·lules sobre cobres de vidres de 13 mm de diàmetre (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany), col·locats en plaques de 24 pous. Després de 48 hores de la sembra, les cèl·lules es van rentar amb PBS fred, es van fixar amb paraformaldehid al 4% (vol/vol) durant 15 min en fred i es van rentar de nou amb PBS fred. Seguidament, es van incubar les cèl·lules amb clorur d'amoni a 50 mM durant 30 min i rentar de nou amb PBS 3 vegades durant 3 min. El bloqueig i la permeabilització es va realitzar alhora amb la solució PBS-BSA 1% (vol/vol) i saponina 0.1% (pes/vol) durant 30 min en una cambra humida. Es van incubar amb l'anticòs primari d'ER α 1 (PPG5/10, Serotec) dissolt en la solució de bloqueig en una dil·lució 1:20 durant tota la nit a 4°C. A l'endemà, es va rentar l'excés d'anticòs amb PBS i les cèl·lules es van incubar amb

l'anticòs secundari anti-ratolí Alexa Fluor 568 (Molecular Probes-Invitrogen) a 1:200 en la solució de bloqueig, es van rentar de nou i finalment, es van muntar en un portaobjectes de vidre. El senyal fluorescent d'Alexa Fluor 568 es va captar per microscòpia confocal (LEICA TCS-NT), utilitzant una longitud d'ona d'excitació de 488 nm (laser Kr/Ar) i una longitud d'ona d'emissió a partir de 590 per l'Alexa Fluor 568.

3.2.4.5 Disseny i obtenció d'un anticòs específic de la isoforma ER α 2

En aquest treball ens vam proposar estudiar les dues principals isoformes del receptor d'estrògens beta. Degut a la manca d'anticossos comercials que reconexessin específicament la isoforma del receptor d'estrògens beta2/cx, es va decidir generar-ne un en col·laboració amb el servei de producció d'anticossos de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Espanya). Primerament es va escollir un pèptid (MKMETLLPEATMEQ) que corresponia als últims 14 aminoàcids de la proteïna humana. Aquest pèptid havia estat prèviament utilitzat per altres autors (Ogawa, 1998). Es va afegir una cisteïna en l'extrem N-terminal del pèptid i es va conjuguar amb KLH. Es van realitzar quatre immunitzacions amb el pèptid conjugat a dos conills (nomenats conills 758 i 759 respectivament).

3.2.4.6 Síntesi de la proteïna recombinant GST-ER α 2

Es va sintetitzar la proteïna recombinant GST-ER α 2 per tal de confirmar que l'anticòs per a ER α 2 reconeixia específicament la proteïna humana. El cDNA sencer que codifica per la proteïna de ER α 2 es va clonar en pauta en el vector pGEX-2T. Un

cop clonat, es va seqüenciar per tal d'assegurar l'absència de mutacions. El vector amb l'insert es va transformar en la soca d'*E. coli* BL21 per tal d'induir l'expressió de la proteïna de fusió com s'ha descrit prèviament en l'apartat 3.2.4.1. La proteïna recombinant es va purificar incubant l'extracte de bactèria amb una suspensió al 50% de boles de glutatió-sefarosa ("GS-beads", Amersham Pharmacia Biotech) equilibrades en el tampó NETN (15 mM NaCl, 1mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1% Nonidet P-40, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 µg/ml leupeptin, 0.5 µg/ml pepstatin). Després de 3h d'incubació a 4°C i en rotació, les boles de GST es van centrifugar a 3000 rpm a 4°C durant 5 min i es van rentar 3 vegades en el tampó fred NETN. Després de l'últim rentat, la proteïna de fusió es va eluir en una solució de 10 mM de glutatió en 50 mM Tris/HCl pH 8.0 a 4°C i en rotació. Finalment, es van centrifugar les boles de GST unides al glutatió i es va recuperar el sobrenedant que contenia la proteïna recombinant GST-ER².

L'especificitat de l'anticòs es va testar amb sèrum immunitzat dels dos conills mitjançant la tècnica d'ELISA. El sèrum pre-inmune es va utilitzar com a control negatiu.

3.2.5. Mètodes d'anàlisi de les línies cel·lulars

3.2.5.1 Transfecció transitòria

Tots els experiments de transfecció es van efectuar amb la línia cel·lular hormonodepenent LNCaP. Es van sembrar cèl·lules en plaques de 100 mm fins a un 70% de confluència. La transfecció de cada constructe es va dur a terme amb Fugene-6 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanya) seguint les instruccions del

protocol. Després de tota una nit de transfecció, es va afegir medi fresc RPMI a cada placa i es va procedir a realitzar els corresponents experiments.

3.2.5.2 Disseny i transfecció transitòria amb oligonucleòtids de siRNA

Es van dissenyar dúplex de siRNA contra la seqüència de l'exó 8 de la isoforma d'ER α 1 (oligonucleòtid sentit 5'-AACACATTTTTGCACTTCATGCCTGTCTC-3' i antisentit 5'-AACATGAAGTGCAAAAATGTGCCTGTCTC-3'). Com a control d'expressió es van utilitzar els oligonucleòtids (sentit 5'-AATGTCAAGTAGCGGA AATAACCTGTCTC-3' i antisentit 5'-AATTATTTCCGCTACTTGACACCTGTCTC-3'). Tots aquests oligonucleòtids es van sintetitzar per transcripció *in vitro* utilitzant el Silencer RNA construction kit (Ambion, Austin, Texas). Les cèl·lules LNCaP es van sembrar en plaques i es van transfectar quan la confluència era del 70% amb FUGENE 6.0 (Roche). 48 hores després de la transfecció, les cèl·lules es van lliurar per analitzar l'expressió del gen ER α per western blot.

3.2.5.3 Anàlisi per citometria de flux i separació cel·lular

Les cèl·lules tripsinitzades es van rentar dues vegades amb PBS-EDTA a 10 mM i una vegada més amb PBS-BSA 1% (vol/vol) abans de la fixació. Les cèl·lules es van fixar afegint 1 ml d'etanol fred gota a gota. Després d'una hora com a mínim de fixació, les cèl·lules es van rentar de nou amb la solució de PBS-BSA 1% (vol/vol) dues vegades. El RNA es va digerir amb 50 mg/ml de l'enzim Ribonucleasa A (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) a 37°C durant 1 h. Finalment, es van tenyir les cèl·lules amb 5 µg/ml de iodur de propidi (PI). L'anàlisi de cicle cel·lular es va realitzar enregistrant la fluorescència amb el citòmetre de flux EPICS XL (Coulter Corp., Hialeah, FL), equipat

amb un laser (Ar; 488 nm). La fluorescència vermella (620 nm) del PI i la llum *scatter* es van mesurar simultàniament. L'anàlisi del l'histograma es va realitzar amb el software del programa Multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). Es van analitzar un mínim de 12,000 cèl·lules per mostra. Per la tècnica de separació cel·lular es va utilitzar el citòmetre de flux FACS Aria (BD Biosciences, San José, CA). Amb tots dos citòmetres, es van discriminar els doblats i agregats cel·lulars. Les cèl·lules tenyides amb PI es van visualitzar en base al seu contingut en DNA i es van aïllar en tres poblacions separades (G0/G1, S i G2/M). Les cèl·lules separades en cada fase del cicle es van centrifugar i rentar amb PBS fred. Finalment es va extreure la proteïna com s'ha descrit anteriorment.

3.2.5.4 Sincronització de la línia cel·lular LNCaP

Les cèl·lules LNCaP es van sincronitzar en la fase G0/G1 mitjançant la privació de l'aminoàcid isoleucina en el medi de cultiu RPMI 1640 complementat amb: 50000 U de penicil·lina, 50 mg de estreptomina, 10 mM de piruvat sòdic, 29.2 mg/ml de L-glutamina, 5 ml d'aminoàcids no essencials i un 6% de sèrum dialitzat. Aquest procediment ha estat descrit prèviament (Cifuentes, 2003). Resumidament, el protocol va consistir en sembrar les cèl·lules en presència de medi complet i a poca confluència. Després de l'adhesió a la placa de cultiu es van incubar en el medi deficient en l'aminoàcid isoleucina durant un període de 36–40h, aconseguint induir un bloqueig de les cèl·lules en la fase G0/G1 del cicle cel·lular. Finalment, es va alliberar les cèl·lules d'aquest bloqueig deixant-les créixer en medi complet RPMI al 10% de FCS i seguidament, es van recollir les cèl·lules a diferents temps (0, 8, 15, 22 i 25 hores).

3.2.5.5 Fraccionament subcel·lular

Per tal de separar l'extracte de proteïnes nuclears de les no nuclears, es van resuspendre 10^6 cèl·lules tripsinitzades en 0.5 ml del tampó hipotònic fred (25 mM MES [morpholin ethane sulfonic acid], pH 6.5), que contenia inhibidors de proteases. Les membranes citoplasmàtiques de les cèl·lules es van llisar amb un homogeneïtzador i, amb l'ajuda d'un microscopi, es va controlar que la lisi fos completa. Els llisats es van centrifugar a 4°C a $3000 \times g$. D'aquesta centrifugació s'obtenia un *pellet*, que corresponia als nuclis, i un sobrenedant que es separava en un tub nou i corresponia a la fracció no nuclear. El *pellet* de la fracció nuclear es va rentar dues vegades amb el tampó hipotònic per tal d'eliminar contaminacions de la fracció no nuclear. Finalment, cada fracció es va ajustar amb el tampó d'extracció de proteïnes RIPA i es va centrifugar a 4°C a $13000 \times g$ durant 5 min.

3.2.5.6 Transfecció transitòria i determinació de l'activitat luciferasa

Els assaigs de luciferasa es van realitzar mitjançant la transfecció transitòria de vectors reportadors del gen de la luciferasa controlats per elements de resposta a factors de transcripció. En aquest treball s'han emprat tres vectors luciferasa diferents controlats pel receptor d'estrògens (ERE) i pels factors de transcripció AP1 i NF- κ B, subministrats pel Dr. Miguel Beato (Barcelona, Espanya), la Dra. Anna Bigas (Barcelona, Espanya) i Dr. Michel Kracht (Hannover, Alemanya), respectivament. En aquest tipus d'assaigs, l'activitat luciferasa és directament proporcional a l'activitat gènica dels factors de transcripció que controlen els promotors reportadors del gen de la luciferasa. L'activitat és mesurada per una reacció de l'enzim luciferasa en presència del substrat luciferina i ATP. Concretament, el substrat oxidat per l'enzim emet una llum que és captada i quantificada per un luminòmetre.

Aquests experiments de luciferasa es van realitzar en plaques de sis pous (NUNC), en les que es van sembrar 300.000 cèl·lules LNCaP per pou en un medi RPMI al 10 % de FCS fins que l'adherència va ser completa. Per tal d'eliminar restes d'hormones del medi de cultiu es van cultivar les cèl·lules durant 24 hores amb medi RPMI (lliure de fenols) i al 10 % de FCS (tractat amb *charcoal*, SIGMA). Transcorregut aquest temps es va procedir a la co-transfecció equimolar dels vectors luciferasa i el d'expressió constitutiva del gen de la β -galactosidasa. Després de les 6-7 hores de transfecció, el cultiu cel·lular es va tractar durant 36-48 hores en un medi RPMI (lliure de fenols) al 1% de FCS (tractat amb *charcoal*) amb estradiol a 1 nM (SIGMA-Aldrich) i amb l'inhibidor del receptor d'estrògens ICI 182,780 (TOCRIS) a 1 μ M. Un cop finalitzada aquesta fase es va procedir a la lisi cel·lular amb 150 μ l del tampó (Promega, Madison, WI) directament sobre el pou i en fred. Els llisats cel·lulars es van centrifugar a 19,000 x g durant 30s a temperatura ambient. A continuació es va pipetejar un volum de 10 μ l d'extracte per a cada mostra directament en una placa de 96 pous opaca. En aquest moment es va procedir a la lectura amb el luminòmetre Luminoscan RS (Lab system, Helsinki, Finland) que injecta directament sobre el pou a llegir un volum de 50 μ l de la solució luciferina just abans de la lectura.

3.2.5.7 Lectura de l'activitat β -galactosidasa

Per tal de normalitzar la transfecció transitòria es va mesurar l'activitat β -galactosidasa dels llisats de les cèl·lules LNCaP. Amb el mateix llisat obtingut per la lectura de la luciferasa, es va pipetejar un volum de 20 μ l directament sobre una placa de 96 pous transparent i es va incubar amb el reactiu X-gal (SIGMA-Aldrich) a 37°C. La reacció colorimètrica emesa en el moment que l'enzim reacciona amb el substrat es

va quantificar a 405 nm amb el lector de plaques d'ELISA *Wittaker microplate Reader 2001* (Innogenetics).

3.2.5.8 Anàlisi del cicle cel·lular per citometria, separació cel·lular i determinació de l'activitat luciferasa

Les cèl·lules LNCaP en creixement exponencial es van transfectar durant tota la nit amb el vector reportador de la luciferasa controlat per seqüències ERE i el vector ψ -Gal. Al matí següent es van tractar durant sis hores amb 10 nM d'estradiol sol o amb 1 μ M de l'antagonista ICI 182780 dissolts en medi RPMI al 10% de FCS. Després del tractament, es van incubar les cèl·lules amb 5 μ g/ml del colorant vital Hoescht 33342 durant 1 h a 37°C en la foscor. Després de la tripsinització, les cèl·lules es van resuspendre en medi de cultiu i es van separar considerant el contingut de DNA. Es van definir tres regions: una per G0/G1, una altra per S i finalment una per G2/M. Un mínim de 100.000 cèl·lules aïllades de cada fase del cicle es van recuperar en tres tubs que contenien medi de cultiu. La separació cel·lular es va realitzar mitjançant el citòmetre FACSAria equipat amb un laser ultravioleta necessari per l'excitació del Hoescht. Les cèl·lules recuperades es van centrifugar i rentar amb PBS fred per tal de lliurar-les amb el tampó de lisi de luciferasa. Finalment, es va procedir a la lectura de la luciferasa.

3.2.5.9 Detecció de la incorporació de BrdU en cèl·lules LNCaP transfectades transitòriament amb ER β 1 per microscòpia confocal

Les cèl·lules LNCaP es van sembrar en cobreobjectes de vidre, es van transfectar transitòriament amb el vector EGFP-ER β 1 i es van tractar amb 10 μ M de BrdU durant

les dues últimes hores de cultiu. Després dels rentats amb PBS, es van fixar amb PFA al 4%, dissolt en PBS (pes/vol) durant 15 min a 4°C, es van permeabilitzar amb tritó X-100 al 0.2%, dissolt en PBS (vol/vol) durant 15 min, i es van tractar amb 4 mg/ml de DNAsa I (QIAGEN) dil·luida en aigua durant 1h a 37°C. Les cèl·lules es van rentar de nou amb PBS i es van incubar en la solució de bloqueig (1% BSA dissolt en PBS (vol/vol)) durant 1h i amb l'anticòs monoclonal anti-BrdU (Sigma) dil·luït cent vegades en la solució de bloqueig durant 1h a temperatura ambient. Després de diversos rentats amb PBS, els cobreobjectes es van incubar 1h amb l'anticòs secundari anti-ratolí Alexa Fluor 568 (Molecular Probes-Invitrogen) a 1:200 en la solució de bloqueig, es van rentar de nou i finalment, es van muntar en un portaobjectes de vidre. El senyal fluorescent d'EGFP i d'Alexa Fluor 568 es va captar per microscòpia confocal (LEICA TCS-NT), utilitzant una longitud d'ona d'excitació de 488 nm (laser Kr/Ar) i una longitud d'ona d'emissió de 425-550 nm per l'EGFP i a partir de 590 per l'Alexa Fluor 568.

3.2.5.10 Detecció de la incorporació de BrdU en cèl·lules LNCaP transfectades transitòriament amb ER β 1 per citometria de flux

Les cèl·lules LNCaP es van sembrar en plaques de 100 mm, es van transfectar amb el vector EGFP-ER β 1 i tractar amb BrdU (10 μ M) durant les dues hores últimes del cultiu. Dos milions de cèl·lules es van tripsinitzar, fixar en etanol fred (75% dissolt en PBS (vol/vol)) a 4°C durant 1h i es van rentar en una solució de rentat (PBS-BSA al 0.1% (pes/vol)). El DNA de les cèl·lules es va desnaturalitzar a temperatura ambient durant 20 min amb 1 N d'HCl, rentar amb la solució de rentat i neutralitzar amb 0.1 M de borat sòdic a temperatura ambient durant 2 min. Les cèl·lules es van rentar de nou amb la solució de rentat i es van incubar amb l'anticòs anti-BrdU marcat amb Alexa

Fluor 660 (Molecular Probes-Invitrogen) a una dil·lució 1:5 en PBS-BSA al 0.05% (vol/vol) a 4°C durant tota la nit. Després dels rentats, les cèl·lules es van resuspendre a una concentració de 1×10^6 cèl·lules per mil·lilitre en PBS-BSA al 0.5% (vol/vol), 200 mg de RNasa A i 5 μ g/ml de IP. Per l'anàlisi del cicle cel·lular, la fluorescència vermella del IP (emissió de 620 nm), la fluorescència verda del EGFP (emissió de 505 nm) i la fluorescència blava del BrdU (emissió de 660) es van mesurar simultàniament en un citòmetre MoFlo (Dako Cytomation, Fort Collins, CO), equipat amb un laser de 488nm (Ar) i es van recollir un total de 10.000 cèl·lules per l'anàlisi.

Assaig de co-immunoprecipitació

Les cèl·lules LNCaP es van sembrar en flascons T75 i es van transfectar transitòriament amb el vector FLAG-ER β 1 durant tota la nit. A continuació es van tractar amb medi RPMI al 10% de FCS sol o en combinació amb 1 μ M d'ICI 182,780 i es van lliar amb el tampó de lisi (50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Tritó X-100). Els lliats es van centrifugar a 19,000 x g a 4°C durant 5 minuts. Per a cada tractament, es va immunoprecipitar la mateixa quantitat de proteïna (500 μ g/ml) amb 40 μ l de l'ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) per rotació, durant tota la nit, a 4°C. El immunoprecipitat es va recollir per centrifugació a 5000 x g a 4°C durant 30 s i es va rentar amb el tampó de lisi dues vegades. Els *pellets* rentats es van resuspendre en tampó Laemmli (62.5 mM Tris HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.002%), es van bullir durant 3 min i es van analitzar per western blot amb els anticossos JNK i c-jun.

3.2.6 Anàlisi estadístic

L'anàlisi de la variància es va utilitzar allà on s'indica, per testar diferències significatives entre les mitjanes dels grups, i els grups es van considerar estadísticament diferents quan $p \leq 0.05$ (*) o $p \leq 0.01$ (**). Es va realitzar un mínim de tres experiments independents en tots els casos en que es va analitzar la significació estadística.

4. RESULTATS

4.1. EXPRESSIÓ I LOCALITZACIÓ DELS RECEPTORS NUCLEARS EN TEIXIT I EN LÍNIES CEL·LULARS DE PRÒSTATA HUMANA

4.1.1 Expressió del RNA missatger de les isoformes d'ER α en teixit i en línies cel·lulars de pròstata humana

L'expressió de les isoformes del receptor s'ha analitzat: 1) en part sana i tumoral de pròstates amb tumor d'estadi T2/T3N0M0 de la malaltia (n=11), 2) en pròstates sanes (n=3) i 3) en les línies cel·lulars de pròstata.

4.1.1.1 Expressió del RNA missatger de la isoforma d'ER α

L'anàlisi de l'expressió en pacients revela que els teixits de les pròstates tumorals expressen més RNA missatger d'ER α 1 que els de les pròstates no tumorals. No s'han detectat diferències d'expressió entre la part sana i tumoral de les pròstates amb tumor (Fig. 20A). Quant a les línies cel·lulars, s'observa que el nivell del RNA missatger d'ER α 1 de les línies tumorals LNCaP i PC3 és superior al de la línia no tumoral PZ-HV-7 (Fig. 20B). La seqüenciació de la banda de 206 pb obtinguda per la PCR confirma que el cDNA amplificat correspon al RNA missatger d'ER α 1 humà (dades no mostrades).

4.1.1.2 Expressió del missatger de la isoforma d'ER β

L'expressió del RNA missatger d'ER β 2 en les pròstates tumorals és superior a la de les pròstates sanes. De manera similar a ER α 1, no es detecten diferències d'expressió entre la part sana i tumoral de les pròstates amb tumor (Fig. 21A). En les línies

cel·lulars, les línies tumorals LNCaP i PC3 expressen més RNA missatger d'ER β 2 que la línia no tumoral PZ-HV-7 (Fig. 21B). La seqüenciació de la banda de 576 pb obtinguda per la PCR confirma que el cDNA amplificat correspon al RNA missatger d'ER β 2 humà (dades no mostrades).

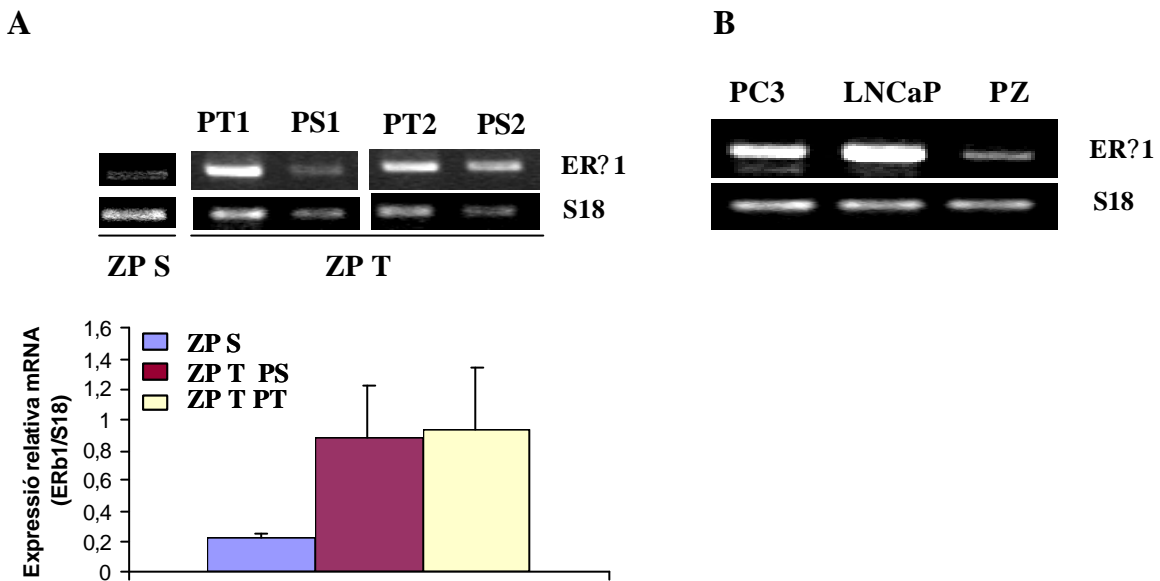


Figura 20: Expressió del RNA missatger d'ER β 1 en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata. (A) Nivells del RNA d'ER β 1 (línia superior) i S18 (línia inferior) analitzats per RT/PCR en pròstates sanes (ZP S) i en part sana (PS) i tumoral (PT) de les pròstates amb tumor (ZP T). Representació gràfica del RNA d'ER β 1 després de la normalització amb S18. Es mostren els promitjos \pm SD. (B) Expressió del missatger d'ER β 1 (línia superior) i del S18 (línia inferior) analitzats per RT-PCR en les línies cel·lulars PZ-HV-7, LNCaP i PC3.

4.1.1.3 Expressió de la isoforma d'ER β 503 humana

Un altre objectiu d'aquest treball ha estat identificar la seqüència del RNA missatger de la isoforma d'ER β 503 humana. Per identificar aquesta seqüència es va realitzar dues PCRs a partir d'una llibreria de cDNA de testicle humà. En la primera PCR es va amplificar la seqüència 5' de l'intró pròxima a l'exó 5 del gen d'ER β i en la segona PCR es va amplificar la seqüència 3' de l'intró pròxima a l'exó 6.

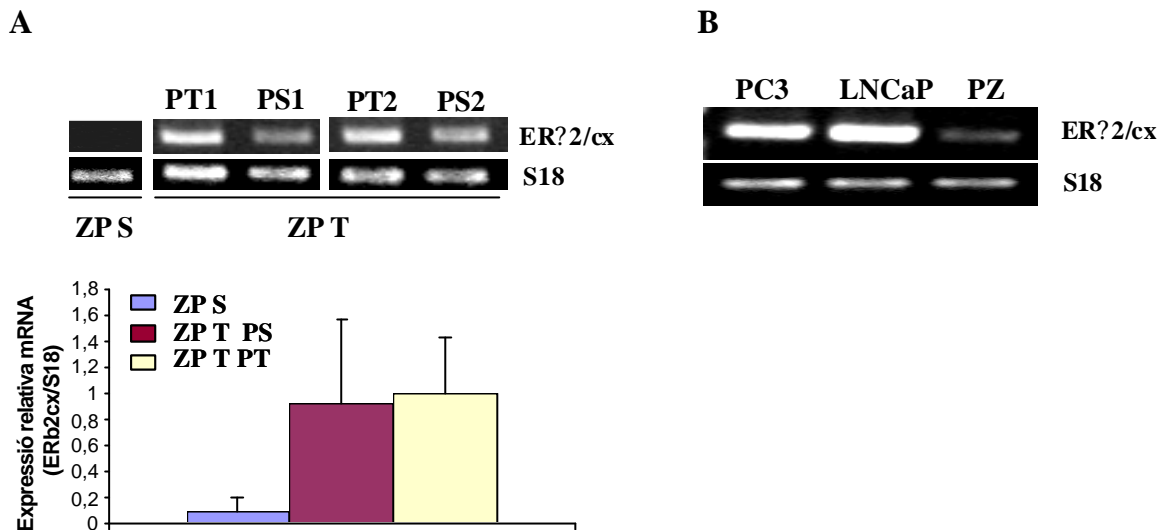


Figura 21: Expressió del RNA missatger d'ER?? en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata. (A) Nivells del RNA d'ER?? (línia superior) i del S18 (línia inferior) analitzats per RT/PCR en pròstates sanes (ZP S) i en part sana (PS) i tumoral (PT) de les pròstates amb tumor (ZP T). Representació gràfica del RNA d'ER?? després de la normalització amb S18. Es mostren els promitjos \pm SD són mostrats. (B) Expressió del RNA d'ER² (línia superior) i del S18 (línia inferior) analitzats per RT-PCR en les línies cel·lulars PZ-HV-7, LNCaP i PC3.

L'estratègia emprada per amplificar la regió 5' de l'intró pròxima a l'exó 5 va consistir en utilitzar un *primer upstream* que reconeixia l'exó 1 del missatger humà i un *primer lowstream* que reconeixia 24 nucleòtids de la seqüència de l'intró humà (I) entre els exons 5 i 6 (Fig. 22A). La seqüència del *primer lowstream* coincideix amb una part de la seqüència de l'intró del ratolí i es va identificar comparant la seqüència intrònica del RNA missatger de ratolí i la seqüència del gen d'ER² humà. El producte amplificat de la primera PCR humana tenia la mida esperada de 856 pb (Fig. 22B). La banda del gel d'agarosa es va retallar i purificar, i cDNA obtingut es va seqüenciar. El producte de la seqüenciació ens va permetre identificar la seqüència 5' de l'intró pròxima a l'exó 5 (Fig. 22C).

Per tal d'amplificar la seqüència 3' de l'intró pròxima a l'exó 6 es van dissenyar un *primer upstream*, que contenia la part final de l'exó 5 i la part inicial l'intró i un

primer lowstream, que conté part de la seqüència de l'exó 7 (Fig 23A). El producte de la PCR amplificat tenia la mida esperada de 163 pb (Fig. 23B). Novament, es va retallar la banda del gel d'agarosa, es va purificar el cDNA i, a continuació, es va seqüenciar. El resultat de la seqüenciació es mostra a la figura 23C.

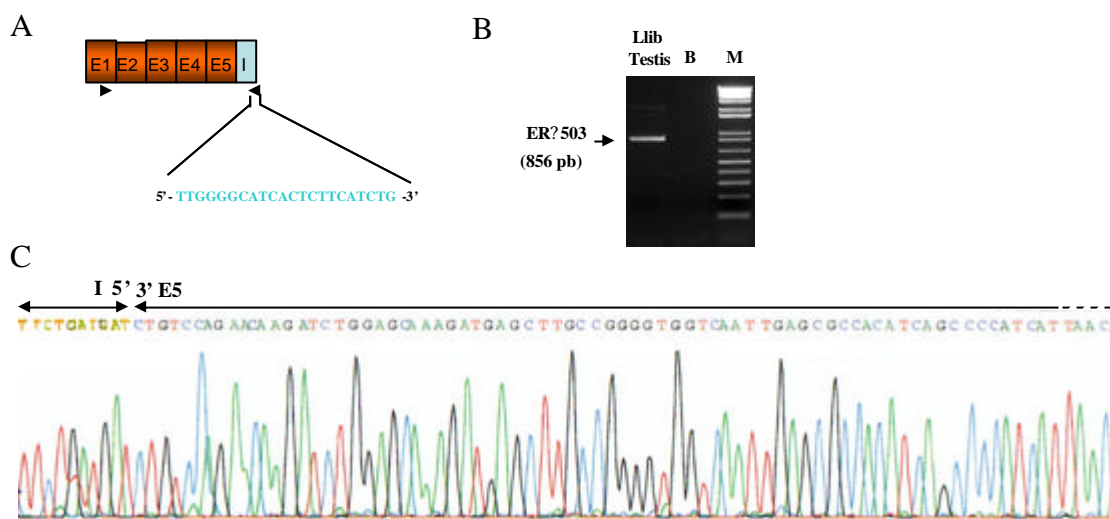


Figura 22: Amplificació de la regió 5' de l'intró (I) propera a l'exó 5 de la isoforma d'ER? 503 humana a partir d'una llibreria de testicle humà. (A) Esquema representatiu del cDNA amplificat per PCR amb els primers (fletxa) emprats. (B) cDNA amplificat en la llibreria de testis humana (Llib. Testis). Marcador (M). (C) Electroferograma de la seqüència amplificada per PCR mostrant la regió 5' de l'intró.

La seqüència de l'intró de la isoforma d'ER???? humana es mostra a la figura 24A (panel superior). La longitud de la seqüència humana és menor a la de ratolí i comparteixen únicament els nucleòtids de la regió pròxima a l'exó 6. En el RNA missatger humà apareix un codó de parada de la lectura que genera una proteïna truncada (Fig. 24B).

Per tal d'avaluar l'expressió del missatger d'ER???? en el teixit de pròstata, es va analitzar per RT/PCR semiquantitativa els nivells del RNA missatger en les línies cel·lulars i en part sana i tumoral de pròstates tumorals. Els resultats d'aquest anàlisi han

revelat que únicament la línia cel·lular tumoral PC3 expressa baixos nivells del RNA missatger d'aquesta isoforma (Fig. 25).

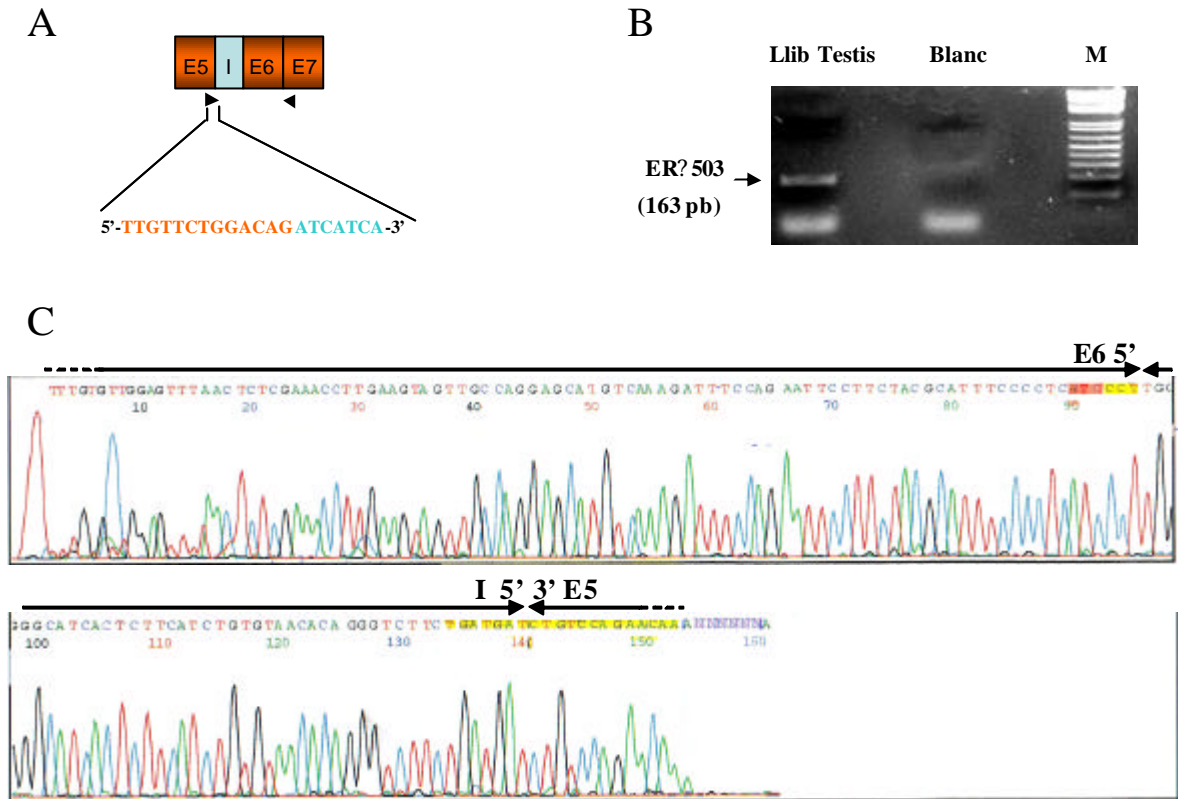


Figura 23: Amplificació de la regió 3' de l'intró (I) pròxima a l'exó 6 de la isoforma d'ER? 503 humana a partir d'una llibreria de testicle humà. (A) Esquema representatiu del cDNA amplificat per PCR amb els primers (fletxa) emprats. (B) cDNA amplificat en la llibreria de testis humana (Llib. Testis). Marcador (M). (C) Electroferograma de la seqüència amplificada per PCR mostrant la regió 5' de l'intró (marcat en blau) i les regions flanquejants dels exons 5 i 6 (marcat en vermell).

A

Humà 5'-CAG ATCATCAGACCCTGTGTTACACAGATGAAGAGTGATGCCCA AGG-3'

Ratolí 5'-AGG TCCTCAGAAGACCCTCACTGGCACGTTGCGCAGATGAAGAGTGCTGCCCA AGG-3'

B

```

1364 attcccggtcttgtggagctcagcctgttgcaccaagtgcggctc
I P G F V E L S L F D Q V R L
1409 ttggagagctgttggatggaggtgtaatgatgggctgatgtgg
L E S C W M E V L M M G L M W
1454 cgtcaattgaccaccocggcaagctcattttgtccagatcatt
R S I D H P G K L I F A P D L
1499 gttctggacagatcattcagaagaccctgtgttacacagatga 1540
V L D R S S E D P V L H R *

```

Figura 24. Seqüència de l'intró de la isoforma d'ER???? humana. (A) Alineament de les seqüències humana i de ratolí (nucleòtids color vermell). Els nucleòtids ombrejats representen els nucleòtids idèntics entre totes dues seqüències. (B) Proteïna resultant de la isoforma d'ER???? humana. La seqüència específica de la isoforma es marca en ombrejat vermell.

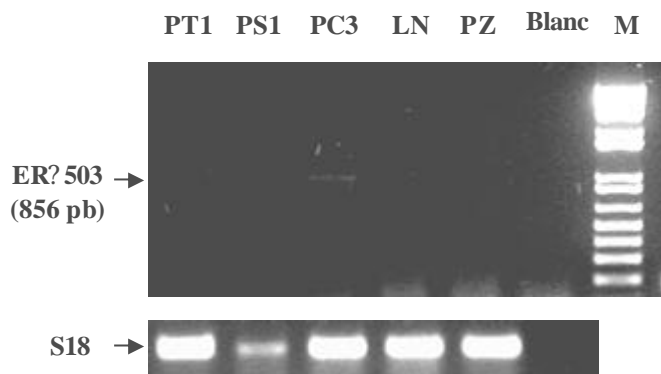


Figura 25: Expressió de la isoforma d'ER α 503 humana en les línies cel·lulars i en mostres de teixit humà de pròstata.

4.1.2 Expressió i localització de la proteïna ER α 1 en teixit i en línies cel·lulars de pròstata humana

4.1.2.1 Expressió de la proteïna ER α 1 per western blot

Per analitzar l'expressió de la proteïna ER α 1 per western blot es va utilitzar l'anticòs comercial PA1-313 que reconeix 19 aminoàcids de la regió C-terminal d'aquesta isoforma del receptor. Els resultats mostren que l'anticòs PA1-313 identifica la proteïna recombinant del receptor (530 aminoàcids) amb un pes molecular aproximat de 55 kDa (Figs. 26A i B). L'anàlisi de l'expressió en línies cel·lulars de pròstata, revela que la línia no tumoral PZ-HV-7 expressa una proteïna amb un pes molecular idèntic al de la proteïna recombinant i que les línies tumorals LNCaP i PC3 expressen una proteïna amb un pes molecular aproximat de 64 kDa (Fig. 26A). Quant a les mostres humanes, es detecta la banda de 64 kDa tant en les pròstates no tumorals com en les tumorals (Fig. 26B).

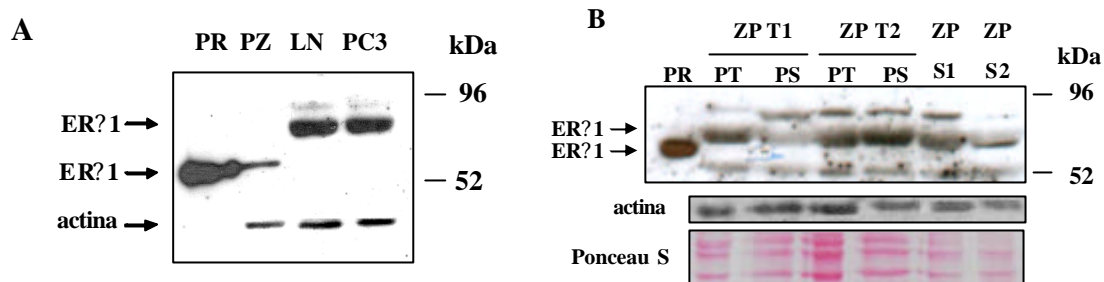


Figura 26: Expressió de la proteïna ER?? en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata. (A) Nivells de la proteïna ER?? i actina analitzats per western blot en les línies cel·lulars PZ-HV-7, LNCaP i PC3. (B) Nivells de la proteïna ER?1 (línia superior) analitzats per western blot i de la càrrega total de proteïna (línia inferior) de pròstates sanes (ZP S) i de part sana (PS) i tumoral (PT) de pròstates amb tumor (ZP T).

4.1.2.2 Determinació de l'especificitat de l'anticòs PA1-313 i de la banda de 64 kDa

Atenent als resultats obtinguts pel western blot, es va plantejar la possibilitat de que la banda de 64 kDa obtinguda en pacients i en línies cel·lulars fos inespecífica. Per resoldre aquesta qüestió es van realitzar tres aproximacions: 1) demostrar l'absència de senyal després d'incubar l'anticòs amb el corresponent pèptid de bloqueig, 2) demostrar la pèrdua d'expressió després del silenciament d'ER?1 amb oligonucleòtids antisentit dirigits contra l'exó 8 d'aquesta isoforma i 3) demostrar que l'anticòs PA1-313 reconeix les proteïnes de fusió FLAG-ER?1 i EGFP-ER?1 en extractes de la línia LNCaP transfectades amb aquests vectors.

Els resultats revelen que la incubació de l'anticòs PA1-313 amb el corresponent pèptid de bloqueig causa una desaparició de la banda de 64 kDa (Fig 27A). La transfecció de les cèl·lules LNCaP amb oligonucleòtids antisentit d'ER?1 durant 48 hores també causa una desaparició de la mateixa banda. Per contra, la transfecció amb la mateixa molaritat d'oligonucleòtids controls no afecta a la desaparició de la banda d'ER?? (Fig. 27B). Finalment, s'observa que l'anticòs PA1-313 reconeix les proteïnes

de fusió FLAG-ER α 1 i EGFP-ER α 1 en extractes de cèl·lules LNCaP transfectades amb els vectors CMV-FLAG-ER α 1 i CMV-EGFP-ER α 1, respectivament (Fig. 27C i D). Addicionalment, l'anticòs PA1-313 reconeix també la proteïna endògena ER α 1 en l'extracte total de les cèl·lules LNCaP transfectades amb el vector CMV-EGFP-ER α 1 (Fig. 27D).

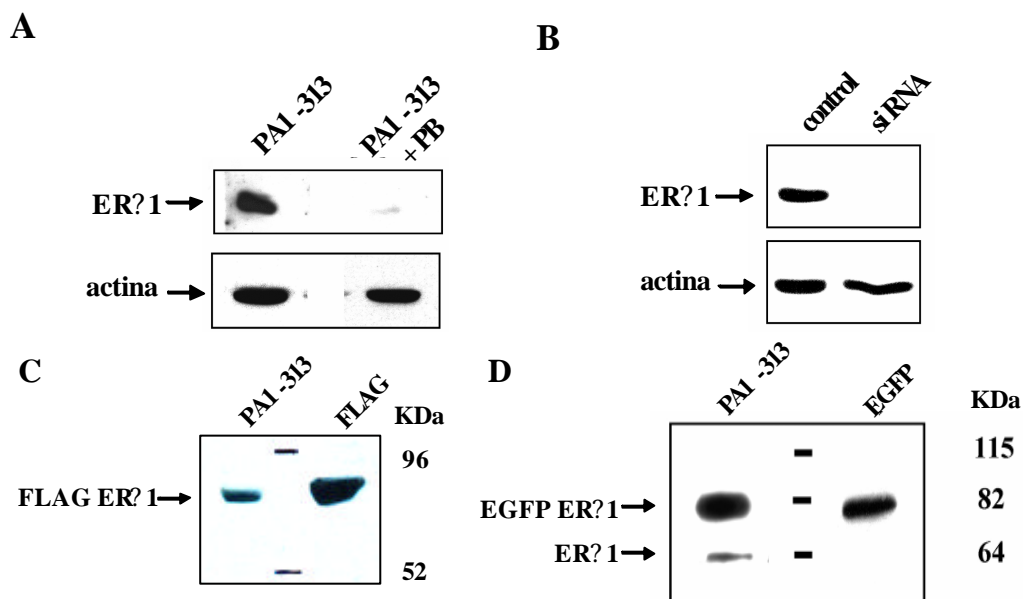


Figura 27: Determinació de l'especificitat de l'anticòs PA1-313. (A) Duplicats d'extractes proteics de les cèl·lules LNCaP es van separar en gels SDS de poliacrilamida i es van incubar amb l'anticòs PA1-313, amb o sense el pèptid de bloqueig. (B) Anàlisi per western blot en extractes proteics de les cèl·lules LNCaP transfectades amb oligonucleòtids antisentit d'ER α 1 o control incubats amb l'anticòs PA1-313. (C) Anàlisi per western blot en duplicats d'extractes proteics de cèl·lules LNCaP transfectades amb el vector FLAG-ER α 1 i incubats amb els anticòssos PA1-313 i FLAG. (D) Anàlisi per western blot en duplicats d'extractes proteics de cèl·lules LNCaP transfectades amb el vector EGFP-ER α 1 i incubats amb els anticòssos PA1-313 i FLAG.

4.1.2.3 Localització de la proteïna ER α 1

L'estudi de la localització de la proteïna ER α 1 per immunohisto- i immunocitoquímica de es va dur a terme amb l'anticòs PPG5/10, i per western blot amb

l'anticòs PA1-313. L'anticòs PPG5/10 reconeix la regió carboxi-terminal de la proteïna ER α 1.

La immunohistoquímica de pròstates sanes revela que la proteïna ER α 1 s'expressa: en la zona perifèrica, majoritàriament en el nucli de les cèl·lules epitelials hiperplàsiques (Fig. 28A) i en la zona de transició, únicament en el nucli de les cèl·lules intermèdies de l'epiteli (Fig. 28B). La immunohistoquímica dels pacients amb carcinoma de pròstata revela que ER α 1 s'expressa tant en el nucli com en el citoplasma de l'epiteli tumoral. En el nucli d'aquestes cèl·lules, ER α 1 s'expressa amb diferents graus d'intensitat (Fig. 28C).

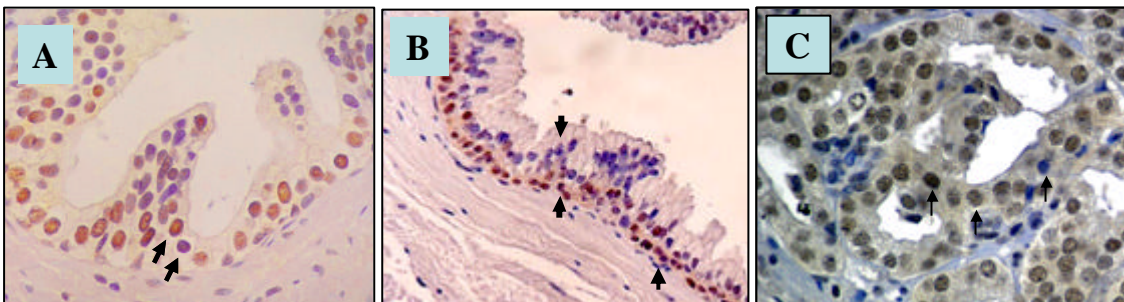
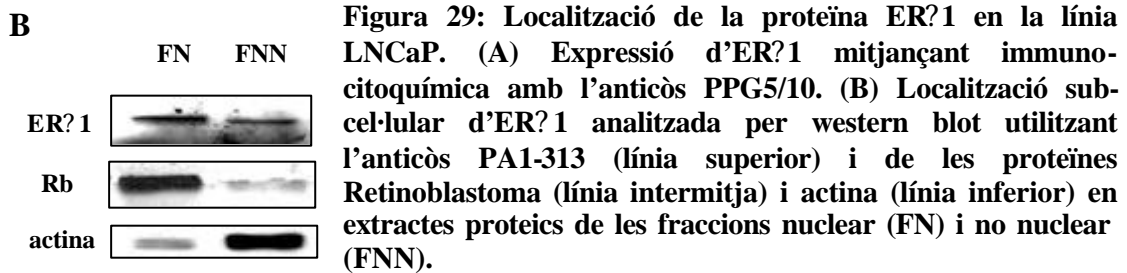
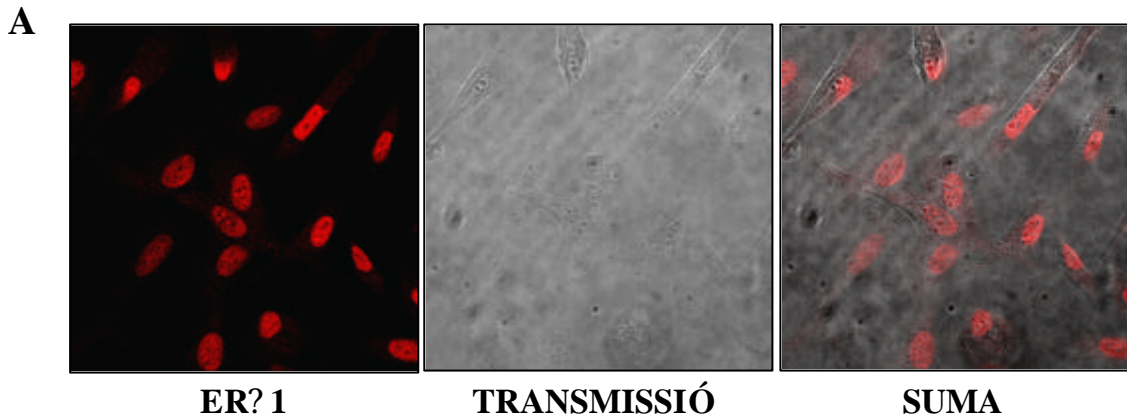


Figura 28: Localització de la proteïna ER α 1 en teixit de pròstata humana. Expressió de la proteïna ER α 1 per immunohistoquímica: (A) de la zona perifèrica i (B) de la zona de transició d'una pròstata sana i (C) de la zona perifèrica d'una pròstata tumoral. Les fletxes mostren cèl·lules epitelials amb diferents graus d'expressió. Augments: A (x40), B (x20) i C (x60).

La localització d'ER α 1 en la línia LNCaP és molt intensa en el nucli i més feble en el citoplasma (Fig. 29A). Coincidint amb els resultats del teixit, l'expressió nuclear de les cèl·lules LNCaP també es detecta amb diferents graus d'intensitat. El fraccionament subcel·lular de l'extracte proteic d'aquesta línia cel·lular confirma que el receptor s'expressa tant en el citoplasma com en el nucli (Fig. 29B). Les proteïnes

retinoblastoma i actina es van emprar com a controls de les fraccions nuclears i no nuclears, respectivament (Fig. 29B).



4.1.2.4 Determinació de l'especificitat de l'anticòs PPG5/10

Per tal de determinar l'especificitat de l'anticòs PPG5/10, es va transfectar la línia tumoral de carcinoma d'endometri HEC (negativa per l'expressió d'ER? 1) amb el vector EGFP-ER? 1 i es va realitzar la immunocitoquímica amb aquest anticòs. Els resultats mostren que les senyals d'EGFP i de l'anticòs PPG5/10 colocalitzen, confirmant que aquest anticòs reconeix la proteïna de fusió EGFP-ER? 1 (Fig. 30).

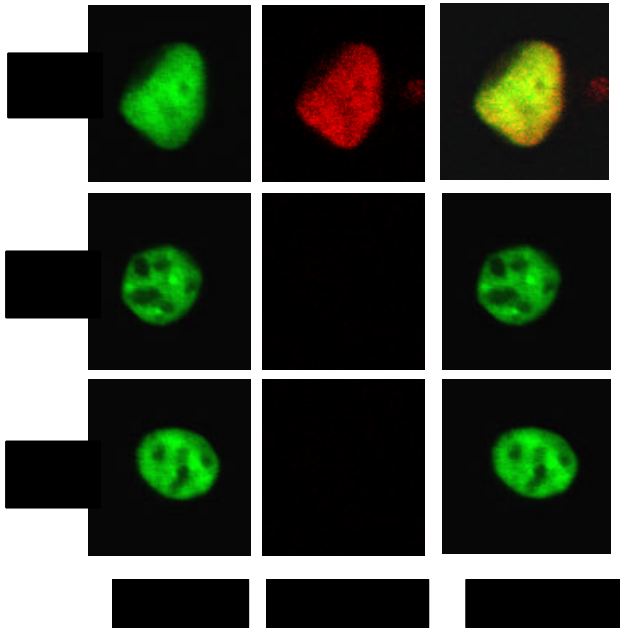


Figura 30: Determinació de l'especificitat de l'anticòs PPG5/10. Les cèl·lules HEC transfectades transitòriament amb el vector EGFP-ER α 1 i incubades amb l'anticòs PPG5/10 i l'anticòs secundari de ratolí Alexa 568 (A) i amb el secundari sol (B). (C) cèl·lules transfectades i sense cap anticòs.

4.1.3 Expressió i localització de la proteïna ER α 2 en teixit i en línies cel·lulars de pròstata humana

4.1.3.1 Expressió de la proteïna ER α 2

L'anàlisi de l'expressió d'aquesta isoforma es va realitzar utilitzant un anticòs que reconeix 19 aminoàcids de la regió carboxi-terminal de la proteïna ER α 2. L'anàlisi d'expressió en les línies cel·lulars de pròstata, revela que les línies PZ-HV-7, LNCaP i PC3 expressen la proteïna ER α 2 (Fig. 31A). Quant a les mostres humanes, també es detecta la proteïna ER α 2 tant en pròstates no tumorals com en les tumorals (Fig. 31B.).

La localització subcel·lular de la proteïna ER α 2 revela que aquesta isoforma s'expressa únicament en el nucli de la línia tumoral LNCaP (Fig. 31C). Es van emprar les proteïnes retinoblastoma i actina com a controls de les fraccions nuclears i no nuclears, respectivament (Fig. 31C).

4.1.3.2 Determinació de l'especificitat de l'anticòs d'ER α 2

El sèrum de conill obtingut abans i després de la hiper-immunització amb el pèptid IBBp9, es va incubar tant amb la proteïna recombinant GST-ER α 2 com amb la proteïna purificada GST. Els resultats d'ELISA mostren que únicament el sèrum hiper-immunitzat reconeix la proteïna recombinant GST-ER α 2. La màxima senyal s'obté amb una dil·lució 1/400 del sèrum (Fig. 32A). Per tal de confirmar novament l'especificitat de l'anticòs, les cèl·lules LNCaP es van transfectar transitòriament amb el vector CMV-HA-ER α 2 i es va realitzar un western blot amb l'extracte proteic d'aquestes cèl·lules amb els anticossos HA i ER α 2. La figura 31B mostra com l'anticòs ER α 2 reconeix la proteïna recombinant HA-ER α 2.



Figura 31: Expressió de la proteïna ER α en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata. (A) Nivells de la proteïna ER α i actina analitzats per western blot en les línies cel·lulars PZ-HV7, LNCaP i PC3. (B) Nivells de la proteïna ER α 2 (línia superior) analitzats per western blot i de la càrrega total de proteïna (línia inferior) de les pròstates sanes (ZP S) i de la part sana (PS) i tumoral (PT) de les pròstates amb tumor (ZP T). (C) Localització subcel·lular de la proteïna ER α en la línia LNCaP per western blot (panel superior) i de les proteïnes Retinoblastoma (panel intermitja) i actina (panel inferior) en extractes de proteïnes de les fraccions nuclear (FN) i no nuclear (FNN) de la línia cel·lular LNCaP.

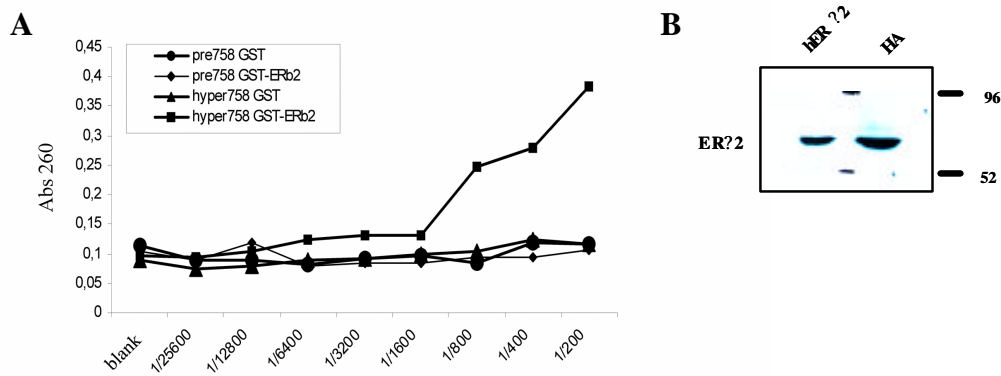


Figura 32: Determinació de l'especificitat de l'anticòs ER?2. (A) Anàlisi de les proteïnes purificades GST i GST-ER?2 mitjançant ELISA en el sèrum de conill abans i després de la immunització a diferents concentracions. Els complexos es van visualitzar a 260 nm. (B) Anàlisi per western blot dels duplicats d'extractes proteics de les cèl·lules LNCaP transfectades transitòriament amb el vector HA-ER?2 i incubats amb els anticossos HA i ER?2.

4.1.4 Expressió d'ER? i d'AR en mostres i en línies cel·lulars de pròstata humana

L'expressió d'aquests receptors s'ha analitzat: 1) en parts sanes i tumorals de pròstates amb tumor d'estadi T2/T3N0M0 de la malaltia (n=11), 2) en pròstates sanes (n=3) i 3) en les línies cel·lulars de pròstata.

4.1.4.1 Expressió d'ER? ?

L'anàlisi de l'expressió del RNA missatger d'ER? en pròstates humanes revela que no hi ha diferències entre: la part sana i tumoral de les pròstates tumorals i les pròstates tumorals (Fig. 33A). Quant a les línies cel·lulars, s'observa que les línies tumorals LNCaP i PC3 no expressen ni el RNA missatger ni la proteïna d'ER? . Però que la línia cel·lular PZ-HV-7 sí expressa el RNA missatger d'ER? i no la proteïna (Fig. 33B i C).

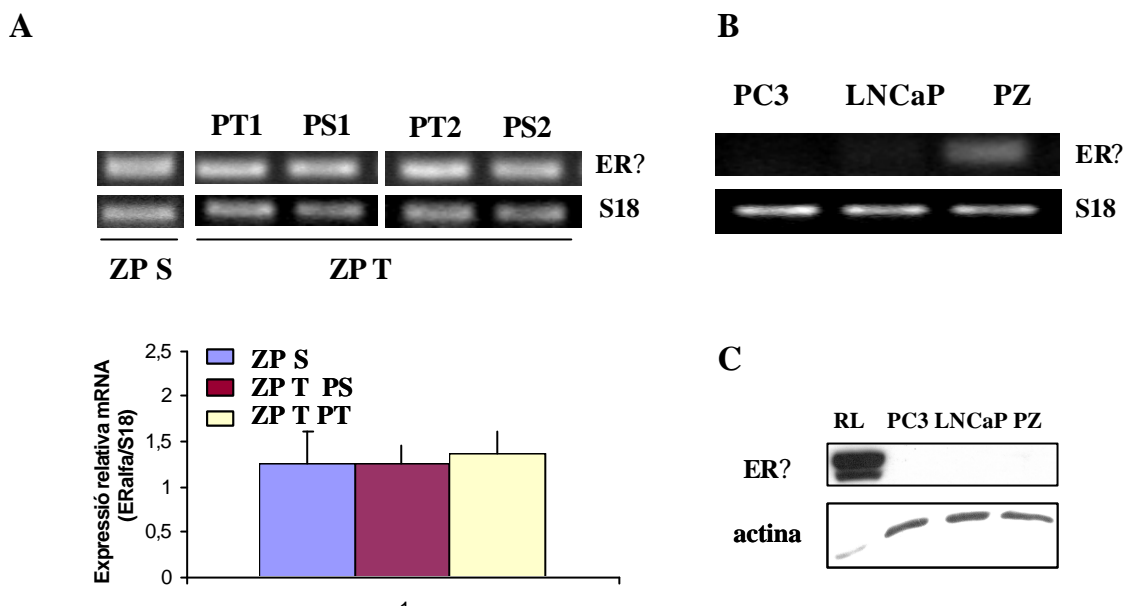


Figura 33: Expressió d'ER? en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata. (A) Nivells del RNA missatger d'ER? (línia superior) i del S18 (línia inferior) analitzats per RT/PCR en pròstates sanes (ZP S) i en part sana (PS) i tumoral (PT) de pròstates amb tumor (ZP T). Representació gràfica de l'abundància relativa del RNA missatger d'ER? normalitzat amb S18. (B) Nivells del RNA missatger d'ER? (línia superior) i del S18 (línia inferior) analitzats per RT-PCR en les línies cel·lulars PZ-HV-7, LNCaP i PC3. (C) Nivells de la proteïna ER? i actina analitzats per western blot en les línies cel·lulars de pròstata. Es va emprar la línia cel·lular RL de carcinoma d'endometri com a control positiu de l'expressió d'ER? .

4.1.4.2 Expressió d'AR

L'anàlisi de l'expressió del RNA missatger d'AR en pròstates humanes revela que no hi ha diferències entre: la part sana i tumoral de pròstates tumorals les pròstates sanes (Fig. 34A). Quant a les línies cel·lulars, s'observa que la línia tumoral LNCaP expressa el RNA missatger de manera més abundant que la línia PC3, i que la línia cel·lular PZ-HV-7 no l'expressa (Fig. 34B). Quant a l'expressió de la proteïna en les línies cel·lulars, es constata que únicament les cèl·lules LNCaP expressen la proteïna de 110 i 95 kDa (Fig. 34C).

?

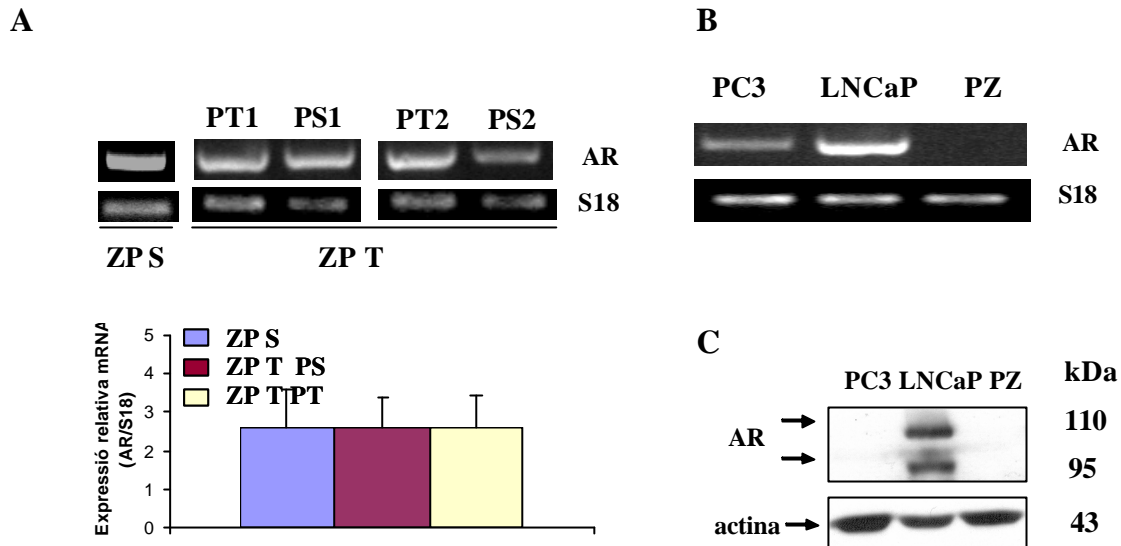


Figura 34: Expressió d'AR en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata. (A) Nivells del RNA missatger d'AR (línia superior) i del S18 (línia inferior) analitzats per RT/PCR en pròstates sanes (ZP S) i en part sana (PS) i tumoral (PT) de pròstates amb tumor (ZP T). Representació gràfica de l'abundància relativa del RNA missatger d'AR normalitzat amb S18. **(B)** Nivells del RNA missatger d'AR (línia superior) i del S18 (línia inferior) analitzats per RT-PCR en les línies cel·lulars PZ-HV-7, LNCaP i PC3. **(C)** Nivells de la proteïna d'AR i d'actina analitzats per western blot de les línies cel·lulars de pròstata.

4.1.5 Expressió i localització de l'enzim P450 aromatasa en mostres i en línies cel·lulars de pròstata humana

L'expressió de l'enzim s'ha analitzat: 1) en part sana i tumoral de pròstates amb tumor d'estadi T2/T3N0M0 de la malaltia (n=11), 2) en pròstates sanes (n=3) i 3) en les línies cel·lulars de pròstata.

4.1.5.1 Expressió del RNA missatger del gen CYP19

L'anàlisi de l'expressió del gen CYP19 en pacients revela que les pròstates tumorals expressen més RNA missatger que les pròstates no tumorals. No es detecten diferències entre els teixits sans o tumorals de les pròstates amb tumor (Fig. 35A).

Quant a les línies cel·lulars, s'observa que el RNA missatger del gen CYP19 s'expressa únicament en les línies tumorals LNCaP i PC3 (Fig. 33B).

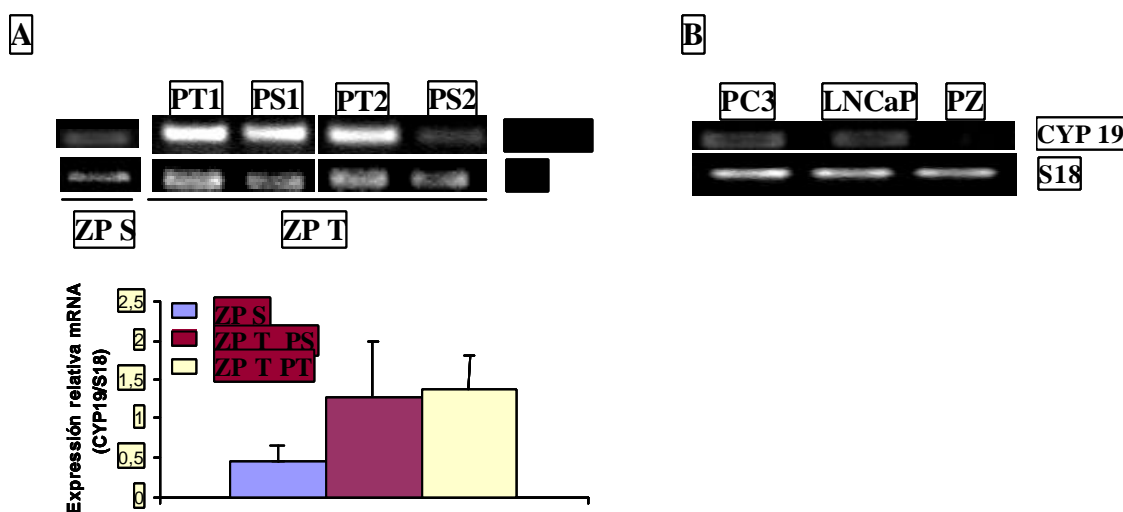


Figura 35: Expressió del RNA missatger del gen CYP19 en mostres humanes i en línies cel·lulars de pròstata. (A) Nivells del RNA missatger del gen CYP19 (línia superior) i del S18 (línia inferior) analitzats per RT/PCR en les pròstates sanes (ZP S) i en part sana (PS) i tumoral (PT) de les pròstates amb tumor (ZP T). Representació gràfica de l'expressió relativa del RNA missatger del gen CYP19 normalitzat amb S18. (B) nivells del RNA missatger del gen CYP19 (línia superior) i S18 (línia inferior) analitzats per RT-PCR en les línies cel·lulars.

4.1.5.2 Expressió i localització de la proteïna P450 aromatasa

L'anàlisi de l'expressió de l'enzim P450 aromatasa es va realitzar amb un anticòs comercial (veure material i mètodes). Els resultats mostren que l'anticòs identifica una proteïna amb un pes molecular aproximat de 55 kDa (Fig. 36). L'anàlisi de l'expressió en línies cel·lulars de pròstata, revela que únicament les línies tumorals LNCaP i PC3 expressen l'enzim (Fig. 36).

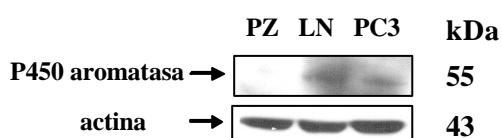


Figura 36: Expressió de la proteïna P450 aromatasa en línies cel·lulars de pròstata. Nivells de les proteïnes P450 aromatasa i actina analitzades per western blot en les línies cel·lulars PZ-HV-7, LNCaP i PC3.

La immunohistoquímica de pròstata sana revela que l'enzim P450 s'expressa en l'estroma de la zona perifèrica (Fig. 37A). En canvi, en els pacients amb carcinoma de pròstata, l'expressió també es localitza en l'estroma circulant de l'epiteli tumoral (Fig. 37B) i en el citoplasma del propi epiteli tumoral (Fig. 37C).

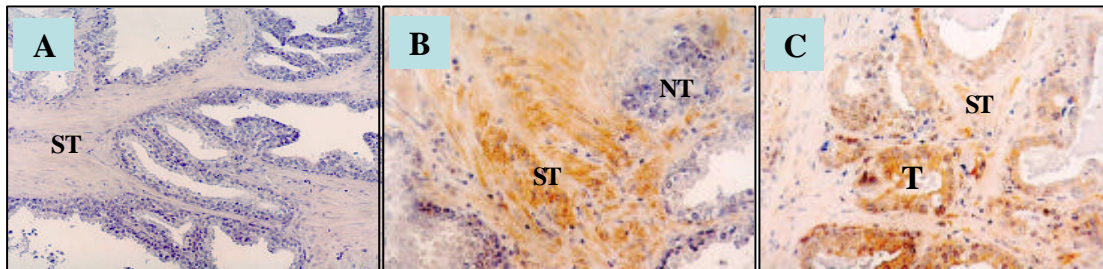


Figura 37: Localització de l'enzim P450 aromatasa en teixit de pròstata humana. Expressió de la proteïna per immunohistoquímica en la zona perifèrica: (A) d'una pròstata sense tumor, (B) l'estroma i l'epiteli no tumoral d'una pròstata amb tumor i (C) en l'estroma i l'epiteli tumoral d'una pròstata amb tumor. ST: estroma. NT: glàndula tumoral. T: glàndula tumoral. Augments: A (x4), B i C (x40).

4.2 EXPRESSIÓ I FUNCIO D'ER α EN EL CICLE CEL·LULAR

4.2.1 Anàlisi de l'expressió d'ER α en cada fase del cicle cel·lular

L'expressió d'ER α 1 i d'ER α 2 en les diferents fases del cicle cel·lular es va analitzar per les tècniques de western blot i RT/PCR semiquantitativa. Es van emprar les següents tècniques per obtenir cèl·lules en les diferents fases del cicle: 1) citometria de flux associada a un separador cel·lular i 2) sincronització de les cèl·lules en la fase G0/G1.

4.2.1.1 Separació per citometria de flux

El primer procediment va consistir en la tinció de les cèl·lules LNCaP, procedents d'un cultiu asincrònic, amb iodur de propidi (IP) i l'anàlisi del seu contingut en DNA per citometria de flux. Aquesta tècnica permet aïllar cèl·lules en les fases G0/G1, S i G2/M del cicle cel·lular amb un separador cel·lular acoblat a un citòmetre. Amb aquest procediment es va analitzar l'expressió de la proteïna dels receptors.

Es va extreure la proteïna de 500.000 cèl·lules aïllades en cada fase del cicle cel·lular i es va transferir a membranes de PVDF. Les membranes es van incubar amb anticossos específics per a cada fase del cicle cel·lular (cyclina D1 per G1, cyclina A per S i G2 i cyclina B per G2-M) per tal de demostrar la validesa de la tècnica (Fig. 38).

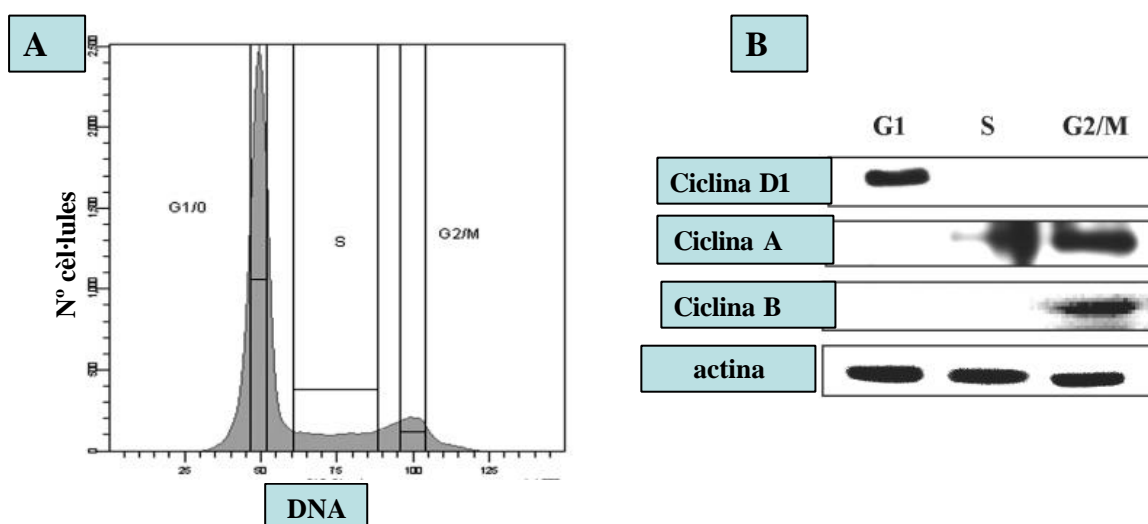


Figura 38: Separació de cèl·lules LNCaP en les diferents fases del cicle per la tècnica de citometria de flux. (A) Histograma representatiu del nombre de cèl·lules en cada fase del cicle. Les columnes defineixen els límits emprats per aïllar les poblacions en G0/G1, S i G2/M del cicle cel·lular (B) Anàlisi per western blot de les cèl·lules LNCaP aïllades en cada fase del cicle i incubades amb els anticossos cyclina D1, cyclina A i cyclina B com a marcadors específics de les fases G1, S i G2/M, respectivament.

Els extractes de proteïna procedents de les diferents fases del cicle es van incubar amb els anticossos PA1-313 i ER². Cada una de les membranes es va incubar amb l'anticòs actina per tal de normalitzar la càrrega de proteïna. Les bandes d'ER² i d'actina es van quantificar per densitometria i es va representar l'abundància relativa de

les isoformes d'ER α en les diferents fases del cicle. La figura 39 mostra que la proteïna ER α es detecta durant la fase G0/G1 del cicle, que augmenta en la fase S i disminueix marcadament en la fase G2/M. Per contra, la proteïna ER β que també es detecta durant la fase G1, disminueix a la fase S i augmenta de nou en la fase G2/M, assolint nivells similars als obtinguts en la fase G1.

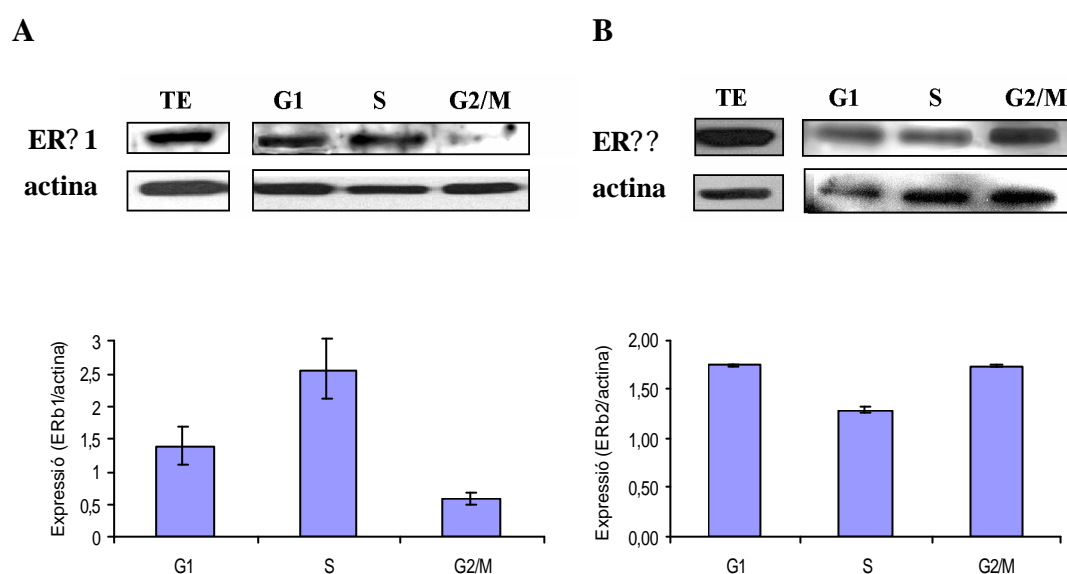


Figura 39: Expressió d'ER α durant el cicle cel·lular en cèl·lules LNCaP separades mitjançant un citòmetre de flux a coblat a un separador cel·lular. Anàlisi per western blot d'ER α 1 (A) i d'ER β 2 (B) en les cèl·lules LNCaP no separades (TE) i separades en les diferents fases del cicle amb els respectius gràfics, després de la normalització amb actina. Es mostren els promitjos \pm SD de dos experiments independents.

4.2.1.2 Sincronització en fase G0/G1 del cicle cel·lular

Per tal de confirmar els resultats anteriors, es van sincronitzar les cèl·lules LNCaP en la fase G0/G1 del cicle cel·lular utilitzant medi RPMI deprivat de l'aminoàcid isoleucina. Aquest mètode ha estat descrit prèviament per sincronitzar les línies cel·lulars de pròstata (Cifuentes, 2003). Es van recollir cèl·lules a les 0, 8, 15, 19, 22 i 25 hores, després de reemplaçar el medi deprivat d'isoleucina per medi complet.

Per a cada un d'aquests temps es va extreure la proteïna i el RNA total. Per tal de verificar la sincronització també es va recollir mostres per l'anàlisi de FACS. Aquest anàlisi mostra que la fase G0/G1 dura fins a les 15 hores, moment on comença la fase S que s'allarga fins a les 19 hores i a les 22 hores es detecta la fase G2/M. Finalment, a les 25 hores el cultiu de cèl·lules LNCaP creixen en asincronia (Fig. 40).

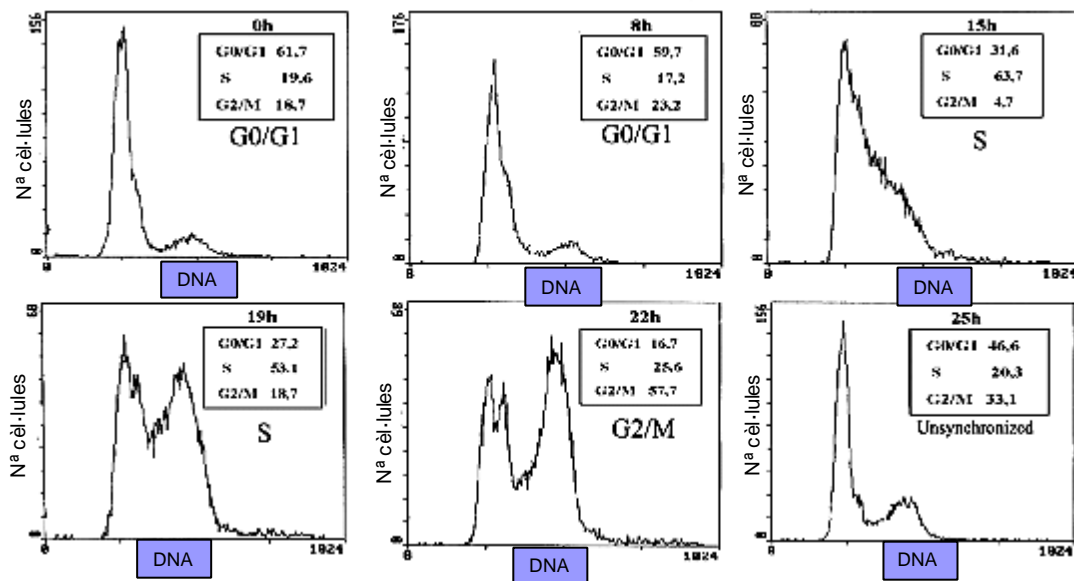


Figura 40: Representació gràfica del percentatge de cèl·lules LNCaP en les fases G0/G1, S i G2/M analitzades per citometria de flux en mostres recollides a diferents temps després de reemplaçar el medi lliure en l'aminoàcid isoleucina per medi complet.

Els extractes de proteïna es van transferir a membranes de PVDF i es van incubar amb els anticossos PA1-313 i ER α 2. La intensitat de les bandes d'ER α 1 del western blot es van normalitzar amb la des les bandes d'actina en cada punt de la sincronització. Els resultats mostren que la proteïna ER α 1 augmenta des de la fase G1 fins a la fase S i que disminueix fins a nivells mínims de la fase S a la G2/M. Els nivells de la proteïna ER α 2 són elevats en la fase G1, disminueixen durant la fase S i augmenten de nou en la fase G2/M. L'anàlisi d'expressió a nivell del RNA en els

mateixos punts mostren que, per les dues isoformes del receptor, els nivells de RNA correlacionen amb els de la proteïna (Fig. 41).

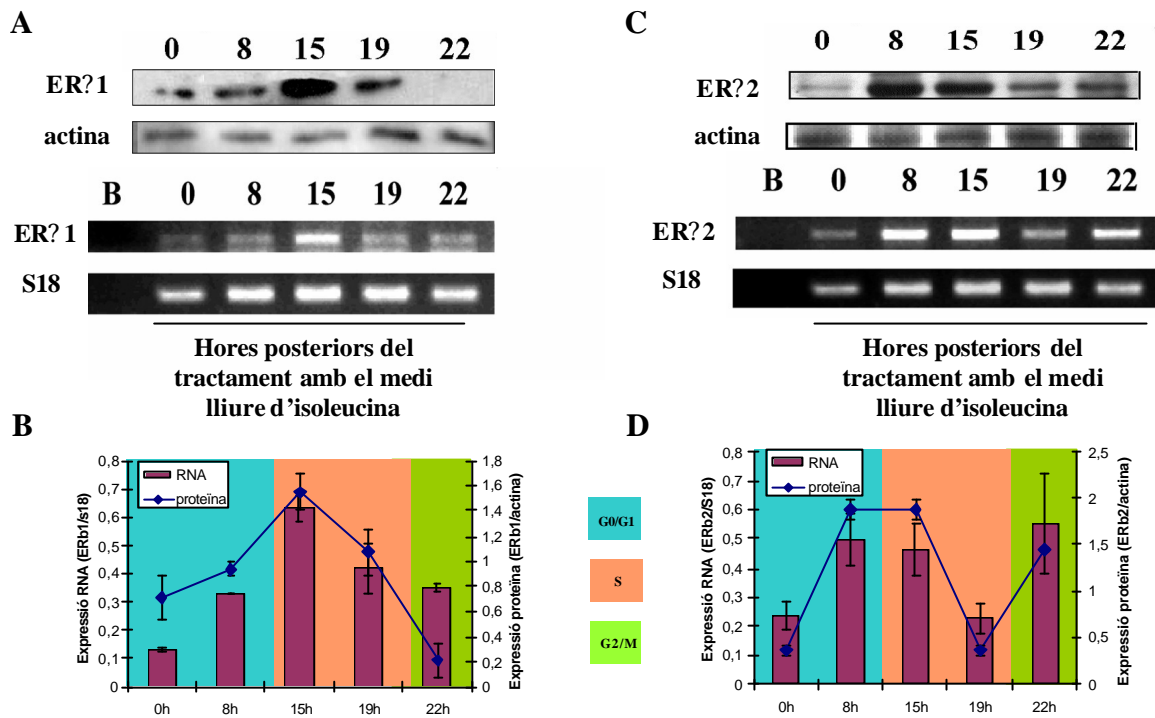


Figura 41: Expressió d'ER? durant el cicle cel·lular en les cèl·lules LNCaP sincronitzades. Expressió de la proteïna ER?1 (A) i ER?? (C) (panel superior) i del missatger (panel inferior) analitzat per western blot i RT-PCR, respectivament. Representació gràfica dels nivells del missatger i de la proteïna ER?1 (B) i ER?2 (D) després de la normalització amb S18 i actina respectivament. Es mostren els promitjos \pm SD de dos experiments independents.

4.2.2 Localització sub-cel·lular d'ER? en cada fase del cicle cel·lular

Per tal de conèixer la localització d'ER?1 i d'ER?2 en les diferents fases del cicle, es va analitzar l'expressió d'aquestes isoformes en extractes nuclears i no nuclears de les cèl·lules sincronitzades en les diferents fases del cicle cel·lular per western blot. Els resultats mostren que ER?1 es localitza tant en la fracció nuclear com en la no

nuclear de les fases del cycle on s'expressa, i que ER β 2 es localitza únicament en la fracció nuclear de les mateixes (Fig. 42).

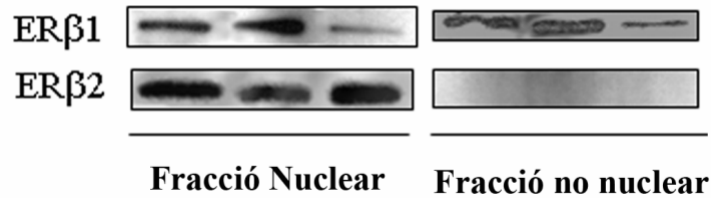


Figura 42: Localització subcel·lular de les isoformes d'ER β en les fases del cycle cel·lular. Anàlisi per western blot d'ER β 1 i d'ER β 2 d'extractes proteics obtinguts de les fraccions nuclears (FN) i no nuclears (FNN) de cèl·lules LNCaP sincronitzades en les fases G0/G1 (8h), S (15h) i G2/M (22h) del cycle cel·lular.

4.2.3 Activitat transcripcional d'ER β en la línia cel·lular LNCaP

Un dels objectius d'aquest treball ha estat analitzar els mecanismes d'acció d'ER β 1 en el cycle cel·lular en les cèl·lules LNCaP. Com a receptor nuclear s'ha avaluat l'activitat transcripcional d'ER β en resposta a l'estradiol i a l'inhibidor ICI 182,780 sobre les seqüències ERE. També s'ha avaluat si podia modular l'activitat dels factors de transcripció AP-1 i NF-kB, en resposta als dos lligands.

4.2.3.1 Activitat transcripcional de les isoformes d'ER β 1 i d'ER β 2 sobre les seqüències ERE

La línia cel·lular LNCaP es va transfectar transitòriament amb el vector reportador del gen de la luciferasa controlat per seqüències ERE repetides en tàndem. Els resultats demostren que l'estradiol indueix un augment significatiu de l'expressió de la luciferasa amb el vector ERE-LUC. Aquest efecte induït per l'estradiol és contrarestat

completament per ICI. Per contra, el tractament amb l'inhibidor sol no afecta a l'expressió de la luciferasa (Fig 43A).

Per avaluar en quina fase del cycle cel·lular ER α mostrava aquesta activitat transcripcional, les cèl·lules LNCaP es van transfectar transitòriament amb el vector ERE-LUC i es van aïllar en les fases G0/G1, S i G2/M del cycle cel·lular. Els resultats mostren que la transactivació en seqüències ERE està present únicament en la fase S del cycle cel·lular (Fig 43B).

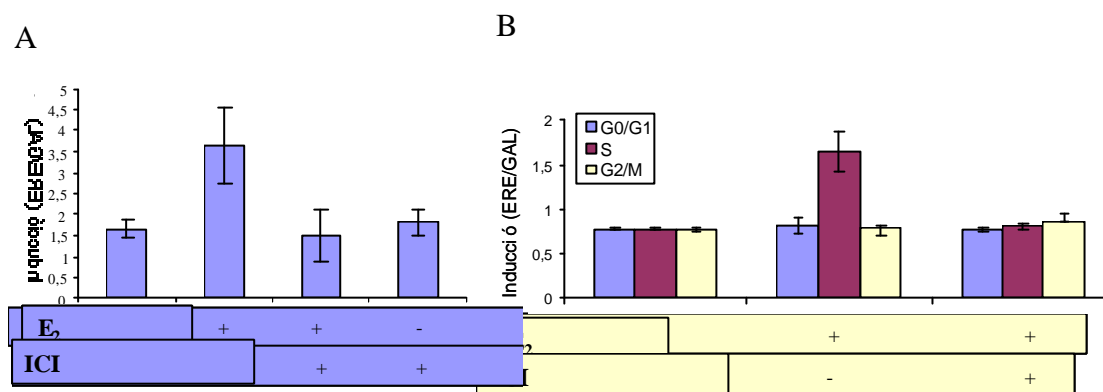


Figura 43: Activitat transcripcional d'ER α sobre les seqüències ERE de la línia cel·lular LNCaP. (A) Les cèl·lules LNCaP es van transfectar amb el vector ERE-LUC i tractar amb E₂ (10nM), E₂ i ICI (1 μ M) i ICI sol durant 36 h. El gràfic mostra l'activitat luciferasa de l'ER α endogen normalitzada amb β -galactosidasa. (B) Les cèl·lules LNCaP es van transfectar amb el vector ERE-LUC i es van tractar amb E₂ (10nM) i E₂ i ICI (1 μ M) durant 6 h i les no tractades durant 2h. Es van incubar les cèl·lules durant 1 h amb 5 μ g/ml del colorant vital Hoescht 33342 i es van separar en les fases G0/G1, S i G2/M del cycle cel·lular. Es va extreure la proteïna de les cèl·lules separades i es va mesurar l'activitat luciferasa. El gràfic representa l'activitat luciferasa normalitzada amb β -galactosidasa en cada fase del cycle cel·lular. Es mostren els promitjos \pm SD de duplicats de quatre experiments independents.

En aquest treball també s'ha volgut testar que únicament la isoforma d'ER α 1 presentava activitat transcripcional depenent d'estradiol sobre les seqüències ERE en les cèl·lules LNCaP. Per a tal objecte, es va co-transfectar transitòriament la línia cel·lular amb el vector ERE-LUC i el vector FLAG-ER α 1 o HA-ER α 2. Els resultats confirmen que únicament la isoforma d'ER α 1 activa la transcripció en les seqüències gèniques ERE (Fig. 44A). El control de sobre-expressió de totes dues proteïnes confirma que, per

les dues construccions, els nivells de proteïna sobre-expressats en resposta a cada tractament és comparable (Fig 44B).

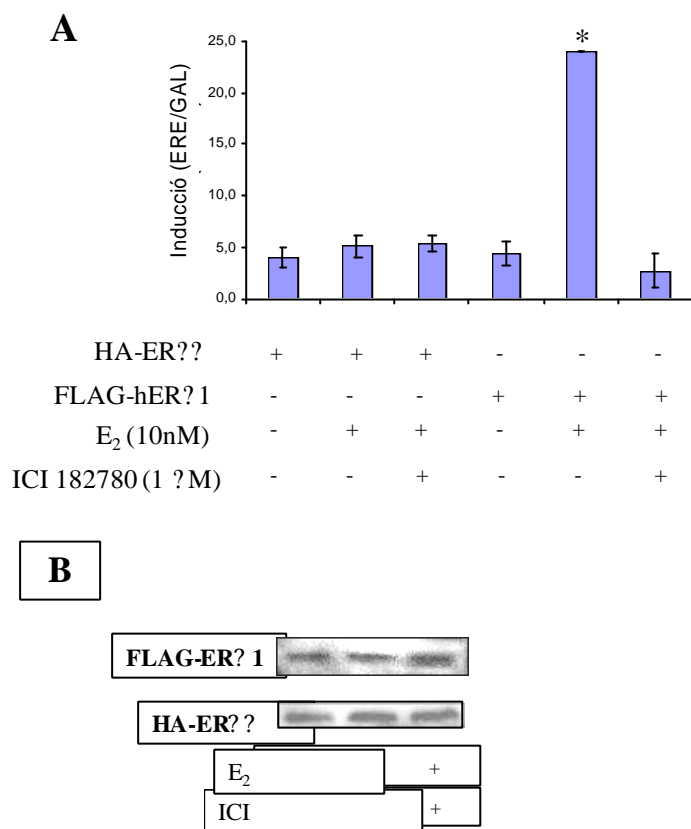


Figura 44: Activitat transcripcional de les isoformes d'ER?1 i d'ER?2. (A) Les cèl·lules LNCaP co-transfectades amb el vector ERE-Luc i els vectors FLAG-ER?1 o HA-ER?2, es van tractar amb E2 (10nM) i E2 i ICI (1?M) durant 36 h. L'activitat luciferasa es va normalitzar amb l'activitat ?-galactosidasa. Es mostren els promitjos \pm SD de duplicats de quatre experiments independents. (B) Anàlisi per western blot amb els anticossos FLAG (línia superior) i HA (línia inferior) de les cèl·lules transfectades.

4.2.3.2 Activitat transcripcional d'AP1 i de NF-kB modulada per ER? ?

Per tal d'avaluar si la proteïna endògena ER? també modulava l'activitat transcripcional dels factors de transcripció AP-1 i NF-kB, la línia LNCaP es va transfectar transitòriament amb els vectors AP1-LUC i NF-kB-LUC. Els resultats han demostrat que l'estradiol, a través de l'ER? endogen, no afecta significativament l'expressió de la luciferasa en les cèl·lules transfectades amb els vectors AP1-LUC i NF-kB-LUC (Fig. 45).

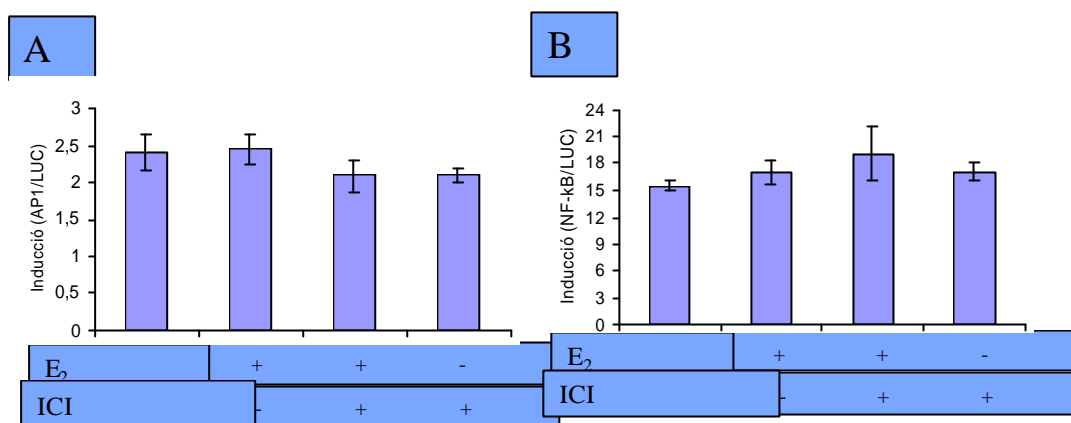


Figura 45: Regulació de l'activitat transcripcional d'AP-1 i de NF-kB a través d'ER α en les cèl·lules LNCaP. Les cèl·lules es van transfectar amb els vectors AP1-Luc (A) i NF-kB-Luc (B) i es van tractar amb E₂ (10nM), E₂ i ICI (1 μ M) i ICI sol durant 36 h. L'activitat luciferasa es va normalitzar amb β -galactosidasa. Es mostren els promitjos \pm SD de duplicats de quatre experiments independents.

4.2.4 Efecte de la sobre-expressió d'ER α 1 sobre la progressió del cycle cel·lular

Per tal d'avaluar la funció d'ER α 1 sobre el cycle cel·lular, es va analitzar també l'efecte de la sobre-expressió de la proteïna ER α 1 en la progressió del cycle cel·lular. La línia LNCaP es va transfectar transitòriament amb els vectors EGFP-ER α 1 i EGFP sol. Els resultats mostren que el vector EGFP sol no té cap efecte sobre la progressió del cycle cel·lular a les 24 h després de la transfecció (Fig. 46).

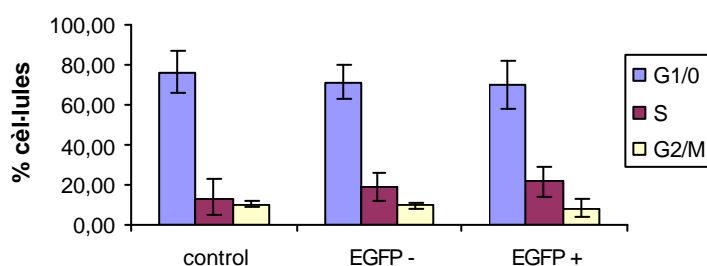


Figura 46: Efecte de la transfecció amb EGFP sobre el cycle cel·lular de les cèl·lules LNCaP. Les cèl·lules es van transfectar amb el vector EGFP buit durant 24 h i es van tenir amb IP. L'histograma representa el percentatge

de les cèl·lules en les diferents fases del cycle en les poblacions sense transfectar (control), transfectades transitòriament (EGFP +) i les no transfectades de la mateixa placa (EGFP-) analitzades per citometria de flux. Es mostren els promitjos \pm SD de tres experiments independents.

4.2.4.1 Anàlisi de la incorporació de BrdU en cèl·lules transfectades amb EGFP-ER? 1

Per tal d'investigar l'efecte de la sobre-expressió d'ER? 1 en la progressió del cicle cel·lular, es va analitzar la incorporació de BrdU en cèl·lules transfectades i no transfectades per les tècniques de citometria de flux i de immunocitoquímica.

L'anàlisi de la incorporació de BrdU per citometria de flux en cèl·lules transfectades i no transfectades de la mateixa placa de cultiu mostra que el nombre de cèl·lules BrdU positives en la població transfectada va ser significativament inferior al de la població no transfectada (Fig. 47A). La tinció amb IP revela que les cèl·lules transfectades es troben bloquejades en la fase G1 del cicle cel·lular (Fig. 47B). D'acord amb aquests resultats, la immunodetecció de BrdU en cèl·lules crescudes en cobreobjectes i transfectades revela que les cèl·lules EGFP-ER? 1 positives són BrdU negatives i que la localització de la proteïna sobre-expressada és nuclear (Fig 47C).

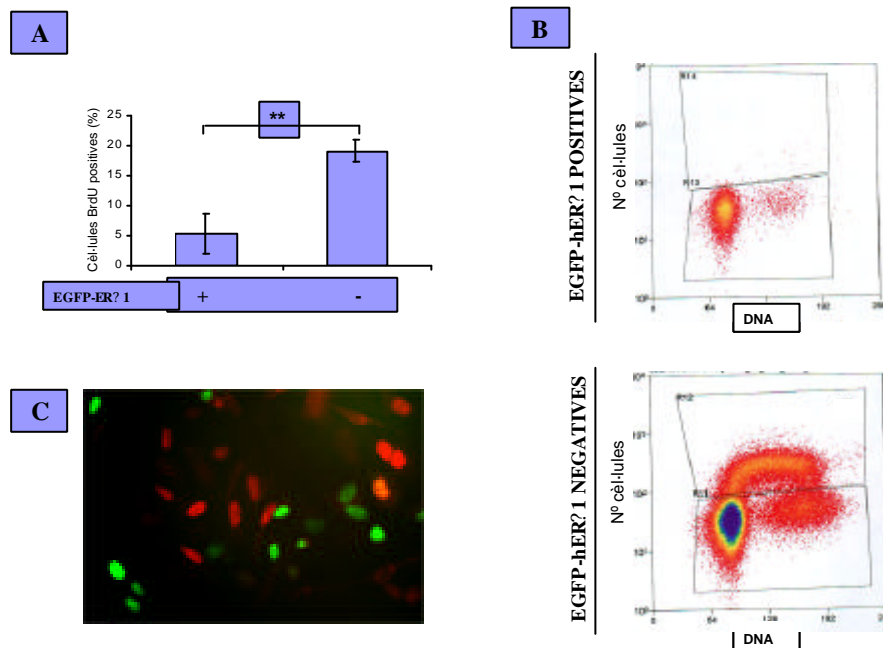


Figura 47: Efecte de la sobre -expressió d'ER? 1 sobre la progressió de l cicle cel·lular. (A) Les cèl·lules LNCaP transfectades transitòriament amb el vector EGFP-ER? 1 durant 24 h es van incubar amb BrdU (20 ?M) i analitzar per citometria de flux (A i B) i per immunofluorescència (C). Es mostren els promitjos \pm SD de tres experiments independents.

4.2.5 Mecanisme d'acció d'ER? 1 en la progressió de la fase G1 del cicle cel·lular

4.2.5.1 Anàlisi de la incorporació de BrdU en cèl·lules transfectades amb el mutant EGFP-ER? 1 EG167/168AA

Per tal de testar si el bloqueig en G1 es produïa per un mecanisme ERE-independent, les cèl·lules LNCaP es van transfectar amb el vector EGFP-ER? 1 EG167/168AA que conté dues mutacions en el DBD. L'anàlisi per citometria de flux indica que les cèl·lules sobre-expressades amb el mutant incorporen significativament menys BrdU que les cèl·lules no transfectades de la mateixa placa (Fig. 48A).

Per valorar si la localització del mutant continuava sent nuclear, es van aïllar extractes nuclears i no nuclears de les cèl·lules transfectades transitòriament amb el vector del receptor mutat. L'anàlisi de l'expressió per western blot de l'epítoc EGFP, indica que la localització del receptor mutat continua sent nuclear (fig. 48B).

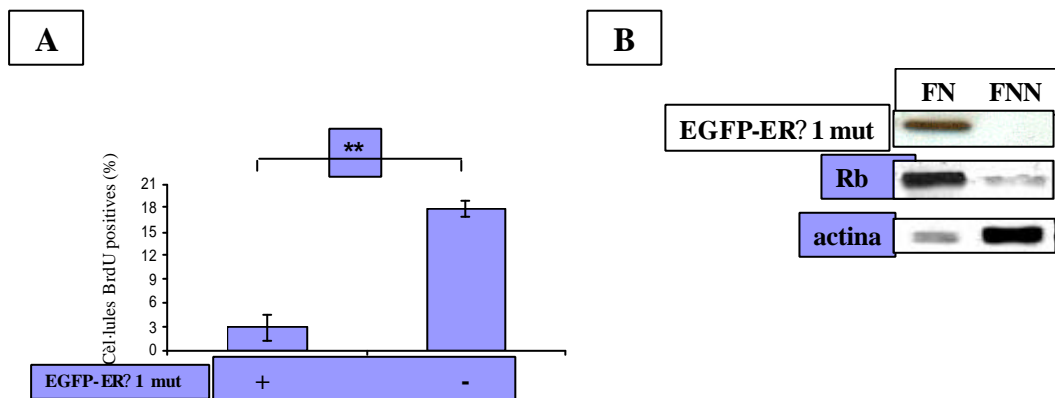


Figura 48. Efecte de la sobre-expressió del mutant d'ER?1 EG167/168AA sobre la progressió del cicle cel·lular. (A) Les cèl·lules LNCaP transfectades transitòriament amb el vector EGFP-ER?1 EG167/168AA durant 24 h es van incubar amb BrdU (20 μ M) i analitzar per citometria de flux (A). Anàlisi del western blot en l'extracte proteic de les fraccions nuclear (FN) i no nuclear (FNN) de les cèl·lules LNCaP transfectades amb el mutant d'ER?1 (B) amb els anticossos EGFP, Rb i actina. Es mostren els promitjos \pm SD de tres experiments independents.

4.2.5.2 Inhibició d'EGFP-ER? 1

Per determinar si el bloqueig en la fase G1 era dependent de lligand, les cèl·lules LNCaP transfectades transitòriament amb EGFP-ER? 1 es van tractar amb l'inhibidor específic del receptor d'estrògens ICI 182,780. L'anàlisi per la citometria de flux de les cèl·lules transfectades indica que el bloqueig es produeix en la fase G1a (Fig. 49, panel superior), mentre que el tractament amb l'inhibidor permet l'avenç fins a la fase G1b del cicle cel·lular (Fig. 49, panel inferior).

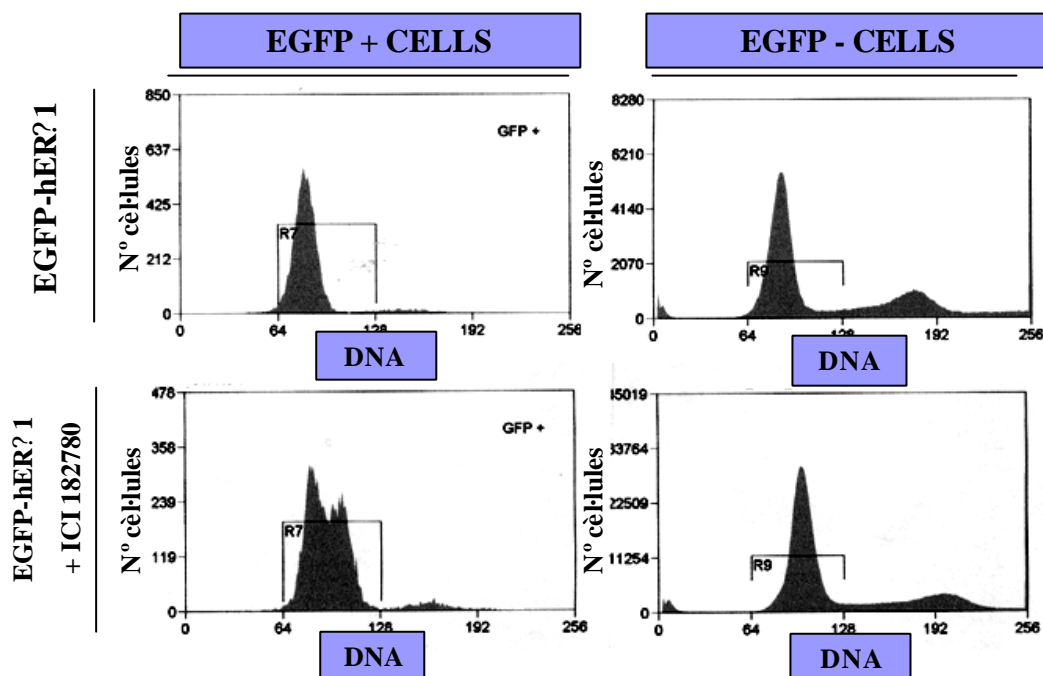


Figura 49: Efecte inhibitori del receptor sobre -expressat sobre la progressió del cicle cel·lular. Les cèl·lules LNCaP es van transfectar transitòriament amb el vector EGFP-ER? 1, es van tractar amb o sense ICI, es van tenyir amb IP i es va analitzar el cicle per citometria de flux.

4.2.5.3 Regulació del factor de transcripció AP1 i expressió de la ciclina D1 en cèl·lules sobre-expressades amb ER? 1

Tenint en compte els resultats obtinguts fins el moment, varem volent testar si el bloqueig en G1a induït per la sobre-expressió d'ER α 1 succeïa a través de la regulació del factor de transcripció AP1 i de l'expressió de la ciclina D1, regulada pel factor de transcripció AP-1.

L'anàlisi de l'activitat luciferasa de les cèl·lules LNCaP co-transfectades amb els vectors FLAG-ER α 1 i AP1-LUC, mostra que únicament les cèl·lules que sobre-exprésen ER α 1 i tractades amb ICI 182,780 són capaces d'augmentar significativament l'expressió del gen de la luciferasa (Fig. 50A; gràfic esquerra). Per valorar si aquest efecte podria ser induït també per la isoforma ER α 2, les cèl·lules LNCaP també es van co-transfectar amb els vectors HA-ER α 2 i AP1-LUC (Fig. 50A; gràfic dreta). Els resultats mostren que la sobre-expressió d'ER α 2 no indueix cap efecte sobre l'activitat transcripcional d'AP1 (Fig. 50B).

Per tal de testar si la inhibició d'ER α 1 sobre AP-1 es produïa per la interacció entre totes dues proteïnes, es van transfectar transitòriament les cèl·lules LNCaP amb el vector FLAG-ER α 1, es va immunoprecipitar la proteïna de fusió FLAG-ER α 1 amb l'anticòs FLAG i finalment es va realitzar un western blot per detectar la subunitat c-jun del factor de transcripció AP1 i la cinasa activadora d'AP1, la proteïna N-Jun cinasa (JNK). Els resultats mostren que la proteïna ER α 1 no interacciona amb la subunitat c-jun del factor de transcripció AP1, que ER α 1 sí interacciona amb JNK1 i que aquesta interacció es troba molt disminuïda quan les cèl·lules es tracten amb l'inhibidor ICI 182,780 (Fig. 51).

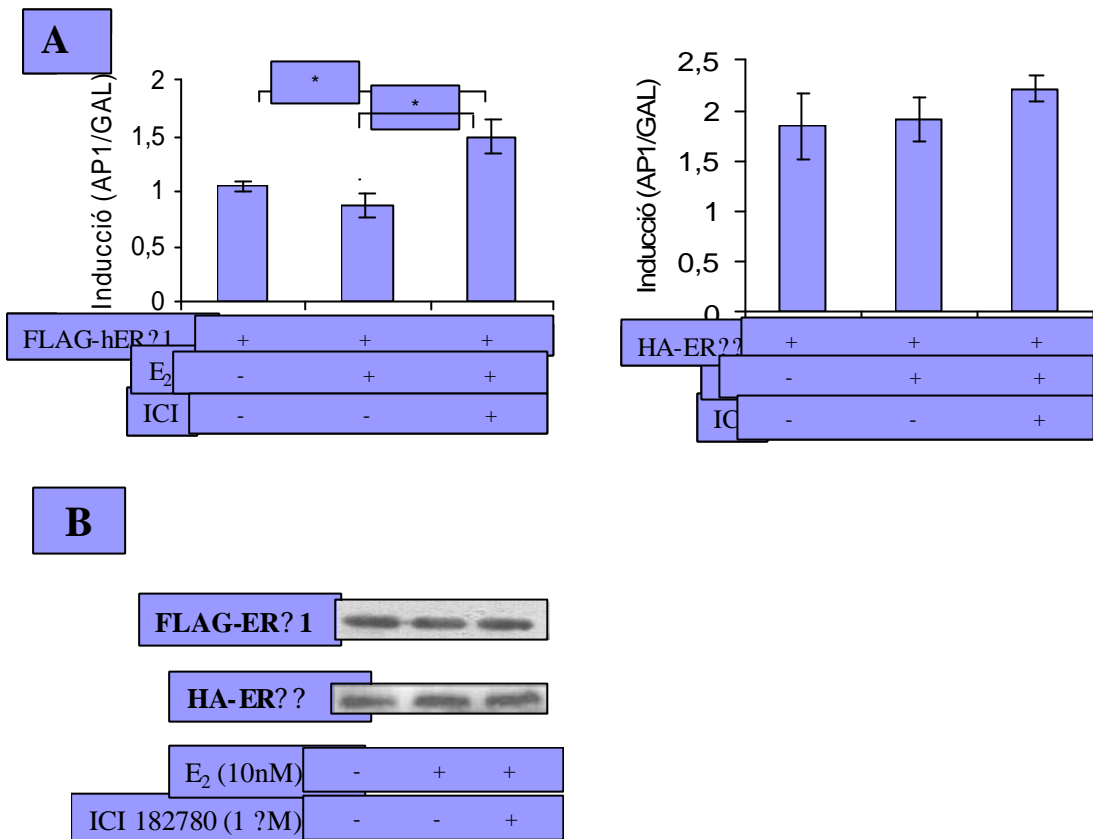


Figura 50: Regulació de l'activitat transcripcional d'AP-1 per les isoformes d'ER? sobre-expressades en les cèl·lules LNCaP. Les cèl·lules es van co-transfectar amb el vector AP1-LUC i el vector FLAG-ER? 1 (A) o HA-ER? 2 (B) i tractar amb E2 (10nM) i E2 i ICI (1 μM) durant 36 h. L'activitat luciferasa es va normalitzar amb ?-galactosidasa. Es mostren els promitjos ± SD de duplicats de quatre experiments independents.

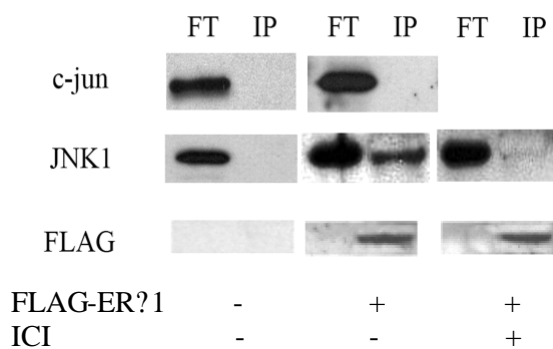


Figura 51: Co-immunoprecipitació de FLAG-ER?1 en cèl·lules LNCaP no transfectades (columna esquerra), transfectades amb el vector FLAG-ER?1 (columna central) i tractades amb ICI (columna dreta). Anàlisi del western blot de les proteïnes FLAG-ER?1 (fila inferior). Es mostra un experiment representatiu de tres experiments independents.

Finalment, es va avaluar l'expressió de la ciclina D1, en les cèl·lules que sobre-
 expressaven ER α 1 i les que també van estar sotmeses al tractament amb l'inhibidor ICI
 182,780. El resultat del western blot de les cèl·lules LNCaP, transfectades
 transitòriament amb EGFP-ER α 1, revela que el tractament amb l'inhibidor augmenta
 significativament els nivells de la proteïna ciclina D1 (Fig. 52).

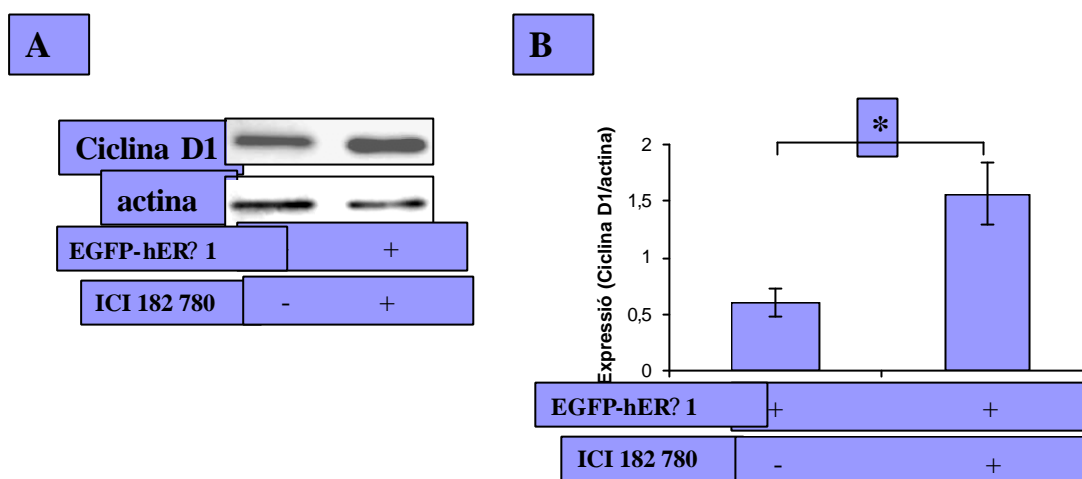


Figura 52. Expressió de la ciclina D1 en cèl·lules transfectades amb EGFP-ER α 1. (A) Anàlisi per western blot de ciclina D1 en cèl·lules LNCaP tractades i no tractades amb l'inhibidor ICI (1 μ M). (B) Representació gràfica de l'expressió de ciclina D1 normalitzada amb actina. Es mostren els promitjos \pm SD corresponents a tres experiments independents.

5. DISCUSSIÓ

5.1 EXPRESSIÓ I LOCALITZACIÓ DELS RECEPTORS NUCLEARS EN TEIXIT I EN LÍNIES DE PRÒSTATA HUMANA

5.1.1 Determinació de l'especificitat del senyal detectat amb els anticossos d'ER?

Un dels objectius d'aquest treball ha estat demostrar l'expressió de les isoformes d'ER α 1 i d'ER α 2 en les línies cel·lulars i en les mostres de teixit humà de pròstata. Un dels principals obstacles en l'anàlisi d'ER α és la disponibilitat d'anticossos amb suficient especificitat i sensibilitat. En aquest treball hem utilitzat dos anticossos comercials, el PA1-313 i el PPG5/10 que reconeixen la proteïna ER α 1, i un anticòs no comercial, que reconeix ER α 2.

Estudis previs han demostrat que l'anticòs PA1-313 identifica per western blot una banda amb un pes molecular aproximat de 55 kDa (Pasquali, 2001 i Skliris, 2002) i una banda addicional de 70 kDa (Skliris, 2002). En aquest treball, nosaltres hem detectat dues bandes, amb una mida aproximada de 64 kDa i una altra de 55 kDa i que té el mateix pes molecular de la proteïna recombinant. La especificitat de la banda de 64 kDa queda demostrada degut a que: 1) desapareix quan l'anticòs es pre-incuba amb un excés del corresponent pèptid de bloqueig i quan es transfecten les cèl·lules amb oligonucleòtids antisensit de l'exó 8 de la isoforma d'ER α 1 i 2) l'anticòs PA1-313 detecta les proteïnes de fusió d'ER α 1 amb els epítops FLAG i EGFP en l'extrem N-terminal. En els teixits de pròstata, s'han identificat proteïnes ER α 1 amb pesos moleculars que oscil·laven desde 63 kDa (Leav, 2001) a 55 kDa (Pascualí, 2001). En tots dos treballs s'han utilitzat anticossos diferents, el que suggereix que aquestes diferències en els pesos moleculars podrien ser atribuïdes a l'habilitat de cada anticòs a reconèixer diferents modificacions post-traduccionals. Considerant els nostres resultats

l'anticòs PA1-313 podria reconèixer la proteïna amb i sense modificacions post-traduccionals.

En aquest treball l'anticòs PPG5/10 s'ha emprat per les tècniques d'immunoblot. S'ha demostrat que aquest anticòs reconeix específicament la proteïna ectòpica ER α 1 en la línia cel·lular HEC de carcinoma d'endometri.

Quant a la proteïna ER α 2, hem utilitzat un anticòs no comercial, que hem generat contra l'extrem carboxi-terminal de la proteïna. Dues dades experimentals demostren l'especificitat d'aquest anticòs: 1) l'experiment d'ELISA demostra que únicament el sèrum de conill hiper-immunizat reconeix la proteïna GST-ER α 2) que aquest sèrum reconeix també la proteïna de fusió HA-ER α 2 en extractes de proteïna de cèl·lules LNCaP transfectades amb aquest vector.

5.1.2 Expressió dels receptors nuclears en pacients amb carcinoma de pròstata

En aquest treball s'ha demostrat que els teixits humans sans i tumorals de pròstata expressen el RNA missatger i la proteïna ER α 1. A més, s'ha constatat que aquesta expressió és més abundant en els teixits de pacients amb tumor que en els teixits de pròstates sanes. L'estudi mitjançant la immunohistoquímica ha confirmat que aquesta isoforma s'expressa tant en la pròstata sana com en la tumoral. L'expressió en la pròstata sana s'ha localitzat en els nuclis de les cèl·lules intermèdies de la capa basal de la zona de transició i en els de les cèl·lules hiperplàsiques de l'epiteli de la zona perifèrica. En en la pròstata tumoral, l'expressió s'ha localitzat tant en els nuclis com en els citoplasmes de les cèl·lules de l'epiteli tumoral. Els resultats d'ER α 1 obtinguts en aquest treball no coincideixen amb els descrits en alguns treballs publicats (Pascuali, 2001 i Latil, 2001), en els que s'afirma que les mostres tumorals perden l'expressió del

receptor. Els diferents estadiatsges de la malaltia i els diferents graus de Gleason estudiats entre els treballs de la literatura i aquests podrien explicar aquesta discrepància. En aquest estudi s'ha analitzat l'expressió en pacients d'estadi T2/T3N0M0 de la malaltia i amb un grau de Gleason baix i mitjà. Per contra, aquests altres treballs han analitzat l'expressió en seccions de teixit tumoral amb graus de Gleason més alts. En aquest sentit, s'ha demostrat que ER α s'expressa en les cèl·lules tumorals de Gleason baix-mitjà i que l'expressió del receptor desapareix en graus de Gleason més alts (Leav, 2001 i Fujimura, 2001) per metilació de la regió promotora (Nojima, 2001; Sasaki, 2002; Zhu, 2004).

En aquest treball no s'ha pogut analitzar la immunoexpressió d'ER β en el teixit de pròstata humana degut a que l'anticòs d'ER β no ha funcionat per aquesta tècnica. Altrament, s'ha constatat que el RNA missatger i la proteïna d'aquesta isoforma s'expressa més abundantment en pròstates tumorals que en les sanes. A la literatura s'ha descrit l'expressió d'aquesta isoforma en tumors de pròstata (Fujimura, 2001), contribuint a validar els resultats obtinguts en aquest treball.

En aquest treball també hem identificat la seqüència de la isoforma d'ER β 503 humana. L'alineament entre la seqüència humana i la de ratolí ha indicat que les regions 5' de totes dues seqüències són molt diferents perquè la seqüència murina és més llarga que la humana. A més, s'ha constatat que la inserció de l'intró en la seqüència humana afecta al marc de la lectura de la proteïna, generant una proteïna truncada. L'absència d'expressió en teixits de pròstata i la detecció feble en la línia cel·lular PC3, suggereix que l'expressió d'aquesta isoforma en la pròstata humana no és molt rellevant.

La funció que exerciria ER β en les fases inicials de la carcinogènesi de pròstata és un tema que encara no s'ha resolt. Pel que fa a ER α , se li han atribuït diversos rols:

com a supressor de tumor (Signoretti, 2001), inductor de la diferenciació de l'epiteli prostàtic (Imamov, 2005) i en la desdiferenciació tumoral (Torlakovic, 2002). En aquest treball s'ha observat que ER α s'expressa en cèl·lules epitelials proliferants dels teixits sans i en les cèl·lules epitelials de tumors, suggerint que ER α participa en la proliferació tumoral de la pròstata. Molt interessant és el fet que no totes les cèl·lules expressen la proteïna ER α amb el mateix grau d'intensitat en les seccions d'immunohistoquímica. Alguns treballs han descrit diversos efectes d'ER α sobre la progressió del cicle cel·lular (Lazennec, 2001; Strom, 2004 i Paruthiyil, 2004) i també l'associació de l'expressió del receptor amb proteïnes específiques del cicle cel·lular (Jensen, 2001), suggerint la possibilitat que l'expressió de la proteïna ER α del teixit de pròstata reguli i/o estigui regulada durant el cicle cel·lular.

En aquest treball s'ha constatat que la pròstata humana expressa l'enzim aromatasa en les cèl·lules estromals. A més, s'ha observat que hi ha un guany de l'expressió de l'enzim en l'epiteli del teixit tumoral. Aquests resultats confirmen els obtinguts en altres treballs (Tsugaya, 1996; Hiramatsu, 1997 i Ellem, 2004), suggerint que els estrògens locals produïts per la pròstata exerceixen accions directes sobre l'epiteli a través d'ER α sobre l'estroma a través d'ER β . En aquest sentit, s'ha demostrat que els estrògens poden regular l'entrada i la progressió del cicle cel·lular (Doisneau-Sixou, 2003), el que donaria suport a la hipòtesi de que ER α podria regular el cicle cel·lular de les cèl·lules epitelials de pròstata.

Els resultats d'aquest treball pel que fa als nivells d'expressió d'AR en tumors de pròstata d'estadi T2/T3N0M0 han estat similars als del teixit de pròstata normal. Altres treballs han demostrat que l'expressió d'AR no varia entre el teixits sans i els

tumor primaris de pròstata (Latil, 2001 i Leav, 2001), confirmant els resultats obtinguts en aquest treball.

5.1.3 Expressió dels receptors a les línies de càncer de pròstata

Els resultats d'aquest treball demostren que les línies cel·lulars de pròstata expressen el RNA missatger i la proteïna ER α 1 i ER α 2. Actualment, només s'ha publicat un treball que demostrï l'expressió del RNA missatger d'ER α 2 en línies de càncer de pròstata (Leung, 2006). Quant a l'expressió del RNA missatger d'ER α 1, s'ha demostrat que les cèl·lules PC3 l'expressen clarament (Torlakovic, 2002; Sasaki, 2002; Zhu, 2004) i que les en cèl·lules LNCaP l'expressió és molt baixa o en alguns casos indetectable (Sasaki, 2002; Zhu, 2004; Torlakovic, 2002). Per contra, els nivells del RNA missatger en les cèl·lules LNCaP són elevats després del tractament amb agents desmetilants (Sasaki, 2002; Zhu, 2004) o sotmesos a radiació (Torlakovic, 2005). A nivell proteic, ER α 1 s'ha detectat per western blot en cèl·lules LNCaP (Maggiolini, 2004), i s'ha constatat un increment dels nivells de proteïna després del tractament del cultiu amb estradiol i dihidrotestosterona (Maggiolini, 2004) o després d'irradiació (Torlakovic, 2005).

En aquest treball també s'ha demostrat que l'expressió d'ER α 1 i ER α 2 és més abundant en les línies tumorals que en la línia no tumoral. Aquest resultat coincidiria amb l'obtingut en els teixits de les pròstates humanes. També s'ha constatat per la tècnica d'immunocitoquímica que en la línia cel·lular LNCaP la proteïna ER α 1 nuclear s'expressa amb diferents graus d'intensitat, suggerint que la expressió del receptor en aquesta línia cel·lular també podria regular i/o estar regulada en les fases del cicle cel·lular.

En aquest treball, s'ha confirmat l'expressió de l'enzim P450 aromatasasa en les línies de càncer de pròstata, tal com s'havia descrit prèviament en la literatura (Negri-Cesi, 1998). Tot i que en aquest treball no s'ha avaluat si l'enzim era actiu, altres treballs han reportat aquesta activitat que la línia LNCaP (Castagnetta, 1997 i Lou, 2005), suggerint que l'estradiol en la línia LNCaP actua via autocrina a través d'ER? .

Quant a l'expressió d'AR, els nostres resultats confirmen que la línia cel·lular hormono-depenent LNCaP expressa les proteïnes de 110 i 95 kDa (Brinkmann, 1989) i pel que fa a ER? , cap de les línies tumorals de pròstata estudiades l'expressen.

Els resultats de l'anàlisi de l'expressió dels receptors nuclears analitzats i de l'enzim P450 aromatasasa obtinguts en aquest treball, demostren que la cèl·lula epitelial tumoral de pròstata i la línia LNCaP presenten perfils d'expressió coincidents. Aquests resultats validen la utilitat d'aquesta línia com a model d'estudi de les accions d'ER? en la pròstata.

5.2. EXPRESSIÓ I FUNCIÓ D'ER? EN EL CICLE CEL·LULAR

Un altre objectiu d'aquest treball ha estat avaluar si l'expressió d'ER? 1 i ER? 2 està regulada durant la progressió del cicle cel·lular. Per assolir aquest objectiu s'ha emprat la línia cel·lular LNCaP. Es va posar a punt una tècnica de citometria de flux associada a separació cel·lular en addició a la sincronització cel·lular com a mètode clàssic habitualment utilitzat per obtenir cèl·lules en les diferents fases del cicle. Dos motius ens van fer decidir el posar a punt aquesta tècnica: 1) per augmentar la puresa de les poblacions cel·lulars obtingudes en cada fase del cicle cel·lular, degut a la dificultat de sincronitzar les cèl·lules LNCaP amb els mètodes clàssics i 2) per controlar els possibles canvis en l'expressió d'ER? deguts al tractament emprat per bloquejar les

cèl·lules en les diferents fases del cicle. Utilitzant les ciclines com a marcadors específics de cada fase del cicle, s'ha demostrat que les cèl·lules poden ser aïllades en les diferents fases considerant el seu contingut en DNA. Els canvis en els nivells proteics d'ER α i ER β emprant aquest mètode van ser corroborats per l'anàlisi de cèl·lules separades a diferents temps després de la sincronització en G0/G1 amb medi deprivat d'isoleucina. Utilitzant els dos mètodes, s'ha demostrat que cada isoforma presenta un perfil d'expressió característic: mentre ER β augmenta des de la fase G1 a la S i disminueix a nivells mínims abans de començar la fase G2/M, els nivells d'ER α són elevats en la fase G0/G1, disminueixen durant la fase S i augmenten de nou en la fase G2/M. Tant mateix, el paral·lelisme observat en els nivells d'expressió del missatger i de la proteïna ER β suggereix que tots dos receptors tindrien una regulació a nivell transcripcional. El diferent perfil d'expressió dels dos receptors suggereix també que durant la progressió del cicle, els dos receptors podrien estar regulats per promotors diferents. Dos promotors, el 0N i el 0K s'han identificat en la regió 5' del gen ER β (Hirata, 2001; Zhao, 2003 i Rody, 2005). El promotor 0K està localitzat 41 kb *upstream* del promotor 0N (Rody, 2005). El fet que la seqüència del missatger d'ER β 2 (NCBI # AB006589) conté exons 5'UTR localitzats *upstream* del promotor 0N, suggereix que la isoforma d'ER β 2 podria estar regulada pel promotor 0K. Si aquest fos el cas, es podria especular que elements de resposta específics localitzats en cada promotor regularien diferencialment l'expressió d'ER β 1 i d'ER β 2 durant les fases del cicle cel·lular. En aquest sentit, s'ha demostrat que les illes CpG localitzades en el promotor 0N són metilades progressivament en el càncer de pròstata (Zhu, 2004) i de mama (Eisslimani-Sahla, 2005). L'existència, doncs, de diferents promotors per ER β 1 i ER β 2 podria explicar la pèrdua d'expressió d'ER β 1 i no d'ER β 2, durant la progressió del càncer.

La regulació d'altres receptors nuclears durant el cicle cel·lular ja s'ha descrit prèviament. La proteïna ER α ha estat detectada únicament en la fase S de la línia cel·lular osteosarcoma HOS TE85 (Ikegami, 1994), l'activitat transcripcional i els nivells de proteïna d'AR es perden durant la transició de les fases G1-S en una línia cel·lular de fibrosarcoma (Martinez i Danielsen, 2002), i la isoforma β del receptor de les hormones tiroïdals s'expressa en la fase tardana de G2 i declina durant la mitosis en cèl·lules pituïtàries GH3 (Maruvada, 2004). Més recentment, s'ha demostrat que la fosforilació i la funció del receptor de progesterona són també cicle-dependents amb una major activitat durant la fase S del cicle (Narayanan, 2005).

Per altra banda, el canvi d'expressió d'ER α durant el cicle cel·lular suggereix que una mateixa cèl·lula respondrà de manera diferent als lligands estrogènics depenent de la fase del cicle en la que es trobi. Aquest fet podria ser important a l'hora de sincronitzar tractaments ja que si bloquegem les cèl·lules en G2/M disminuïm la seva capacitat de respondre als agonistes o antagonistes del receptor d'estrògens.

L'anàlisi de la localització subcel·lular ha demostrat que ER α 1 es troba present tant en la fracció nuclear com en la no nuclear de totes les fases del cicle, mentre que ER α 2 es localitza exclusivament en la fracció nuclear. La localització nuclear d'ER α en les fases G1 i S suggereix que aquest receptor modularia l'expressió de proteïnes implicades en la entrada i la progressió de la fase S del cicle cel·lular.

En aquest treball s'ha avaluat si la proteïna endògena d'ER α podria actuar com a regulador transcripcional durant el cicle cel·lular. És conegut que ER α regula la transcripció, tant positivament com negativament, per dos mecanismes diferents. El primer implica la unió d'homodímers d'ER α a les seqüències ERE localitzades en les regions reguladores dels gens diana del receptor d'estrògens. El segon mecanisme es

basa en la interacció d'ER α amb altres factors de transcripció com AP-1, SP-1 i NF-kB. Els experiments amb el sistema reportador de luciferasa han demostrat que l'estradiol indueix un augment significatiu de l'activitat transcripcional sobre promotors regulats per seqüències ERE en la línia de càncer de pròstata LNCaP. Com que aquesta línia cel·lular no expressa ER α ni tampoc observem transactivació sobre ERE amb la isoforma ER α 2, aquesta activitat transcripcional ha de ser deguda a la isoforma ER α 1. L'anàlisi de l'activitat luciferasa en cèl·lules separades en les diferents fases del cicle cel·lular ha demostrat també que la transactivació sobre les seqüències ERE és produeix únicament en la fase S del cicle cel·lular, coincidint amb el nivell d'expressió màxima de la isoforma ER α 1. Quant a l'activitat sobre els altres elements de resposta estudiats, ni l'estradiol ni l'inhibidor indueixen canvis sobre l'activitat transcripcional d'AP1 i de NF-kB. Cal destacar que l'activitat transcripcional basal de NF-kB fou de l'ordre de cinc vegades superior a la de ERE o AP1. Encara que s'ha descrit una activitat transcripcional basal de NF-kB molt elevada en altres línies de càncer de pròstata (Leung, 2006), l'absència de canvis després del tractament amb l'estradiol o l'inhibidor en les cèl·lules LNCaP suggereix que la proteïna endògena ER α no participa en aquesta inducció. D'altra banda, tampoc es pot descartar que l'absència de transactivació sobre les seqüències ERE en altres fases del cicle com també l'absència a incapacitat de l'estradiol per transactivar indirectament AP1 i NF-kB siguin degudes a l'insuficient nivell d'ER α endogen de la línia LNCaP. Aquesta proposta ve reforçada pel fet que la transactivació en ERE i AP1 varia en la fase G1 del cicle quan la proteïna ER α 1 està sobre-expressada.

Quant a la funció d'ER α 1, els nostres resultats demostren que la sobre-expressió d'ER α 1 inhibeix la proliferació. Concretament, en aquest treball s'ha demostrat que les cèl·lules LNCaP que sobre-expressen ER α 1 disminueixen significativament la

incorporació de BrdU com a conseqüència d'un bloqueig en la fase G1a del cycle cel·lular. Altres treballs previs han descrit una associació entre la sobre-expressió d'ER α i la inducció d'un bloqueig en G1 (Martineti, 2005) com també la regulació negativa de l'expressió de gens de la fase S del cycle cel·lular (Lazennec, 2001; Strom, 2003 i Paruthiyil, 2004). Els resultats d'aquest treball suggereixen que aquesta regulació negativa hauria de ser atribuïda a una disminució del nombre de cèl·lules que entren en fase S més que a una regulació directa d'aquests gens específics de fase S.

El bloqueig en la fase G1 del cycle cel·lular induït per la sobre-expressió d'ER α 1 en les cèl·lules LNCaP restringeix la utilitat de la tècnica a l'estudi d'aquesta fase. Els resultats d'aquest treball demostren que la sobre-expressió del mutant d'ER α 1 en el DBD causa també un bloqueig en la fase G1a del cycle cel·lular, suggerint que les accions nuclears d'ER α 1 en aquesta fase del cycle succeïxen a través de la unió a altres seqüències del DNA o proteïnes. A més, s'ha constatat que el bloqueig provocat per la sobre-expressió d'ER α 1 depèn de lligand, doncs l'administració de l'inhibidor del receptor d'estrògens ICI 182,780 aconsegueix alliberar el bloqueig en G1a i indueix un bloqueig en la fase G1 tardana del cycle cel·lular (G1b), suggerint que a més ER α 1 regularia la transició de les fases del cycle de G1a a G1b a través d'un mecanisme dependent de lligand. S'ha descrit que ER α 1 és capaç de regular l'activitat del factor de transcripció AP1 (Paech, 1997 i Webb, 1999) i que AP1 regula la transcripció de la ciclina D1 en presència de l'inhibidor ICI 182,780 (Liu, 2002). En aquest treball s'ha comprovat que únicament les cèl·lules LNCaP co-transfectades amb els vectors d'ER α 1 i d'AP1-LUC i tractades amb l'inhibidor són capaces d'activar AP1 i que la inhibició del receptor amb ICI 182,780 en cèl·lules que el sobre-expressen augmenta significativament els nivells de ciclina D1. En aquest treball es postula que ER α regula la transició de les fases G1a a G1b inhibint l'activitat transcripcional d'AP1. És

interessant destacar que ER α no és capaç de realitzar aquesta acció, donant suport a la hipòtesi que únicament ER α regula l'activitat transcripcional d'AP1.

En aquest treball també hem volgut analitzar el mecanisme pel qual ER α regula l'activitat d'AP1. Els nostres resultats demostren que ER α interacciona amb la proteïna JNK1 i que aquesta interacció desapareix quasi completament quant el receptor és inhibit. La JNK1 és una MAPK que es transloca al nucli on fosforila i activa el factor de transcripció AP1, que alhora activa l'expressió de gens del cicle cel·lular com la ciclina D1. En aquest treball s'ha constatat que ER α no interacciona amb AP1 i que l'expressió de la ciclina D1 augmenta quan el receptor està inhibit, suggerint la hipòtesi que la unió d'ER α a la proteïna JNK1 impediria l'activació del factor de transcripció AP1 afectant negativament a l'expressió dels seus gens diana. El mecanisme concret pel qual ER α exerciria aquesta acció no és del tot clar, però els nostres resultats suggereixen que un dels mecanismes seria que la interacció amb JNK1 evitaria l'activació d'AP1. En aquest sentit, es coneix que l'absència d'activació d'AP1 disminueix la seva vida mitjana (Dunn, 2002), el que suggereix que la interacció d'ER α amb JNK1 afectaria l'estabilitat d'AP1.

La localització no nuclear d'ER α i el seu canvi d'expressió durant el cicle cel·lular suggereix que mecanismes no nuclears també participen en la regulació del cicle cel·lular. S'ha descrit que ER α s'associa en el citoplasma amb el receptor d'andrògens i la proteïna de membrana citoplasmàtica c-src (Migliaccio, 2000) i en la fracció mitocondrial (Yang, 2003 i Cammarata, 2005). Si les accions no nuclears d'ER α juguen un paper en la progressió del cicle cel·lular i si aquestes actuen independentment o en coordinació amb mecanismes nuclears són aspectes que requereixen ser investigats.

Respecte a la funció d'ER α , no hi ha estudis postulant la seva funció en el cicle cel·lular. S'ha reportat que ER α no s'uneix la seqüència ERE (Ogawa, 1998) i que té una capacitat reduïda per unir-se al DNA (Peng, 2003). Experiments in vitro han revelat que ER α és capaç de dimeritzar amb ER β i inhibir la seva activitat transcripcional, però contràriament no presenta tal efecte sobre ER β (Ogawa, 1998 i Peng, 2003). Recentment, s'ha demostrat que ER α és capaç d'heterodimeritzar amb ER β i promocionar la seva transactivació (Leung, 2006). En aquest treball, hem demostrat que ER α i ER β es co-expressen en el nucli de les cèl·lules en les fases G1 i S del cicle cel·lular de la línia LNCaP. En aquest context específic, es podria hipotetitzar que durant la fase S ER α heterodimeritzaria amb ER β promocionant l'activitat transcripcional sobre les seqüències ERE i contràriament, no realitzaria aquesta funció en G1 perquè els nivells d'ER β durant aquesta fase serien insuficients per activar la transcripció. D'altra banda, durant la fase G2/M, ER α s'expressa abundantment i ER β és gairebé absent. En aquest sentit, s'ha demostrat que la regió D d'ER α interacciona amb la proteïna implicada en el *checkpoint* de mitosis MAD2 (Poezl, 2000), tot i que el significat d'aquesta interacció continua sent desconeguda. En un treball previ del nostre grup, es va mostrar que la sobre-expressió d'ER α estava associada amb un augment en l'expressió de MAD2 en espermatòcits primaris del ratolí transgènic amb el gen de rata ABP, bloquejats en metafase (Selva, 2004). Aquests resultats obtinguts en aquest treball suggereixen que si ER α juga algun paper en el *spindle checkpoint* de mitosi i/o meiosi, aquesta acció hauria d'implicar ER α , el que actuaria possiblement mitjançant la interacció amb altres proteïnes.

CONCLUSIONS

1. Els anticossos PA1-313 i PPG5/10 reconeixen específicament la proteïna ER? 1 humana i l'anticòs policlonal generat contra la part carboxi-terminal d'ER? 2 reconeix específicament la proteïna ER? 2 humana.
2. La pròstata humana sana i tumoral expressa el missatger i la proteïna ER? 1 i ER? 2.
3. L'enzim P450 aromatasa s'expressa a les cèl·lules estromals de la pròstata humana tan sana com tumoral i a les cèl·lules epitelials de la pròstata tumoral.
4. La longitud de la seqüència de la isoforma d'ER? 503 humana és menor a la de la seqüència murina. La traducció de la seqüència humana genera una proteïna truncada.
5. El RNA missatger de la seqüència d'ER? 503 no s'expressa en els teixits de pròstata humana, el que suggereix que la participació d'aquesta isoforma en el mecanisme d'acció dels estrògens és poc rellevant en aquest teixit.
6. L'expressió d'AR en tumors de pròstata d'estadi T2/T3N0M0 és similar a la de la pròstata sana.
7. La línia cel·lular LNCaP expressa AR, ER? i P450aromatasa i no expressa ER?. Aquest patró d'expressió és similar al de les cèl·lules del càncer de pròstata humà, fet que valida la utilitat d'aquesta línia com a model d'estudi de les accions d'ER? en la pròstata.
8. Les cèl·lules LNCaP cultivades asincrònicament poden ser aïllades en les diferents fases del cicle cel·lular per citometria de flux considerant el seu contingut en DNA. Aquest procediment permet l'extracció de proteïnes i l'anàlisi de la seva expressió per western blot així com l'anàlisi de la seva activitat transcripcional per assaigs de luciferasa.
9. Les isoformes d'ER? mostren un perfil d'expressió específic durant la progressió del cicle cel·lular de la línia LNCaP. L'expressió d'ER? 1 augmenta des de la fase G1 a la S i disminueix abans d'arribar a la fase G2/M i l'expressió d'ER? 2 està present en G1, disminueix en S i augmenta de nou en la fase G2/M.
10. El perfil d'expressió del RNA missatger d'ER? 1 i ER? ? durant la progressió del cicle cel·lular és similar al de la proteïna, el que suggereix una regulació de l'expressió de cada isoforma a nivell transcripcional.
11. L'estradiol indueix un augment significatiu de l'activitat transcripcional d'ER? ? sobre promotors regulats per seqüències ERE en la fase S del cicle cel·lular.
12. L'estradiol i l'inhibidor ICI 182,780 no indueixen canvis sobre l'activitat transcripcional d'AP1 i de NF-kB.

13. La sobre-expressió d'ER α 1 en les cèl·lules LNCaP indueix un bloqueig en la fase G1a del cicle cel·lular i la inhibició d'aquest receptor indueix el bloqueig en la fase G1b. Aquesta inhibició s'associa a un guany en l'activitat del factor de transcripció AP1.
14. El doble bloqueig induït en la fase G1 del cicle cel·lular indica que ER α 1 regula negativament la progressió de la fase G1 i l'entrada en la fase S a través de diversos mecanismes.
15. La localització no nuclear d'ER α 1 i el seu canvi d'expressió durant el cicle cel·lular suggereix que mecanismes no nuclears també participen en la regulació del cicle cel·lular.
16. En la fase G2/M del cicle cel·lular s'expressa majoritàriament ER α 2, el que suggereix la seva participació en la regulació de la fase de mitosi.

BIBLIOGRAFIA

-A-

Adams JY, Leav I, Lau KM, Ho SM, Pflueger SM. Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate*. 2002 Jun 1;52(1):69-81.

Arnold JT, Isaacs JT. Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocr Relat Cancer*. 2002 Mar;9(1):61-73. Review.

Aronica SM, Katzenellenbogen BS. 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*. 1993 Jun;7(6):743-52.

Assoian RK. Control of the G1 phase cyclin-dependent kinases by mitogenic growth factors and the extracellular matrix. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997 Sep;8(3):165-70. Review.

Augereau P, Miralles F, Cavailles V, Gaudet C, Parker M, Rochefort H. Characterization of the proximal estrogen-responsive element of human cathepsin D gene. *Mol Endocrinol*. 1994 Jun;8(6):693-703.

Ausrubel FM. *Current Protocols in Molecular Biology*. 1996. Brooklyn, New York: Greene Publishing Associates, Inc.

-B-

Batistuzzo de Medeiros SR, Krey G, Hiji AK, Wahli W. Functional interactions between the estrogen receptor and the transcription activator Sp1 regulate the estrogen-dependent transcriptional activity of the vitellogenin A1 promoter. *J Biol Chem*. 1997 Jul 18;272(29):18250-60.

Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol*. 1984 Sep;132(3):474-9.

Berwaer M, Martial JA, Davis JR. Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol Endocrinol*. 1994 May;8(5):635-42.

Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR, Abate-Shen C, Shen MM. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev*. 1999 Apr 15;13(8):966-77.

Bjornstrom L, Sjoberg M. Mutations in the estrogen receptor DNA-binding domain discriminate between the classical mechanism of action and cross-talk with Stat5b and activating protein 1 (AP-1). *J Biol Chem*. 2002 Dec 13;277(50):48479-83.

Bostwick DG, Brawer MK. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer*. 1987 Feb 15;59(4):788-94.

Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, Gasser TC, Koivisto P, Lack EE, Kononen J, Kallioniemi OP, Gelmann EP. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res.* 2000 Nov 1;60(21):6111-5.

Brinkmann AO, Faber PW, van Rooij HC, Kuiper GG, Ris C, Klaassen P, van der Korput JA, Voorhorst MM, van Laar JH, Mulder E, et al. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem.* 1989;34(1-6):307-10.

Brooks JD, Bova GS, Isaacs WB. Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. *Prostate.* 1995 Jan;26(1):35-9.

Brooks JD, Bova GS, Ewing CM, Piantadosi S, Carter BS, Robinson JC, Epstein JI, Isaacs WB. An uncertain role for p53 gene alterations in human prostate cancers. *Cancer Res.* 1996 Aug 15;56(16):3814-22.

Bruchovsky N, Rennie PS, Coldman AJ, Goldenberg SL, To M, Lawson D. Effects of androgen withdrawal on the stem cell composition of the Shionogi carcinoma. *Cancer Res.* 1990 Apr 15;50(8):2275-82.

Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 1996 May 1;15(9):2174-83.

-C-

Cariou S, Donovan JC, Flanagan WM, Milic A, Bhattacharya N, Slingerland JM. Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 1;97(16):9042-6.

Carroll JS, Prall OW, Musgrove EA, Sutherland RL. A pure estrogen antagonist inhibits cyclin E-Cdk2 activity in MCF-7 breast cancer cells and induces accumulation of p130-E2F4 complexes characteristic of quiescence. *J Biol Chem.* 2000 Dec 8;275(49):38221-9.

Castagnetta LA, Granata OM, Bellavia V, Amodio R, Scaccianoce E, Notarbartolo M, Follari MR, Miceli MD, Carruba G. Product of aromatase activity in intact LNCaP and MCF-7 human cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997 Apr;61(3-6):287-92.

Cammarata PR, Flynn J, Gottipati S, Chu S, Dimitrijevic S, Younes M, Skliris G, Murphy LC. Differential expression and comparative subcellular localization of estrogen receptor beta isoforms in virally transformed and normal cultured human lens epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2005 Aug;81(2):165-75.

Chalbos D, Philips A, Rochefort H. Genomic cross-talk between the estrogen receptor and growth factor regulatory pathways in estrogen target tissues. *Semin Cancer Biol.* 1994 Oct;5(5):361-8. Review.

- Chang WY, Prins GS. Estrogen receptor-beta: implications for the prostate gland. *Prostate*. 1999 Jul 1;40(2):115-24. Review.
- Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*. 1999 Jun 25;284(5423):2174-7.
- Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 1995 Oct 5;377(6548):454-7.
- Chen Y, Martinez LA, LaCava M, Coghlan L, Conti CJ. Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression to cyclin D1. *Oncogene*. 1998 Apr 16;16(15):1913-20.
- Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J*. 1999 Mar 15;18(6):1571-83.
- Cheung E, Schwabish MA, Kraus WL. Chromatin exposes intrinsic differences in the transcriptional activities of estrogen receptors alpha and beta. *EMBO J*. 2003 Feb 3;22(3):600-11.
- Chu S, Fuller PJ. Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Mol Cell Endocrinol*. 1997 Sep 19;132(1-2):195-9.
- Cifuentes E, Croxen R, Menon M, Barrack ER, Reddy GP. Synchronized prostate cancer cells for studying androgen regulated events in cell cycle progression from G1 into S phase. *J Cell Physiol*. 2003 Jun;195(3):337-45.
- Cook JC, Johnson L, O'Connor JC, Biegel LB, Krams CH, Frame SR, Hurtt ME. Effects of dietary 17 beta-estradiol exposure on serum hormone concentrations and testicular parameters in male Crl:CD BR rats. *Toxicol Sci*. 1998 Aug;44(2):155-68.
- Cordon-Cardo C, Koff A, Drobnjak M, Capodieci P, Osman I, Millard SS, Gaudin PB, Fazzari M, Zhang ZF, Massague J, Scher HI. Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep 2;90(17):1284-91.
- Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999 Apr-Jun;69(1-6):165-75.
- Craft N, Chhor C, Tran C, Beldegrun A, DeKernion J, Witte ON, Said J, Reiter RE, Sawyers CL. Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process. *Cancer Res*. 1999 Oct 1;59(19):5030-6.

-D-

Delaunay F, Pettersson K, Tujague M, Gustafsson JA. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Pharmacol*. 2000 Sep;58(3):584-90.

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*. 1998 Nov 15;12(22):3499-511.

Djakiew D. Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *Prostate*. 2000 Feb 1;42(2):150-60. Review.

Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2003 Jun;10(2):179-86. Review.

Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem*. 1998 Nov 6;273(45):29321-30.

Drobnjak M, Osman I, Scher HI, Fazzari M, Cordon-Cardo C. Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. *Clin Cancer Res*. 2000 May;6(5):1891-5.

Dunn C, Wiltshire C, MacLaren A, Gillespie DA. Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal*. 2002 Jul;14(7):585-93. Review.

-E-

El-Ashry D, Chrysogelos SA, Lippman ME, Kern FG. Estrogen induction of TGF-alpha is mediated by an estrogen response element composed of two imperfect palindromes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1996 Nov;59(3-4):261-9.

Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*. 1996 Dec 6;274(5293):1664-72. Review.

Ellem SJ, Schmitt JF, Pedersen JS, Frydenberg M, Risbridger GP. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 May;89(5):2434-41.

Elo JP, Visakorpi T. Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Med*. 2001 Mar;33(2):130-41. Review.

Esteller M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J Pathol*. 2005 Jan;205(2):172-80. Review.

Esslimani-Sahla M, Kramar A, Simony-Lafontaine J, Warner M, Gustafsson JA, Rochefort H. Increased estrogen receptor betacx expression during mammary carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9):3170-4.

-F-

Fan JD, Wagner BL, McDonnell DP. Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol Endocrinol.* 1996 Dec;10(12):1605-16.

Farnsworth WE. Estrogen in the etiopathogenesis of BPH. *Prostate.* 1999 Dec 1;41(4):263-74. Review.

Fernandez PL, Arce Y, Farre X, Martinez A, Nadal A, Rey MJ, Peiro N, Campo E, Cardesa A. Expression of p27/Kip1 is down-regulated in human prostate carcinoma progression. *J Pathol.* 1999 Apr;187(5):563-6.

Freedman LP. Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell.* 1999 Apr 2;97(1):5-8. Review.

Fribourg AF, Knudsen KE, Strobeck MW, Lindhorst CM, Knudsen ES. Differential requirements for ras and the retinoblastoma tumor suppressor protein in the androgen dependence of prostatic adenocarcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 2000 Jul;11(7):361-72.

Fondell JD, Guermah M, Malik S, Roeder RG. Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):1959-64.

Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogawa S, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Inoue S. Differential expression of estrogen receptor beta (ERbeta) and its C-terminal truncated splice variant ERbetacx as prognostic predictors in human prostatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Dec 7;289(3):692-9.

-G-

Galien R, Garcia T. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15;25(12):2424-9.

Garraway LA, Lin D, Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Bhattacharya N, Loda M. Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. *Prostate.* 2003 May 5;55(3):206-18.

Gaudin PB, Epstein JI. Adenosis of the prostate. Histologic features in transurethral resection specimens. *Am J Surg Pathol.* 1994 Sep;18(9):863-70. Review.

Grana X, Garriga J, Mayol X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene.* 1998 Dec 24;17(25):3365-83. Review.

Green S, Kumar V, Krust A, Walter P, Chambon P. Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 2:751-8.

Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem.* 1986 Jan;24(1):77-83.

Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, Cunha GR, Donjacour AA, Matusik RJ, Rosen JM. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 11;92(8):3439-43.

Greenblatt J. RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Jun;9(3):310-9. Review.

Guiochon-Mantel A, Delabre K, Lescop P, Milgrom E. The Ernst Schering Poster Award. Intracellular traffic of steroid hormone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996 Jan;56(1-6 Spec No):3-9. Review.

Gumbiner LM, Gumerlock PH, Mack PC, Chi SG, deVere White RW, Mohler JL, Pretlow TG, Tricoli JV. Overexpression of cyclin D1 is rare in human prostate carcinoma. *Prostate.* 1999 Jan 1;38(1):40-5.

-H-

Hache RJ, Wiskocil R, Vasa M, Roy RN, Lau PC, Deeley RG. The 5' noncoding and flanking regions of the avian very low density apolipoprotein II and serum albumin genes. Homologies with the egg white protein genes. *J Biol Chem.* 1983 Apr 10;258(7):4556-64.

Han EK, Lim JT, Arber N, Rubin MA, Xing WQ, Weinstein IB. Cyclin D1 expression in human prostate carcinoma cell lines and primary tumors. *Prostate.* 1998 May;35(2):95-101.

Hanstein B, Liu H, Yancisin MC, Brown M. Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol.* 1999 Jan;13(1):129-37.

Harada N, Utsumi T, Takagi Y. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1;90(23):11312-6.

Hartley-Asp B, Deinum J, Wallin M. Diethylstilbestrol induces metaphase arrest and inhibits microtubule assembly. *Mutat Res.* 1985 Aug;143(4):231-5.

Heichman KA, Roberts JM. Rules to replicate by. *Cell.* 1994 Nov 18;79(4):557-62. Review.

Hiramatsu M, Maehara I, Ozaki M, Harada N, Orikasa S, Sasano H. Aromatase in hyperplasia and carcinoma of the human prostate. *Prostate.* 1997 May 1;31(2):118-24.

Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. The multiple untranslated first exons system of the human estrogen receptor beta (ER beta) gene. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001 Jul;78(1):33-40.

Ho SM. Estrogens and anti-estrogens: key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *J Cell Biochem.* 2004 Feb 15;91(3):491-503. Review.

Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature.* 1995 Oct 5;377(6548):397-404.

Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, Quinn DI, Makela S, Delprado W, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill G, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Gustafsson JA, Sutherland RL. Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 2001 Jul 15;61(14):5331-5.

Hu X, Lazar MA. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Jan-Feb;11(1):6-10. Review.

-I-

Ignar-Trowbridge DM, Pimentel M, Parker MG, McLachlan JA, Korach KS. Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology.* 1996 May;137(5):1735-44.

Ikegami A, Inoue S, Hosoi T, Kaneki M, Mizuno Y, Akedo Y, Ouchi Y, Orimo H. Cell cycle-dependent expression of estrogen receptor and effect of estrogen on proliferation of synchronized human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology.* 1994 Aug;135(2):782-9.

Imamov O, Morani A, Shim GJ, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 22;101(25):9375-80.

Ince BA, Montano MM, Katzenellenbogen BS. Activation of transcriptionally inactive human estrogen receptors by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and ligands including antiestrogens. *Mol Endocrinol.* 1994 Oct;8(10):1397-406.

Inoue S, Ogawa S, Horie K, Hoshino S, Goto W, Hosoi T, Tsutsumi O, Muramatsu M, Ouchi Y. An estrogen receptor beta isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ERalpha and ERbeta. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Dec 29;279(3):814-9.

Isaacs JT, Coffey DS. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl.* 1989;2:33-50. Review.

Isaacs JT. The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop?

Urol Clin North Am. 1999 May;26(2):263-73. Review.

Ito M, Yuan CX, Malik S, Gu W, Fondell JD, Yamamura S, Fu ZY, Zhang X, Qin J, Roeder RG. Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell*. 1999 Mar;3(3):361-70.

-J-

Jallepalli PV, Kelly TJ. Cyclin-dependent kinase and initiation at eukaryotic origins: a replication switch? *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Jun;9(3):358-63. Review.

Jarrard DF, Sarkar S, Shi Y, Yeager TR, Magrane G, Kinoshita H, Nassif N, Meisner L, Newton MA, Waldman FM, Reznikoff CA. p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells. *Cancer Res*. 1999 Jun 15;59(12):2957-64.

Jarred RA, Cancilla B, Prins GS, Thayer KA, Cunha GR, Risbridger GP. Evidence that estrogens directly alter androgen-regulated prostate development. *Endocrinology*. 2000 Sep;141(9):3471-7.

Jeltsch JM, Roberts M, Schatz C, Garnier JM, Brown AM, Chambon P. Structure of the human oestrogen-responsive gene pS2. *Nucleic Acids Res*. 1987 Feb 25;15(4):1401-14.

Jensen EV, Cheng G, Palmieri C, Saji S, Makela S, Van Noorden S, Wahlstrom T, Warner M, Coombes RC, Gustafsson JA. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 18;98(26):15197-202.

-K-

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 1995 Dec 1;270(5241):1491-4.

Klein-Hitpass L, Schwerk C, Kahmann S, Vassen L. Targets of activated steroid hormone receptors: basal transcription factors and receptor interacting proteins. *J Mol Med*. 1998 Jun;76(7):490-6. Review.

Knudsen ES, Buckmaster C, Chen TT, Feramisco JR, Wang JY. Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1/S transition and S-phase progression. *Genes Dev*. 1998 Aug 1;12(15):2278-92.

Knudsen KE, Arden KC, Cavenee WK. Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20213-22.

Knudsen KE, Fribourg AF, Strobeck MW, Blanchard JM, Knudsen ES. Cyclin A is a functional target of retinoblastoma tumor suppressor protein-mediated cell cycle arrest. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24;274(39):27632-41.

Koivisto P, Hyytinen E, Palmberg C, Tammela T, Visakorpi T, Isola J, Kallioniemi OP. Analysis of genetic changes underlying local recurrence of prostate carcinoma during androgen deprivation therapy. *Am J Pathol.* 1995 Dec;147(6):1608-14.

Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS. Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol Endocrinol.* 1994 Aug;8(8):952-69.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):5925-30.

-L-

Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Labrie C, Simard J, Breton R, Belanger A. The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids.* 1997 Jan;62(1):148-58.

Lahooti H, Thorsen T, Aakvaag A. Modulation of mouse estrogen receptor transcription activity by protein kinase C delta. *J Mol Endocrinol.* 1998 Apr;20(2):245-59.

Lai A, Sarcevic B, Prall OW, Sutherland RL. Insulin/insulin-like growth factor-I and estrogen cooperate to stimulate cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of cyclin E and p21(WAF1/Cip1). *J Biol Chem.* 2001 Jul 13;276(28):25823-33.

Lai JS, Brown LG, True LD, Hawley SJ, Etzioni RB, Higano CS, Ho SM, Vessella RL, Corey E. Metastases of prostate cancer express estrogen receptor-beta. *Urology.* 2004 Oct;64(4):814-20.

Latil A, Bieche I, Vidaud D, Lidereau R, Berthon P, Cussenot O, Vidaud M. Evaluation of androgen, estrogen (ER alpha and ER beta), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res.* 2001 Mar 1;61(5):1919-26.

Lau KM, Leav I, Ho SM. Rat estrogen receptor-alpha and -beta, and progesterone receptor mRNA expression in various prostatic lobes and microdissected normal and dysplastic epithelial tissues of the Noble rats. *Endocrinology.* 1998 Jan;139(1):424-7.

Lavia P, Jansen-Durr P. E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays.* 1999 Mar;21(3):221-30. Review.

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

Leav I, Lau KM, Adams JY, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol.* 2001 Jul;159(1):79-92.

Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271(34):20608-16.

Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem.* 1994 Feb 11;269(6):4458-66.

Leung YK, Gao Y, Lau KM, Zhang X, Ho SM. ICI 182,780-regulated gene expression in DU145 prostate cancer cells is mediated by estrogen receptor-beta/NFkappaB crosstalk. *Neoplasia.* 2006 Apr;8(4):242-9.

Leung YK, Mak P, Hassan S, Ho SM. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 29;103(35):13162-7.

Li LC, Chui R, Nakajima K, Oh BR, Au HC, Dahiya R. Frequent methylation of estrogen receptor in prostate cancer: correlation with tumor progression. *Cancer Res.* 2000 Feb 1;60(3):702-6.

Li LC, Okino ST, Dahiya R. DNA methylation in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Sep 20;1704(2):87-102. Review.

Linja MJ, Savinainen KJ, Tammela TL, Isola JJ, Visakorpi T. Expression of ERalpha and ERbeta in prostate cancer. *Prostate.* 2003 May 15;55(3):180-6.

Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH Jr, Pestell RG, Kushner PJ. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem.* 2002 Jul 5;277(27):24353-60.

Lou YR, Murtola T, Tuohimaa P. Regulation of aromatase and 5alpha-reductase by 25-hydroxyvitamin D(3), 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3), dexamethasone and progesterone in prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 Feb;94(1-3):151-7.

Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol.* 1998 Feb;18(2):753-61.

Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol.* 1996 Dec;16(12):6917-25.

-M-

- Macri E, Loda M. Role of p27 in prostate carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 1998-1999;17(4):337-44. Review.
- Maggiolini M, Recchia AG, Carpino A, Vivacqua A, Fasanella G, Rago V, Pezzi V, Briand PA, Picard D, Ando S. Oestrogen receptor beta is required for androgen-stimulated proliferation of LNCaP prostate cancer cells. *J Mol Endocrinol.* 2004 Jun;32(3):777-91.
- Martin MB, Franke TF, Stoica GE, Chambon P, Katzenellenbogen BS, Stoica BA, McLemore MS, Olivo SE, Stoica A. A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 2000 Dec;141(12):4503-11.
- Martineti V, Picariello L, Tognarini I, Carbonell Sala S, Gozzini A, Azzari C, Mavilia C, Tanini A, Falchetti A, Fiorelli G, Tonelli F, Brandi ML. ERbeta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocr Relat Cancer.* 2005 Jun;12(2):455-69.
- Martinez ED, Danielsen M. Loss of androgen receptor transcriptional activity at the G(1)/S transition. *J Biol Chem.* 2002 Aug 16;277(33):29719-29.
- Maruyama K, Endoh H, Sasaki-Iwaoka H, Kanou H, Shimaya E, Hashimoto S, Kato S, Kawashima H. A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 May 8;246(1):142-7
- Maruvada P, Dmitrieva NI, East-Palmer J, Yen PM. Cell cycle-dependent expression of thyroid hormone receptor-beta is a mechanism for variable hormone sensitivity. *Mol Biol Cell.* 2004 Apr;15(4):1895-903. Epub 2004 Feb 6.
- Masumori N, Thomas TZ, Chaurand P, Case T, Paul M, Kasper S, Caprioli RM, Tsukamoto T, Shappell SB, Matusik RJ. A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential. *Cancer Res.* 2001 Mar 1;61(5):2239-49.
- McKenna NJ, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 29;95(20):11697-702.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 1999 Jun;20(3):321-44. Review.
- McNeal JE. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol.* 1968 Mar;49(3):347-57.
- Meyers FJ, Gumerlock PH, Chi SG, Borchers H, Deitch AD, deVere White RW. Very frequent p53 mutations in metastatic prostate carcinoma and in matched primary tumors. *Cancer.* 1998 Dec 15;83(12):2534-9.

Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta- β -Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J*. 2000 Oct 16;19(20):5406-17.

Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jun 9;247(1):75-8.

Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:261-91. Review.

-N-

Narayanan R, Edwards DP, Weigel NL. Human progesterone receptor displays cell cycle-dependent changes in transcriptional activity. *Mol Cell Biol*. 2005 Apr;25(8):2885-98.

Nasmyth K. Separating sister chromatids. *Trends Biochem Sci*. 1999 Mar;24(3):98-104. Review.

Negri-Cesi P, Poletti A, Colciago A, Magni P, Martini P, Motta M. Presence of 5 α -reductase isozymes and aromatase in human prostate cancer cells and in benign prostate hyperplastic tissue. *Prostate*. 1998 Mar 1;34(4):283-91.

Ng KM, Catalano MG, Pinos T, Selva DM, Avvakumov GV, Munell F, Hammond GL. Evidence that fibulin family members contribute to the steroid-dependent extravascular sequestration of sex hormone-binding globulin. *J Biol Chem*. 2006 Jun 9;281(23):15853-61.

Nojima D, Li LC, Dharia A, Perinchery G, Ribeiro-Filho L, Yen TS, Dahiya R. CpG hypermethylation of the promoter region inactivates the estrogen receptor-beta gene in patients with prostate carcinoma. *Cancer*. 2001 Oct 15;92(8):2076-83.

Norris JD, Fan D, Kerner SA, McDonnell DP. Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol*. 1997 Jun;11(6):747-54.

Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol*. 1998 Jul;153(1):141-8.

-O-

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta β : a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res*. 1998 Aug 1;26(15):3505-12.

Omoto Y, Imamov O, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Feb 1;102(5):1484-9.

-P-

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*. 1997 Sep 5;277(5331):1508-10.

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

Pasquali D, Staibano S, Prezioso D, Franco R, Esposito D, Notaro A, De Rosa G, Bellastella A, Sinisi AA. Estrogen receptor beta expression in human prostate tissue. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Jun 10;178(1-2):47-50.

Pasquali D, Rossi V, Esposito D, Abbondanza C, Puca GA, Bellastella A, Sinisi AA. Loss of estrogen receptor beta expression in malignant human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 May;86(5):2051-5.

Patra D, Wang SX, Kumagai A, Dunphy WG. The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem*. 1999 Dec 24;274(52):36839-42.

Patrone C, Gianazza E, Santagati S, Agrati P, Maggi A. Divergent pathways regulate ligand-independent activation of ER alpha in SK-N-BE neuroblastoma and COS-1 renal carcinoma cells. *Mol Endocrinol*. 1998 Jun;12(6):835-41.

Peng B, Lu B, Leygue E, Murphy LC. Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J Mol Endocrinol*. 2003 Feb;30(1):13-29.

Petersen DN, Tkalcevic GT, Koza-Taylor PH, Turi TG, Brown TA. Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. *Endocrinology*. 1998 Mar;139(3):1082-92.

Picard D, Kumar V, Chambon P, Yamamoto KR. Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul*. 1990 Feb;1(3):291-9.

Poelzl G, Kasai Y, Mochizuki N, Shaul PW, Brown M, Mendelsohn ME. Specific association of estrogen receptor beta with the cell cycle spindle assembly checkpoint protein, MAD2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2836-9.

Poola I, Abraham J, Baldwin K, Saunders A, Bhatnagar R. Estrogen receptors beta4 and beta5 are full length functionally distinct Erbeta isoforms: cloning from human ovary and functional characterization. *Endocrine*. 2005 Aug;27(3):227-38.

Porter W, Wang F, Wang W, Duan R, Safe S. Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol Endocrinol*. 1996 Oct;10(11):1371-8.

Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*. 1997 Jun;18(3):306-60. Review.

Pratt WB. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; 37:297-326. Review.

Prins GS, Birch L, Couse JF, Choi I, Katzenellenbogen B, Korach KS. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6089-97.

-Q-

Qin C, Singh P, Safe S. Transcriptional activation of insulin-like growth factor-binding protein-4 by 17beta-estradiol in MCF-7 cells: role of estrogen receptor-Sp1 complexes. *Endocrinology*. 1999 Jun;140(6):2501-8.

-R-

Reese JH, McNeal JE, Goldenberg SL, Redwine EA, Sellers RG. Distribution of lactoferrin in the normal and inflamed human prostate: an immunohistochemical study. *Prostate*. 1992;20(1):73-85.

Reese JH, McNeal JE, Redwine EA, Stamey TA, Freiha FS. Tissue type plasminogen activator as a marker for functional zones, within the human prostate gland. *Prostate*. 1988;12(1):47-53.

Reese JH, McNeal JE, Redwine EA, Samloff IM, Stamey TA. Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and the seminal vesicle. *J Urol*. 1986 Nov;136(5):1148-52.

Richard S, Zingg HH. The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *J Biol Chem*. 1990 Apr 15;265(11):6098-103.

Rody A, Holtrich U, Solbach C, Kourtis K, von Minckwitz G, Engels K, Kissler S, Gatje R, Karn T, Kaufmann M. Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Dec;12(4):903-16.

Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, Hermann H, Fichter M, Mayer H, Siegfried W, Young JK, Renschmidt H, Hebebrand J. Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Dec;83(12):4524-7.

Royuela M, de Miguel MP, Bethencourt FR, Sanchez-Chapado M, Fraile B, Arenas MI, Paniagua R. Estrogen receptors alpha and beta in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J Endocrinol.* 2001 Mar;168(3):447-54.

-S-

Sakr WA, Sarkar FH, Sreepathi P, Drozdowicz S, Crissman JD. Measurement of cellular proliferation in human prostate by AgNOR, PCNA, and SPF. *Prostate.* 1993;22(2):147-54.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. - *A Laboratory Molecular Cloning Manual, 2nd Edition* Hrsg. 1989. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, Dharia A, Kotcherguina I, Fujimoto S, Dahiya R. Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Mar 6;94(5):384-90.

Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, Dharia A, Kotcherguina I, Fujimoto S, Dahiya R. Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Mar 6;94(5):384-90.

Seol W, Mahon MJ, Lee YK, Moore DD. Two receptor interacting domains in the nuclear hormone receptor corepressor RIP13/N-CoR. *Mol Endocrinol.* 1996 Dec;10(12):1646-55.

Selva DM, Tirado OM, Toran N, Suarez-Quian CA, Reventos J, Munell F. Estrogen receptor beta expression and apoptosis of spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene. *Biol Reprod.* 2004 Nov;71(5):1461-8.

Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science.* 2002 Mar 29;295(5564):2465-8.

Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995 May 15;9(10):1149-63. Review.

Shiraishi T, Watanabe M, Muneyuki T, Nakayama T, Morita J, Ito H, Kotake T, Yatani R. A clinicopathological study of p53, p21 (WAF1/CIP1) and cyclin D1 expression in human prostate cancers. *Urol Int.* 1998;61(2):90-4.

Signoretti S, Loda M. Estrogen receptor beta in prostate cancer: brake pedal or accelerator? *Am J Pathol.* 2001 Jul;159(1):13-6. Review.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amareh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 1994 Jun;15(3):342-55. Review.

Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Sun T, Fisher CR, Qin K, Mendelson CR. Aromatase expression in

health and disease. *Recent Prog Horm Res.* 1997;52:185-213; discussion 213-4. Review.

Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Sep;86(3-5):225-30. Review.

Simpson E, Jones M, Misso M, Hewitt K, Hill R, Maffei L, Carani C, Boon WC. Estrogen, a fundamental player in energy homeostasis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 May;95(1-5):3-8. Review.

Skliris GP, Parkes AT, Limer JL, Burdall SE, Carder PJ, Speirs V. Evaluation of seven oestrogen receptor beta antibodies for immunohistochemistry, western blotting, and flow cytometry in human breast tissue. *J Pathol.* 2002 Jun;197(2):155-62.

Smith CL. Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signalling pathways. *Biol Reprod.* 1998 Mar;58(3):627-32. Review.

Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res.* 1996 Jan 1;56(1):218-22.

Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 10;101(6):1566-71.

Suen CS, Berrodin TJ, Mastroeni R, Cheskis BJ, Lyttle CR, Frail DE. A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem.* 1998 Oct 16;273(42):27645-53.

Sun G, Porter W, Safe S. Estrogen-induced retinoic acid receptor alpha 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex. *Mol Endocrinol.* 1998 Jun;12(6):882-90.

-T-

Tamrazi A, Carlson KE, Daniels JR, Hurth KM, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor dimerization: ligand binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate. *Mol Endocrinol.* 2002 Dec;16(12):2706-19.

Taplin ME, Ho SM. Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Aug;86(8):3467-77. Review.

Teng CT, Liu Y, Yang N, Walmer D, Panella T. Differential molecular mechanism of the estrogen action that regulates lactoferrin gene in human and mouse. *Mol Endocrinol.* 1992 Nov;6(11):1969-81.

Theodorescu D, Broder SR, Boyd JC, Mills SE, Frierson HF Jr. p53, bc1-2 and retinoblastoma proteins as long-term prognostic markers in localized carcinoma of the prostate. *J Urol.* 1997 Jul;158(1):131-7.

Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 1989 Nov 3;59(3):477-87.

Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, Rosenfeld MG. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*. 1997 Jun 12;387(6634):677-84.

Torlakovic E, Lilleby W, Torlakovic G, Fossa SD, Chibbar R. Prostate carcinoma expression of estrogen receptor-beta as detected by PPG5/10 antibody has positive association with primary Gleason grade and Gleason score. *Hum Pathol*. 2002 Jun;33(6):646-51.

Torlakovic E, Lilleby W, Berner A, Torlakovic G, Chibbar R, Furre T, Fossa SD. Differential expression of steroid receptors in prostate tissues before and after radiation therapy for prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2005 Nov 10;117(3):381-6.

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

Trowbridge JM, Rogatsky I, Garabedian MJ. Regulation of estrogen receptor transcriptional enhancement by the cyclin A/Cdk2 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 16;94(19):10132-7.

Tsugaya M, Harada N, Tozawa K, Yamada Y, Hayashi Y, Tanaka S, Maruyama K, Kohri K. Aromatase mRNA levels in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Int J Urol*. 1996 Jul;3(4):292-6.

Turner KJ, Macpherson S, Millar MR, McNeilly AS, Williams K, Cranfield M, Groome NP, Sharpe RM, Fraser HM, Saunders PT. Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. *J Endocrinol*. 2002 Jan;172(1):21-30.

-U-

Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, Schaafsma HE, Karthaus HF, Oosterhof GO, Debruyne FM, Schalken JA. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res*. 1994 Jul 15;54(14):3929-33.

-V-

Verrijzer CP, Tjian R. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci*. 1996 Sep;21(9):338-42. Review.

Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvanen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, Isola JJ, Kallioniemi OP. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*. 1995 Jan 15;55(2):342-7.

Visakorpi T. The molecular genetics of prostate cancer. *Urology*. 2003 Nov;62(5 Suppl 1):3-10. Review.

vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD, Ganjam VK, Parmigiani S, Welshons WV. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 4;94(5):2056-61.

-W-

Wahli W, Martinez E, Corthesy B, Cardinaux JR. cis- and trans-acting elements of the estrogen-regulated vitellogenin gene B1 of *Xenopus laevis*. *J Steroid Biochem*. 1989;34(1-6):17-32.

Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol*. 1995 Apr;9(4):443-56.

Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McInerney E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JA, Nilsson S, Kushner PJ. The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol*. 1999 Oct;13(10):1672-85.

Weigel NL, Zhang Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med*. 1998 Jun;76(7):469-79. Review.

Weinert T. DNA damage checkpoints update: getting molecular. *Curr Opin Genet Dev*. 1998 Apr;8(2):185-93. Review.

Weisz A, Bresciani F. Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol Endocrinol*. 1988 Sep;2(9):816-24.

Weisz A, Rosales R. Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res*. 1990 Sep 11;18(17):5097-106.

-Y-

Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM Jr, Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins JW. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 23;101(12):4130-5.

-Z-

Zhao C, Lam EW, Sunters A, Enmark E, De Bella MT, Coombes RC, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K. Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene*. 2003 Oct 23;22(48):7600-6.

Zou A, Marschke KB, Arnold KE, Berger EM, Fitzgerald P, Mais DE, Allegretto EA. Estrogen receptor beta activates the human retinoic acid receptor alpha-1 promoter in

response to tamoxifen and other estrogen receptor antagonists, but not in response to estrogen. *Mol Endocrinol.* 1999 Mar;13(3):418-30.

Zhu X, Leav I, Leung YK, Wu M, Liu Q, Gao Y, McNeal JE, Ho SM. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am J Pathol.* 2004 Jun;164(6):2003-12.