



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"FARMACOLOGIA E ONCOLOGIA MOLECOLARE"

CICLO XXI

COORDINATORE Prof. Pier Andrea Borea

La regolazione dell'espressione del gene per il Recettore
dell'Estrogeno α (ER α) in osteoblasti umani:
ruolo di Runx2, AP-1 e NFATc1

Settore Scientifico Disciplinare BIO/10

Dottorando
Dott. Tavanti Elisa

Tutore
Prof. Piva Roberta

Anni 2006/2008

INDICE

INTRODUZIONE	1
IL TESSUTO OSSEO	1
<i>Formazione del tessuto osseo</i>	1
<i>Rimodellamento osseo</i>	2
GLI OSTEOLASTI E I FATTORI INDUCENTI IL LORO DIFFERENZIAMENTO	8
RECETTORE PER GLI ESTROGENI α (ERα)	13
<i>Ruolo di ERα nell'organismo umano</i>	13
<i>Struttura di ERα</i>	14
<i>Meccanismo d'azione</i>	15
<i>Organizzazione genomica del gene di ERα</i>	19
<i>Ruolo di ERα nel tessuto osseo</i>	25
<u>Estrogeno ed osteoblasti</u>	27
<u>Geni estrogeno responsivi in cellule di osso</u>	29
AP-1	31
<i>Fattori trascrizionali della Famiglia AP-1</i>	31
<i>Fattori trascrizionali ATF/CREB</i>	35
RUNX2	39
NFATc1	42
<i>Ruolo di NFATc1 negli osteoclasti</i>	42
<i>Ruolo di NFATc1 negli osteoblasti</i>	44
SCOPO	46
MATERIALI E METODI	48
<i>Colture cellulari</i>	48
<i>Immunocitochimica</i>	49
<i>Estrazione dell'RNA</i>	49
<i>Reversione in cDNA</i>	50
<i>RT-PCR-quantitativa</i>	51
<i>Preparazione degli estratti nucleari</i>	52
<i>Preparazione degli estratti cellulari</i>	53
<i>Western blotting</i>	53
<i>Preparazione dei costrutti</i>	54
<i>Altri costrutti</i>	56
<i>Saggio di luciferasi</i>	56
<i>Silenziamento genico mediante Small Interfering RNA (siRNA)</i>	58
<i>Esperimenti di decoy</i>	58

<i>EMSA (Electrophoretic mobility Shift Assay)</i>	59
<i>Saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)</i>	60
<i>Analisi dell'apoptosi</i>	63
<i>Mineralizzazione</i>	64
<i>Analisi statistica</i>	64
RISULTATI	65
1.ANALISI BIOINFORMATICA DEL PROMOTORE F DI ER α	67
2.DESCRIZIONE DEL MODELLO CELLULARE SaOS-2	71
2.1.ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE ER α , RUNX2, AP-1 E NFATc1	75
3.ANALISI FUNZIONALE DEL PROMOTORE F	77
4.IL RUOLO DELLE PROTEINE ER α , RUNX2, AP-1 E NFATc1 NEL PROMOTORE F DEL GENE DI ER α	83
4.1.RUNX2	83
4.1.1.ANALISI <i>IN VIVO</i> DELL'INTERAZIONE DI RUNX2 AL PROMOTORE F	83
4.1.2.ANALISI <i>IN VITRO</i> DELL'INTERAZIONE DI RUNX2 AL PROMOTORE F	86
4.1.3.L'EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI RUNX2	91
4.1.4.VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE ESOGENA DI RUNX2 SULL'ATTIVITA' DEL PROMOTORE F	96
4.1.5.VALUTAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE DEI SITI RUNX2 MEDIANTE MUTAGENESI SITO-SPECIFICA	99
4.2.ER α E AP-1	101
4.2.1.VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE ESOGENA DI ER α SULL'ATTIVITA' DEL PROMOTORE F	101
4.2.2.ANALISI <i>IN VIVO</i> DELL'INTERAZIONE DI ER α E AP-1 AL PROMOTORE F	103
4.2.3.ANALISI <i>IN VITRO</i> DELL'INTERAZIONE DI ER α E AP-1 AL PROMOTORE F	107
4.2.4.VALUTAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE DEI SITI ER α E AP-1 MEDIANTE MUTAGENESI SITO-SPECIFICA	123
4.3.NFATc1	127
4.3.1.BACKGROUND	127
4.3.2.ANALISI <i>IN VITRO</i> DELL'INTERAZIONE DI NFATc1 AL PROMOTORE F	130
4.3.3.STRATEGIA DECOY	134
4.3.4.ANALISI DELL'EFFETTO DELLA DEPLEZIONE DI NFATc1 MEDIANTE DECOY	136
4.3.5.ANALISI <i>IN VIVO</i> DELL'INTERAZIONE DI NFATc1 AL PROMOTORE F E AL PROMOTORE C	144
4.3.6.VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SULLA FUNZIONE DI ER α	146
DISCUSSIONE	149
BIBLIOGRAFIA	161

INTRODUZIONE

IL TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato dotato di proprietà elastiche e di resistenza; per questo motivo è in grado di assolvere sia a funzioni di tipo meccanico (offre supporto e siti di aggancio per la muscolatura scheletrica), sia a funzioni protettive per gli organi vitali (ad esempio cervello, cuore e midollo osseo), nonché funzioni metaboliche di primaria importanza. La matrice mineralizzata, infatti, rappresenta la principale riserva di ioni minerali, in particolare calcio e fosfato. Questo tessuto è composto principalmente da due popolazioni cellulari, osteoblasti e osteoclasti, da fibre collagene (il collagene di tipo I rappresenta il 90% delle proteine totali), e da proteine non collageniche come osteopontina, proteina sialica e osteocalcina. Nell'insieme queste proteine legano cristalli di idrossiapatite (fosfato di calcio) e compongono l'osso mineralizzato.

Formazione del tessuto osseo

Lo scheletro è formato da due tipi di tessuti connettivi di origine mesenchimale: cartilagine ed osso, i quali sono formati rispettivamente da condrociti ed osteoblasti.

Lo sviluppo osseo, durante l'embriogenesi, si articola attraverso processi ben precisi: l'ossificazione intramembranosa, endocondrale e suturale. Attraverso l'ossificazione intramembranosa si formano le ossa piatte del cranio e della mandibola: in questo processo gli osteoblasti, le cellule deputate alla formazione dell'osso, differenziano da cellule mesenchimali ed iniziano a produrre e secernere matrice extracellulare (l'osteoido); questa successivamente mineralizza e si riorganizza originando osso compatto. La maggior parte delle ossa si formano mediante il processo di ossificazione endocondrale: le cellule mesenchimali differenziano in condrociti, formando una struttura cartilaginea temporanea che

funge da modello per quella ossea. Man mano che la cartilagine aumenta di volume, i condrociti della parte più interna smettono di proliferare, e differenziano in condrociti ipertrofici caratterizzati da una aumentata dimensione e dalla capacità di secernere matrice extracellulare che calcifica. Essi, a causa dell'assenza di nutrienti, muoiono lasciando delle cavità all'interno della cartilagine. Le cellule mesenchimali che circondano questa struttura costituiscono il pericondrio. A questo livello, in seguito ad opportuni stimoli induttivi, gli osteoblasti iniziano a differenziare e a secernere matrice non mineralizzata, che in seguito darà origine ad osso compatto attraverso la formazione di nuovi vasi sanguigni. Gli osteoblasti migrano successivamente nelle cavità all'interno della cartilagine, sostituendola con la formazione di osso spugnoso. Gli osteoblasti, che rimangono intrappolati all'interno della matrice mineralizzata, differenziano in osteociti, ultimo stadio del differenziamento osteoblastico.

Gli osteoclasti, le cellule responsabili del riassorbimento osseo, intervengono nel processo di formazione del tessuto osseo erodendo la parte centrale della struttura, e dando origine alla cavità midollare. In seguito, gli osteoblasti proseguiranno il processo di sviluppo realizzando l'accrescimento del diametro e della lunghezza dell'osso (Hartman, 2006).

Il processo suturale interviene, invece, nell'accrescimento delle ossa del viso e del cranio permettendo, attraverso un continuo accomodamento delle sue dimensioni, la corretta crescita degli organi che racchiude e cioè del cervello e degli occhi (Storey 1972).

Rimodellamento osseo

Il tessuto osseo può essere definito un tessuto dinamico; la matrice di cui è composto va incontro, infatti, a continui cicli di rimodellamento necessari a soddisfare esigenze di adattamento a carico di tipo meccanico e di mantenimento dell'omeostasi di calcio e fosforo. Queste modificazioni cicliche sono caratterizzate da fasi coordinate di riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti (Rousselle and Heymann 2002) e deposizione di nuova matrice ad

opera degli osteoblasti (Aguila et al, 2005); questi due tipi cellulari, quindi, collaborano in questo processo in quella che viene chiamata Bone Multicellular Unit (BMU) (figura 1).

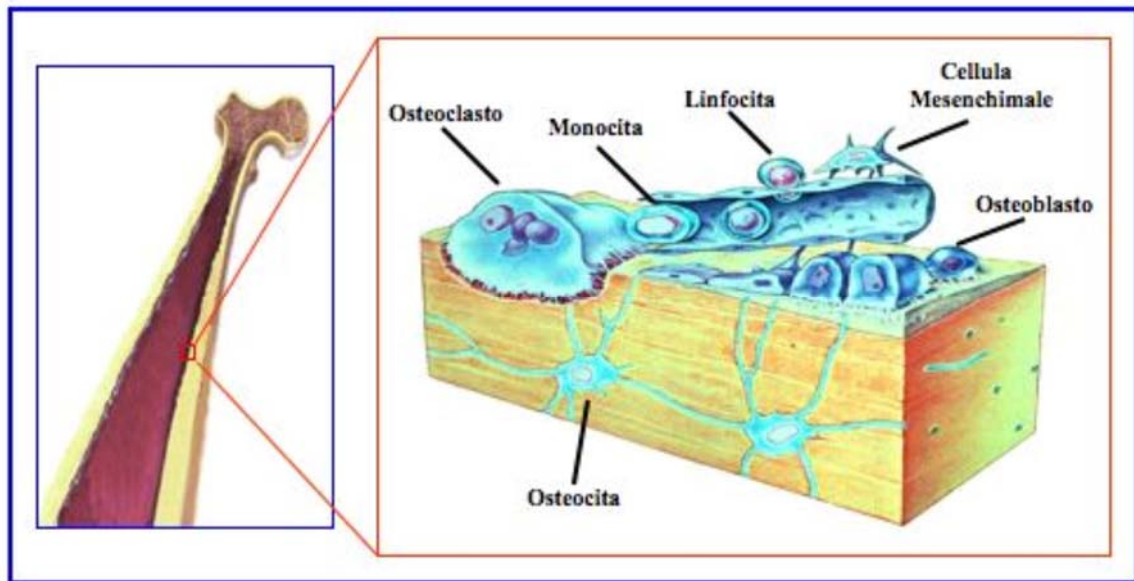


Figura 1. Ultrastruttura di una sezione di osso lungo con rappresentazione di una tipica “Bone Multicellular Unit”

Per ogni ciclo di rimodellamento vengono riconosciute tre fasi consecutive: riassorbimento, inversione e formazione, figura 2 (Dempster et al, 2006).

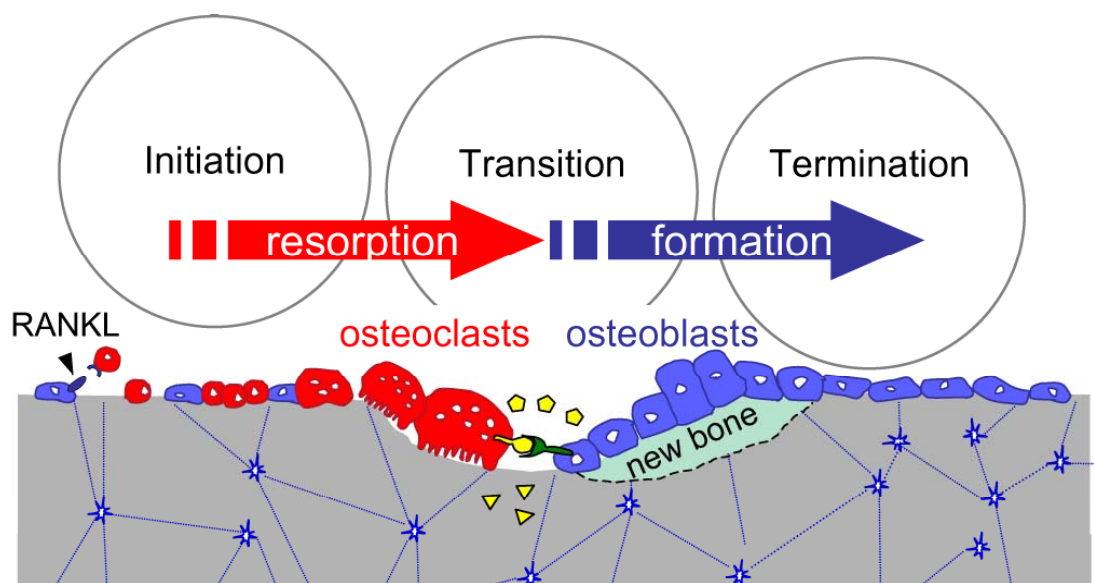


Figura 2. Modello a tre fasi del ciclo di rimodellamento osseo (Fonte Matsuo and Irie, 2008)

Il riassorbimento inizia con la migrazione di precursori osteoclastici mononucleati verso la superficie ossea, dove completeranno il differenziamento in osteoclasti multinucleati. Dopo il completamento di questa fase, inizia quella di inversione nella quale inizialmente l'attività degli osteoclasti è fortemente inibita e poi gli osteoclasti stessi vanno incontro ad apoptosi. Altre cellule mononucleate fanno il loro ingresso sulla superficie ossea secernendo fattori necessari per il differenziamento e la migrazione degli osteoblasti. La fase di formazione prevede che gli osteoblasti appongano nuova matrice (osteoidi), fino a che non si sia verificato il completo ripristino di tutto l'osso che era stato precedentemente rimosso. Quando anche questa fase giunge a compimento la superficie ossea viene ricoperta da cellule di rivestimento, solitamente per un periodo prolungato e comunque fino a che non inizia un nuovo ciclo di rimodellamento. Il tempo di durata delle tre fasi è sicuramente differente. La fase di riassorbimento molto probabilmente continua per due settimane, la fase di inversione anche per quattro o cinque settimane, mentre la fase di formazione può perdurare addirittura per quattro mesi fino a che la nuova struttura ossea non si sia completamente riformata (Hadjidakis and Androulakis 2006). Fu Forst, tra il 1964 e il 1966 (Frost 1996) a descrivere il ciclo di rimodellamento, tuttavia i meccanismi molecolari alla base delle interazioni tra osteoblasti e osteoclasti sono stati solo parzialmente chiariti e sono ancora oggi oggetto di studio.

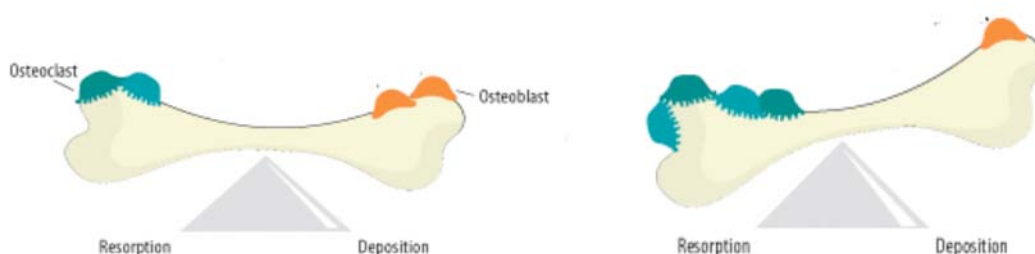


Figura 3. La prima figura rappresenta la condizione normale di bilancio tra attività di deposizione di matrice ossea ad opera degli osteoblasti (cellule in arancione) e di riassorbimento ad opera degli osteoclasti (cellule in verde). In molte situazioni patologiche l'equilibrio tra queste due attività viene a mancare (figura di destra).

Il mancato equilibrio fra le fasi del ciclo di rimodellamento può generare importanti conseguenze: la massa ossea non rimane costante e il rinnovamento osseo è compromesso. In modo semplificato si possono distinguere patologie caratterizzate dall'aumento della massa ossea (osteopetrosi) e patologie caratterizzate dalla diminuzione della massa ossea (osteoporosi) (figura 3). L'osteopetrosi può essere causata sia da una iperattività degli osteoblasti che depongono una sovrabbondanza di matrice o da una diminuzione dell'attività di riassorbimento da parte degli osteoclasti. Fu Albers Shonberg nel 1904 a descrivere per la prima volta questa patologia anche se solo molto tempo dopo si comprese che la causa era di natura genetica. L'osteopetrosi è, infatti, una patologia geneticamente eterogenea comprendente varie forme, le principali delle quali sono riportate nella Tabella 1. La forma autosomica dominante di tipo II e la forma autosomica recessiva maligna sono tutt'oggi chiamate con il nome del loro scopritore. Oltre a causare deformità ossee importanti, l'osteopetrosi danneggia anche il midollo osseo in quanto diminuisce lo spazio in cui esso risiede.

Types	Inheritance	Chromosome location	Mutated genes	Comments
Type I	Autosomal dominant	11q13.4	<i>LRP5</i>	Phenotypes include autosomal dominant osteopetrosis, autosomal dominant osteosclerosis, endosteal hyperostosis, and Van Buchem disease. Some cases are associated with large mandible and torus palatinus
Type II	Autosomal dominant	16p13	<i>CLCN7</i>	Dense cranial bone, "sandwich" vertebrae, subcrestal sclerosis, and many fractures. Also known as Albers-Schönberg disease.
Van Buchem disease	Autosomal dominant	17q11.2	<i>SOST</i>	Osteosclerosis of the skull, mandible, limbs, ribs, and long bone diaphyses
Sclerosteosis	Autosomal dominant	17q12-q21	<i>SOST</i>	Similar to Van Buchem disease, but different radiological appearance of long bones and asymmetric cutaneous syndactyly of fingers
Osteopetrosis	Autosomal recessive; genetically heterogeneous	6q21 11q13.4-q13.5 16p13	<i>OSTM1 TCIRG1 CLCN7</i>	Known as malignant autosomal recessive osteopetrosis. Macrocephaly, deafness, blindness, hepatosplenomegaly, and severe anemia. Also known as Albers-Schönberg disease
Mild osteopetrosis	Autosomal recessive			Variable features including mandibular prognathism, genua valga, anemia, hepatosplenomegaly, tendency to fracture, mandibular osteomyelitis, and dental anomalies
Osteopetrosis with renal tubular acidosis	Autosomal recessive	8q22	<i>CA2</i>	Short stature, mental retardation, optic nerve compression
Lethal osteopetrosis	Autosomal recessive			Skeletal hyperdensity, fractures in utero, and hydrocephalus
Osteopetrosis with infantile neuraxonal dystrophy	? Autosomal recessive			

Tabella 1. Elenco di vari tipi di osteopetrosi proveniente da Frattini et al, 2000, Benichou et al, 2001, Kornak et al, 2000, Kornak et al, 2001, Sobacchi et al, 2001 e OMIM 2005. (Fonte Cohen Jr 2006).

Anche i meccanismi che portano allo sviluppo dell'osteoporosi possono essere essenzialmente ricondotti a due: il primo è quello osservato con maggiore frequenza ed è caratterizzato da un aumento della frequenza di attivazione del numero di unità di rimodellamento presenti sulla superficie ossea, altrimenti conosciuto con il nome di "high bone turnover". Questo tipo di osteoporosi è reversibile a patto che sia comunque mantenuto l'equilibrio tra le fasi del ciclo di rimodellamento. Il secondo meccanismo spesso coesiste con il primo ed è appunto caratterizzato dalla perdita di equilibrio nel rimodellamento. In questo caso si può verificare un maggiore riassorbimento di matrice da parte degli osteoclasti o una diminuzione nella deposizione di matrice da parte degli osteoblasti o addirittura entrambe le cose nello stesso momento. Come conseguenza la massa ossea diminuisce e la suscettibilità alle fratture aumenta. La perdita di matrice ossea che si verifica in questo caso è irreversibile (Compston 2002).

Una delle forme più comuni di osteoporosi, e forse la più frequente, è quella senile. Le donne in menopausa sono, infatti, più suscettibili alle fratture rispetto agli uomini. Una diminuzione della densità ossea (Bone Mineral Density) anche di una sola deviazione standard, unita ad un'alterata microarchitettura ossea, aumenta il rischio di frattura di circa 2,4 volte. Le più comuni fratture coinvolgono l'anca, la colonna vertebrale e all'avambraccio (Paiement et al., 1993; The Canadian Consensus Conference on Menopause and Osteoporosis, 1998; Gigue` re and Rousseau, 2000).

Sono tuttavia numerosi i fattori che sono stati riconosciuti essere causa della cosiddetta osteoporosi secondaria: iperadrenocorticismo, glucocorticoidi esogeni, ipogonadismo in maschi giovani, iperparatiroidismo, ipertiroidismo, ipopituitarismo, gravidanza, malnutrizione, malassorbimento, malfunzionamento renale, somministrazione cronica di eparina e ridotta attività fisica (Paiement et al., 1993; The Canadian Consensus Conference on Menopause and Osteoporosis, 1998; Melton et al., 2002).

Anche l'osteoporosi, come l'osteopetrosi, è una patologia multifattoriale e i geni candidati e alcuni dei più frequenti polimorfismi associati sono riassunti in tabella 2.

Types	Inheritance	Chromosomal locations	Mutated genes/candidate genes/polymorphisms	Comments
Senile osteoporosis	Multifactorial	12q12-q14 6q25.1 17q21.31-q22 3q27 7p21 19q31.2 19p13.2 1q25-q31 19p13.1 14q24 13q12	<i>VDR</i> ^a <i>ESR1</i> ^a <i>COL1A1</i> ^a <i>AHSG</i> ^a <i>IL6</i> ^a <i>APOE</i> ^a <i>CALR</i> ^a <i>BGLAP</i> ^a <i>TGFβ1</i> ^a <i>TGFβ3</i> ^a <i>KL</i> ^a	Candidate genes/polymorphisms
Idiopathic juvenile osteoporosis	Sporadic occurrence			Affects mainly bone surface in contact with marrow cavity. Prepubertal metaphyseal fractures and vertebral compression fractures. Spontaneous recovery.
Osteoporosis-pseudoglioma syndrome	Autosomal recessive	11q13.4	<i>LRP5</i>	Pseudoglioma means exudative vitreoretinopathy
Familial expansile osteolysis	Autosomal dominant	18q22.1	<i>RANK</i>	Some similarities to Paget disease

Tabella 2. Elenco di vari tipi di osteoporosi proveniente da Ralston et al, 1999; Gigue` re and Rousseau 2000; Rauch et al, 2002 e OMIM 2005. (Fonte Cohen Jr 2006).

GLI OSTEOLASTI E I FATTORI INDUCENTI IL LORO DIFFERENZIAMENTO

Gli osteoblasti differenziano da cellule staminali mesenchimali e sono le cellule specializzate nella produzione della matrice extracellulare e nel processo di mineralizzazione (Blair et al, 2002). Sono implicati anche nel processo di riassorbimento della matrice sia indirettamente che direttamente: -indirettamente perchè, come già detto, sono in stretto contatto con gli osteoclasti (figura 4) e producendo vari fattori, come IL6 (Ishimi et al, 1990), RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B ligand) (Theoleyre et al, 2004) e prostaglandine E2 (Marie et al, 1993) influiscono positivamente sull'attività erosiva degli osteoclasti (Lowik et al, 1989; Liu et al, 2005);

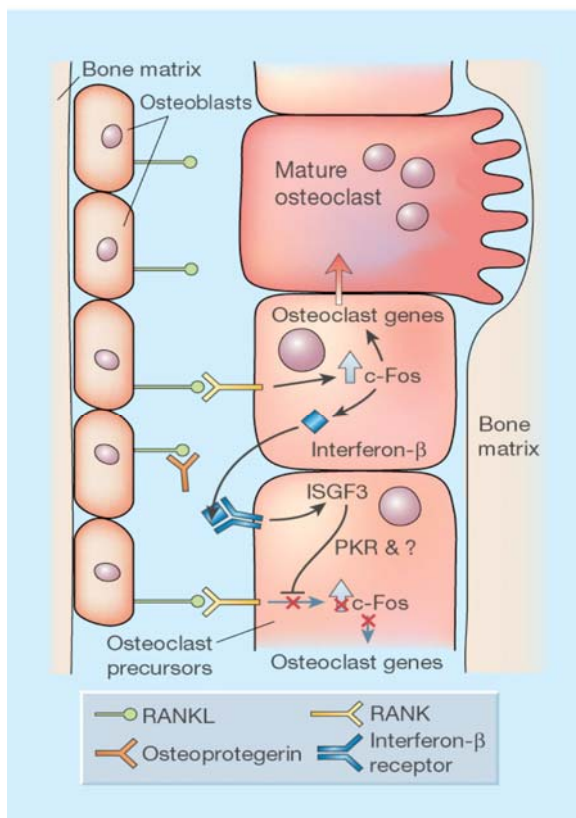


Figura 4. Disegno esemplificativo delle principali interazioni tra osteoclasti ed osteoblasti. Gli osteoblasti producono RANK-L (ligando), il quale attiva RANK (recettore) posto sulla membrana dei precursori osteoclastici, stimolandone il differenziamento, attraverso l'induzione dell'espressione della proteina c-fos, la quale regola positivamente molti geni bersaglio necessari per le funzioni degli osteoclasti. Un esempio è IFN- β , il quale, secreto, può legarsi al suo recettore, presumibilmente sulla membrana dei vicini precursori osteoclastici, inibendone il differenziamento impedendo il meccanismo prima descritto. L'osteoprotegerina è una proteina solubile, rilasciata dagli osteoblasti, che si lega a RANK-L impedendone il legame a RANK.

-direttamente perchè sono in grado di rilasciare, come è stato recentemente descritto, alcune metalloproteinasi, enzimi notoriamente coinvolti nella digestione della matrice extracellulare (Filanti et al, 2000; Uchida et al, 2000).

Ad oggi sono stati definiti alcuni marcatori del differenziamento osteoblastico che in maniera inequivocabile permettono di distinguere queste cellule da altre, i principali sono:

- Runx2 o Cbfa1 (Core binding factor -1) è il principale fattore trascrizionale coinvolto nel processo di osteogenesi,
- Collagene di tipo I è depositato come matrice extracellulare e costituisce la struttura bersaglio per la successiva mineralizzazione,
- Osteopontina (OP) è una proteina fosforilata ricca di acido sialico,
- Osteonectina è una glicoproteina fosforilata che lega il calcio, e il collagene di tipo I
- Osteocalcina (OC) è una proteina legante il calcio conosciuta anche come Bone Gla Protein (BGP), vitamina K-dipendente, in grado legare l'idrossiapatite,
- Proteina sialica ossea (BSP),
- Fosfatasi alcalina (ALP) che direttamente influenza il processo di mineralizzazione.

Esperimenti fatti principalmente su modelli animali e recentemente su modelli umani ha stabilito, in linea generale, che l'attività degli osteoblasti può essere schematizzata in tre fasi: una (a) fase proliferativa seguita da (b) un momento in cui viene depositata la matrice che subirà quindi un processo di mineralizzazione (c). L'aumentata espressione di geni correlati al ciclo cellulare solitamente definisce la fase proliferativa degli osteoblasti anche se, sul finire di questa fase e durante la fase di deposizione della matrice, è già possibile rilevare la presenza di RNA messaggero per il collagene di tipo I, per l'osteonectina e ALP. La fase maturativa degli osteoblasti differenziati è infatti identificata dall'espressione di marcatori osteogenici precoci come ALP. Alla fine della fase di deposizione della matrice e all'inizio

della fase di mineralizzazione vengono prodotte osteopontina, osteocalcina e BSP (Olsen et al, 2000), che nell'insieme costituiscono i cosiddetti marcatori tardivi del differenziamento. Questo si accompagna a deposizione di sali di fosfato di calcio, che sia *in vitro* sia *in vivo* possono essere valutati tramite saggi più o meno sofisticati.

È noto che il differenziamento da cellule progenitrici richiede l'attuazione di un programma genetico specifico che porta all'espressione di proteine necessarie alle funzioni specifiche di quel determinato tipo cellulare. Nel caso degli osteoblasti l'induzione di questo programma è controllato da vari fattori che in parte sono stati caratterizzati e che vengono attualmente impiegati con successo per il differenziamento dei progenitori osteoblastici. Essi sono: acido ascorbico, vitamina D3, β -glicerofosfato quale fonte di fosfato organico (Pittenger et al, 1989; Muraglia et al, 2000; Jaiswal et al, 1997; Olivier et al, 2006). Anche il Dexametasone è utilizzato come fattore di differenziamento (Buttery et al, 2001; Kawaguchi et al, 2005) in quanto potenzia la mineralizzazione (Cheng et al, 1994).

Runx2 è decisamente il fattore trascrizionale più indagato ed è stato riconosciuto come regolatore principale del "commitment osteogenico" (Duplomb et al, 2007) e infatti è espresso durante tutte le tre fasi anche se svolge la sua funzione soprattutto nel passaggio da cellule staminali a preosteoblasti e da preosteoblasti ad osteoblasti.

Negli ultimi dieci anni sono stati ottenuti risultati significativi nella comprensione dei meccanismi che regolano il differenziamento degli osteoblasti. Questi si attuano, com'è noto attraverso ormoni, fattori di trascrizione e vie del segnale ben distinti che in alcuni casi si intrecciano in maniera importante.

Nelle tabelle 3, 4 e 5 sono riassunti i principali protagonisti del differenziamento osteoblastico noti fino ad oggi. Si tratta di tre ambiti complessi a cui la ricerca si sta dedicando molto, non senza numerosi insuccessi dovuti alla difficoltà di definire dei modelli unici. In particolare, per il tessuto osseo, più che per altri tessuti, si riscontrano incongruenze tra i risultati ottenuti sugli animali e quelli ottenuti sull'uomo.

Da qui la necessità di ricavare il maggior numero di dati possibili soprattutto sull'uomo per poterli mettere a confronto. Il lavoro di questa tesi è stato dedicato ad ampliare le conoscenze sul recettore dell'estrogeno α (hER α) negli osteoblasti umani in relazione alla sua regolazione da parte di fattori di trascrizione descritti avere un ruolo importante nel differenziamento osteoblastico.

VIE DEL SEGNALE
Wnt signaling
Superfamiglia TGF β /BMP
Notch signaling
Hedgehog signaling
FGF signaling
IGF (insulin-like growth factors)
PDGF (platelet-derived growth factor)

Tabella 3

FATTORI DI TRASCRIZIONE
Runx2
Osterix
ATF-4
AP-1
TAZ
NFATc1
ER α , ER β

Tabella 4

ORMONI
Ormone Paratiroide
Parathyroid hormone-related protein
Ormone Tiroideo
Ormone della crescita
Insulina
Progesterone
Prolattina
Ormoni Estrogeni
Ormoni Androgeni
Vitamina D3
Ormoni Retinoidi

Tabella 5

Per comprendere il razionale del lavoro sperimentale nei paragrafi vengono dettagliate le caratteristiche e il ruolo dei fattori trascrizionali studiati in questa tesi.

RECETTORE PER GLI ESTROGENI α (ER α)

Ruolo di ER α nell'organismo umano

Le due isoforme del recettore per gli estrogeni α (ER α) e β (ER β) sono membri di una superfamiglia di recettori nucleari che consta di circa 150 differenti proteine. Membri di questa famiglia sono anche il recettore per l'ormone tiroideo, il recettore per la vitamina D, il recettore per l'acido retinoico e altri recettori per ormoni steroidei quali glucocorticoidi, androgeno, progesterone e mineralcorticoidi, nonché una serie di recettori chiamati orfani a causa della mancata identificazione dei loro ligandi (Parker 1993, Mangelsdorf et al. 1995).

Fu nei laboratori dei Drs. Jensen e Gorski, a partire dalla fine degli anni 50 fino agli anni 70 che venne elaborata l'ipotesi, poi rivelatasi corretta, secondo la quale l'interazione tra 17- β estradiolo (E2) e il recettore per gli estrogeni fosse coinvolta nella trasduzione degli effetti cellulari di questo ormone (Toft and Gorski 1966, Jensen and DeSombre 1973). E2 è uno degli ormoni steroidei estrogeni, un gruppo di molecole attive in quanto regolano vie del segnale cellulare importanti nella regolazione della proliferazione, differenziamento e omeostasi della cellula stessa. Gli estrogeni sono presenti in natura in varie forme. Nella donna in età fertile le ovaie producono una quantità di E2 tra 70 e 500 ug al giorno, il quale è poi convertito ad estrone e in minor parte in estriolo. Questi due metaboliti dell'E2, sebbene leghino ER α con alta affinità (Kuiper et al, 1997), sono agonisti più deboli rispetto all'E2. Nonostante questi ormoni siano da tempo riconosciuti come fondamentali nella fisiologia dell'apparato riproduttivo femminile essi sono coinvolti anche nello sviluppo e nella fisiologia di quello maschile. Una piccola ma fisiologicamente rilevante quantità di estrogeni è infatti sintetizzata sia negli uomini che nelle donne attraverso la conversione periferica degli androgeni circolanti in estrogeno ad opera dell'enzima Aromatasi P450. Ci sono sempre maggiori evidenze che gli estrogeni prodotti localmente abbiano un ruolo importante anche in altri tessuti.

Attraverso tecniche di localizzazione come l'Ibridazione in-situ e l'Immunocitochimica e tecniche di quantificazione dell'mRNA come RT-PCR e Northern Blot, è emerso che, infatti, i recettori sono espressi in molti tessuti dell'organismo umano. Ad esempio, ER α e ER β sono stati localizzati non solo nella mammella e nel tratto urogenitale, ma anche nel cervello, è nel sistema cardiovascolare, nel tratto gastrointestinale e, come verrà presentato in dettaglio in questa tesi, nell'osso (Mueller and Korach, 2001). La presenza in termini di quantità e la distribuzione variabile dei recettori sembra siano, in parte, determinati da quanto il ligando è presente localmente e se il legame con questo produce degli effetti.

Per comprendere a fondo il ruolo dei recettori per gli estrogeni durante lo sviluppo e la maturità dei tessuti in cui sono espressi sono stati creati topi transgenici non esprimenti ER α (α ERKO), ER β (β ERKO) e topi doppi-mutanti, i quali, cioè, non esprimono sia ER α che ER β ($\alpha\beta$ ERKO) (Emmen and Korach 2003).

Struttura di ER α

Si deve sempre ai Drs. Jensen e Gorski l'isolamento e l'iniziale caratterizzazione dei recettori per gli estrogeni, il cDNA viene clonato da cellule di carcinoma mammario MCF7 successivamente nel 1985 (Walter et al, 1985). ER β viene clonato dieci anni più tardi da prostata di ratto e solo in un secondo momento anche le forme presenti nel topo e nell'uomo (Orimo et al, 1995). Geni separati collocati in differenti cromosomi codificano per ognuno dei recettori. Il gene per ER α si trova nel cromosoma 6, locus 6q25.1, ha una lunghezza approssimativa di 140 Kb ed origina un trascritto di circa 6,6 Kb il quale codifica per una proteina di 66KDa (Greene et al, 1986) che non è però l'unica forma esistente. Infatti a causa di eventi di splicing alternativo sono descritte altre due isoforme del recettore di pesi molecolari inferiori; la forma di 46KDa espressa specificamente nel tessuto osseo agli stessi livelli della forma completa (Denger et al, 2001) e manca della regione N-terminale e quindi

del dominio di attivazione AF-1, e la forma di 36KDa recentemente scoperta ad opera di Wang (Wang et al, 2006), mancante di entrambi i domini di attivazione.

I recettori nucleari mostrano un'organizzazione strutturale comune. Si distinguono 6 regioni con differente estensione delle sequenze conservate e queste regioni corrispondono approssimativamente ai differenti domini funzionali dei recettori (Krust et al, 1986; Evans 1988). Il dominio A/B contiene la prima Funzione di Attivazione 1 (AF-1) che reclutando coattivatori è coinvolta nell'attività trascrizionale del recettore. Il dominio di legame al DNA o dominio C è sicuramente la regione più conservata a differenza del dominio D o regione cerniera, contenente il segnale di localizzazione nucleare. Infine la regione E/F contiene il dominio di legame al ligando, il dominio di dimerizzazione, un secondo segnale di localizzazione nucleare e la seconda funzione di attivazione (AF-2). Al contrario della funzione AF-1, AF-2 è una funzione di attivazione ligando-dipendente.

Esistono poi un'ampia gamma di composti, strutturalmente diversi, in grado di legare i recettori con differenti affinità. Alcuni ligandi, come il dietilstilbestrolo di origine sintetica (DES) e i fitoestrogeni di origine naturale, agiscono come agonisti. Altri composti, come ICI 162,780, sono invece antagonisti. I Modulatori Selettivi dei Recettori Estrogenici (SERMs) sono una categoria mista che contiene sia agonisti che antagonisti, come tamoxifene e raloxifene (Bryant and Dere 1998).

Meccanismo d'azione

I recettori nucleari, incluso ER α , si collocano inizialmente nel citoplasma, prima dell'attivazione da parte del ligando, e solo dopo traslocano al nucleo; è stato dimostrato tuttavia che ER α può essere presente nel nucleo in assenza del suo ligando. Una volta nel nucleo ER α si lega al DNA (Lees et al, 1990), e successivamente avviene il reclutamento della macchina trascrizionale al promotore bersaglio (Kumar et al, 1987), come avviene nel

caso del gene per la prolattina (Maurer and Notides 1987) e di c-fos (Weisz and Rosales 1990).

Le sequenze che in un promotore creano la responsività all'estrogeno sono sia sequenze palindrome ERE perfette (5' -GGTCAnnnTGACC-3'), sia palindromi imperfette o mezzi siti ERE (O'Lone et al, 2004). Le proteine cosiddette "High mobility group" (HMG) sono in grado di prendere diretto contatto con i recettori steroidei facilitando e stabilizzando l'interazione tra il recettore ed i suoi elementi responsivi, rendendo possibile il legame alle palindromi imperfette e ai mezzi siti di legame (Melvin et al, 2004). L'interazione con il DNA è stabilizzata dal legame con il ligando nonostante il legame al DNA non sia strettamente dipendente dal ligando stesso (Zhuang et al, 1995). L'associazione del recettore nucleare con il DNA è dinamica *in vivo* come monitorato da analisi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) e microscopia (McNally et al, 2000; Reid et al, 2003). Il meccanismo genomico attraverso il quale l'ormone estrogeno esplica il suo effetto può anche essere mediato dall'interazione di ER α con altri fattori trascrizionali. In questo caso la proteina ER α prende contatto con proteine come Sp1 (Safe 2001), AP1 (Petz and Nardulli 2002a), NF κ B (Kalaitzidis and Gilmore 2005) e GATA le quali direttamente legano i rispettivi "cis-elements" sui promotori dei geni bersaglio (Björnström and Sjöberg 2005).

L'interazione di ER α con il complesso proteico AP-1 ed il meccanismo molecolare associato è un esempio di modalità di azione dell'estrogeno ERE-indipendente (Bjornstrom and Sjoberg 2005). Questo sistema è responsabile della regolazione di numerosi geni tra cui quelli codificanti l'ovoalbumina (Gaub et al, 1990), IGF-1 (Umayahara et al, 1994) e la collagenasi (Webb et al, 1995). In letteratura sono riportati molti esempi di come l'interazione tra AP-1 ed ER α sia importante nella regolazione dell'espressione genica. Di seguito ne sono descritti alcuni.

Il gene del recettore umano per il progesterone (PR) è un gene responsivo all'estrogeno e come molti altri non contiene le classiche sequenze ERE nella sua regione promotrice, ma

presenta un mezzo sito ERE e due siti AP-1. Per mezzo della tecnica di mutagenesi sito-specifica è stato possibile dimostrare che nonostante i due siti AP-1 abbiano la stessa sequenza nucleotidica possono avere effetti sia stimolatori che inibitori sulla trascrizione genica e, probabilmente, le sequenze fiancheggianti dei due siti giocano un ruolo nel regolare l'espressione genica stessa (Petz et al, 2002; Petz et al, 2004). Ulteriori studi hanno evidenziato che Fos e Jun si legano sotto forma di dimero ad entrambi i siti AP-1 e che ER α è in grado di promuovere positivamente questa interazione sia *in vitro* che *in vivo*. L'attivazione mediante trattamento con estrogeno avviene solo in presenza di ER α , suggerendo che sia la presenza dell'ormone che del recettore sono necessari (Petz et al, 2002).

Uno dei più importanti geni attraverso cui l'estrogeno, interagendo con ER α , esplica la propria azione proliferativa in cellule di carcinoma mammario, è il gene della ciclina D1 (Planas-Silva and Weinberg 1997; Prall et al, 1998). Sebbene la sua trascrizione sia indotta dall'estrogeno, questo gene non presenta nel suo promotore alcuna sequenza ERE, ma cis elementi per fattori trascrizionali che mediano l'azione dell'ormone stesso (Allan et al, 2001). Studi di delezione del promotore hanno portato all'identificazione di un sito CRE, che sembra svolgere un ruolo centrale nel mediare gli effetti del complesso E/ER α , ed un sito AP-1 che sembra invece partecipare in modo marginale (Sabbah et al, 1999).

Numerosi sono gli studi che dimostrano che anche l'espressione del gene BRCA-1 è modulata dall'estrogeno (Gudas et al, 1995; Romagnolo et al, 1998), con la formazione di un complesso trascrizionale costituito da ER α e p300, il quale, una volta reclutato a livello della sequenza di legame per AP-1, localizzata nel promotore di BRCA-1, ne attiva la trascrizione. Mutazioni a livello di questo sito, comportano una repressione dell'attività del promotore di BRCA-1 in cellule di carcinoma mammario MCF7. Saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) hanno dimostrato che questa regione del promotore è in grado di interagire *in vivo* con i fattori c-jun e fosB (Hess et al, 2004).

Trefoil Factor 1 (TFF1), conosciuto anche come pS2 è un marcatore prognostico per varie tipologie di cancro, primo fra tutti quello mammario (Gillesby et al, 1999; Ather et al, 2004), ed è stato comunque osservato che l'espressione di questa proteina favorisce la mobilità cellulare, requisito essenziale per i processi di invasione e metastatizzazione propri del cancro (Rodrigues et al, 2003; Rodrigues et al, 2003 a; Prest et al, 2002). La risposta del gene pS2 all'estrogeno viene mediata dalla presenza di due sequenze ERE imperfette (Berry et al, 1989) in prossimità delle quali è stata riscontrata la presenza di due siti AP-1. È stato dimostrato che in questo promotore, il legame di AP-1 al proprio sito rafforza l'interazione di ER α alle sequenze ERE. Si è inoltre osservato che è necessario mantenere l'integrità del sito AP-1 per poter indurre una espressione estrogeno dipendente del promotore pS2 stesso (Barkem et al, 2002).

Il fattore di crescita insulinico di tipo I (IGF-1) è prodotto in molti tessuti e agisce come fattore stimolante la crescita (Daughaday and Rotwein 1989). Studi in cellule di epatocarcinoma umano (HepG2) hanno dimostrato che anche il gene per questo fattore è bersaglio per una regolazione mediata dall'estrogeno. Analisi della sequenza del promotore di IGF-1 hanno evidenziato anche in questo caso la mancanza di elementi classici responsivi all'estrogeno (Hall et al, 1992). Studi di trasfezione in HepG2 utilizzando una sequenza del promotore del gene IGF-1 contenente il sito di legame per AP-1, hanno dimostrato che il complesso E2/ER α promuove il legame della proteina AP-1 al proprio sito di legame (Umayara et al, 1994).

Il complesso formato dall'estrogeno e da ER α è implicato nella regolazione dell'espressione del gene MMP13, enzima responsabile della degradazione del collagene e coinvolto nella patogenesi dell'osteoartrite (Mitchell et al, 1996; Mengshol et al, 2001; Vincenti and Brinckerhoff 2002). La regione del promotore di questo gene è caratterizzata dalla mancanza di canonici siti responsivi all'estrogeno, ma presenta numerosi elementi di regolazione tra cui siti di legame per le proteine AP-1, p53 e un sito per Runx2 (Vincenti et al,

1998; Tardif et al, 1997). Studi di delezione e di mutagenesi sito specifica effettuati in cellule di coniglio HIG-82 trattate in assenza e in presenza di estrogeno hanno dimostrato che, mentre il sito AP-1 da solo determina un aumento significativo dell'attività del promotore, gli altri cis elementi svolgono un ruolo minore nel mediare gli effetti di ER α (Lu et al, 2006).

Dagli esempi riportati, emerge che in molti casi non siano presenti a livello del promotore del gene bersaglio sequenze ERE perfette ma piuttosto sequenze ERE imperfette o mezzi siti ERE o addirittura non siano affatto presenti e come, al contrario, siano sempre presenti siti di legame per AP-1; per questo motivo il mantenimento di questi elementi sembra indispensabile per modulare la trascrizione.

Gli estrogeni possono regolare l'espressione genica anche attraverso l'attivazione di recettori di membrana che producono i loro effetti coinvolgendo la via del segnale delle MAP chinasi (Santen et al, 2002): questa via "non genotropica" sembra essere particolarmente importante per gli effetti antiapoptotici che gli estrogeni hanno sugli osteoblasti (Endoh et al, 1997).

Organizzazione genomica del gene di ER α

Dall'anno in cui il primo cDNA di ER α umano è stato clonato (Greene et al, 1986), sono stati identificati numerosi cDNA divergenti nella regione 5' non tradotta (UTR) (Kos et al, 2001). Il sequenziamento del genoma umano ha inoltre portato a riconoscere che la regione promotrice di ER α occupa circa 300 kb, invece delle 140 kb ipotizzate inizialmente (Kos et al, 2001). E'interessante inoltre notare che molti esoni non codificanti nella 5' UTR ed i loro promotori associati sono conservati tra le specie umana e di topo come rappresentato nella figura 5.

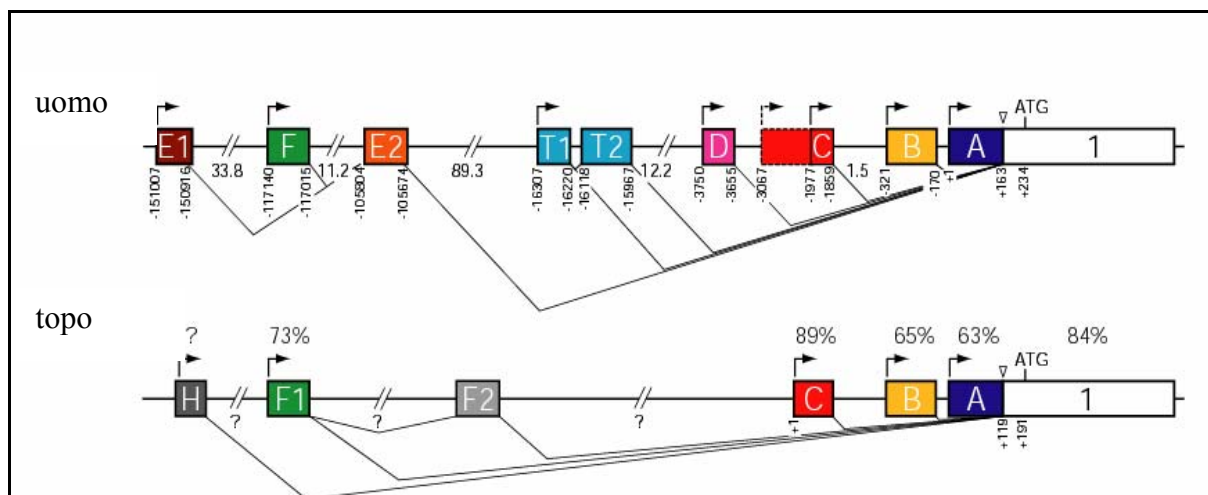


Figura 5. Organizzazione genomica della regione 5' del gene ER α

In figura è mostrata la localizzazione genomica dei diversi promotori e degli esoni “upstream” che caratterizzano la complessa unità 5' del gene ER α umano e di topo. I rettangoli colorati rappresentano gli esoni “upstream” i cui nomi sono in accordo con la nomenclatura (Kos et al, 2001). Le frecce indicano i siti d’inizio della trascrizione degli esoni ed i numeri sotto corrispondono alla distanza in paia di basi dal sito canonico di inizio della trascrizione (+1). I numeri tra gli esoni indicano le dimensioni in Kb degli introni. Le linee mostrano i possibili eventi di splicing osservati e il comune sito accettore presente nell’esone 1 (∇). Gli esoni conservati tra il gene umano e quello di topo sono evidenziati con lo stesso colore e il grado di omologia è indicato in percentuale.

I promotori di ER α sono ancora poco conosciuti sia in termini di organizzazione che di regolazione. Come mostrato in figura 5, ad oggi sono stati classificati nove esoni non codificanti; molti non possiedono TATA box, CCAAT box, o GC box canoniche, tranne il promotore T1 testicolo-specifico (Brand et al, 2002). I promotori mostrano generalmente una debole attività nei saggi trascrizionali convenzionalmente impiegati (Kos et al, 2001). La bassa attività del promotore di ER α può essere indice del fatto che bassi livelli di questa proteina sono espressi nella cellula bersaglio. Le spiegazioni del perché esistano così tanti promotori per un gene espresso a bassi livelli possono essere molteplici: -differenti tessuti utilizzano differenti promotori e/o -differenti promotori sono utilizzati in differenti stadi dello sviluppo cellulare e/o -i trascritti prodotti dai vari promotori vanno incontro a “splicing alternativi”. Come mostrato in figura 1 gli esoni non codificanti si congiungono ad un comune sito di “splicing” a +163 (Lu et al, 1999; Hirata et al, 2003). Un altro evento di splicing

congiunge gli esoni E1 ed F all'esone E2, e quindi al sito comune (Kos et al, 2001). Questi eventi di "splicing" producono la stessa proteina di 66 KDa. La quantificazione relativa dei livelli delle varianti di mRNA di ER α (Flouriot et al, 1998; Griffin et al, 1999; Kos et al, 2000) dimostra che alcuni promotori sono utilizzati in misura diversa in molti tessuti e anche nei tessuti dove è previsto l'utilizzo di un promotore specifico. Probabilmente i promotori che sono attivi in tutti i tessuti producono i livelli basali di mRNA di ER α mentre il promotore tessuto specifico rifinisce i livelli di espressione di ER α a seconda della richiesta cellulare. Questo presume che i promotori ubiquitariamente attivi condividano gli stessi elementi regolatori; ad oggi nessun dato sperimentale avvalora o rigetta questa ipotesi.

In generale ancora poco si conosce riguardo ai segnali extracellulari, ai meccanismi e ai fattori trascrizionali che dirigono l'espressione specifica di ER α nelle varie tipologie cellulari. Il controllo dell'espressione di ER α , a tutt'oggi, è meglio conosciuto nel carcinoma mammario, dove ER α gioca un ruolo centrale nell'avvio e nella progressione di questa neoplasia (Ikeda and Inoue, 2004). Gli studi su questo modello hanno permesso di tracciare una serie di possibili correlazioni tra ER α e altri fattori, utili per la comprensione del ruolo di ER α in altri contesti cellulari.

Due fattori sono stati identificati avere un ruolo nell'espressione differenziale di ER α nelle linee di carcinoma mammario ER α positive ed ER α negative. Uno di questi, dimostrato da Tang et al. (Tang et al, 1997), è formato dal fattore trascrizionale AP-1 legato ad una regione "enhancer" posizionata a -3,7 kb, e da altri fattori sconosciuti che si legano alle regioni adiacenti.

Un altro fattore trascrizionale conosciuto come AP2- γ , presente nelle cellule di carcinoma mammario ER α positive e nelle linee cellulari di endometrio, è in parte responsabile dell'aumento della trascrizione di ER α in cellule AP2- γ positive. Non tutte le linee cellulari ER α positive, però, esprimono AP2- γ , questo indica che meccanismi multipli contribuiscono all'espressione di ER α in questo tipo cellulare (Cohn et al, 1999).

Sempre in cellule di carcinoma mammario ER α positive è stata recentemente dimostrata l'interazione tra i fattori trascrizionali Sp1 e USF-1 in grado di legare la regione promotrice del recettore, compresa tra -245/-182 bp (deGraffenried et al, 2004); è anche molto probabile che si instauri una interazione di questo complesso con ER α stesso dal momento che una espressione esogena combinata di questi fattori risulta in un effetto sinergico di transattivazione del promotore (deGraffenried et al, 2004).

In cellule di carcinoma mammario ER α negative è stata invece dimostrata la presenza di un ipotetico fattore trascrizionale ad azione negativa che lega la regione -3258/-3157 bp del promotore; l'introduzione in questo tipo cellulare della sequenza in esame nella forma di DNA a doppia elica è stato in grado di riattivare la trascrizione del recettore (Penolazzi et al, 2000); in cellule osteoblastiche ER α positive lo stesso trattamento è stato in grado di incrementare la trascrizione del gene ER α (Lambertini et al, 2002; Lambertini et al, 2002a).

È importante ricordare che la perdita di espressione del recettore per l'estrogeno è uno dei più comuni meccanismi in grado conferire resistenza al trattamento farmacologico al carcinoma mammario. Il gene WT1 (Wilms' tumor 1 suppressor gene) è un marcatore clinico associato ad una prognosi infausta per i pazienti affetti da cancro al seno in quanto la sua elevata espressione si osserva frequentemente in casi di carcinoma mammario negativo per l'espressione del recettore per gli estrogeni e per il progesterone e cioè in quei tumori che non rispondono al trattamento con il farmaco di elezione per il trattamento del cancro al seno, il tamoxifene. In questo studio è stato osservato che una overespressione di WT1 in colture di MCF7 (cellule di carcinoma mammario ER α positive) inibisce in modo significativo l'apoptosi indotta dal trattamento con tamoxifene, la proliferazione indotta da E2 e l'espressione di ER α ed i suoi geni bersaglio sono significativamente repressi. La down-regolazione della proteina WT1 mediante shRNA può riattivare l'espressione di ER α e la responsività al tamoxifene di cellule MDA468 e HCC1954 che esprimono alti livelli di WT1.

È stato dimostrato, poi, che WT1 lega effettivamente il promotore prossimale di ER α in un sito consensus e ne inibisce l'attività (Han et al, 2008).

Anche in tumori mammari difettivi per l'espressione di BRCA1 è stata osservata una correlazione significativa con la mancata espressione di ER α . Questa ipotesi è stata avvalorata da esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina che evidenziano come, in colture di MCF7, il fattore trascrizionale Oct-1 sia in grado di reclutare al promotore di ER α la proteina BRCA1 (Hosey et al, 2007).

La perdita dell'espressione di ER α nei tumori è associata ad una prognosi infausta non solo perché diventano insensibili ai trattamenti con antiestrogeni ma anche perché acquisiscono la capacità di invadere altri tessuti e cioè di metastatizzare. Il lavoro prodotto da Dhasarathy A et al, propone un meccanismo molecolare che coinvolge Snail, fattore trascrizionale correlato al normale processo di transizione epiteliale dal mesenchima e anche alle metastasi cancerose. In cellule MCF7, non invasive, è ER α ad agire come repressore indiretto di Snail, attraverso l'azione di MTA3 (proteina 3 associata alle metastasi), una componente del complesso di rimodellamento della cromatina Mi-2/NuRD. Una volta però che Snail viene espresso dalle cellule cancerose, secondo un meccanismo ancora non del tutto chiaro, reprime direttamente l'attività del promotore di ER α interagendo con esso. L'espressione di Snail in cellule MCF7 provoca infatti un decremento significativo della presenza del messaggero di ER α e della proteina corrispondente (Dhasarathy et al, 2007).

È stata dimostrata infine una autoregolazione del recettore, a livello del promotore A: introducendo la proteina ER α umana esogena contemporaneamente ad un costrutto luciferasico, la cui regione promotorice era costituita dal segmento -9/-239 bp del promotore del recettore, si aumentava la transattivazione di quest'ultimo (Castels et al, 1997). Allo stesso modo, la proteina ER α umana esogena cotrasfettata con un costrutto luciferasico contenente parte del promotore F è in grado di aumentare di 50 volte l'attività del promotore in esame

(Denger et al, 2001a). Entrambe le sequenze del promotore di ER α clonate nei costrutti di luciferasi contengono un mezzo sito ERE.

È importante ricordare che esistono ulteriori meccanismi che potenzialmente regolano l'espressione del gene a livello trascrizionale e sono la metilazione del DNA e la condensazione cromatinica della regione promotrice. Il silenziamento epigenetico, che può compiersi attraverso l'ipermetilazione delle isole CpG associate con i promotori di ER α (Ottaviano et al, 1994; Ferguson et al, 1995, Penolazzi et al, 2004) o attraverso la condensazione cromosomica per acetilazione del nucleosoma, previene l'espressione di ER α . È possibile che i promotori necessitino di essere separati dagli altri da distanze significative così che gli eventi epigenetici coinvolti nell'attivazione, o repressione, di promotori singoli durante il differenziamento si ripercuotano solo ed esclusivamente su di un singolo promotore in una determinata tipologia cellulare.

Molto recentemente è stato descritto un altro tipo di regolazione cui è soggetta l'espressione di ER α in cellule di carcinoma mammario. Una serie di osservazioni condotte negli ultimi anni correlano mutazioni o alterazioni nell'espressione di microRNA con varie tipologie di cancro; è riportato che un'alterata espressione di miR-206 conduce ad una diminuzione del messaggero e della proteina di ER α in cellule MCF7 attraverso il legame di miR-206 a due siti specifici nella regione 3' non tradotta del trascritto di ER α . In particolare questo studio dimostra che l'espressione di miR-206 è significativamente diminuita in tessuti di carcinoma mammario ER α positivo e che quindi esiste una correlazione inversa tra l'espressione di MiR-206 e di ER α . Inoltre, esperimenti di transfezione di miR-206 in cellule MCF7 evidenziano come questo contribuisca ad inibire la crescita cellulare con modalità dose dipendente (Kondo et al, 2008).

Come si può osservare dai dati presenti in letteratura le maggiori evidenze riguardo alla regolazione dell'espressione di ER α provengono da studi effettuati in modelli cellulari di

mammella, pochissimo invece si conosce riguardo alla regolazione di questo gene nel tessuto osseo.

Ruolo di ER α nel tessuto osseo

Il tessuto osseo rappresenta un tipico bersaglio degli estrogeni.

Durante lo sviluppo fetale fino all'età puberale, l'estrogeno è responsabile del dimorfismo sessuale dello scheletro; in età puberale è invece responsabile dell'arresto della crescita longitudinale dello scheletro (Couse and Korach, 1999; Turner 1999). Quando la produzione di estrogeni nella donna inizia a calare, naturalmente a causa della menopausa oppure dopo ovariectomia, si incorre inevitabilmente in una progressiva e veloce perdita della massa ossea, specialmente dell'osso trabecolare, come quello presente nelle vertebre, nel bacino e nell'avambraccio (Riggs et al, 2002). La perdita di massa ossea è dovuta, in questo caso, ad un aumento del rimodellamento osseo che porta, cioè, ad un incremento sia nel riassorbimento che nella deposizione di matrice; tuttavia il riassorbimento risulta sempre più marcato della deposizione. Il fatto che la perdita di osso dopo la menopausa possa essere migliorata con un trattamento a base di estrogeni fornisce un'ulteriore prova che gli estrogeni sono coinvolti nell'omeostasi ossea (Riggs et al, 2002). Quindi è possibile affermare che l'estrogeno riveste un ruolo protettivo nei confronti dell'osso perché: (i) inibisce il rimodellamento osseo (cioè, l'attivazione di nuove unità di rimodellamento); (ii) sopprime il riassorbimento dell'osso; e (iii) ha un effetto stimolatore sulla formazione dell'osso. Le basi cellulari e molecolari degli effetti dell'estrogeno sull'osso iniziano solo da qualche tempo ad essere comprese.


Dato che l'estrogeno è il principale ormone steroideo nella donna, mentre negli uomini è il testosterone, in passato si era creduto che questi due ormoni potessero avere lo stesso ruolo nei due sessi. Questa ipotesi è stata completamente confutata dopo la descrizione di un soggetto maschile omozigote per un delezione del recettore dell'estrogeno ER α , il quale, nonostante gli alti livelli di testosterone, mostrava comunque difetti sia nello sviluppo

scheletrico, come le epifisi delle ossa lunghe non fuse, che un elevato rimodellamento osseo con conseguente sviluppo di una condizione osteoporotica (Smith et al, 1994). Successivamente a questo, furono descritti molti altri casi di soggetti maschili con difetti nell'enzima aromatase che mostravano un fenotipo scheletrico identico a quello precedentemente descritto (Morishima et al, 1995; Carani et al, 1997). Il trattamento di questi soggetti con deficienza dell'enzima aromatasi con ormoni estrogeni ha portato ad un aumento della mineralizzazione ossea e termine della crescita, con evidente fusione epifiseale. (Simm et al, 2008).


La tabella 6 riporta uno schema riassuntivo degli effetti dovuti alla presenza ed alla mancanza di estrogeno.

La funzione degli estrogeni e dei loro recettori nell'omeostasi ossea è stata ulteriormente indagata utilizzando modelli di topi knockout mancanti o dell'enzima aromatasi o di ER α o di ER β (Oz et al, 2000; Sims et al, 2002; Sims et al, 2003). La perdita di entrambi i recettori o dell'aromatasi, nei topi femmina, mima gli effetti di una ovariectomia. Topi femmina knockout per un solo ER perdono matrice ossea dopo l'ovariectomia, mentre i doppi knockout mostrano una diminuzione della densità ossea che non è però incrementata dall'ovariectomia.

Presenza di estrogeno	Assenza di estrogeno
Diminuzione dei cicli di rimodellamento	Aumento dei cicli di rimodellamento
Attenuazione del differenziamento di OB e OC dai rispettivi progenitori cellulari	Aumento dell'attività sia di OC che di OB con uno sbilanciamento a favore dell'attività degli OC
Effetto pro-apoptotico negli OC	Osteoporosi
Effetto anti-apoptotico negli OB	



Effetto osteoprotettivo



Ridotta densità di massa ossea

Tabella 6. Effetti della presenza e dell'assenza di estrogeno nel tessuto osseo.

Questo suggerisce che il mantenimento della densità ossea, e quindi l'effetto osteoprotettivo degli estrogeni, è sostenuto da entrambi i recettori nella femmina. Anche nel maschio l'orchidectomia induce una perdita di osso ma il fenotipo è complicato dal coinvolgimento degli androgeni e dei loro recettori, perché sia androgeni che estrogeni sono importanti per il mantenimento osseo stesso (Sims et al, 2003). Ad alte dosi, gli estrogeni non solo prevengono la perdita di osso indotta dalla gonadectomia ma aumentano anche la densità ossea, anche in animali intatti. Questa risposta anabolica agli estrogeni risiede solo in ER α sia per la femmina che per il maschio (McDougall et al, 2002; McDougall et al, 2003).

Diversi studi hanno poi confermato che l'estrogeno, legando i propri recettori a livello del tessuto osseo, ed in particolare l'isoforma α , svolge la propria funzione sia sugli osteoblasti che sugli osteoclasti.

Estrogeno ed osteoblasti

È stato stimato che il numero di recettori per l'estrogeno negli osteoblasti sia molto basso in confronto ai 15000 per cellula presenti in tipiche cellule bersaglio dell'estrogeno come le cellule dell'utero, e possa variare dalle poche centinaia al migliaio per cellula osteoblastica (Eriksen et al, 1988; Davis et al, 1994). Negli osteoblasti primari umani, oltre alla forma canonica, è stata rilevata una differente isoforma del recettore, troncata della parte N-terminale, espressa agli stessi livelli della forma completa (Denger et al, 2001). Questa origina da un evento di "splicing" alternativo che congiunge l'esone F ad un sito presente nell'esone 2 (Flouriot et al, 2000).

I recettori presenti negli osteoblasti sono funzionali e possono attivare geni reporter esogeni responsivi all'estrogeno (Ernst et al, 1991). In termini di risposta agli estrogeni esistono dati conflittuali. Alcuni affermano che gli estrogeni possono spingere debolmente il differenziamento di colture di osteoblasti *ex vivo*, mentre altri riportano che gli estrogeni non hanno effetti sul differenziamento osteoblastico (Keeting et al, 1991; Scheven et al, 1992; Qu et al, 1998). È stato da altri osservato che gli estrogeni promuovono il differenziamento

osteoblastico da cellule staminali mesenchimali in opposizione al differenziamento degli adipociti (Dang et al, 2002; Okazaki et al, 2002). Queste osservazioni apparentemente contrastanti sono molto probabilmente legate al tipo di modello cellulare e animale impiegato. È stato infatti più volte riportato come l'azione dell'estrogeno sia fortemente influenzata dai livelli di espressione del suo recettore, i quali, in uno stesso tipo cellulare, fino ad un certo valore sono responsabili di un effetto e, sopra a quel valore, mediano effetti diversi e addirittura, in certi casi, opposti (Waters et al, 2001). L'mRNA di ER α è regolato attivamente durante tutto lo sviluppo del fenotipo osteoblastico. Questa osservazione indica che ER α è espresso specificatamente negli osteoblasti e che la sua espressione è parte del programma differenziativo di queste cellule. L'estrogeno agisce direttamente sull'espressione di geni codificanti per enzimi, proteine della matrice ossea, recettori ormonali, fattori di trascrizione, citochine e fattori di crescita sia di osteoblasti che di osteoclasti. È vero anche che i dati su alterazioni metaboliche e genetiche indotte dall'estrogeno ottenuti in sistemi in vitro sono discordanti. Queste discrepanze potrebbero essere causate, ancora una volta, da differenze nella concentrazione del recettore, dalla specie animale e dalla localizzazione scheletrica dalla quale provengono, dallo stadio differenziativo e dalla differente presenza delle due specie di recettore (ER α ed ER β) negli osteoblasti. L'estrogeno inibisce la proliferazione degli osteoblasti umani maturi in coltura, ma non è esclusa la possibilità che l'estrogeno possa stimolare la proliferazione degli osteoblasti in condizioni differenti.

Geni estrogeno responsivi in cellule di osso

Per poter comprendere il profilo trascrizionale di ER α , in particolare, nei geni delle cellule di osso sono state utilizzate cellule di osteosarcoma umano U2OS ER α negative e ER β negative trasfettate stabilmente con vettori di espressione per i due recettori (Stossi et al, 2004). Questi studi hanno permesso di valutare i cambiamenti del profilo di espressione di circa 1200 geni causati dall'azione dell'estrogeno attraverso i due recettori specifici. Sono stati identificati nuovi geni regolati dall'estrogeno e geni regolati esclusivamente o preferenzialmente da ER α

o da ER β . Sono stati quindi identificati numerosi geni codificanti per citochine, fattori di crescita e proteine della matrice ossea. In particolare è stato osservato che l'estrogeno induce la sintesi del TGF- β (transforming growth factor- β), dell' IGF-I (insulin like growth factor-I), e delle proteine leganti IGF; inibisce la sintesi delle interleuchine IL-1, IL-6, IL-11 e del TNF- α (tumor necrosis factor- α). Utilizzando la stessa strategia Rudnik (Rudnik et al, 2008) fornisce ulteriori dati: esperimenti condotti in colture cellulari di U2OS, transfettate con vettore di espressione per ER α wt o una forma che non è in grado di legare le sequenze ERE, dimostrano che la presenza della forma completa del recettore provoca un incremento nel messaggero dei geni ALP e IGF-1. Al contrario l'espressione della forma inabile al legame con ERE provoca una diminuzione nell'espressione del messaggero dei geni ALP, collagene I, OCN e IGF-I (Rudnik et al, 2008). La mancanza di estrogeno aumenta la produzione dell' M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) nelle cellule stromali di midollo osseo (Pacifci 1996; Manolagas 2000). Anche geni associati con la regolazione della motilità cellulare e del citoscheletro sono regolati dall'estrogeno, così come alcuni fattori di trascrizione, TIEG (TGF- β inducible early gene), NF-kB, c/EBP- β e c-fos negli osteoblasti umani (Oursler 1998; Jilka 1998).

Più recentemente è stato dimostrato che l'estrogeno regola la sintesi delle proteine di matrice ossea come OPG e BMP-6 (bone morphogenetic protein-6); proprio il promotore del di BMP6 è regolato da ER α in un'ampia gamma di tipologie cellulari (Ong et al, 2004). Come in molti altri geni responsivi all'estrogeno, l'analisi della sequenza del promotore di BMP6 ha permesso di identificare che non vi è la presenza di sequenze ERE consensus mentre si è riscontrata la presenza di sequenze specifiche per altri fattori trascrizionali come la proteina AP-1 (Aranda et al, 2001).

Studi nella organizzazione genomica del promotore del gene della proteina BMP-4, un altro fattore importante nella fisiologia dell'osso regolato da ER α , hanno permesso di identificare che anche in questo caso manca una sequenza ERE consensus che permetta il legame diretto

di ER α al DNA. In questo caso si è riscontrata invece la presenza di siti di legame per il fattore trascrizionale Sp1, ipotizzando così che la modulazione della trascrizione effettuata da ER α venga mediata da un complesso trascrizionale ER α /Sp1 (van den Wijngaard et al, 2000). Anche Runx2 viene regolato da ER α nelle cellule di osso. Analisi della sequenza del promotore di Runx2, anche in questo caso, hanno rilevato la presenza di siti di legame per la proteina AP-1 ma non la presenza di sequenze specifiche di legame per il recettore dell'estrogeno. Questo suggerisce che ER α ed AP-1 cooperano attivamente nel transattivare il promotore del gene Runx2 grazie al legame al sito AP-1 (Tou et al, 2001).

Questa regolazione prodotta dall'estrogeno su fattori di crescita e citochine negli osteoblasti, in modo inevitabile si riflette e regola il differenziamento e l'attività degli osteoclasti, che, come gli osteoblasti esprimono il recettore (Splesberg et al, 1999).

L'estrogeno antagonizza l'induzione della superossido dismutasi correlata alle glicoproteine di membrana, mentre diminuisce l'espressione del gene per il "signaling" dell'IL-1. L'estrogeno blocca l'attività di riassorbimento degli osteoclasti attraverso l'inibizione di enzimi che esplicano questa funzione e attraverso l'induzione dell'apoptosi, diminuendo quindi numericamente la popolazione ossea di osteoclasti.

AP-1

Il fattore trascrizionale AP-1 (Activator Protein-1) è costituito da una varietà di dimeri rappresentati dalle famiglie proteiche Fos, Jun e da alcuni componenti delle famiglie di proteine CREB (cAMP responsive element-binding protein) e ATF (activating transcription factor) quali ATF-2, ATF-a, ATF-3. Le proteine Jun (c-jun, JunB, JunD) possono formare omodimeri oppure eterodimeri stabili con le proteine della famiglia Fos (cFos, FosB, Fra-1, Fra-2) che, invece non sono in grado di omodimerizzare (Shaulian et al, 2000). Tutti i membri del complesso AP-1 sono del tipo bZip, caratterizzati cioè da una regione basica (b) necessaria per il legame al DNA e da una regione ricca in leucine (leucin zipper, Zip), che permette la formazione di complessi etero-omodimerici con altre proteine bZip (vanDam and Castellazzi 2001). L'interazione con il DNA avviene in una regione "consensus" specifica (TGA G/C TCA), anche se variazioni nelle regioni fiancheggianti a quella "consensus" nonché variazioni nella composizione del dimero e modificazioni post-traduzionali possono incidere notevolmente sulla capacità di legare il DNA (Hadman et al, 1993; Gruda et al, 1994). Tuttavia, i diversi composti dimerici possono anche legarsi anche all'elemento di risposta al cAMP (CRE) (TGA CG TCA) (Eferl and Wagner, 2003).

Fattori trascrizionali della Famiglia AP-1

Tutti i membri della famiglia AP-1 sono implicati in diversi processi cellulari e hanno importanti ruoli nello sviluppo dell'embrione. Studi sul fenotipo di topi knockout hanno permesso di individuare c-jun, JunB e Fra-1 come particolarmente importanti nello sviluppo embrionale (Jochum et al, 2001). Questi fattori rivestono funzioni essenziali anche nel tessuto osseo, come si evince da alcuni esempi di seguito riportati. Modelli animali in cui è stata provocata una espressione maggiore di FosB o Fra-1 sono andati incontro ad osteopetrosi. I topi mostravano anche un maggior numero di osteoblasti dovuto all'inibizione del

differenziamento in senso adipocitico delle cellule mesenchimali (Kveiborg et al, 2004). Topi knock-out per l'espressione di Fra1 hanno mostrato invece una ridotta espressione delle proteine della matrice come osteocalcina, MGP e collagene di tipo II, non solo nel tessuto osseo ma anche nella cartilagine (Eferl et al, 2004).

Negli osteoblasti l'attività della proteina AP-1 può essere indotta da molteplici fattori implicati nella regolazione del differenziamento e della proliferazione degli osteoblasti stessi, quali: vitamina D (Candelieri et al, 1991), PTH (Clohisy et al, 1992; Lee et al, 1994) e TGF- β (Breen et al, 1994; Machwate et al, 1995). Mediante esperimenti *in vitro* è stato osservato che i diversi membri del complesso AP-1 vengono espressi in modo differenziale durante la maturazione di queste cellule (McCabe et al, 1996). Durante il processo proliferativo tutte le proteine Fos e Jun presentano livelli di espressione piuttosto alti. Successivamente, nella fase di produzione della matrice extracellulare e di mineralizzazione, la loro espressione diminuisce, mentre si rafforza l'espressione dei fattori Fra-2 e JunD.

Risultati di analisi funzionale evidenziano che questi due fattori sono coinvolti nella soppressione della trascrizione del gene dell'osteocalcina quando gli osteoblasti sono ancora in fase proliferante ma anche nell'aumento dell'espressione mediata dalla Vitamina D. Il promotore dell'osteocalcina presenta, infatti, tre siti AP-1, uno dei quali all'interno di un sito responsivo alla Vitamina D. Questo fenomeno permette al gene per l'osteocalcina di divenire suscettibile alla vitamina D solo quando le cellule transitano dalla fase proliferativa a quella matura di deposizione della matrice e successiva mineralizzazione (Owen et al, 1990).

Il promotore del gene MMP13 (collagenase 3) contiene siti di legame per AP-1 e Runx adiacenti e cooperativi in risposta al PTH; la possibilità che, in ragione di queste osservazioni, i fattori AP-1 e Runx possono interagire è stata dimostrata sia *in vitro* e che *in vivo* (D'Alonzo 2002). Il dominio ricco in leucine di c-jun ed il dominio Runt di Runx sono sufficienti per la loro interazione, inoltre c-fos è in grado di interagire con il dominio C-terminale delle proteine Runx. Attraverso esperimenti di overespressione si è osservato che mentre l'azione

coordinata di c-jun e c-fos in presenza di Runx2 aumenta l'attività del promotore di MMP13, l'azione di Fra-2 e junD ne reprime l'attività indotta da Runx2 (D'Alonzo 2002). Questo suggerisce un possibile duplice effetto (attivatore ed inibitore) dei membri della famiglia AP-1 sull'attività del promotore del gene MMP13 (Winchester et al, 2000).

La proteina AP-1 svolge un ruolo di notevole importanza anche nella regolazione del promotore del gene umano $\alpha 2(I)$ del collagene di tipo 1 (COL1A2). Una serie di studi ha dimostrato, per esempio, che nei fibroblasti l'espressione di tale gene viene modulata dai fattori TGF- β e TNF- α (Chung et al, 1996). Esperimenti di delezione progressiva dell'estremità 5' del promotore COL1A2 e la successiva trasfezione di questi costrutti, hanno dimostrato che la regione compresa tra -265 e -241 bp gioca un ruolo critico nel controllo dell'attività del promotore. In particolare questa regione di 25 bp media l'effetto positivo del TGF- β sull'attività del promotore, grazie alla presenza di un potenziale sito di legame proprio per la proteina AP-1 che risulta essere essenziale per l'azione del TGF- β stesso (Chung et al, 1996). Saggi EMSA effettuati utilizzando estratti nucleari di fibroblasti trattati con TGF- β e incubati con anticorpi contro c-jun e junB, hanno permesso di individuare junB, ma non c-jun, come fattore coinvolto nella formazione del complesso che lega la regione -256/-241 di COL1A2. Infine esperimenti di mutagenesi sito specifica sul sito di AP-1 hanno dimostrato che la sua modificazione comporta una diminuzione del 50% dell'attività basale del promotore con la conseguente perdita di responsività al TGF- β (Chung et al, 1996).

Studi recenti hanno evidenziato il coinvolgimento dei fattori c-jun e c-fos nella regolazione trascrizionale del gene che codifica per la proteina dentin matrix 1 (DMP1), proteina non collagenica localizzata principalmente nella matrice mineralizzata dell'osso e della dentina (Narayanan et al, 2004). Durante il differenziamento osteoblastico DMP1 viene espressa in modo costitutivo. (Narayanan et al, 2002). Il sito di legame per junB nel promotore DMP1 è localizzato in una regione compresa tra -1950 e -1940 bp e la delezione di questa regione

comporta un indebolimento dell'attività del promotore *in vitro*. È stato inoltre dimostrato che c-jun, legandosi al coattivatore p300, è in grado di modulare l'attività del promotore DMP1 proprio durante la fase di mineralizzazione (Narayanan et al, 2004).

L'allestimento di topi transgenici e di topi knockout per alcuni componenti della famiglia AP-1, ha permesso di evidenziare la loro importanza anche nel controllo dell'attività degli osteoclasti. Il loro differenziamento dipende anche dall'espressione della proteina c-fos nelle cellule progenitrici, infatti topi knockout per c-fos sono privi di osteoclasti, ma possiedono un elevatissimo numero di macrofagi a livello del midollo osseo. L'assenza di osteoclasti e quindi una riduzione nel riassorbimento osseo porta allo sviluppo dell'osteopetrosi (Grigoriadis et al, 1994; Johnson et al, 1992; Wang et al, 1992). Tutte le proteine Fos, una volta veicolate all'interno di precursori osteoclastici mutanti per c-fos, sono in grado di sopperire alla sua mancanza. Il fattore di differenziamento degli osteoclasti RANKL stesso induce la trascrizione di Fra-1 attraverso una via c-fos dipendente, stabilendo in tal modo un legame tra la cascata del segnale generata da RANKL e l'espressione delle proteine AP-1 durante il differenziamento osteoclastico (Matsuo et al 2000). Infatti, a valle di RANKL agiscono due importanti fattori trascrizionali: NF-kB e c-fos (Matsuo and Ray 2004). L'attivazione del segnale RANKL/c-fos è richiesta per l'espressione di NFAT-c1 e di IFN- β , i quali svolgono un ruolo chiave nel differenziamento degli osteoclasti (Takayanagi 2002). Mentre NFAT-c1 promuove il differenziamento, IFN- β lo blocca, interferendo con l'attivazione genica di c-fos indotta da RANKL. Anche i fattori c-Jun e JunB sembrano essere partner di Fos nell'osteoclastogenesi perché monociti mutanti per questi fattori diminuiscono la loro capacità differenziativa, mentre l'assenza di JunD non ha dimostrato avere effetti. Come IFN- β , la proteina Fra-1 rappresenta un bersaglio di c-fos (Matsuo et al, 2000), infatti, pur non essendo indispensabile per il differenziamento, diminuisce la formazione di osteoclasti in topi knockout per Fra-1 (Fleischmann et al, 2000).

Fra-2, appartenente alla famiglia delle proteine Fos, è coinvolto soprattutto nello sviluppo della cartilagine. Poco è conosciuto riguardo al ruolo di questa proteina (Carrasco e Bravo, 1995). Lo studio di embrioni e di neonati di topo mutanti per Fra-2 ha permesso di comprendere, almeno in parte, la funzione che questo fattore svolge nella crescita della cartilagine e dell'osso. Questi topi, presentano zone di cartilagine ipertrofica più ridotte durante tutto il periodo di sviluppo embrionale e post natale e inoltre mostrano un minor deposito di matrice cartilaginea calcificata nella placca epifisaria. Questo, probabilmente, è dovuto ad un alterato differenziamento dei condrociti sia *in vivo* che *in vitro*. Nei topi mutanti si verifica, inoltre, un ritardo nello sviluppo della colonna vertebrale (Karreth et al, 2004).

Fattori trascrizionali ATF/CREB

Il fattore trascrizionale ATF-2 interviene nella regolazione di geni osso specifici come osteopontina (Craig and Denhardt 1991) e osteocalcina (Schule et al 1990). Insieme a Fos e Jun, ATF-2 è soprattutto implicato nel processo di ossificazione endocondrale che, come descritto in precedenza, è estremamente complesso. Mutazioni in geni che controllano questo processo può dare luogo, sia nell'uomo che nel topo, a diverse patologie quali condrodiplasie, osteoartriti e condrosarcomi (Mundlos and Olsen 1997; Reimold et al, 1996; Cohen 2002). Topi mancanti di ATF-2 presentano una ridotta proliferazione di condrociti che causa nanismo e altre anomalie a livello scheletrico (Reimold et al, 1996).

La proteina ATF-2 può formare omodimeri o eterodimeri con il fattore c-jun (Benbrook and Jones 1990) e, interagendo con la sequenza responsiva CRE, può regolare l'espressione di numerosi geni nei condrociti. I siti CRE sono presenti anche in numerosi geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, tra cui i geni che codificano per la ciclina D1 (Watanabe et al, 1996) e per la ciclina A (Nakamura et al, 1995; Shimizu et al, 1998), che di fatto legano ATF-2 e, nel caso della ciclina D1, in complesso con CREB. Analisi funzionali hanno confermato che ATF-2 regola in senso positivo l'espressione della ciclina D1, e infatti in topi knockout

per ATF-2 si osservano diminuiti livelli di ciclina D1. Queste osservazioni portano a pensare che quindi ATF-2 eserciti il suo effetto sui condrociti e sull'ossificazione proprio attraverso la regolazione del ciclo cellulare (Beier et al, 1999).

Nel 1998 St-Arnaud e Quelo affermarono che anche nello sviluppo osseo i membri delle famiglie proteiche Fos e Jun interagivano con proteine coattivatori per modulare la trascrizione di geni bersaglio. I coattivatori descritti e più caratterizzati sono stati CBP (CREB-binding protein), JAB1 (Jun-activation domain-binding protein 1), e alpha-NAC (Nascent polypeptide associated complex And Coactivator alpha). Questi hanno il ruolo di potenziare la funzione di attivatore trascrizionale propria di AP-1 e probabilmente di rendere specifica l'attivazione dei geni bersaglio da parte di AP-1 nelle cellule di osso, lungo i vari stadi del loro differenziamento.

Negli anni successivi sono state raccolte una serie di evidenze riguardo alla collaborazione tra AP-1 e ATF/CREB come riportato di seguito:

Negli osteoblasti la trascrizione del gene IL-6 è modulata dal fattore di crescita di derivazione piastrinica PDGF, il quale viene prodotto sia dalle cellule di osteosarcoma che dagli osteoblasti stessi (Hart et al, 1990; Rydziel and Canalis, 1996). PDGF incrementa l'espressione del gene per l'IL6 in seguito ad attivazione dei fattori AP-1 e ATF-2, che si legano ai siti specifici presenti nel promotore di questo gene (Reimold et al, 1996; Franchimont et al, 1999). In particolare, i fattori trascrizionali Jun e Fos si legano sia al sito AP-1 che alla sequenza CRE, mentre la proteina ATF-2 interagisce esclusivamente con la sequenza target (Franchimont et al, 1999). Negli osteoblasti esposti a PDGF, ATF-2 si lega al sito CRE formando complessi eterodimerici con i membri della famiglia Jun (Hai and Curran, 1991; Morooka et al, 1995).

In cellule di osteosarcoma umano SaOS-2 e in condrociti di topo l'attività del promotore del gene Pit1 murino dipende da diversi cis elementi tra cui ATF/CREB, Sp1, AP-1, E-box e

TATA box. Pit1 è un trasportatore del fosfato coinvolto nella gestione della regolazione del fosfato nelle cellule che formano il tessuto osseo. (Palmer et al, 2001)

Il carico meccanico è un evento rilevante per il mantenimento dell'integrità ossea e della sua architettura e le prostaglandine sono mediatori importanti dell'effetto del carico meccanico stesso. La Ciclossigenasi-2 (COX-2), una forma inducibile della prostaglandina G/H sintasi, è indotta dal carico meccanico sia negli osteoblasti che negli osteociti. In cellule osteoblastiche murine sono stati condotti esperimenti di trasfezione transiente con costrutti luciferasici contenenti il promotore del gene COX-2 del topo; applicando uno stimolo stressogeno l'attività del promotore aumenta in modo significativo, come il messaggero e la proteina corrispondente. Attraverso delezioni progressive del promotore sono state individuate due regioni deputate alla risposta allo stimolo, -172/-100 bp e -79/-46 bp, nelle quali si trovano siti di legame per le proteine C/EBP β , AP-1 e CREB. Le mutazioni di questi siti eseguite singolarmente o insieme producono una diminuzione dell'attività del promotore in risposta allo stimolo. In saggi EMSA gli estratti nucleari di cellule stimulate legano sonde contenenti gli elementi C/EBP β e AP-1, e gli anticorpi contro queste proteine producono un ulteriore rallentamento di banda nella corsa. Sebbene la capacità di CREB di legare il suo elemento non sia modificata dallo stimolo, la sua fosforilazione ne risulta invece aumentata in risposta a questo stimolo. Queste evidenze portano sicuramente a concludere che le proteine C/EBP β , AP-1 e CREB cooperano nella modulazione dell'espressione di COX-2 in risposta ad uno stimolo (Ogasawara et al, 2001).

È noto che il paratormone (PTH) stimola la formazione degli osteoclasti attraverso il legame al suo recettore presente nelle cellule stromali e negli osteoblasti, stimolando la produzione di RANKL e inibendo quella di OPG, ma i meccanismi attraverso i quali regola questi geni rimangono sconosciuti. È stato però dimostrato che PTH induce la trascrizione del gene di RANKL e aumenta la stabilità del suo messaggero in cellule osteoblasti/stromali murine esprimendo stabilmente il recettore umano PTH/PTH-related protein receptor 1. In

queste cellule PTH è in grado anche di sopprimere il messaggero di OPG che risulta ridotta in presenza di dominanti negativi di CREB e c-fos (Fu et al, 2002).

Il collagene XXIV è una proteina scoperta recentemente e principalmente espressa nello sviluppo del tessuto osseo dopo il marcatore del differenziamento tardivo che è l'osteocalcina. Una prima caratterizzazione del promotore e la sua regolazione sono state studiate nel gene corrispondente di topo (Col24a1). Questo gene produce due proteine generate da splicing alternativi con differenti regioni 5' non tradotte. Esperimenti di trasfezione e saggi di legame al DNA hanno dimostrato che l'attività di questo promotore in cellule di osteosarcoma di topo è sotto il controllo di un cis element condiviso da entrambi i trascritti e riconosciuto da specifiche combinazioni dei fattori c-Jun, CREB1, ATF-1 e ATF-2. L'overespressione di questi fattori stimola una maggiore attività del promotore e per la prima volta si forniscono le indicazioni di una implicazione di complessi CREB-AP1 nell'espressione di geni collagenici in cellule osteoblastiche (Matsuo et al, 2006).

In cellule di osteosarcoma umano SaOS-2 è stato dimostrato attraverso delezioni progressive del promotore della proteina sialica ossea (BSP), che una regione tra -56/-84 bp, contenente un cAMP response element (CRE), da sola sostiene l'attività del promotore. Il controllo in questo sito è a carico delle proteine CREB-1, JunD e Fra-2 e la overespressione di JunD e Fra-2 produce un aumento dell'attività del promotore. JunD e Fra-2, inoltre, sono in grado di legare l'elemento CRE nel promotore di BSP sia come eterodimeri fra di loro che con CREB-1 (Detry et al, 2008).

RUNX2

Il ruolo di Runx2 è sostenuto da molti esperimenti condotti soprattutto sui topi. Basti ricordare che topi knockout per Runx2 muoiono appena dopo la nascita e mostrano una assoluta assenza di ossificazione sia endocondrale che membranosa (Otto et al., 1997). Topi eterozigoti per la delezione di Runx2 sviluppano un difetto osseo specifico che riflette il fenotipo della displasia cleidocraniale (CCD) umana (Otto et al., 1997). Runx2, da solo, è sufficiente per promuovere, sia *in vitro* che *in vivo*, il programma di differenziamento osteoblastico (Komori 2008).

La famiglia dei fattori trascrizionali PEBP2/Cbf sono stati originariamente identificati nel topo come fattori che legano la sequenza “core enhancer” del poliovirus. Sono proteine eterodimeriche formate da una subunità α legante il DNA ed una subunità β non legante il DNA. I geni Runx sono presenti in molte specie animali e nei mammiferi le subunità α sono codificate da tre geni distinti Runx1, Runx2 e Runx3. Tutte le isoforme sono caratterizzate dalla presenza di un dominio di legame al DNA, chiamato Runt domain, altamente conservato composto da 128 aa, che conferisce a queste proteine la capacità di interagire anche con altri fattori e di legare l'ATP (Karsenty, 2000). La subunità β comune aumenta l'affinità di legame delle subunità α al DNA.

In qualità di fattore trascrizionale Runx2 lega specifiche sequenze nel DNA (AACCACA), altrimenti conosciute come OSE2 (osteoblast-specific cis-acting elements) (Ducy et al, 1997). I siti consensus OSE si trovano nei promotori di geni osso-specifici come collagene di tipo I, fibronectina, BSP, MMP13 e osteoprotegerina (Barnes et al., 2003) solo durante il periodo di differenziamento osteoblastico, perché, come già detto, nel successivo periodo di maturità di queste cellule non è più Runx2 a sostenere l'espressione di queste proteine.

In vitro, l'espressione forzata di Runx2 in cellule non osteoblastiche porta all'induzione dell'espressione di osteocalcina e BSP (Barnes et al., 2003). *In vivo*, l'espressione ectopica di

Runx2 in animali transgenici induce la formazione di osso tramite ossificazione endocondrale. Sempre in modelli in vivo è stato dimostrato come Runx2 porti all'acquisizione del fenotipo osteoblastico promuovendo l'espressione della maggior parte delle proteine che formano la matrice ossea (Ducy et al, 1997; Harada et al, 1999; Jimenez et al, 1999; Lee et al, 2000; Thirunavukkarasu et al, 2000; Kern et al, 2001), anche se, successivamente nella fase di osteoblasto maturo, non è indispensabile per il suo mantenimento.

Il livello di Runx2 aumenta continuamente durante il differenziamento osteoblastico (Komori 2008), e la sua attività è strettamente correlata con specifiche modificazioni post-traduzionali ed interazioni con proteine regolatrici durante tutti gli stadi maturativi delle cellule. Molte delle proteine che interagiscono con Runx2 vengono esse stesse riconosciute come regolatori del differenziamento osteoblastico e sono Sp7/Osterix e alcune proteine del segnale Wnt, come Lef/Tcf (Kahler et al, 2003; Gaur et al, 2005; Reinhold et al, 2007). Queste proteine agiscono bloccando soprattutto il differenziamento in senso adipogenico e condrogenico e favorendo quello in senso osteoblastico. L'attivazione di Runx2 mediante fosforilazione è a carico di MAPK (mitogen-activated protein kinase) e della protein chinasi A (PKA). Un aumento dell'attività endogena di Runx2 è stata osservata anche da parte di fattori che notoriamente stimolano specifiche vie di trasduzione del segnale come PTH/PTHrP e Smads (Franceschi et al, 2003).

Una serie di evidenze in letteratura descrivono Runx2 come un fattore trascrizionale, che, in dipendenza delle proteine a cui è associato in uno specifico momento e contesto cellulare, può comportarsi da regolatore sia positivo che negativo della trascrizione. A questo proposito sono state descritte interazioni di Runx2 con HES, p300, SRC-1, CBP, MO7 e MORF, C/EBP (Lian et al, 2003), SWI/SNF (Javed et al., 2001) e con TLE (trasducin like enhancer of split), YAP (yes-associated protein), mSin3a, deacetilasi istoniche HDAC3 e HDAC6 che agiscono da repressori (Lian et al, 2003; Westendorf, 2006), impedendo a Runx2 di legarsi al DNA,

alterando la struttura della cromatina e/o bloccandone l'interazione con i coattivatori (Lian et al, 2003).

Dopo aver promosso l'induzione dell'osteoblastogenesi, Runx2 mantiene gli osteoblasti in uno stadio "immaturo" durante il quale si forma "osso immaturo" caratterizzato da fibre collagene impaccate in modo non organizzato e lasso e un basso grado di mineralizzazione. I livelli di Runx2 si abbassano successivamente per permettere il passaggio da osteoblasti immaturi a osteoblasti completamente maturi: questi formeranno osso maturo con fibre collagene disposte in modo regolare e fitto e un alto grado di mineralizzazione (Maruyama et al, 2007). Quindi la convinzione comune è che Runx2 è coinvolto nella formazione dell'osso immaturo indirizzando le cellule mesenchimali al differenziamento osteoblastico e bloccando la maturazione di queste cellule. Runx2 è, infatti, soppresso quando il processo maturativo giunge a compimento (Maruyama et al, 2007). Le conoscenze acquisite riguardo a questo fattore trascrizionale spingono a credere che il controllo trascrizionale operato da Runx2 sia esercitato attraverso un controllo a più livelli: questo supporta l'ipotesi della convergenza di molteplici segnali regolatori per arrivare ad avere un assoluto controllo dell'espressione genica tessuto specifica (Coffman, 2003, Lian et al, 2003, Schroeder et al, 2005).

Promotori efficienti del differenziamento osteoblastico sono le cosiddette BMPs (bone morphogenetic proteins), appartenenti alla famiglia TGF β . Da studi recenti è emerso che la BMP-2, in modo particolare, attiva le proteine Smad 1 e 5 [Nishimura et al, 1998] le quali, una volta fosforilate, attivano a loro volta una cascata di segnali in grado di promuovere il differenziamento in senso osteogenico. Tra i fattori coinvolti in questa complessa rete di segnali ci sono Dlx5, le proteine Runx2 e Osterix (Ryoo et al., 1988).

NFATc1

NFATc1 (Nuclear Factor for Activated T cells 1) appartiene alla famiglia di fattori originariamente individuati nei linfociti T, ed è solo una delle quattro isoforme proteiche riconosciute (c1, c2, c3, c4) caratterizzate da un dominio di legame al DNA molto conservato. Questa famiglia di proteine è coinvolta nella regolazione di molti processi in sistemi biologici differenti quali il sistema cardiovascolare, muscolare nonché nel sistema immunitario (Hogan et al, 2003). La cascata del segnale promossa dal fattore trascrizionale NFATc1 regola, nel tessuto osseo, la proliferazione degli osteoblasti, il differenziamento degli osteoclasti e più in generale coordina il ciclo continuo di riassorbimento e deposizione di nuova matrice ossea (Monte et al, 2006), elevandolo a regolatore chiave del turnover osseo (Asagiri et al, 2005). NFATc1 svolge la sua funzione di fattore trascrizionale a livello nucleare dove lega specifiche regioni di geni bersaglio. La traslocazione di NFATc1 dal citoplasma al nucleo è strettamente dipendente dalla sua attivazione da parte di una specifica fosfatasi serina/treonina, la calcineurina, la cui attività dipende dalla cascata del segnale calcio/calmodulina (Hogan et al, 2003). Inibitori della calcineurina, ad esempio, inibiscono in vitro il differenziamento degli osteoclasti, proprio perché questo causa una mancata attivazione di NFATc1.

Ruolo di NFATc1 negli osteoclasti

Recenti studi individuano NFATc1 come il fattore indispensabile nel differenziamento degli osteoclasti (Asagiri et al, 2005; Takayanagi et al, 2002) soprattutto in risposta all'attivazione del recettore RANK (Ishida et al, 2002; Takayanagi et al, 2002; Hirotsu et al, 2004). È stato dimostrato che RANK-L (ligando del recettore RANK) stimola prima la traslocazione della subunità NF- κ B che, nell'arco di pochi minuti, si colloca a livello nucleare (Komarova et al, 2003) e in un tempo maggiore, 24-48h, anche quella di NFATc1 (Ishida et al, 2002;

Takayanagi et al, 2002) e poi, a lungo termine, aumenta l'espressione del messaggero di NFATc1 in modo molto significativo durante l'osteoclastogenesi. Un numero consistente di geni osteoclasto-specifici, regolati direttamente da NFATc1 (Day et al., 2005; Kim et al., 2005; Matsumoto et al., 2004; Crotti et al., 2006; Ikeda et al., 2004; Matsuo et al., 2004), e direttamente coinvolti nel riassorbimento osseo (TRAP, recettore per la calcitonina, catepsina K) (Kim et al, 2005; Anusaksathien et al, 2001), sono overespressi durante la formazione degli osteoclasti in risposta a RANK-L. Anche TNF riveste un ruolo importante per l'osteoclastogenesi per due ragioni: 1) perchè aumenta l'espressione sia del recettore RANK che di c-Fms sulla superficie dei precursori amplificando così il segnale indotto da RANK-L e M-CSF (Yao et al, 2006; Zhang et al, 2001) e 2) perché induce l'attivazione dei fattori AP-1, NF-kB e NFATc1 stesso (Boyce et al, 2005; Karsenty and Wagner 2002) che sono di fatto attivati a valle del segnale promosso dall'interazione RANKL/RANK. Uno dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica regolata da NFATc1 prevede, infatti, che NFATc1 formi dei complessi, interagendo in modo cooperativo con AP-1 e NF-kB, provvedendo anche a sostenere la sua autoregolazione in senso positivo, strategia utilizzata nel "commitment" dei linfociti T, delle cellule muscolari scheletriche e cardiache (Hogan et al, 2003; Asagiri et al, 2005; Takayanagi et al, 2002; Kim e tal, 2005; Matsumoto et al., 2004; Anusaksathien et al, 2001; Takayanagi 2005).

Sembra che anche c-Fos sia in grado di indurre l'espressione di NFATc1 (Takayanagi et al, 2002; Matsuo et al, 2004) promuovendo quindi la formazione di osteoclasti promossa da RANK-L anche se non è indispensabile per questo, infatti, in topi knockout per c-Fos (Takayanagi et al, 2002; Matsuo et al, 2004; Koga et al, 2004; Ishida et al, 2002; Hirotsu et al, 2004), NFATc1 riesce comunque a stimolare l'osteoclastogenesi, indicando quindi che c-Fos si trova a monte di NFATc1 in questa via del segnale.

Altri dati di letteratura descrivono, invece, l'attivazione di NF-kB come primo evento nella cascata del segnale seguito poi dall'attivazione di c-Fos e NFATc1. L'utilizzo di inibitori di

NF-kB bloccano, infatti, la maturazione dei precursori osteoclastici anche se questi sono trattati con RANKL o TNF, nonostante questo NF-kB non è essenziale nel “commitment” delle cellule staminali ematopoietiche a progenitori degli osteoclasti, quando però siano overespressi c-Fos e NFATc1 (Yamashita et al, 2007).

Ruolo di NFATc1 negli osteoblasti

Studi recenti hanno dimostrato quanto NFAT abbia un ruolo rilevante anche nel promuovere la proliferazione e il differenziamento degli osteoblasti e nell’espressione di proteine collageniche e non collageniche.

Alcuni autori hanno inizialmente dimostrato che tutte le isoforme sia della subunità catalitica A che della subunità regolatrice B della calcineurina sono espresse negli osteoblasti murini. L’espressione poi della calcineurina come proteina di fusione TAT-calcineurina A α ha prodotto un aumento dell’espressione di Runx2 e di altri marcatori osteoblastici come fosfatasi alcalina, BSP e osteocalcina, nonché un aumento nella formazione ossea quando espressa in topi transgenici. Al contrario topi mutanti, calcineurina A α -/-, mostravano ossa osteoporotiche e una ridotta apposizione di matrice ossea (Sun et al, 2005). La overespressione di NFATc1 in precursori osteoblastici da cranio di topo promuove l’attivazione del promotore del gene per il collagene di tipo I (Col1a1).

In linea con queste osservazioni altri hanno evidenziato che il trattamento di osteoblasti da cranio con un inibitore della calcineurina FK506 interferiva con la formazione di noduli di matrice mineralizzata (Kuroda et al, 2008). Ciò veniva confermato in cellule che non esprimevano NFATc1, dove la formazione di noduli era assente (Kuroda et al, 2008). Allo scopo di identificare il meccanismo alla base di questo fenomeno, gli autori hanno pensato di valutare l’effetto di una overespressione di NFAT sull’attività trascrizionale di tre fattori essenziali per il differenziamento osteoblastico: Osterix, Runx2 e Smad. Osterix è un fattore trascrizionale e Smad rappresentano una famiglia di proteine di segnale intermedie nella

cascata del segnale promossa dalla BMP-2 (Chen et al, 2004). I risultati ottenuti mostrano come ci sia una cooperazione significativa tra NFAT e Osterix, calcineurina-dipendente, nell'attivare la trascrizione del gene *Col1a1*. NFAT enfatizza l'azione di Osterix tramite interazione diretta tra i due fattori e non attraverso un legame al DNA, infatti il reclutamento al promotore di *Col1a1* di NFATc1 è, in vivo, strettamente dipendente dalla presenza di Osterix. Questa ipotesi è stata avvalorata dall'utilizzo di una proteina Osterix tronca che non era più in grado di interagire con NFATc1 (Koga et al, 2005).

In uno degli studi più recenti (Winslow et al, 2006) sono stati creati topi transgenici esprimenti una variante di NFATc1 costitutivamente localizzata nel nucleo sotto il controllo di un promotore inducibile con tetraciclina. Questa forma di NFATc1 è espressa nel timo, nei linfociti splenici e nell'osso, e più precisamente negli osteoblasti; il fenotipo osseo di questi topi era caratterizzato da un aumento numerico degli osteoblasti e da un marcato aumento del volume osseo (Winslow et al, 2006). Al contrario topi transgenici non esprimenti NFATc1 sviluppano difetti nella struttura ossea, mostrando un aumento nell'osteoclastogenesi a dispetto di livelli di espressione di RANK-L e osteoprotegerina normali.

Anche altri fattori tra cui citochine, ormoni e fattori di crescita inducono la formazione di osteoclasti e quindi il riassorbimento osseo attraverso un meccanismo indiretto che prevede l'incremento dell'espressione di RANK-L e MCS-F in cellule stromali e osteoblastiche piuttosto che attraverso un'azione diretta sui precursori osteoclastici (Kitaura et al, 2005).

Comunque risulta chiaro da tutte queste considerazioni che il ruolo del segnale promosso da calcineurina/NFATc1 è estremamente significativo sia in cellule osteoclastiche che osteoblastiche soprattutto in riferimento all'opposta funzione che questi due tipi cellulari esplicano all'interno del tessuto osseo.

SCOPO

L'analisi dell'organizzazione della complessa regione 5' del gene umano ER α e della conseguente regolazione dell'espressione di questo gene in tessuti bersaglio dell'estrogeno, rappresentano da tempo l'oggetto di studio del nostro gruppo di ricerca.

Lo scopo di questa tesi è stato rivolto alla caratterizzazione della regione regolativa del promotore distale F, situata tra -117884 e -117014. Sulla base di evidenze che sono state raccolte mediante un'analisi bioinformatica, lo studio ha preso in considerazione putativi siti di legame per i fattori trascrizionali Runx2, NFATc1, AP-1 e ER α , allo scopo di far luce sui meccanismi che regolano l'espressione del gene ER α stesso, il quale gioca un ruolo centrale nel metabolismo osseo. Un'alterata espressione della proteina determina, infatti, uno sbilanciamento dell'omeostasi ossea con la conseguente insorgenza di diverse situazioni patologiche.

In particolare la ricerca si è concentrata su quei fattori che numerosi studi hanno indicato come regolatori essenziali dell'osteoblastogenesi, e che pertanto possono risultare buoni candidati per una terapia mirata rivolta a curare difetti del tessuto osseo basata sulla modulazione dell'espressione di geni specifici. E' stato infatti dimostrato che molte patologie del tessuto osseo che comprendono condizioni degenerative, infiammazioni, neoplasie primarie o secondarie sono caratterizzate da un'alterata attività di alcuni fattori trascrizionali, tra cui quelli considerati in questa tesi.

Per raggiungere questo scopo si sono effettuate:

- Analisi del ruolo funzionale di differenti sequenze appartenenti al promotore F mediante saggi di luciferasi.
- Valutazione mediante saggi di ritardo della corsa elettroforetica (EMSA) delle interazioni DNA-proteina "in vitro" tra i putativi siti Runx2, ERE e AP-1 presenti nel promotore e le proteine presenti negli estratti nucleari di cellule osteoblastiche.

- Valutazione mediante immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) delle interazioni “in vivo” tra i fattori trascrizionali considerati e la regione del promotore F in esame.
- Valutazioni del ruolo funzionale dei siti Runx2, ERE e AP-1 mediante mutagenesi sito-specifica.
- Valutazione dell’effetto della deplezione di Runx2, mediante silenziamento genico.
- Valutazione del ruolo di NFATc1 mediante strategia decoy combinata all’analisi del promotore.

Pertanto, nel complesso, il disegno sperimentale è stato rivolto ad una caratterizzazione molecolare dei meccanismi che regolano l’espressione del gene $ER\alpha$ nelle cellule osteoblastiche allo scopo di fornire nuovi elementi non solo per comprendere la complessa biologia di queste cellule, ma anche per pensare nuove strategie terapeutiche nel campo della medicina rigenerativa del tessuto osseo.

MATERIALI E METODI

Culture cellulari.

Le linee cellulari umane utilizzate per gli esperimenti di questa tesi sono:

- linea di carcinoma mammario MCF-7;
- linea di carcinoma mammario MDA-MB-231;
- linea di osteosarcoma SaOS-2;
- linea di osteosarcoma MG63.

Tutte le linee cellulari sono mantenute in terreno di coltura α MEM (α -Minimum Essential Medium; Sigma Aldrich) a cui vengono addizionati: siero fetale bovino FBS (CELBIO EuroClone, Milano, Italia) al 10%, in presenza di glutammina (2mM), antibiotici streptomycina (50 mg/ml) e penicillina (100 mg/ml).

Culture primarie di Osteoblasti Umani (hOBs). Queste culture sono state ottenute coltivando frammenti ossei provenienti da prelievi effettuati in sala operatoria dall'anca di pazienti consenzienti e precedentemente informati sulla natura, lo scopo e le procedure del progetto. I frammenti ossei sono stati ulteriormente ridotti di dimensione, lavati con PBS (Phosphate-buffered saline: 136.9 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.13 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄) e mantenuti in coltura in terreno α MEM a cui vengono addizionati: siero fetale bovino FBS al 20%, in presenza di glutammina (2mM), antibiotici streptomycina (50 μ g/ml) e penicillina (100 μ g/ml). Dopo circa una settimana si osserva la fuoriuscita di cellule dai frammenti ossei ma la confluenza sufficiente per procedere alla semina per gli esperimenti si raggiunge solitamente dopo circa quattro- sei settimane. Per gli esperimenti descritti in questa tesi sono state usate culture che avevano subito solo un passaggio.

Tutte le colture cellulari vengono mantenute in incubatore a 37 °C, in atmosfera umidificata all'80% in presenza di CO₂ al 5%.

Immunocitochimica.

L'indagine immunocitochimica per la proteina ER α è stata effettuata mediante il metodo streptavidina-biotina, usando l'Ultrastainin Polyvalent-HRP immunostaining Kit (Ylem, Roma, Italia). Le cellule (MDA-MB-231, MCF7, SaOS-2, MG63 e hOBs) coltivate in chamber slide, vengono lavate due volte con TBS, Tris-buffered saline (2.6 mM KCl, 0.1M NaCl, 25 mM Tris), fissate con metanolo 100% freddo per 10 minuti e permeabilizzate con 0.2% Triton X-100 (Sigma). Segue un'incubazione per l'inibizione della perossidasi endogena con H₂O₂ al 3% che viene bloccata con l'aggiunta di due gocce di Super Block Reagent fornito dal Kit. Viene quindi aggiunto l'anticorpo primario monoclonale di ratto contro ER α (1:500) (Santa Cruz Biotechnology). Il tutto viene incubato a 4°C O.N. A temperatura ambiente le cellule sono incubate con "Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody"; segue un'altra incubazione in Streptavidin HRP ed infine, l'aggiunta della miscela substrato-cromogeno (Cromogeno Kit, Ylem). La reazione viene lasciata procedere per un tempo variabile tra i 5' e i 10', fino al raggiungimento dell'intensità di colorazione desiderata e, quindi, bloccata con un lavaggio in TBS. I vetrini vengono conservati in glicerolo/PBS 9:1 e osservati usando un microscopio Leitz.

Estrazione dell'RNA.

Il pellet cellulare ottenuto da circa 1×10^6 cellule, viene risospeso in un buffer di lisi (900 μ l di Denaturing Solution, RNAgents Total RNA Isolation System, Promega); successivamente al lisato cellulare si aggiungono 90 μ l di sodio acetato 2M e 900 μ l di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico; dopo aver mescolato vigorosamente, il campione viene lasciato in ghiaccio per 15'. Al termine dell'incubazione, una centrifugata a 10000 x g per 20' a 4°C permette la formazione di due fasi: una organica, ed una acquosa e trasparente, sovrastante, in cui si trova l'RNA. Questa deve essere trasferita in una nuova provetta quindi addizionata di alcool isopropilico in egual volume e incubata a -20°C per 10' per permettere

all'RNA di precipitare. Successivamente si effettua una seconda centrifugata per 10' a 10000 x g a 4°C; il pellet trasparente così ottenuto viene lavato in etanolo al 75% mediante centrifugazione a 10000 x g per 10' a 4°C. L'etanolo viene eliminato tramite 5' di essiccazione sottovuoto e il pellet risospeso in 10 µl di acqua DEPC (acqua bidistillata, addizionata di 0.1% dietilpirocarbonato per 24 ore).

Per verificare e quantificare l'RNA estratto, si aggiunge 1 µl di RNA ad una soluzione composta da: 2 µl di 5X running buffer (0.2 M acido 3-morfolin propan sulfonico pH 7.0, 50 mM sodio acetato, 5mM EDTA pH 8.0), 3.5 µl di formaldeide e 10 µl di formammide per un volume totale di 20 µl. Questa soluzione viene lasciata 15' a 55°C per denaturare l'RNA, e quindi aggiunta di glicerolo che ne facilita il caricamento su gel. Questo è un gel di agaroso 1% in TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acido acetico glaciale, 2.0 mM EDTA pH 8) contenente 1mg/ml di etidio bromuro; viene caricato anche un marker di peso molecolare noto per verificare la qualità dell'RNA. L'esposizione del gel alla luce UV permette di verificare la presenza di tre bande corrispondenti all'RNA 5S, 18S e 28S che attestano la presenza di RNA non degradato.

Reversione in cDNA.

L'RNA totale così ottenuto viene revertito a cDNA per il successivo utilizzo in Real Time-PCR quantitativa, tramite il Kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega). I primer forniti alla trascrittasi inversa sono una miscela di oligonucleotidi casuali, presenti nel Kit. Per arricchire il cDNA totale di quello corrispondente ad ER α si aggiungono anche primers specifici complementari a regioni presenti nell'esone 1 (R2L), nell'esone 8 (12mer) e nell'esone F (RH2000), le cui sequenze sono di seguito riportate:

R2L: 5'-TAGGGCCATCCCAGATGCTTTGGT-3'

12mer: 5'-GCCAGGGAGCTC-3'

RH2000: 5'-CAGTGATGGTTCAAAGTTCA-3'

L'RNA viene incubato a 70°C per 5' per permetterne la denaturazione. Successivamente la reazione viene addizionata di 2.5 mM di MgCl₂, 0.5 mM dNTP e 10 mM DTT in "PCR-buffer" 1X. Dopo 5' a temperatura ambiente, si aggiunge 1 unità di trascrittasi inversa ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega) e si lascia incubare per 1 ora a 42°C. La reazione viene poi incubata per 15' a 70°C. Per rimuovere l'RNA ancora presente, il campione viene trattato con 2 unità di RNase H per 20' a 37°C; la reazione viene quindi bloccata per 5' a 95°C. Il cDNA può essere quindi conservato a -20°C.

RT-PCR-quantitativa.

Negli esperimenti descritti in questa tesi è stata utilizzata la tecnologia TaqMan che prevede l'impiego di oligonucleotidi sonda, complementari ai geni bersaglio ed associati in 5' ad un colorante reporter fluorescente (FAM 6-carboxyfluorescein per ER α e per l'isoforma F, VIC per il gene housekeeping GAPDH) e in estremità 3' ad un colorante quencher (TAMRA 6-carboxy-tetramethylrhodamine) che copre la fluorescenza del primo fino a che l'attività esonucleasica 5'-3' della Taq DNA polimerasi non li separa.

L'amplificazione del cDNA di ER α è realizzata utilizzando una mix 20X di primer non marcati e la sonda TaqMan MGB 5'-TGATGAAAGGTGGGATACGAAAAGA-3' (Applied Biosystems), disegnata tra l'esone 3 e l'esone 4.

La sonda specifica per rilevare l'isoforma F è disegnata nell'esone F e la sequenza è riportata di seguito: 5'-TCTCTTCAAGAAGAAGAAA-3'.

La sonda TaqMan MGB per rilevare il cDNA del Recettore per il Progesterone (PR) è la seguente: 5'-ATCATTGCCAGGTTTTTCGAAACTTA-3'.

La fluorescenza ha, per i primi 20-25 cicli, un livello basale; ma quando la quantità di amplificato comincia a crescere in maniera esponenziale, si ha un corrispondente aumento della fluorescenza stessa. L'indicatore della quantità di cDNA di partenza è il cosiddetto ciclo soglia (Ct), ossia la frazione di ciclo in cui comincia l'aumento esponenziale. Il valore del Ct

è inversamente proporzionale alla quantità di cDNA di partenza ed è da esso che parte l'elaborazione dei dati.

L'uso del gene di riferimento permette di normalizzare i valori.

Le PCR sono eseguite in triplicato per ogni campione. Nella stessa reazione, i cDNA sono analizzati per il gene di interesse (ER α o l'isoforma F e PR) e per il gene di riferimento (GAPDH).

I valori di Ct sono presi come valori medi dei duplicati. Si calcola quindi il Δ Ct come la differenza tra il Ct del gene target e quello dell'housekeeping. Quindi si sceglie un campione calibratore, ossia il valore di Δ Ct del campione con i livelli più bassi del cDNA target e che permette il confronto dell'espressione genica tra gli altri campioni. Si calcola poi il $\Delta\Delta$ Ct come la differenza tra il Δ Ct di ogni campione e quello del calibratore. Secondo una elaborazione validata dal depositario della tecnologia, i livelli di espressione dei campioni possono essere espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$, valore definito "fold induction", che valuta le volte di incremento rispetto al campione scelto come calibratore. La macchina impiegata per la PCR quantitativa in tempo reale è ABI Prism 7700 Sequence Detection System.

Preparazione degli estratti nucleari

Dopo eliminazione del terreno di coltura le cellule vengono "lavate" con PBS contenente gli inibitori di proteasi (AESBF 104 mM, Aprotina 0.08 mM, Leupeptina 2 mM, Bestatina 4 mM, Pepstatina A 1.5 mM, E-64 1.4 mM; protease inhibitor cocktail, Sigma) e PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride), raccolte e centrifugate per 5' a 1200 rpm a 4°C. Il pellet cellulare viene risospeso in 400 μ l di buffer A (10 mM Hepes pH 7.9, 2 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF) e mantenuto per 15' in ghiaccio e successivamente centrifugato per 5' a 14000 rpm. Il surnatante viene rimosso e il pellet nucleare viene risospeso in 40 μ l di buffer C (50 mM Hepes pH 7.9, 25% glicerolo, 300 mM

NaCl, 50 mM KCl 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT) e incubato per 20' in ghiaccio. L'omogenato viene quindi centrifugato per 5' a 14000 rpm a 4°C. Si raccoglie quindi il surnatante che rappresenta l'estratto nucleare, lo si aliquota e lo si conserva a -80°C. La concentrazione proteica è valutata tramite il metodo Bradford (Bradford Reagent for Protein Determination, Sigma).

Preparazione degli estratti cellulari

Dopo aver eliminato il terreno di coltura, le cellule vengono lavate due volte con 1X PBS freddo, contenete gli inibitori delle proteasi e PMSF, raccolte e centrifugate per 5' a 1200 rpm a 4°C. Il pellet cellulare corrispondente a circa 5×10^5 cellule, viene risospeso in 200 µl di una soluzione lisante (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.02% Sodio azide, 1% Triton X-100, acqua) a cui si aggiungono gli inibitori delle proteasi. Le cellule vengono mantenute in ghiaccio per circa 30' e successivamente centrifugate per 2' a 14000 rpm a 4°C. Si raccoglie quindi il surnatante, da cui si preleva un'aliquota di circa 5 µl per la valutazione della concentrazione ottenuta mediante metodo Bradford e lettura spettrofotometrica. Il resto viene sottoposto alla soluzione di sfascio e conservato a -80°C.

Western blotting

Le proteine vengono fatte migrare su 10% SDS-PAGE, sono poi trasferite su un filtro di PVDF (membrana di Polivinilidene fluoride). Dopo l'elettroblotting, le proteine vengono visualizzate usando il reagente PONCEAU S (Sigma). Il filtro viene "bloccato" per due ore a temperatura ambiente con 1X PBS, contenente 0.05% TWEEN 20 (PBST) e latte scremato, e viene poi incubato con l'anticorpo specifico contro ERα umano (1:2000) e contro IP(3)-Kinase (1:3000) (Upstate), contro c-jun (1:2000), contro c-fos (1:2000), contro ATF-2

(1:2000), contro Fra-2 (1:2000), contro NFATc1 (1:1000) e contro Runx2 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) nella stessa soluzione usata per il bloccaggio, “over night” a 4°C. In seguito, il filtro viene lavato tre volte con PBST per 30’ e incubato per 45’ con PBST e latte scremato contenente l’enzima perossidasi coniugato con l’anticorpo IgG anti coniglio (1:50000) (Dako). Infine il filtro viene lavato tre volte con PBST per 30’. L’immunoreattività delle proteine viene visualizzata utilizzando il sistema Super Signal West Femto (Pierce).

Preparazione dei costrutti

Per i saggi luciferasici sono stati prodotti costrutti plasmidici, mediante clonazione di frammenti del promotore in studio nel plasmide pGL3-basic (Promega, Madison). Essi vengono inseriti a monte del gene reporter della luciferasi (LUC). La sequenza di 862 bp (-117879/-117014) appartenente al promotore F è stata amplificata da DNA genomico umano mediante reazione di PCR, utilizzando i seguenti primers (in carattere minuscolo sono riportate le sequenze di riconoscimento per gli enzimi di restrizione MluI e BglII):

Fw: 5’- cgacgcgtACCTACTGCATAAACCCACACC -3’

Rev: 5’- gaagatctTTGAAGAGAAGATTATCACTC -3’.

Il frammento di 862 bp è stato usato per generare i mutanti di delezione di 451 bp (-117876/-117426) e di 411 bp (-117426/-117014) mediante digestione enzimatica con l’enzima di restrizione HindIII. Il frammento di 272 bp (-117287/-117014) e il frammento 180 (-117194/-117014) sono stati generati tramite PCR utilizzando come templatato di partenza il frammento di 862 bp, e i primers di seguito riportati (in carattere minuscolo sono indicate le sequenze di riconoscimento per gli enzimi di restrizione MluI e BglII):

Fw (180): 5’ -cgacgcgtTTCCTAATTCATGGTCA -3’,

Fw (272): 5’- cgacgcgtAAGCAAGGCCAC - 3’,

Rev comune: 5’- gaagatctTTGAAGAGAAGATTATCACTC -3’.

I frammenti prodotti sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione opportuni (over night a 37°C con 3 U di enzima) ed inseriti nel vettore reporter pGL3-Basic (Promega) digerito in parallelo con i medesimi enzimi, mediante reazione ligasica con 3 U di ligasi (Promega) per 6 h a 16° C.

La mutagenesi sito-specifica è stata utilizzata per introdurre la sostituzione di uno e due nucleotidi rispettivamente nelle sequenze dei siti di legame (a) e (b) per Runx2 (nei costrutti 862 e 451), generando i prodotti mutati (a) mut e (b) mut e nelle sequenze dei siti di legame AP-1(1) e ERE half site (nei costrutti 862, 451 e 272), generando i prodotti mutati AP-1(1)m e ½ ERE m. I plasmidi mutagenizzati sono stati creati tramite reazione di “primer extension”, condotta sui costrutti originali, utilizzando:

-primers complementari ai siti di legame (a) e (b) per Runx2 portanti la mutazione (indicata in carattere minuscolo nella sequenza sotto riportata):

Sito (a) mut Fw 5'- GCATAAACCTcACCAGACAT -3'

Rev 5'- ATGTCTGGTGaGGTTTATGC -3'

Sito (b) mut Fw 5'- TCAATAACCaCATAAACTT -3'

Rev 5'- AAGTTTATGtGGTTATTGA -3'.

-primers complementari ai siti AP-1(1) e ERE half site portanti la mutazione (indicata in carattere minuscolo nella sequenza sotto riportata):

Sito AP-1(1) mut Fw:

5'-GGTGGTGCTAGTTCTTTATTTTcaAGTAcCTGCATTTCCCTAATTTTCATGG-3'

Rev:

5'-CCATGAAATTAGGAAATGCAGgtACTtgAAAATAAAGAAGACTAGCACCACC-3'

Sito ½ ERE mut Fw:

5'-TTATTTTTGAGTTACTGCATTTCCCTAATTTTCATaaTCATAACAGCC-3'

Rev:

5'-GACAGGAGGCTGTTATGAttATGAAATTAGGAAATGCAGTAACTCAAAAATAA-3'

È stata quindi effettuata una reazione di PCR: 5-25 ng di DNA, 62.5 ng di primer Fw e Rev, 1.5 µl di dNTPs 10 mM, 1.25 U di enzima (PFU turbo) 2' a 95°C; 16 cicli: 30" a 95°C, 1' alla temperatura di melting (che a seconda della coppia di primers utilizzati varia tra 46-48°C), 6' a 72°C; 10' a 72°C.

I prodotti di PCR sono stati digeriti con 5 U dell'enzima di restrizione DpnI per un intervallo di tempo variabile tra 1-4 h a 37° C, al fine di degradare il DNA parentale. La presenza delle mutazioni è testata tramite opportuno taglio enzimatico nel punto di mutazione.

Altri Costrutti

Gli altri costrutti utilizzati negli esperimenti sono stati:

- pNFAT-TA-Luciferase plasmid (Clontech),
- pGL2-VIT-3ERE luciferase reporter plasmid (fornitoci dal Prof. Donald P. McDonnell dell'Università Duke di Durham, North Carolina, USA),
- pGL2-basic (Promega),
- pCDNA3-Runx2 (vettore di espressione per Runx2) proveniente dall'Howard Hughes Medical Institute, Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX,
- pSG5 HEO (vettore di espressione per ER α), proveniente dall'Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, College de France, Universite Louis Pasteur, Strasbourg, France
- pCMV-Sport- β gal (vettore di espressione per la β -galattosidase utilizzato per valutare l'efficienza di trasfezione e normalizzare i dati di luciferasi) (Invitrogen).

Saggio di luciferasi

Gli esperimenti di trasfezione transiente sono compiuti su cellule coltivate in pozzetti di una piastra da 24 pozzetti, portate ad una confluenza pari a 60-70% e mantenute in terreno di coltura privo dell'indicatore rosso fenolo (Phenol Red Free Eagle Medium; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a cui vengono addizionati: siero fetale bovino FBS al 10% deprivato di sostanze estrogeno-simili (FBS charcoal-dextran) per 24 ore.

Le cellule sono trasfettate (come specificamente indicato nei Risultati) con 0,6/1 µg di plasmide pGL3 basic o pGL3 contenente i frammenti del promotore sopra descritti o i costrutti sopra menzionati: pGL2-basic, pNFAT-TA-Luciferase plasmid, pGL2-Vit-3ERE luciferase reporter plasmid precedentemente complessati con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) tramite incubazione di 20' a temperatura ambiente. Le cellule sono cotrasfettate con 0,1/0,25 µg di plasmide di espressione dell'enzima β-galattosidasi (pCMV-Sport-βgal; Invitrogen), per valutare l'efficienza di trasfezione, con 0,25 µg di vettore di espressione plasmidico codificante per hERα (pSG5 HEO), o Runx2 (pcDNA3-Runx2), in presenza o in assenza di 17-β-estradiolo 10^{-8} M. Il DNA viene mantenuto a contatto con le cellule per 24 ore. Successivamente il terreno di trasfezione è sostituito con terreno fresco in combinazione o no con l'estradiolo. Le cellule vengono raccolte dopo ulteriori 24 ore e lisate usando il buffer di lisi "Cell Culture Lysis Reagent 1X" (Promega). Dopo una centrifugata di 15 secondi a 12000 x g a temperatura ambiente per eliminare le membrane, il supernatante viene raccolto e trasferito in una provetta.

L'attività di luciferasi viene letta al luminometro (TD 20 luminometer) aggiungendo a 20 µl di lisato cellulare 50 µl di substrato (Luciferase Assay Reagent, Promega).

La concentrazione proteica dei campioni è valutata mediante il metodo Bradford (Bradford Reagent for Protein Determination, SIGMA). Tutti i valori di attività luciferasica sono poi normalizzati in base al contenuto proteico e in base all'efficienza di trasfezione determinata mettendo a contatto 30 µl di lisato cellulare con 270 µl di una soluzione contenente il

substrato della β -galattosidasi, l'o-nitrofenil- β -D-galactopiranoside. I valori normalizzati di attività luciferasica sono indicati come unità relative di luciferasi.

Silenziamento genico mediante Small Interfering RNA (siRNA)

Per ottenere la maggiore efficienza di silenziamento sono state provate tre diverse coppie di oligonucleotidi silenzianti diretti verso l'mRNA di Runx2 disegnate e sintetizzate da Ambion.

La coppia di oligonucleotidi più efficiente si è dimostrata essere la seguente:

oligonucleotide senso 5'-CGAUCUGAGAUUUGUGGGCtt-3'

oligonucleotide antisenso 5'-GCCACAAAUCUCAGAUCGtt-3',

ed è quindi stata utilizzata per tutti gli esperimenti di silenziamento descritti nel paragrafo dei Risultati. Una coppia di oligonucleotidi Scramble è stata utilizzata come controllo della specificità del risultato ottenuto.

Le cellule SaOs-2 sono seminate su pozzetti di una piastra da 24 pozzetti nel numero di 1×10^5 cellule per pozzetto in terreno α MEM addizionato del 10% di siero fetale bovino FBS. Dopo 24 ore il terreno di coltura viene rimosso, le cellule lavate con PBS, e sostituito con terreno di coltura Phenol Red Free Eagle Medium addizionato di siero fetale bovino FBS al 10% deprivato di sostanze estrogeno-simili (FBS charcoal-dextran). Le cellule vengono quindi trasfettate due volte ad intervalli di 48 ore con gli oligonucleotidi silenzianti (150 mM) contro Runx-2 o Scramble precedentemente complessati con Lipofectamine 2000. Le trasfezioni sono state effettuate anche insieme ai vettori precedentemente descritti secondo le modalità descritte nella sezione *Saggi di Luciferasi*. 96 ore dopo le trasfezioni le cellule sono raccolte secondo i protocolli sopra descritti per valutare l'espressione di messaggero e proteina, l'attività luiferasica come descritto in dettaglio nel paragrafo dei Risultati.

Esperimenti di decoy

Negli esperimenti di decoy sono stati utilizzati due oligonucleotidi a DNA a doppio filamento: RA4-3' ed NFAT.

RA4-3' è un oligonucleotide la cui sequenza appartiene al promotore C del gene hER α ed è localizzata a -3176/-3157 basi dal sito d'inizio della trascrizione (5'-AGTCAGTATTGAAAATAAAT-3').

NFAT è un oligonucleotide la cui sequenza appartiene al promotore del gene umano dell'IL-2 (interleuchina-2) (5'-GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT-3') e contiene un sito di legame per NFATc1.

Gli oligonucleotidi "decoy" sono stati preparati per la trasfezione rendendoli a doppio filamento (ds "double strand"). A tale scopo sono stati uniti nella stessa provetta eppendorf le sequenze forward e reverse per 2 minuti a 95°C, lasciandole quindi per 10 minuti a temperatura ambiente per favorire l'annealing. Le colture sono state trasfettate con 1 μ g/ml degli oligonucleotidi decoy RA4-3' ed NFAT precedentemente complessati per 20 minuti con lipofectamina (lipofectamineTM 2000, Invitrogen,); il DNA è stato mantenuto a contatto con le cellule per 24 ore, al termine delle quali le cellule sono state sottoposte a lavaggio con PBS 1X, mantenute in coltura per ulteriori 24 ore e successivamente analizzate. Le cellule sono raccolte secondo i protocolli specifici per ogni tipo di valutazione.

EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

Il saggio EMSA è una tecnica che consente di identificare le interazioni DNA/proteina, sfruttando l'effetto che ha il legame di una o più proteine sulla migrazione delle molecole di DNA soggette all'azione di un campo elettrico: il legame delle proteine riduce la mobilità del frammento di DNA, causando un rallentamento nella posizione di un frammento radiomarcato.

L'elica 5'-3' dell'oligonucleotide viene precedentemente marcata con γ^{32} P ATP e T4 polinucleotide chinasi (Roche) per 1h e 30' a 37° C, la doppia elica ricostituita aggiungendo

l'emicelica 3'-5' per 2h a temperatura ambiente e l'oligonucleotide marcato viene quindi sottoposto alla separazione cromatografica su colonnina Sephadex G-50.

10 µg di estratti nucleari delle cellule in esame vengono incubati per 15 minuti a temperatura ambiente rispettivamente con un eccesso molare fino a 100/200 volte (dove indicato nulla di specifico) e 25-, 50-, 100-, 250 volte (dove indicato) di competitori non marcati (oligonucleotide specifico e oligonucleotide non correlato) e, laddove indicato negli esperimenti di "supershift", con 4 µg di anticorpo specifico contro Runx2, ERα, c-jun, c-fos, ATF-2, Fra-2 (Santa Cruz Biotechnology) e con 240 ng di proteina ricombinante ERα e 300 ng di proteine ricombinanti c-jun, c-fos, ATF-2. (Santa Cruz Biotechnology). Successivamente vengono aggiunti circa 2 ng di oligonucleotide specifico marcato (10000 cpm), e la reazione è condotta per 30' a temperatura ambiente, in presenza di 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 10 mM DTT, 5 mM EDTA, 0,01% Triton X-100, 0,5% glicerolo, addizionato di 1 µg di poly (dI-dC)-(dI-dC) (Pharmacia Corporation, New Jersey U.S.A.).

I complessi DNA-proteine vengono quindi separati dal DNA non legato mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide non denaturante al 6%, in tampone TBE 0,25 X (Tris-Borato EDTA) e sottoposto per 2h a 150V. Il gel viene poi essiccato ed esposto a lastra autoradiografica a - 80°C.

Saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP).

Le cellule sono dapprima fissate con 1% di formaldeide per 10' a 37°C, per fissare le interazioni proteina-proteina e proteina-DNA. Le cellule vengono poi lavate con PBS freddo, Phosphate-buffered saline (136.9 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.13 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄) contenente gli inibitori delle proteasi (AESBF 104 mM, Aprotina 0.08 mM, Leupeptina 2 mM, Bestatina 4 mM, Pepstatina A 1.5 mM, E-64 1.4 mM; protease inhibitor cocktail, Sigma) e, infine, risospese in 200 µl di "SDS lysis buffer" (1% SDS, 10 mM EDTA,

50 mM Tris, pH 8.1) per 10' in ghiaccio. I campioni vengono sonicati in modo da ridurre il DNA in frammenti aventi una lunghezza compresa tra 0.6-1 Kb. Successivamente essi vengono diluiti in un tampone di diluizione, ChIP Dilution Buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 167 mM NaCl), con l'aggiunta degli inibitori delle proteasi e di 80 µl di "DNA-coated protein A-agarose", biglie di agaroso legate alla proteina A (fornite dal Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit, Upstate), per ridurre la quantità di interazioni aspecifiche che si possono creare. Il surnatante recuperato, viene fatto immunoprecipitare direttamente con 5 µg di anticorpo contro Runx2 (Santa Cruz, Ca) o con 4 µg di anticorpo contro TFIIB (Active Motif's ChIP-ITTM Kit), 5 µg di anticorpo contro ER α , c-jun, c-fos, ATF-2, Fra-2 (Santa Cruz, Ca) o 5 µg di anticorpo contro NFATc1 (Santa Cruz, Ca) per 16 h a 4°C. L'immunocomplesso viene incubato con 80 µl di "DNA-coated protein A-agarose" per un'ora a 4°C per isolare i complessi anticorpo-proteina che si sono formati. Le beads vengono poi raccolte e sottoposte a tre/cinque lavaggi con 1 ml dei seguenti buffer: low salt wash buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl), high salt wash buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 500 mM NaCl), LiCl wash buffer (0.25 mM LiCl, 1% IGEPAL-CA630, 1% deoxycholic acid, 1 mM EDTA, 10 mM tris pH 8.1) e TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Per poter effettuare l'analisi di PCR, l'immunocomplesso viene eluito due volte con 250 µl di una soluzione fresca costituita da 1% SDS e 0.1 M NaHCO₃, in modo da separare i complessi proteina-DNA dalle beads. I complessi così eluiti, sono incubati a 65°C per 4 ore, per permettere la reversione dei "crosslinks" prodotti dalla formaldeide. Inoltre, i campioni vengono incubati con proteinasi K (10 mg/ml) a 42°C per un'ora, in modo da digerire le proteine.

Nel caso degli esperimenti relativi a Runx2 e NFATc1, il DNA viene purificato mediante estrazione fenolo-cloroformio e raccolto mediante precipitazione etanolica, usando 1 µl di 20 mg/ml di glicogeno come "carrier" e, infine, viene risospeso in acqua sterile.

Nel caso degli esperimenti relativi ad ER α e AP-1, il DNA viene purificato mediante sistema di colonnine Qiaquick MinElute Spin Columns (QIAGEN, Inc, Germantown, MD, USA).

Per eseguire l'analisi mediante PCR, viene tenuta da parte un'aliquota di cromatina che non è stata immunoprecipitata, come controllo positivo (Input).

Ogni reazione di PCR viene eseguita usando 2/10 μ l della frazione di DNA legato (bound DNA) e 1/2 μ l di Input. La PCR si sviluppa nelle seguenti fasi: preincubazione a 95°C per 10 min, 30 cicli di denaturazione di 1 min a 95°C, 1 min alla temperatura ottimale di annealing per ogni coppia di primer e 1 min a 72°C, con un'incubazione finale a 72°C per 5 min. Se necessario un'ulteriore reazione di PCR viene eseguita per visualizzare l'amplificato su gel di agarosio all'1,5%.

Per determinare l'associazione:

- di Runx2 al promotore F si utilizza la coppia di primers: Fw (5'-CAAGGCTTG TAGAGAAGAAA-3') e Rev (5'-TCCTGCAGCAATTTTAAAGT-3') (nt-117716 e -117926),

- di TFIIB al promotore del gene GAPDH si utilizza la coppia di primers: GAPDH fw (5'-TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3') e GAPDH rev (5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'),

- di ER α , AP-1 e NFATc1 al promotore F si utilizza la coppia di primers: Fw (5'-TGAGATTTTCCAATCCTAGT-3') e Rev (5'-ACTGTCTTCTTATGCTAGAA-3') (nt-117254 e -117040).

Negli esperimenti di re-ChIP il complesso eluito dopo l'immunoprecipitazione con l'anticorpo specifico viene incubato con una soluzione contenente 10 mM DTT per 30' a 37°C; quindi il surnatante viene diluito 1:40 con il re-ChIP buffer (1% TritonX-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1) e sottoposto ad una seconda immunoprecipitazione con differenti anticorpi.

- di NFATc1 ed ER α al promotore C si utilizza la coppia di primers: Fw (5'-ACTGGTCTAGAGCATGGGTGG-3') e Rev (5'-CCAGTATTGCAGTGTTTGAGCA-3') (nt-3277 e -3117).

- Come controllo della specificità delle interazioni di NFATc1 ed ER α al promotore F e al promotore C si utilizza la coppia di primers: Fw (5'-GAGTTGTGCCTGGAGTGATG-3') e Rev (5'-GGGCCTCCAACTTTAAGTACTG-3'), i quali amplificano una regione del promotore A del gene di ER α (nt- 129 e -9).

Analisi dell'apoptosi

Per l'analisi dell'apoptosi è stato utilizzato il "DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System" (Promega) che misura il grado di frammentazione del DNA.

Le cellule coltivate su vetrini, in seguito a trattamento decoy per sei giorni, sono state fissate con un'incubazione a temperatura ambiente per 25 minuti in una soluzione contenente il 4% di paraformaldeide (in PBS 1X). Quindi, dopo un lavaggio in PBS 1X, le cellule sono state permeabilizzate con una soluzione 0.2% di Triton X-100 (in PBS 1X). E' stato poi effettuato un trattamento di 5-10 minuti in 100 μ l di Equilibration Buffer (200 mM cacodilato di potassio pH 6.6; 25 mM Tris HCl pH 6.6; 0.2 mM DTT, 0.25 mg/ml BSA, 2.5mM cloruro di cobalto). Lo strato di cellule è stato quindi ricoperto con la "TdT Reaction Mix" contenente l'enzima "Terminal-deoxynucleotidyl-transferase" (TdT), in opportuno buffer (Equilibration Buffer), in presenza di Biotinylated Nucleotide Mix. La reazione è avvenuta a 37°C per 60 minuti, in una camera umida. La reazione è stata bloccata immergendo il vetrino in SSC 2X (0,3 M NaCl, 0.03 M sodio citrato) per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, il vetrino è stato posto in perossido di idrogeno 0.3% per 3-5 minuti a temperatura ambiente, per bloccare le perossidasi endogene che potrebbero falsare i risultati sperimentali. Le cellule sono state quindi ricoperte con 100 μ l di "Streptavidin-HRP" solution (1 μ g/ml) e lasciate per 30 minuti a temperatura ambiente. Infine, il vetrino è stato posto in contatto con la soluzione

cromogenica diaminobenzidina (DAB) (DAB substrato 1X Buffer e DAB cromogeno 1X, in H₂O₂ 1X) fino al raggiungimento dell'intensità di colorazione desiderata (marrone scuro). La reazione è stata bloccata immergendo i vetrini in acqua. Il vetrino può essere allestito in glicerolo:TBS 9:1 dopo l'eventuale controcolorazione con ematossilina acida (blu scuro).

La misurazione dei livelli di apoptosi avviene calcolando la percentuale di nuclei apoptotici (nuclei marrone scuro) contro il numero di nuclei totale di cellule valutate in esperimenti indipendenti.

Mineralizzazione

Per valutare la formazione di noduli di mineralizzazione, le colture di osteoblasti umani primari sono mantenute in terreno di coltura osteogenico (α MEM addizionato di: siero fetale bovino FBS al 10%, 50 μ g/mL Acido Ascorbico, 10mM β -glicerofosfato e 100nM Dexametasone). Al termine del trattamento decoy e cellule vengono fissate per 1 ora con etanolo 70% e lavate con PBS 1X; successivamente viene aggiunta una soluzione 40mM "Alizarin Red Solution" (pH 4,1-4,3) per 15' a temperatura ambiente. Le cellule vengono poi lavate per cinque volte con acqua distillata e incubate in PBS 1X per 15', la presenza di noduli di mineralizzazione è evidenziata dall'intensa colorazione rossa. Le piastre vengono asciugate all'aria e osservate al microscopio di Leitz.

Analisi statistica

I dati sono stati mostrati come la media più o meno SEM (Errore Standard della media) di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata eseguita attraverso l'analisi della varianza a "una coda" seguita dal test t di Student.

Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

1. ANALISI BIOINFORMATICA DEL PROMOTORE F DI ER α
2. DESCRIZIONE DEL MODELO CELLULARE SaOS-2
 - 2.1. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE ER α , RUNX2, AP-1 E NFATc1
3. ANALISI FUNZIONALE DEL PROMOTORE F
4. IL RUOLO DELLE PROTEINE ER α , RUNX2, AP-1 E NFATc1 NEL PROMOTORE F DEL GENE DI ER α
 - 4.1. RUNX2
 - 4.1.1. ANALISI *IN VIVO* DELL'INTERAZIONE DI RUNX2 AL PROMOTORE F
 - 4.1.2. ANALISI *IN VITRO* DELL'INTERAZIONE DI RUNX2 AL PROMOTORE F
 - 4.1.3. L'EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI RUNX2
 - 4.1.4. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE ESOGENA DI RUNX2 SULL'ATTIVITA' DEL PROMOTORE F
 - 4.1.5. VALUTAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE DEI SITI RUNX2 MEDIANTE MUTAGENESI SITO-SPECIFICA
 - 4.2. ER α E AP-1
 - 4.2.1. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE ESOGENA DI ER α SULL'ATTIVITA' DEL PROMOTORE F
 - 4.2.2. ANALISI *IN VIVO* DELL'INTERAZIONE DI ER α E AP-1 AL PROMOTORE F
 - 4.2.3. ANALISI *IN VITRO* DELL'INTERAZIONE DI ER α E AP-1 AL PROMOTORE F
 - 4.2.4. VALUTAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE DEI SITI ER α E AP-1 MEDIANTE MUTAGENESI SITO-SPECIFICA
 - 4.3. NFATc1
 - 4.3.1. BACKGROUND

4.3.2. ANALISI *IN VITRO* DELL'INTERAZIONE DI NFATc1 AL PROMOTORE F

4.3.3. STRATEGIA DECOY

4.3.4. ANALISI DELL'EFFETTO DELLA DEPLEZIONE DI NFATc1 MEDIANTE
DECOY

4.3.5. ANALISI *IN VIVO* DELL'INTERAZIONE DI NFATc1 AL PROMOTORE F E AL
PROMOTORE C.

4.3.6. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SULLA FUNZIONE DI ER α

1. ANALISI BIOINFORMATICA DEL PROMOTORE F DI ER α

Come già descritto nell'introduzione, è noto che la trascrizione del gene ER α nelle cellule di osso è diretta dal promotore F, l'unico promotore attivo in questo tessuto (Denger et al, 2001a; Lambertini et al, 2003).

La caratterizzazione di questo promotore e la comprensione del ruolo di proteine specifiche che, legando precisi cis elementi, regolano l'espressione del gene ER α è ancora incompleta. Gli esperimenti descritti in questa tesi, si sono focalizzati sull'analisi di una sequenza del promotore F di circa 800 bp localizzata tra -117884 e -117014 bp dal sito canonico di inizio della trascrizione +1. Questa regione manca della sequenza canonica TATA box, ma presenta una sequenza ricca di TA (TAAAAATA), denominata TATA-like box, e una sequenza canonica CCAAT (figura 6).

L'analisi per la ricerca di siti per fattori trascrizionali, è stata compiuta impiegando il programma MatInspector V2.2 TRANSFAC 4.0 e ha rilevato la presenza di potenziali siti di legame per specifici fattori trascrizionali che vengono di seguito commentati (figura 6).

Sono stati individuati tre potenziali siti di legame per Runx2, fattore essenziale nel differenziamento osteoblastico, denominati Runx2 (a) -117864, Runx2 (b) -117746 e Runx2 (c) -117626. Come mostrato in figura 7 il sito Runx2 (a) presenta un'omologia del 100% con la sequenza consensus (5'-AACCACA-3'), mentre i siti Runx2 (b) e Runx2 (c) (5'-AACCTCA-3') presentano un'omologia dell'85%.

L'analisi ha rilevato, inoltre, la presenza di un ½ sito ERE (half estrogen responsive element) (5'-GGTCA-3', a -117181), e di numerosi siti per la proteina AP-1 con differente omologia rispetto alla sequenza canonica.

La nostra attenzione si è rivolta alla caratterizzazione del sito ERE, la cui sequenza coincide con quella di un mezzo sito AP-1 (5'-GTCA-3', a -117180) (Bergman et al., 2003), e del sito AP-1 più prossimo, indicato in figura 7 come AP-1 (1) (5'-TGAGTTA-3', a -117207), in ragione del fatto che elementi della famiglia AP-1 (Petz et al., 2002b; Garcia-Arencibia et al.,

2005) possono interagire con ER α . L'ipotesi di partenza è stata pertanto che il promotore F venisse regolato da ER α stesso e da membri della famiglia AP-1.

Dall'analisi bioinformatica emerge anche la presenza di un potenziale sito di legame per il fattore trascrizionale NFATc1 (5'-ATTCCTA-3'), recentemente descritto come regolatore importato nel differenziamento osteoblastico oltre che osteoclastico, posizionato a ridosso del sito ½ ERE.

Sono stati individuati inoltre altri siti di legame per TFs che svolgono un ruolo critico nel differenziamento osteoblastico, nella formazione della struttura ossea e nell'organogenesi, tra cui: sei siti per la proteina Ets e due siti per Lef-1. Mancano invece i siti Sp1.

In figura 6 e 7 sono riportate le collocazioni esatte, nella sequenza nucleotidica del promotore F, dei siti di legame su cui è stata effettuata l'analisi.

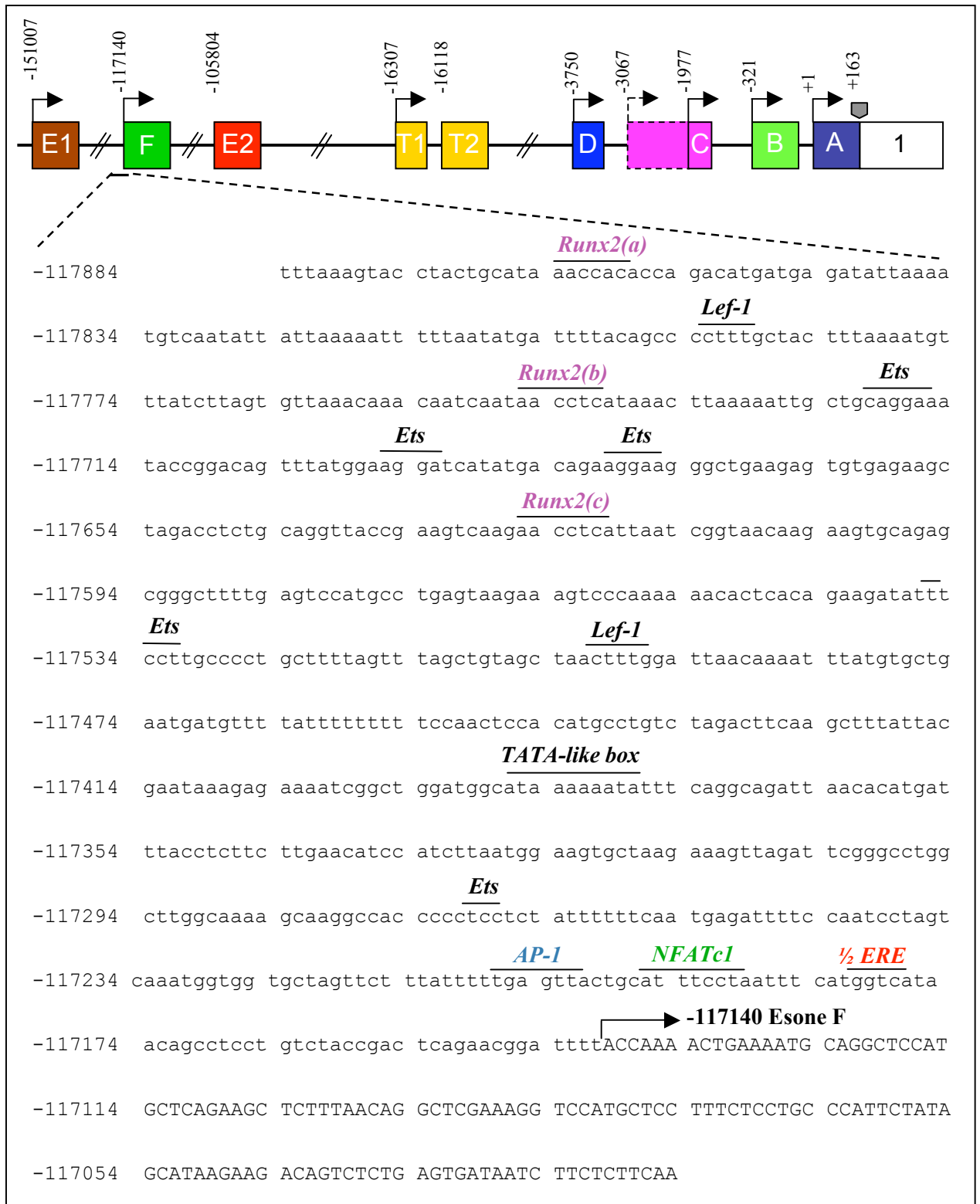


Figura 6. Rappresentazione della regione del promotore F analizzata in questa tesi. Nella parte alta è riportata la schematizzazione della regione 5' del gene ER α . Le frecce indicano i siti di inizio della trascrizione degli esoni corrispondenti appartenenti alla regione 5'. In relazione al sito di inizio della trascrizione dell'esone F (corrispondente a -117140 basi dal sito canonico di inizio della trascrizione collocato nell'esone 1) è stata numerata la sequenza a monte. Le sequenze sottolineate corrispondono ai siti legame per il fattore trascrizionale indicato.

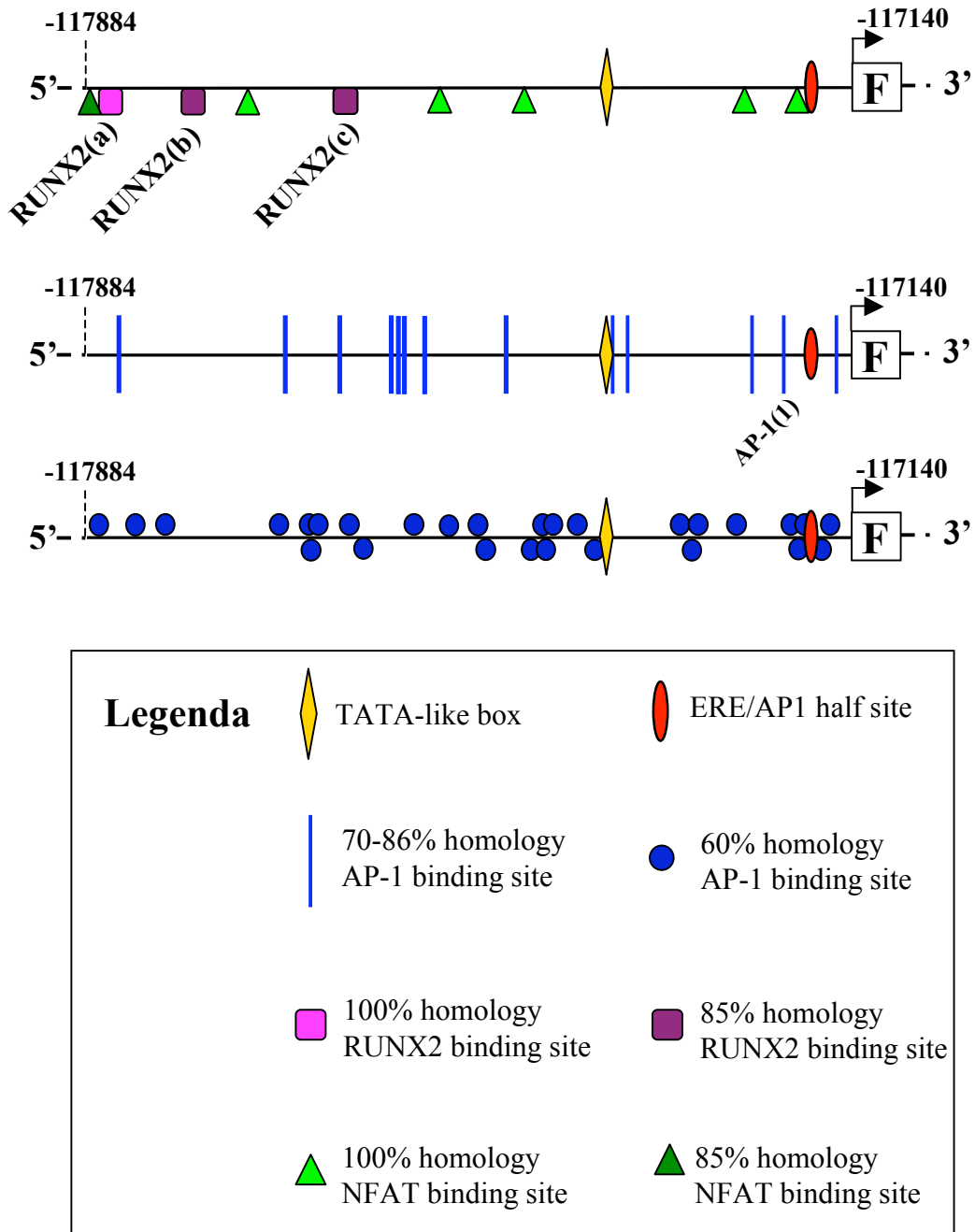


Figura 7. Schema della localizzazione dei potenziali siti di legame per i fattori trascrizionali Runx2, ER α , AP-1 e NFATc1 nel promotore F. Rappresentazione schematica della localizzazione di potenziali siti di legame per alcuni fattori trascrizionali nella regione del promotore F tra -117,884 e -117,140 bp (numerazione intesa dal sito canonico di inizio della trascrizione (+1)). L'analisi per la ricerca di siti per fattori trascrizionali, compiuta impiegando il programma MatInspector V2.2 TRANSFAC 4.0, ha rilevato la presenza di tre siti per Runx2, due dei quali presentano una base di mismatch (85% di omologia rispetto alla sequenza consensus), molti siti AP-1 (70-86% di omologia) o 3 (60% di omologia) con 1-2 basi di mismatch rispetto alla sequenza consensus 5'-TGAC/GTCA, un sito responsivo all'estrogeno nella forma di un mezzo sito ERE (5'-GGTCA-3') coincidente con un mezzo sito AP-1 (5'-GTCA-3'), sei siti per NFATc1, di cui solo uno presenta due basi di mismatch rispetto agli altri siti (85% di omologia), e un elemento simile alla TATA box. La lettera maiuscola F indica l'esone F. Sono riportati tre disegni della stessa regione con l'unico scopo di rendere piú semplice la lettura dei simboli che identificano i vari siti di legame.

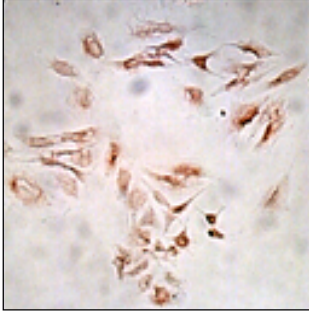
2. DESCRIZIONE DEL MODELLO CELLULARE SaOS-2

Come modello sperimentale si è scelto di lavorare con la linea cellulare SaOS-2, cellule di osteosarcoma umano che vengono classicamente impiegate come cellule osteoblasto-simili. Queste cellule hanno un fenotipo ben differenziato, caratterizzato da elevati livelli di fosfatasi alcalina, da un basso indice proliferativo e da un'evidente capacità di formare noduli mineralizzati (Lin et al., 2004). Inoltre queste cellule presentano bassi livelli di ER α suscettibili pertanto di incremento da parte di particolari modulazioni.

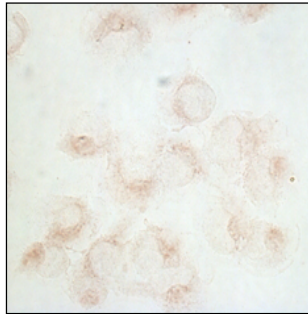
La presenza della proteina ER α è stata valutata mediante immunocitochimica nelle cellule SaOS-2 e come controllo in una linea cellulare ER α negativa, MDA-MB-231 e in una linea ER α positiva, MCF7, di cellule di carcinoma mammario. Le cellule sono state incubate con l'anticorpo contro ER α (H222). In figura 8 sono riportate le immagini relative a questa analisi: le cellule SaOS-2 presentano la proteina con localizzazione marcatamente nucleare e perinucleare ma anche leggermente citoplasmatica, come le MCF7, mentre le cellule MDA-MB-231 risultano completamente negative.

ER α

SaOS-2



MDA-MB-231



MCF7

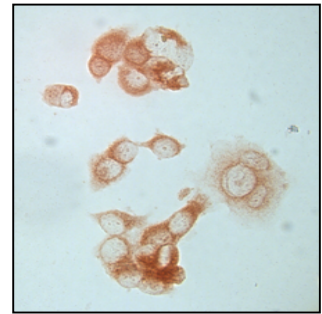


Figura 8. Analisi immunocitochimica dell'espressione di ER α in cellule SaOS-2 MDA-MB-231 e MCF7. Le immagini sono state ottenute al microscopio ottico con un ingrandimento 20X.

Le stesse cellule sono state sottoposte all'analisi dei livelli di mRNA per ER α . Mediante l'uso di due sonde specifiche che riconoscono una il trascritto totale (Totale) e l'altra (Forma F) l'isoforma F, l'RT-PCR quantitativa ha messo in evidenza (figura 9) come, nelle cellule SaOS-2, i livelli di mRNA di ER α totale siano pressochè sovrapponibili con quelli dell'isoforma F. Questo indica che il messaggero di ER α è costituito prevalentemente dall'isoforma F. Le cellule MDA-MB-231, essendo ER α negative, come atteso, non presentano livelli apprezzabili di mRNA per ER α , al contrario delle cellule MCF7 le quali presentano livelli molto più alti di messaggero totale rispetto alla forma F.

Inoltre nelle cellule SaOS-2 coltivate in presenza di 17- β -estradiolo (+ E2), i livelli di mRNA di ER α totale sono più alti rispetto a quelli che si riscontrano in cellule coltivate in assenza (- E2) di estrogeno. Questo dimostra che queste cellule sono sensibili all'estradiolo e che la trascrizione di ER α è influenzata dalla presenza dell'ormone estrogeno.

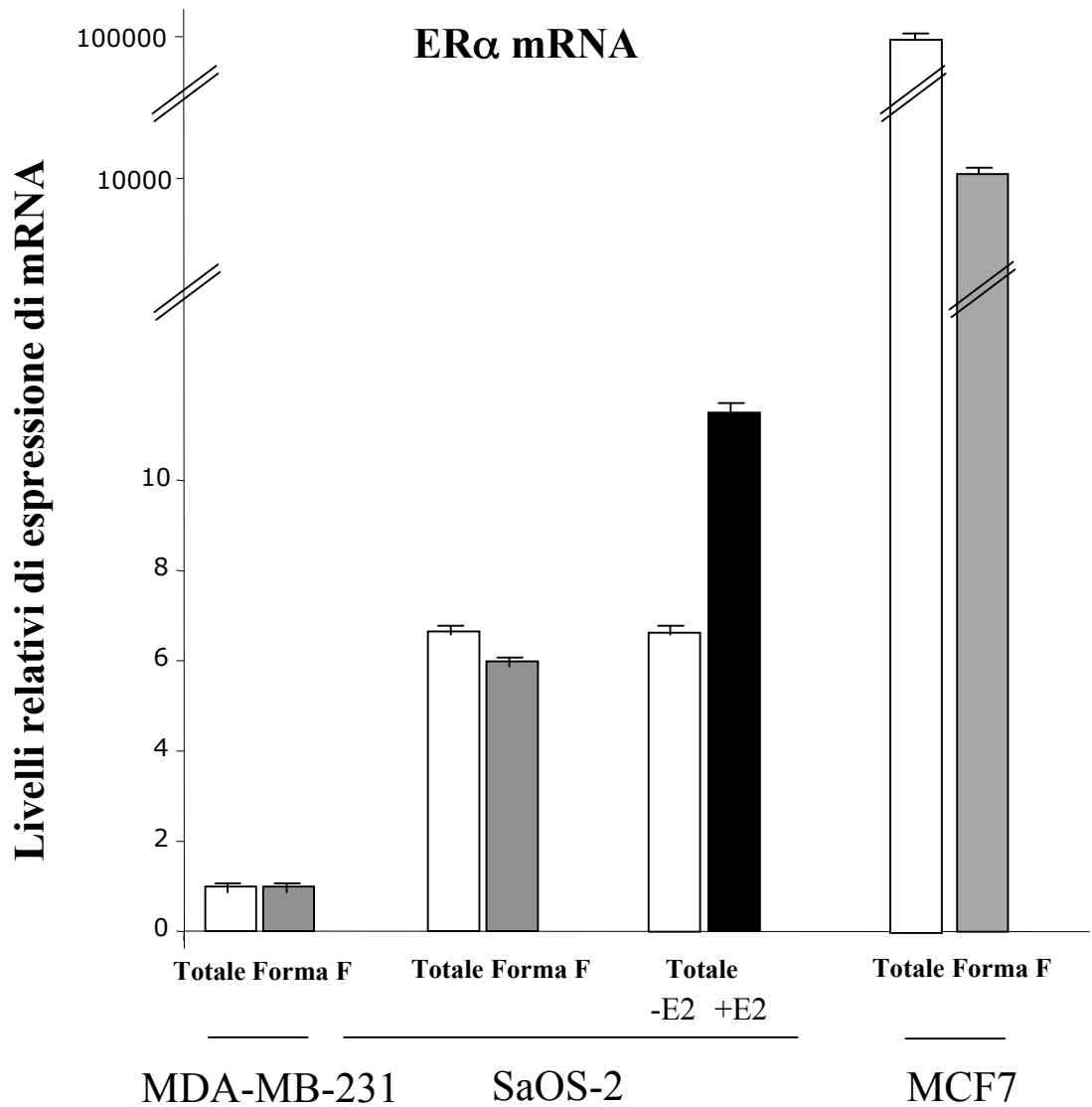


Figura 9. Analisi dell'espressione del gene ER α mediante RT-PCR quantitativa. Il cDNA ottenuto dalle cellule SaOS-2, coltivate in presenza (+ E2) e in assenza (- E2) di 17 β -estradiolo e il cDNA ottenuto dalle cellule MDA-MB-231 e MCF7 è stato sottoposto a RT-PCR quantitativa per valutare i livelli di mRNA di ER α totale (Totale) e di isoforma F (Forma F). I livelli di espressione sono stati normalizzati sulla base dell'espressione del gene di riferimento GAPDH.

2.1 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE ER α , RUNX2, AP-1 E NFATc1

L'espressione di ER α è stata quindi messa in relazione con i livelli di espressione proteica dei fattori trascrizionali oggetto di studio. A questo scopo sono stati caratterizzati, mediante Western blotting, gli estratti nucleari e cellulari delle cellule SaOS-2 coltivate in presenza di 17- β -estradiolo. Come mostra la figura 10, tutti i fattori presi in considerazione presentano livelli di espressione rilevanti. In particolare, le proteine ER α , c-jun e NFATc1 sono espresse ad alti livelli sia nel nucleo che nel citoplasma. L'espressione di c-fos e Fra-2 risulta, invece essere più abbondante a livello cellulare, mentre ATF-2 presenta una espressione prevalentemente nucleare.

Anche l'espressione di NFATc1, valutata a livello nucleare, e quella di Runx2, riferita a tutto il comparto cellulare, risultano rilevanti.

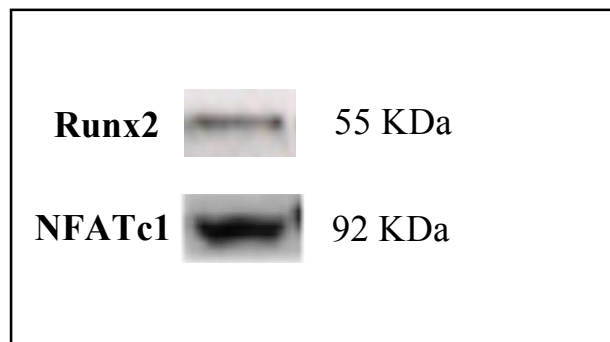
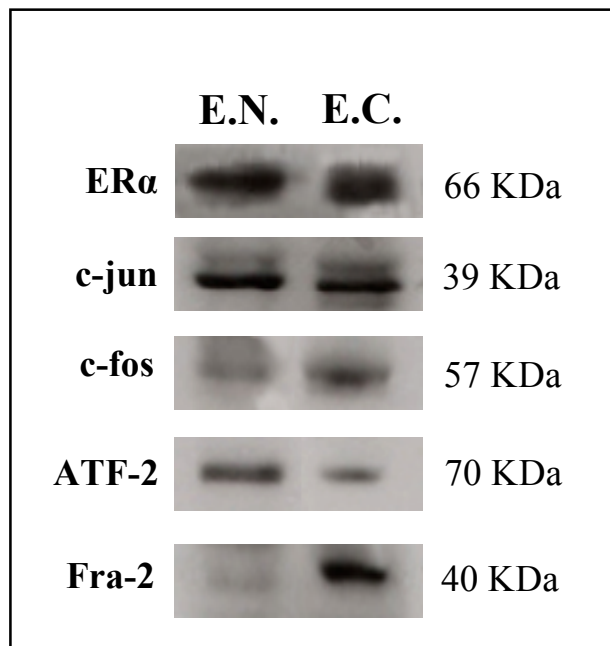


Figura 10. Analisi mediante Western blot dei livelli proteici di ER α , di alcuni dei membri della famiglia AP-1, di Runx2 e NFATc1 in cellule SaOS-2 coltivate in presenza di 17 β -estradiolo. Dopo elettroforesi in SDS-PAGE è stato eseguito un trasferimento in PVDF e ibridazione con gli anticorpi contro ER α , c-jun, c-fos, ATF-2, Fra-2, Runx2 e NFATc1. A lato sono riportati i pesi molecolari delle proteine.

E.N. = Estratti Nucleari di cellule SaOS-2

E.C. = Estratti Cellulari di cellule SaOS-2.

3. ATTIVITA' FUNZIONALE DEL PROMOTORE F

Per valutare l'attività del promotore F sono stati effettuati esperimenti di trasfezione transiente in cellule SaOS-2 e MCF-7. La sequenza completa di 862 bp, appartenente al promotore F e compresa tra -117884 e -117014 bp, è stata clonata nel vettore pGL3 Basic a monte del gene reporter per la luciferasi. Mediante delezioni progressive dell'estremità 5' dell'intera regione promotrice analizzata, sono stati generati altri tre costrutti di 411 bp, 272 bp e 180 bp rispettivamente.

Il costrutto 411 bp (-117426/-117014) privo della regione tra -117884 e -117426, manca dei siti Runx2, contiene la sequenza simile alla TATA-box (TATA-like box), il mezzo sito ERE, altri potenziali siti di legame per le proteine della famiglia AP-1 e quattro dei sei potenziali siti legame per NFATc1; il costrutto 272 bp invece, manca della TATA-like box, di due siti AP-1 e di due siti NFATc1; il costrutto di 180 bp mantiene solo il mezzo sito ERE, un sito AP-1 ed un sito NFATc1 (Figura 11). È stato generato anche un quarto costrutto denominato 451 (-117884 e -117426). Questo è privo della regione prossimale (-117426/-117014) e mantiene i tre siti di legame per Runx2, molti dei siti AP-1 e due siti NFATc1.

Le cellule SaOS-2 sono state quindi transfettate con i singoli costrutti in presenza (+) e in assenza (-) di estradiolo (E2) e sono state poi analizzate per il livello di attività luciferasica. Come risulta dal grafico riportato in figura 12 A, l'intera sequenza analizzata (costrutto 862 bp) mostra una debole ma misurabile attività promotrice nelle cellule SaOS-2. La maggiore attività luciferasica è presentata dal costrutto 411 bp. Tutti gli altri costrutti presentano, invece, un forte calo dell'attività luciferasica. In tutti i casi, però, la presenza dell'estradiolo favorisce un incremento (862, 411) o una ripresa (272, 451) dell'attività del promotore. Solo il costrutto 180 bp non risponde all'estradiolo: sembra che la perdita del sito AP-1 (1) sia responsabile di questo comportamento. Queste indicazioni suggeriscono che l'elemento AP-1

(1) possa essere importante per la responsività del promotore all'estradiolo mentre il mezzo sito ERE/AP-1 da soli non siano sufficienti.

Le cellule MCF-7 (figura 13), caratterizzate da alti livelli della proteina ER α derivante dalla trascrizione sotto il controllo di altri promotori non mostrano attività di nessuno dei costrutti analizzati, a conferma della specificità dell'evento trascrizionale. Anche cellule ER α negative MDA-MB-231 non mostrano alcuna attività luciferasica dopo trasfezione dei singoli costrutti.

Dagli esperimenti condotti possono essere ricavate le seguenti indicazioni:

- L'attività trascrizionale del promotore F è massima nella regione compresa tra -117426 e -117014;
- La regione -117426/-117286 è essenziale per sostenere l'attività del promotore, che è sicuramente legata alla presenza della sequenza TATA-like;
- Nella regione -117286/117014 sono presenti elementi funzionali in grado di mediare l'azione dell'estrogeno attraverso anche un meccanismo di autoregolazione che, potenzialmente, potrebbe essere esercitato in modo diretto e/o indiretto, mediante entrambe le sequenze di regolazione ERE e AP-1.
- Nella regione compresa tra -117884 e -117426 sono sicuramente contenuti elementi che esercitano effetti negativi sulla trascrizione.

Questo tipo di analisi è stata ripetuta anche su un'altra linea di osteosarcoma, le cellule MG63 e anche in colture primarie di osteoblasti umani (hOB) ottenute tramite coltura di frammenti ossei provenienti da espunti chirurgici. Una popolazione non completamente omogenea e aderente si origina spontaneamente dopo circa tre settimane di coltura dei frammenti. Come si può vedere dai risultati riportati in figura 12 B anche in queste cellule i costrutti mostrano la medesima attività riscontrata nelle cellule SaOS-2. I dati riferiti alle colture primarie (hOB) sono il risultato di esperimenti condotti su quattro colture provenienti da differenti frammenti.

Come per le cellule SaOS-2 anche per queste colture è stata inizialmente verificata la positività per l'espressione della proteina ER α mediante immunocitochimica.

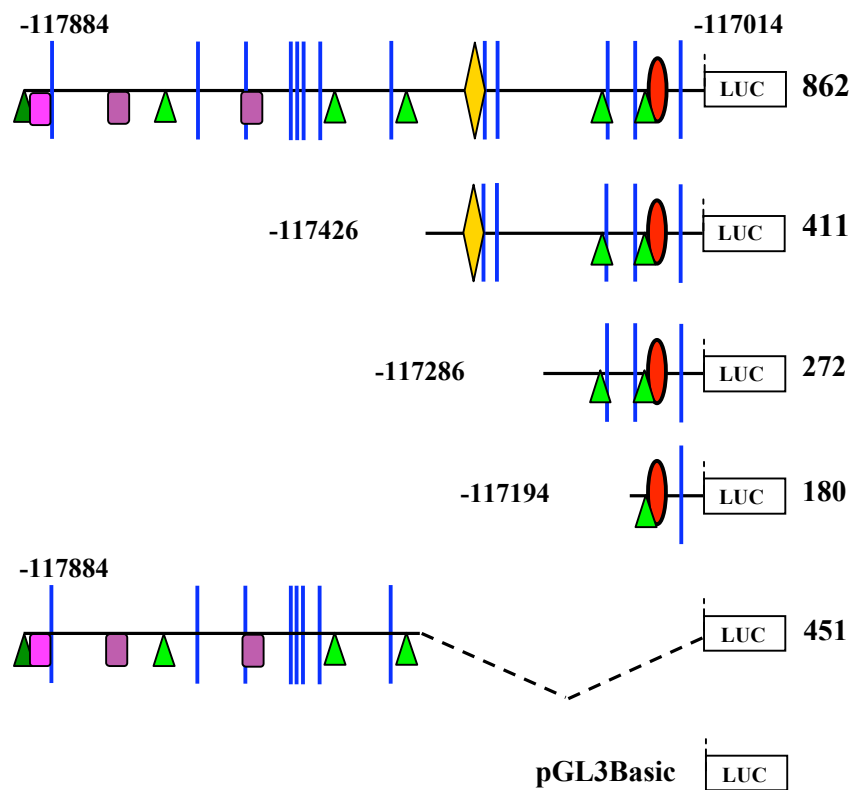


Figura 11. Rappresentazione schematica dei costrutti utilizzati negli esperimenti di trasfezione transiente. La sequenza di 862 paia di basi (-117884/-117014) è stata clonata nel vettore pGL3 basic, a monte del gene reporter per la luciferasi. 411, 272, 180 e 451 sono i costrutti contenenti i mutanti per delezione. Nelle regioni del promotore sono indicati potenziali siti di legame: $\frac{1}{2}$ ERE coincidente con il mezzo sito AP-1 (ovale rosso), AP-1 (linee verticali blu), Runx2 (quadrati rosa) e NFATc1 (triangoli verdi).

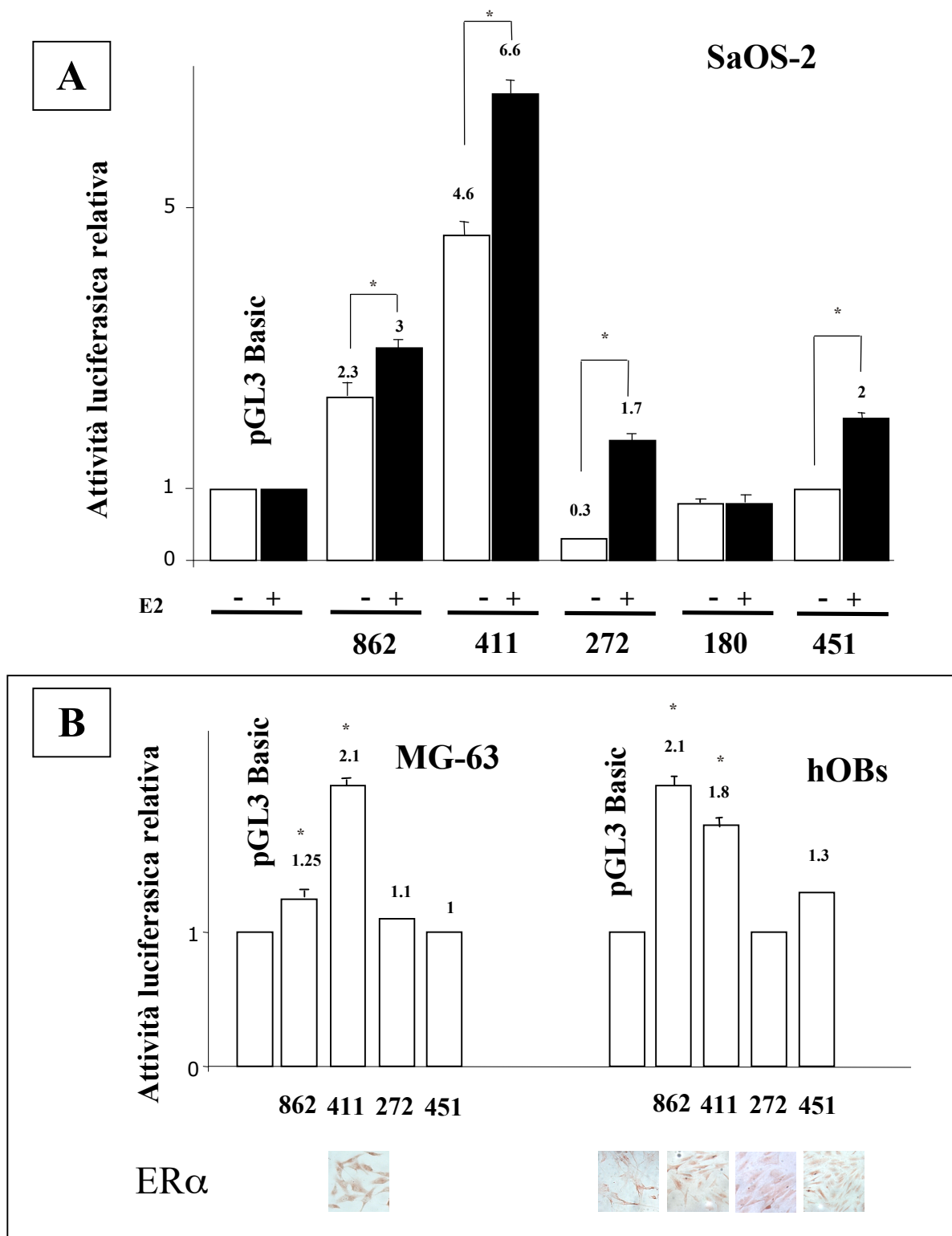


Figura 12. Analisi dell'attività luciferasica. A Analisi effettuata dopo trasfezione dei costrutti indicati o del solo vettore vuoto (pGL3-Basic) in cellule SaOS-2, B MG63 e in colture primarie di osteoblasti umani (hOBs). Dove indicato gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza (-) o presenza (+) di 17- β -estradiolo 10^{-8} M. I valori sono espressi in unità relative di luciferasi. Le immagini riportate rappresentano i livelli di espressione di ER α ottenuti mediante analisi immunocitochimica e fotografate al microscopio ottico con un ingrandimento 40X. La significatività è indicata con * ($P < 0,05$) rispetto al controllo (pGL3Basic) oppure tra altre coppie di dati dove specificato.

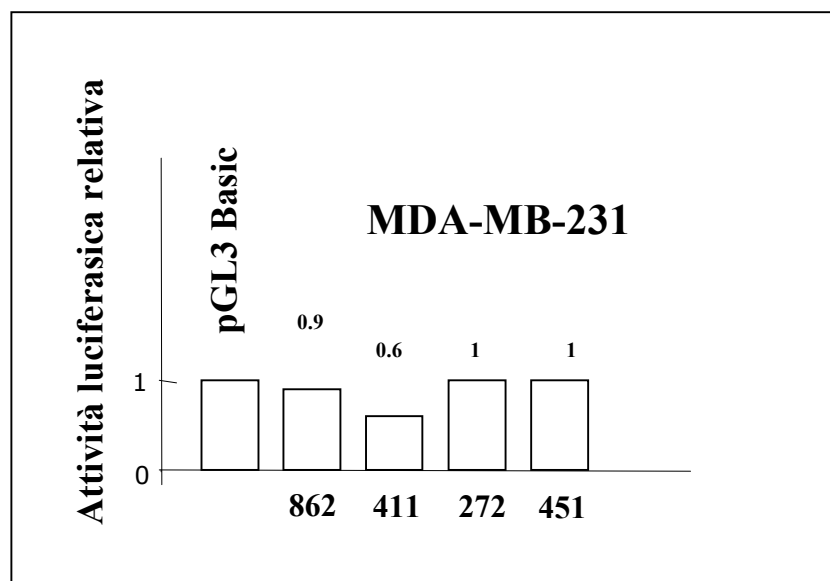
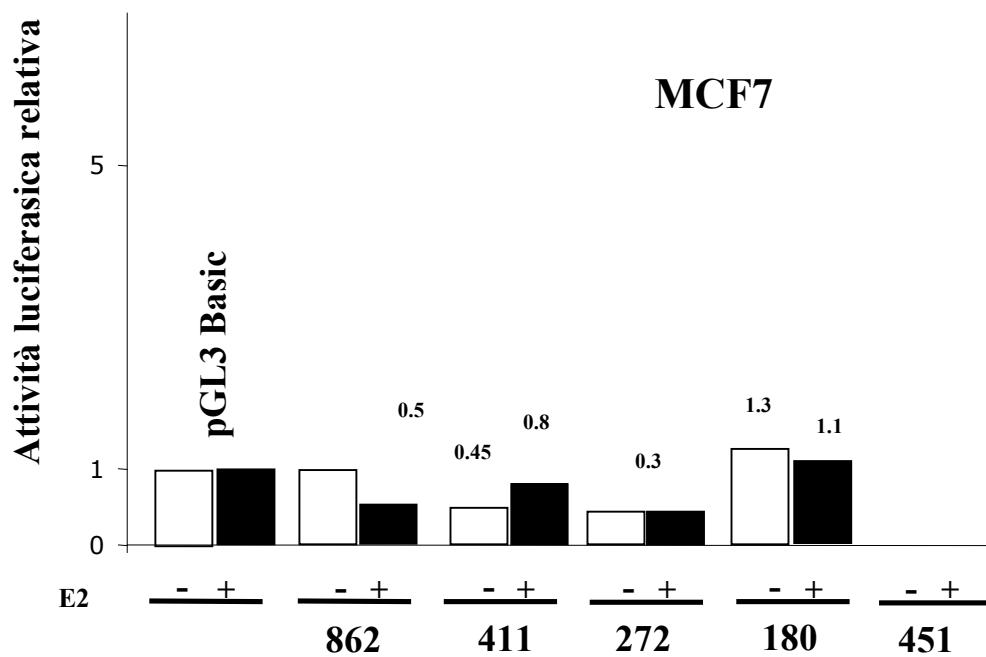


Figura 13. Analisi dell'attività luciferasica dopo trasfezione dei costrutti indicati o del solo vettore vuoto (pGL3-Basic) in cellule MCF7 e MDA-MB-231. Dove indicato gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza (-) o presenza (+) di 17- β -estradiolo 10^{-8} M. I valori sono espressi in unità relative di luciferasi.

4. IL RUOLO DELLE PROTEINE ER α , RUNX2, AP-1 E NFATc1 NEL PROMOTORE F DEL GENE DI ER α

4.1. RUNX2

4.1.1. ANALISI *IN VIVO* DELL'INTERAZIONE DI RUNX2 AL PROMOTORE F

Allo scopo di analizzare possibili interazioni del fattore trascrizionale Runx2 con il promotore F *in vivo*, è stata utilizzata la tecnica della immunoprecipitazione della cromatina (ChIP).

Le cellule SaOS-2 ed MDA-MB-231 sono state trattate con formaldeide al 1% e poi lisate. La cromatina purificata e frammentata attraverso la sonicazione è stata messa in contatto con l'anticorpo specifico per Runx2, con l'anticorpo per il fattore ubiquitario TFIIB, e in assenza di anticorpo (NoAb). Parte della cromatina iniziale è stata prelevata prima della immunoprecipitazione per costituire il controllo positivo di PCR (input).

In figura 14 sono riportati i risultati della PCR effettuata con una coppia di primers specifici per la regione del promotore F che contiene i siti di legame per Runx2. Come si può osservare, il prodotto amplificato (210 bp) è evidenziabile unicamente nel materiale immunoprecipitato con l'anticorpo specifico per Runx2 proveniente dalle cellule SaOS-2 (linea 5) e non in quello proveniente dalle cellule MDA-MB-231 (linea 6). Questo significa che il fattore Runx2 è in grado di interagire, *in vivo*, con il promotore F, nella regione che presenta i tre siti di legame, nelle cellule SaOS-2 e non nelle cellule MDA-MB-231. Come atteso l'amplificazione è stata ottenuta anche nel materiale input di SaOS-2 (linea 1) e MDA-MB-231 (linea 2), e non nel materiale immunoprecipitato in assenza di anticorpo (NoAb) di SaOS-2 (linea 3) e MDA-MB-231 (linea 4).

Nella parte inferiore della stessa figura sono riportati i risultati della PCR effettuata con primers specifici per una regione del promotore del gene costitutivo gliceraldeide-3-fosfo-deidrogenasi, che produce un frammento di 166 bp. L'amplificazione, effettuata nel materiale immunoprecipitato con l'anticorpo anti-TFIIB, è evidente in entrambe le linee cellulari (linea 5 e 6) dimostrando che la capacità di immunoprecipitare le proteine è paragonabile nei due

tipi cellulari. Anche in questo caso il materiale input è stato amplificato (linea 1 e 2), a differenza del materiale immunoprecipitato in assenza di anticorpo (NoAb) (linea 3 e 4).

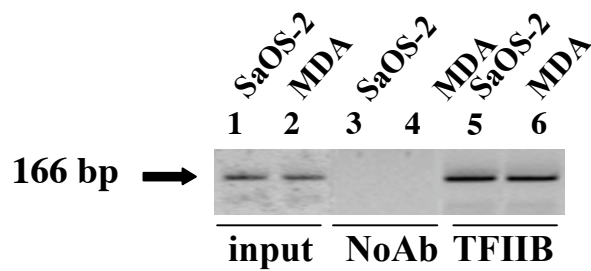
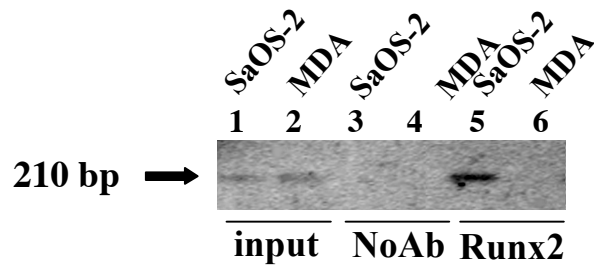
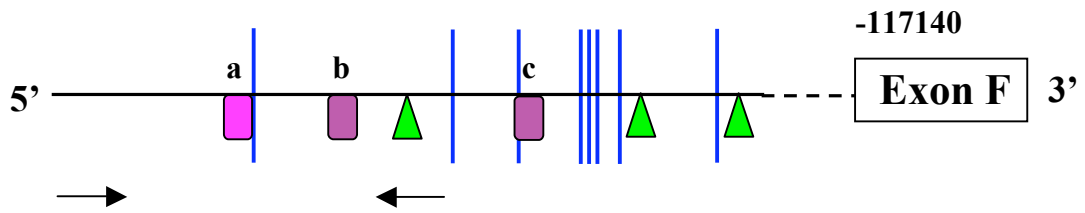


Figura 14. Saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP). Colture cellulari di SaOS-2 ed MDA-MB-231 sono trattate con formaldeide all'1% in modo da fissare le proteine al DNA. Un'aliquota è mantenuta inalterata e costituisce il controllo positivo *input* (DNA totale della cellula). La restante cromatina è immunoprecipitata con l'anticorpo anti-Runx2 e con l'anticorpo anti-TFIIB e in assenza di anticorpo. Una reazione di PCR è quindi allestita con primers che amplificano la regione del promotore F contenente i siti di legame per Runx2 (schematizzati nella figura in alto) di 210 bp, nel materiale *input* (linee 1 e 2), nella cromatina che non ha avuto contatto con nessun anticorpo (NoAb) (linee 3 e 4) e nella cromatina immunoprecipitata con l'anticorpo anti-Runx2 (linee 5 e 6). Lo stesso procedimento è stato applicato con primers che amplificano una regione del promotore del gene per la gliceraldeide-3-fosforo-deidrogenasi e che origina un prodotto di 166bp.

4.1.2. ANALISI *IN VITRO* DELL'INTERAZIONE DI RUNX2 AL PROMOTORE F

Allo scopo di identificare il ruolo dei tre diversi siti Runx2 presenti nella regione in esame e correlare il dato di legame *in vivo* con una specifica funzionalità del fattore trascrizionale, sono stati allestiti saggi di ritardo nella corsa elettroforetica (EMSA) combinati con saggi di “supershift”. Sono stati impiegati estratti nucleari di SaOS-2 e tre oligonucleotidi “double strands” specifici per ciascun sito. Le sequenze sono riportate in tabella 7.

OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENZA
Runx2 (a)*	5'-gcata aaccaca ccagacat-3'
Runx2 (b)*	5'-tcaata aacctca taaactt-3'
Runx2 (c)*	5'-agtcaag aacctca ttaatc-3'
“scramble”	5'-cacaagtgtaacagtct-3'

Tabella 7. Rappresentazione delle sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per l'analisi EMSA. I tre oligonucleotidi marcati Runx2 (a)*, Runx2 (b)*, Runx2 (c)* corrispondono alla sequenza “core” più alcune basi in 5' ed in 3' dei siti di legame per Runx2 localizzati nel promotore F di ER α . L'oligonucleotide “scramble” è utilizzato come sequenza non correlata alle altre tre.

Risultati rappresentativi di queste reazioni sono riportati in figura 15 e dimostrano che gli oligonucleotidi corrispondenti ai tre siti Runx2 sono in grado di interagire con gli estratti nucleari delle cellule SaOS-2 con un pattern specifico per ogni oligonucleotide. Questo suggerisce che le sequenze dei tre oligonucleotidi Runx2 (a), Runx2 (b) e Runx2 (c) sono potenzialmente in grado di legare proteine nucleari differenti. In ogni caso i legami sono specifici, come attestato dal mantenimento dello stesso pattern dopo incubazione con l'oligonucleotide non correlato (linee 4) e dal suo spiazzamento dopo incubazione con un

eccesso di oligonucleotide specifico non marcato (linee 3). La presenza di Runx2 nelle proteine di legame al DNA è stata indagata eseguendo le stesse reazioni di EMSA in presenza di un anticorpo anti-Runx2. Come risulta dalle linee 5 queste reazioni sono in grado di produrre un ulteriore rallentamento nella migrazione elettroforetica (“supershift”) che è molto evidente con l’oligonucleotide Runx2 (a) e decisamente meno con l’oligonucleotide Runx2 (b). Al contrario il supershift non avviene con l’oligonucleotide Runx2 (c). L’impiego di un anticorpo non specifico (linee 6) non produce in alcun caso un supershift dimostrando che il legame del fattore trascrizionale Runx2 è specifico.

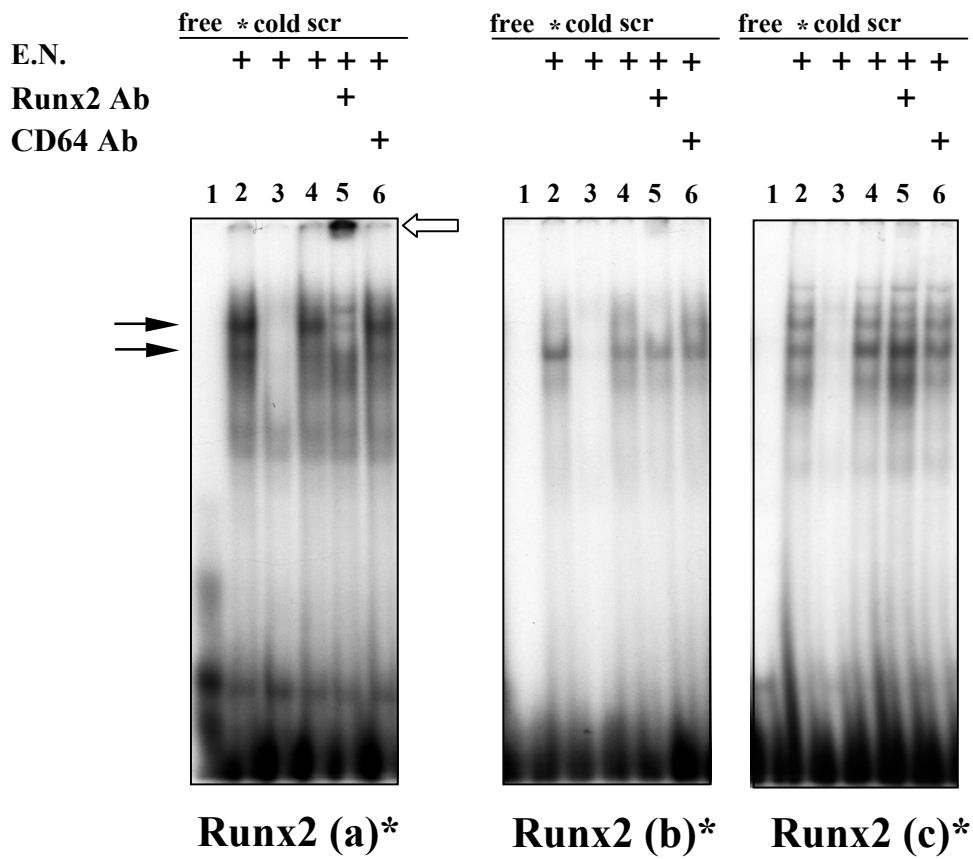


Figura 15. Saggio di ritardo della mobilità elettroforetica (EMSA) su Runx2 (a)*, Runx2 (b)* e Runx2(c)* con estratti nucleari di SaOS-2. Su gel di poliacrilammide al 6% sono stati fatti migrare gli oligonucleotidi marcati Runx2 (a)*, Runx2 (b)* e Runx2(c)* in assenza (linee 1) e in presenza (linee 2-6) di estratti nucleari (E.N.) di cellule SaOS-2. Gli esperimenti sono stati condotti in presenza di un eccesso (100 volte) dell'oligonucleotide corrispondente non marcato (linee 3) o di un oligonucleotide non correlato (scramble linee 4), in presenza dell'anticorpo contro Runx2 (linee 5) o CD64 (linee 6).

L'interazione Runx2-promotore F è stata ulteriormente indagata mediante esperimenti di mutazione sito-specifica introducendo mutazioni nei due siti Runx2 che avevano dimostrato una capacità certa di legare il fattore trascrizionale, e cioè i siti (a) e (b). A questo scopo il sito (b) è stato trasformato nella sequenza consenso del sito (a), mentre introducendo nel sito (a) una T al posto di una A, è stato trasformato il sito (a) nel sito (b). In tabella 8 sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi mutati usati nel saggio EMSA.

OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENZA
Runx2 (a) mt*	5'-gcata aaccTca ccagacat-3'
Runx2 (b) mt*	5'-tcaata aaccAca taaactt-3'

Tabella 8. Rappresentazione delle sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per l'analisi EMSA. Gli oligonucleotidi marcati corrispondono alla sequenza core mutata più alcune basi in 5' ed in 3' dei siti di legame per Runx2 (a) e (b) localizzate nel promotore F di ER α . La mutazione di una singola base è indicata con lettera maiuscola rispetto alle altre basi della sequenza.

I risultati del saggio EMSA riportati in figura 16 dimostrano come l'oligonucleotide Runx2 (a) mt sia in grado di legare fattori nucleari solo molto debolmente, al contrario l'oligonucleotide Runx2 (b) mt acquisisce la capacità di legare in modo molto forte fattori nucleari di cellule SaOS-2. Inoltre la presenza di un evidente rallentamento di banda dopo incubazione con l'anticorpo specifico contro Runx2 conferma che questa sequenza mutata in una sola base è in grado di legare in modo specifico il fattore trascrizionale Runx2.

Questi dati rafforzano l'ipotesi che il contesto del sito Runx2 (a) sia quello maggiormente coinvolto nel legame tra Runx2 e il promotore F.

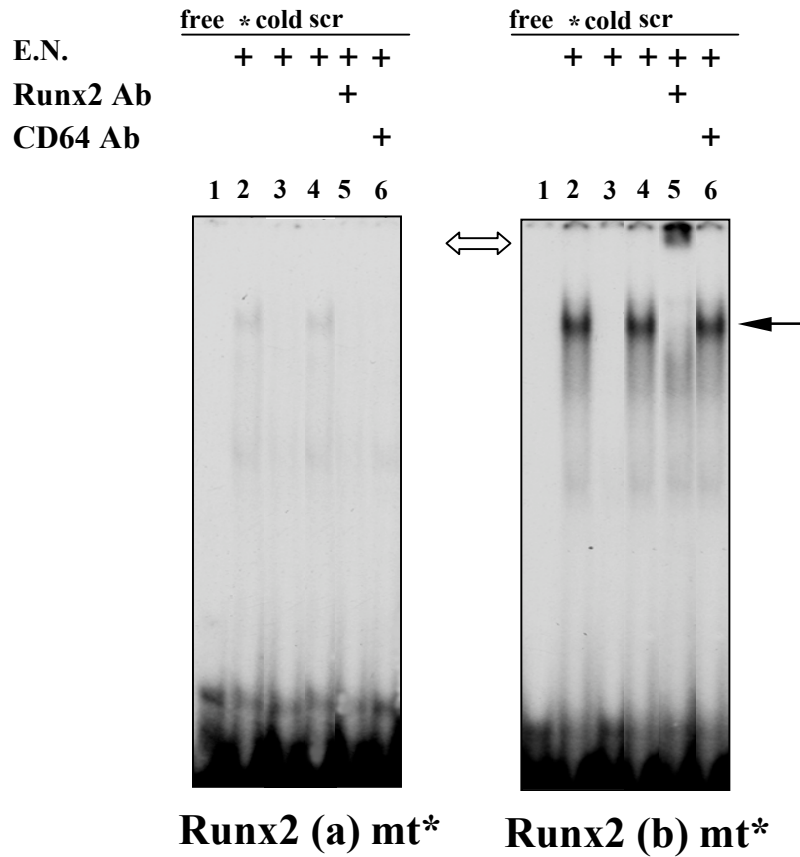
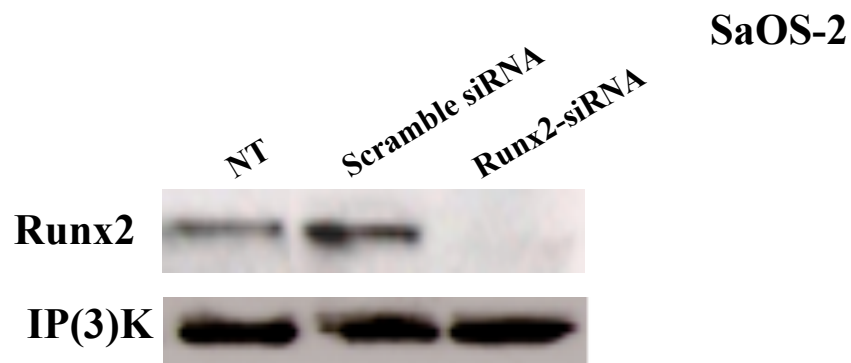


Figura 16. Saggi EMSA su Runx2 (a) mt* e Runx2 (b) mt* con estratti nucleari di SaOS-2. Su gel di poliacrilammide al 6% sono stati fatti migrare gli oligonucleotidi Runx2 (a) mt* e Runx2 (b) mt* mutati in assenza (linee 1) e in presenza di estratti nucleari (E.N.) di cellule SaOS-2 (linee 2-6). Gli esperimenti sono stati condotti in presenza di un eccesso (100 volte) dell'oligonucleotide corrispondente non marcato (linee 3) o non relato (scramble linee 4), in presenza dell'anticorpo contro Runx2 (linee 5) o CD64 (linee 6). Hela (linee 1-2) e di un eccesso (100 volte) dell'oligonucleotide corrispondente non marcato (linee 2).

4.1.3. L'EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI RUNX2

L'approfondimento del ruolo di Runx2 sulla regolazione trascrizionale di ER α è proseguito studiando l'effetto della sua deplezione. Il silenziamento di Runx2 è stato ottenuto trattando le cellule SaOS-2 con l'oligonucleotide "interference" contro Runx2 (Runx2-siRNA) per due volte a distanza di 48 ore. Il silenziamento del gene Runx2 è stato confermato mediante analisi di Western Blot (figura 17 A). La specificità della sequenza utilizzata nella metodica interference è stata dimostrata effettuando lo stesso trattamento con un oligonucleotide "scramble" il quale non produce alcuna alterazione nell'espressione di Runx2 (figura 17 A). Entrambi gli oligonucleotidi non modificano l'espressione della proteina di controllo IP3K. L'effetto del silenziamento è stato quindi indagato sull'attività del promotore F. In figura 17 B è riportato il risultato del saggio di attività dei costrutti 862 e 451 trasfettati in cellule SaOS-2 in combinazione con Runx2-siRNA: è interessante notare come l'attività luciferasica dei due costrutti aumenta in modo significativo in seguito al silenziamento. Da questi dati emerge chiaramente un ruolo prevalentemente negativo di Runx2 sul promotore F. Questo è stato confermato dai dati riportati in figura 18, dove si nota come la soppressione di Runx2 produca un aumento notevole dell'espressione di ER α , sia a livello di messaggero, rilevato tramite RT-PCR quantitativa (figura 18 A), che a livello di proteina rilevata mediante Western Blot (figura 18 B). In entrambi i casi l'oligo "scramble" non produce effetti.

A



B

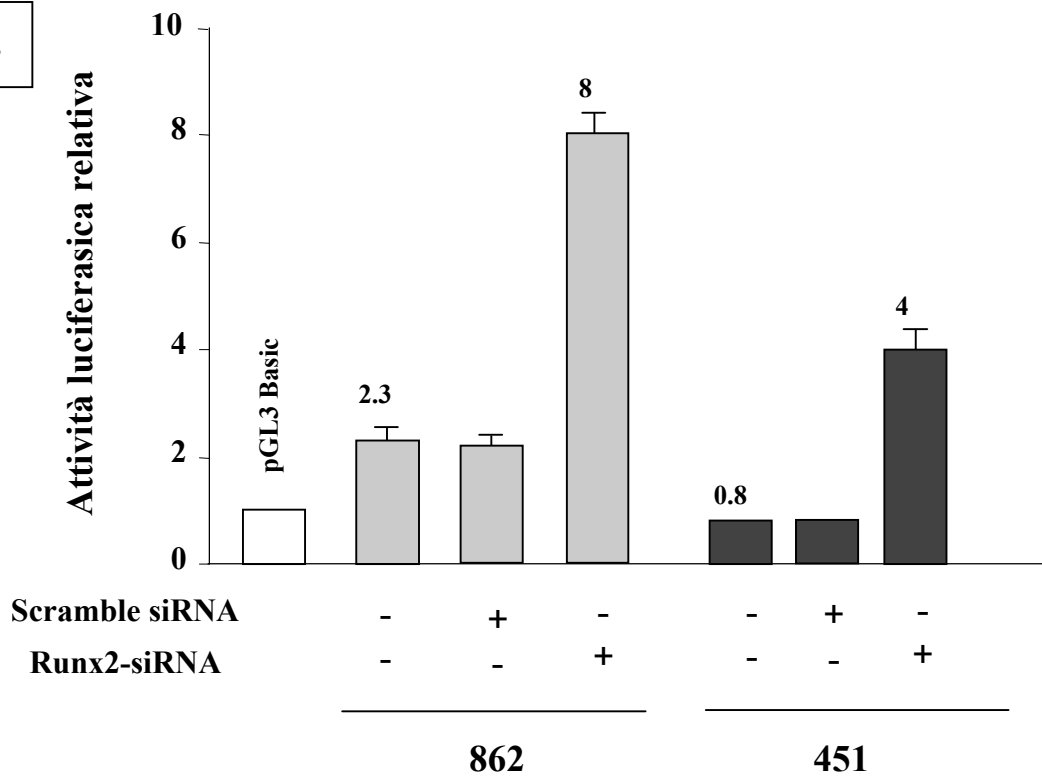


Figura 17. Analisi dell'espressione della proteina Runx2 e dell'attività luciferasica dopo trattamento con siRNA contro Runx2. **A** La figura illustra l'analisi dell'espressione delle proteine Runx2 e IP3K mediante Western Blott su estratti cellulari totali di cellule SaOS-2, sottoposte a trattamento con siRNA contro Runx2 (Runx2-siRNA), con un oligonucleotide non correlato (scr) e non trattate (NT). I lisati totali sono caricati in gel di poliaccrilammide al 12% in uguali quantità (25 ug/lane) e le proteine separate con corsa elettroforetica sono state trasferite in PVDF ed è stata poi eseguita una ibridazione con gli anticorpi contro Runx2 e IP3K. **B** La figura illustra l'analisi dell'attività luciferasica dopo trasfezione dei costrutti indicati (862 e 451) o del solo vettore vuoto (pGL3-Basic) in cellule SaOS-2 non trattate o trattate con oligonucleotide scramble o con oligonucleotide siRNA contro Runx2. I valori sono espressi in unità relative di luciferasi.

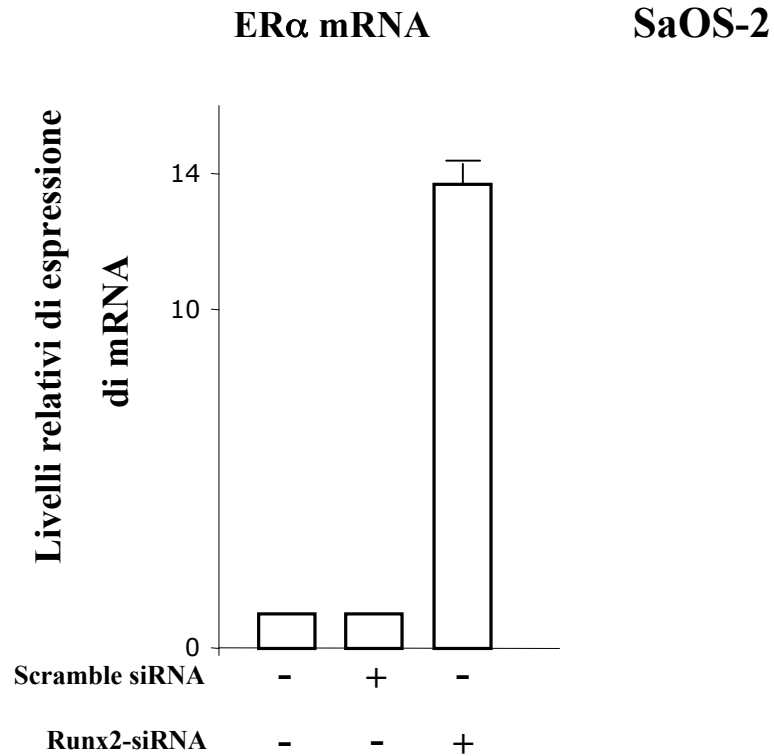
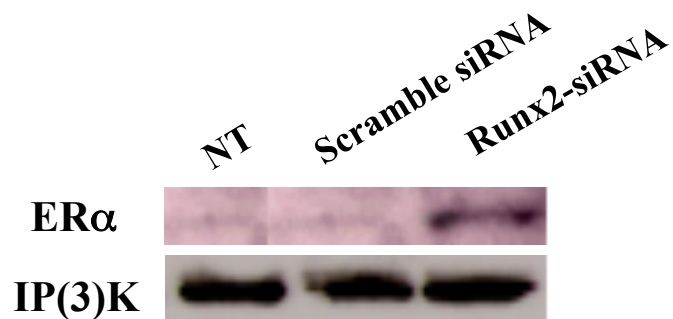
A**B**

Figura 18. Analisi dell'espressione del gene ER α mediante RT-PCR quantitativa e Western Blott dopo silenziamento della proteina Runx2. **A** Il cDNA ottenuto dalle cellule SaOS-2 non trattate (NT), trattate con un oligonucleotide non correlato (scr) e con siRNA contro Runx2 (Runx2-siRNA), è stato sottoposto a RT-PCR quantitativa per valutare i livelli di mRNA di ER α . I livelli di espressione sono stati normalizzati sulla base dell'espressione del gene di riferimento GAPDH. **B** L'analisi dell'espressione delle proteine ER α e IP3K è stata effettuata mediante Western Blot su estratti cellulari totali di cellule SaOS-2 non trattate (NT), trattate con un oligonucleotide non correlato (scr) e con siRNA contro Runx2 (Runx2-siRNA). I lisati totali sono caricati in gel di poliaccrilammide al 12% i uguali quantità (25 ug/lane) e le proteine separate con corsa elettroforetica sono state trasferite in PVDF ed è stata poi eseguita una ibridazione con gli anticorpi contro ER α e IP(3)K.

La funzionalità della proteina overespressa in seguito a Runx2-siRNA è stata dimostrata mediante saggio luciferasico dopo transfezione dell'oligo silenziante in combinazione con il vettore pGL2VIT3ERE in presenza di 17β -estradiolo. Questo classico saggio funzionale impiega un vettore che possiede a monte del gene reporter per la luciferasi tre copie della sequenza consensus per il fattore trascrizionale ER α (3 ERE) corrispondente a quello che si trova nel promotore del gene della vitellogenina, estradiolo dipendente. I dati presenti in figura 19 A indicano chiaramente come il silenziamento del gene Runx2 induca l'espressione di una proteina ER α che è a tutti gli effetti funzionale in quanto capace di attivare i propri elementi ERE.

Lo stesso silenziamento induce un incremento dell'espressione di un gene endogeno bersaglio di ER α , il gene per il recettore del progesterone (PR) (figura 19 B).

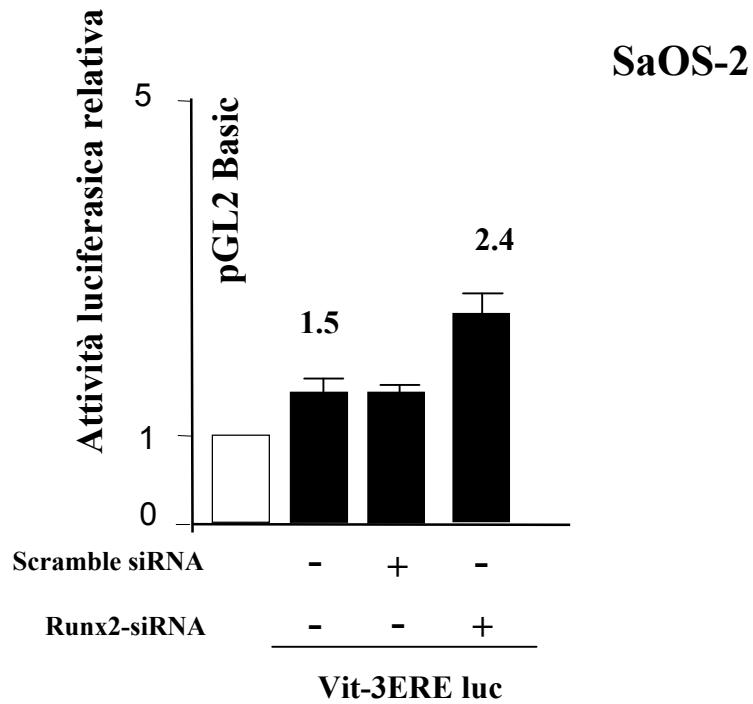
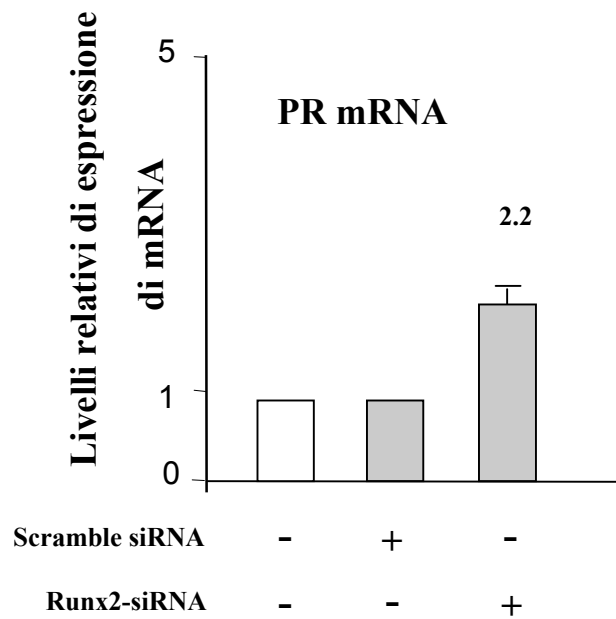
A**B**

Figura 19. Analisi dell'attività di ER α . **A** La figura rappresenta l'attività di luciferasi dopo trasfezione di colture di cellule SaOS-2 non trattate, trattate con l'oligonucleotide scramble siRNA e con il siRNA contro Runx2 (Runx2-siRNA), con 3 ug di vettore contenente elementi responsivi all'estrogeno (ERE) Vit-3ERE luc in presenza di 17 β -estradiolo. La barra bianca rappresenta il controllo effettuato con trasfezione di 3ug del vettore vuoto pGL2 Basic. **B** Il cDNA ottenuto dalle cellule SaOS-2, non trattate, trattate con l'oligonucleotide scramble siRNA e con il siRNA contro Runx2 (Runx2-siRNA) è stato sottoposto a RT-PCR quantitativa per valutare i livelli di mRNA del recettore del progesterone (PR). I livelli di espressione sono stati normalizzati sulla base dell'espressione del gene di riferimento GAPDH.

4.1.4. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE ESOGENA DI RUNX2 SULL'ATTIVITA' DEL PROMOTORE F

Sono stati quindi condotti esperimenti di overespressione di Runx2. È stato pertanto valutata l'influenza di una forzatura dell'espressione di Runx2 sulla regolazione dell'espressione di ER α . A questo scopo i costrutti 411, 451 e 862 sono stati cotrasfettati con il vettore di espressione per la proteina Runx2 (pCDNA3,1-Runx2).

In figura 20 A si osserva come l'espressione forzata di Runx2 produca da una parte un leggero incremento dell'attività del costrutto 451 e del costrutto 862, dall'altra annulli completamente l'attività del costrutto 411. Questi dati si possono spiegare con un ruolo prevalentemente negativo di Runx2 su sequenze che non contengono siti di legame per Runx2 e solo debolmente positivo su sequenze che, invece, li contengono.

Quale di questi ruoli sia prevalente e in quali condizioni resta da definire. Quello che sorprendentemente è molto chiaro è che anche nelle condizioni di overespressione si assiste ad un incremento dell'espressione (figura 20 B e C) e dell'attività (figura 21) di ER α .

I dati di silenziamento e di overespressione di Runx2 che apparentemente sembrano contraddirsi, in realtà trovano spiegazione negli esperimenti che successivamente sono stati allestiti.

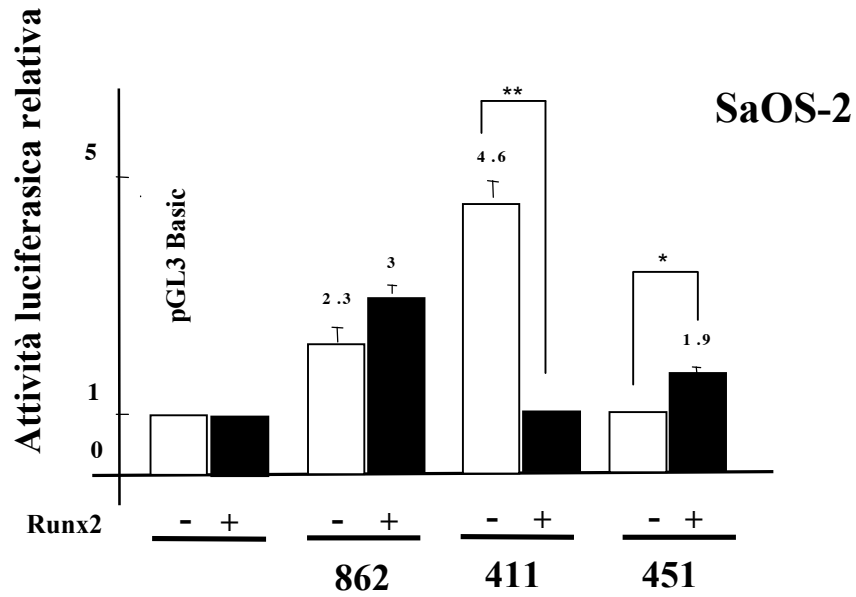
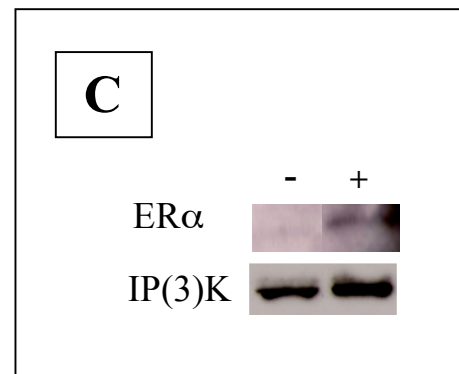
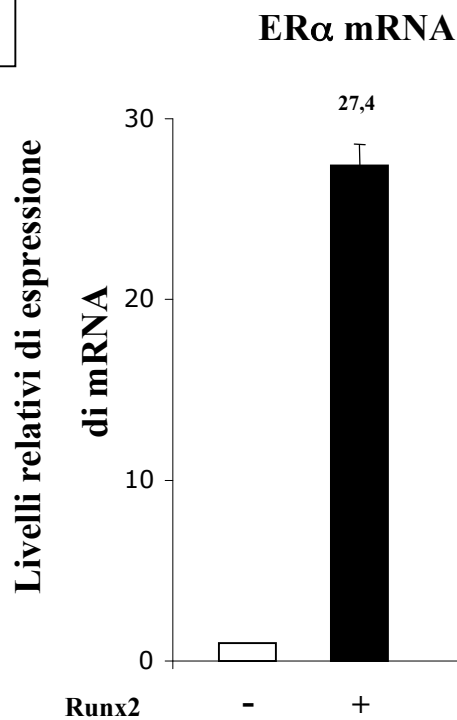
A**B**

Figura 20. Analisi dell'effetto dell'overespressione di Runx2 sull'attività del promotore di ERα e sulla sua espressione. **A** Analisi dell'attività luciferasica dopo trasfezione dei costrutti indicati o del solo vettore vuoto (pGL3basic) in cellule SaOS-2. Gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza (-) o presenza (+) del vettore di espressione per Runx2 (Runx2). I valori sono espressi in unità relative di luciferasi. La significatività è presente quando indicata * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ **B** Le figure rappresentano i livelli relativi di espressione di messaggero di ERα, valutato mediante RealTime Pcr, in assenza (-) o presenza (+) del vettore di espressione per Runx2 (Runx2). **C** Analisi dell'espressione di ERα valutata con Western Blot su estratti cellulari totali di cellule SaOS-2 in assenza (-) o presenza (+) del vettore di espressione per Runx2. La valutazione della proteina IP(3)K è utilizzata come controllo.

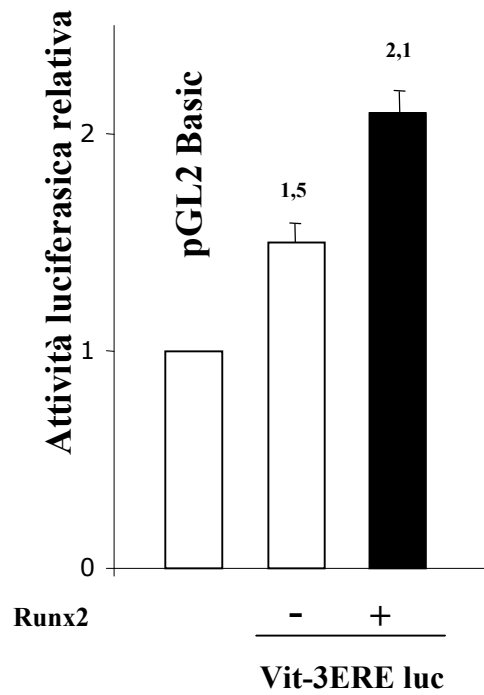
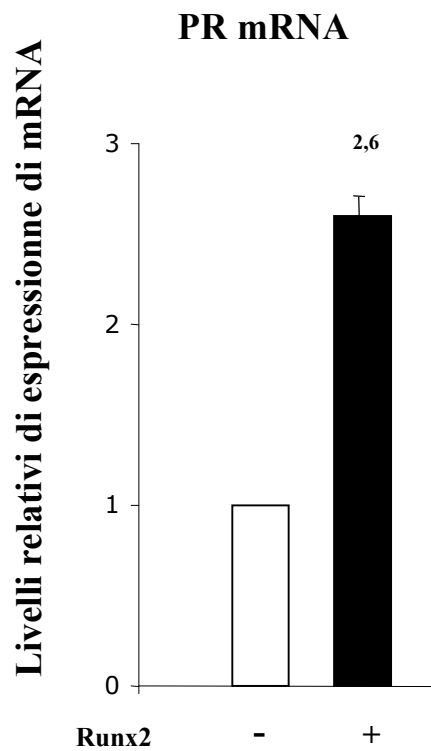
A**B**

Figura 21. Analisi dell'attività di ER α . **A** La figura rappresenta l'attività di luciferasi dopo transfezione di colture di cellule SaOS-2 in assenza (-) o presenza (+) del vettore di espressione per Runx2 (Runx2) con 3 ug di vettore contenente elementi responsivi all'estrogeno (ERE) Vit-3ERE luc in presenza di 17 β -estradiolo. La barra bianca rappresenta il controllo effettuato con transfezione di 3ug del vettore vuoto pGL2 Basic. **B** Il cDNA, ottenuto dalle cellule SaOS-2 in assenza (-) o presenza (+) del vettore di espressione per Runx2 (Runx2), è stato sottoposto a RT-PCR quantitativa per valutare i livelli di mRNA del recettore del progesterone (PR). I livelli di espressione sono stati normalizzati sulla base dell'espressione del gene di riferimento GAPDH.

4.1.5. VALUTAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE DEI SITI RUNX2 MEDIANTE MUTAGENESI SITO-SPECIFICA

Per cercare di capire che cosa sta dietro ad un doppio ruolo di Runx2 nel promotore F si è ricorsi ancora una volta alla mutagenesi sito-specifica. Le mutazioni degli oligonucleotidi utilizzati nei saggi EMSA (paragrafo 4.1.2.) sono state introdotte nei siti Runx2 (a) e Runx2 (b) dei costrutti 451 e 862. I costrutti mutati sono stati quindi trasfettati in cellule SaOS-2 in combinazione con il vettore di espressione Runx2 e testati successivamente in saggi di luciferasi. Il grafico di figura 22 dimostra come la mutazione del sito (a) nei costrutti 451 e 862 produca un effetto positivo nell'attività promotrice rispetto al controllo (pGL3 Basic). La mutazione del sito (b) in entrambi i costrutti induce un incremento ancora più marcato dell'attività luciferasica. Questo suggerisce che il sito Runx2 (a) possa avere un ruolo negativo nel controllo della trascrizione, mentre che il sito Runx2 (b) ricopra un ruolo opposto e cioè positivo.

Ripetendo lo stesso esperimento in condizioni di forzatura dell'espressione di Runx2 si osserva un generale incremento dell'attività del promotore.

La valutazione complessiva di questi dati ci porta ad affermare che, molto probabilmente, alti livelli di espressione di Runx2 contrastino la funzione negativa che solitamente questo fattore esercita nei confronti dell'attività del promotore di ER α

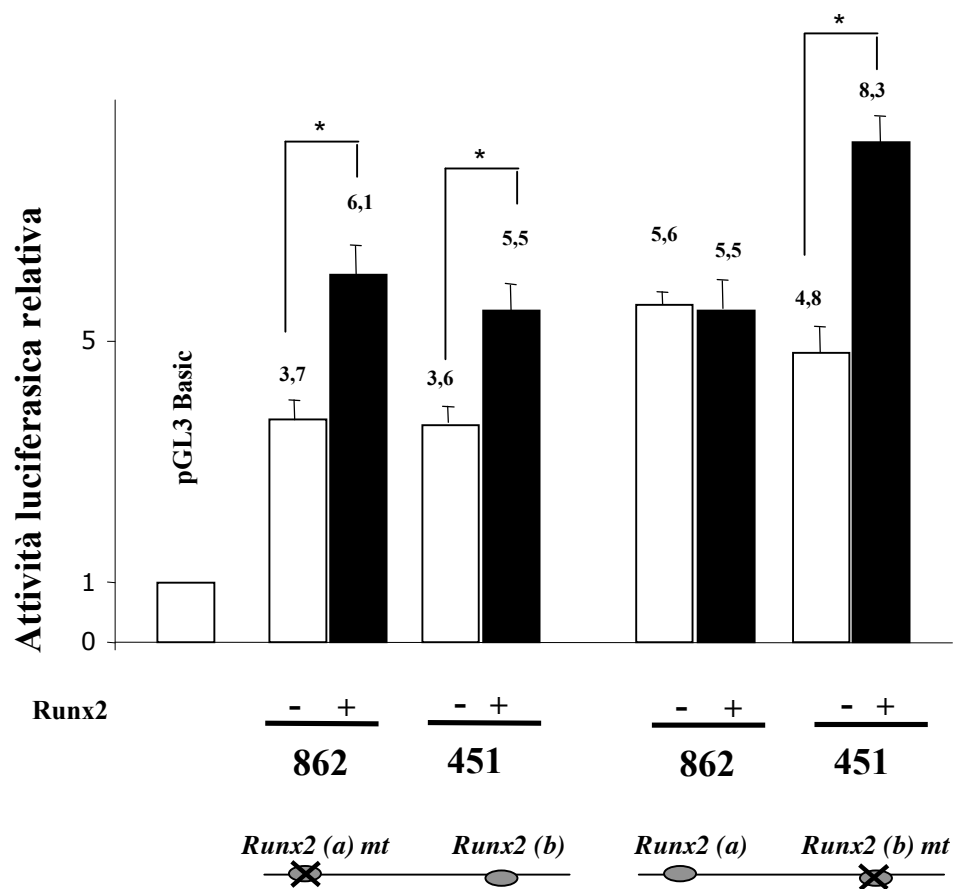


Figura 22. Valutazione dell'attività luciferasica dopo mutazione dei siti Runx2 (a) e Runx2 (b). Analisi effettuata dopo trasfezione dei costrutti indicati mutati nei siti Runx2 (a) o Runx2 (b), come schematizzato nella parte inferiore della figura, o del solo vettore vuoto (pGL3-Basic) in cellule SaOS-2. Gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza (-) o presenza (+) di overespressione della proteina Runx2 (Runx2). I valori sono espressi in unità relative di luciferasi. Tutti i valori sono significativi nei confronti del controllo (pGL3Basic) e dove indicato con * ($P < 0,05$) in modo specifico.

4.2. ER α E AP-1

4.2.1. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE ESOGENA DI ER α SULL'ATTIVITA' DEL PROMOTORE F

Il ruolo di ER α in un possibile meccanismo di autoregolazione è stato studiato valutando sia un legame diretto sul DNA che un legame con le proteine della famiglia AP-1. In una prima fase gli esperimenti di trasfezione descritti nel paragrafo 3 sono stati eseguiti in condizioni di forzatura dell'espressione di ER α , in presenza o in assenza di 17- β -estradiolo. I costrutti 862, 411 e 272 sono stati usati in combinazione con il vettore di espressione per la proteina ER α (pSG5HEO).

I risultati riportati in figura 23 mostrano che l'estrogeno ha un effetto positivo sull'attività di tutti e tre i costrutti, mentre l'overespressione di ER α incrementa ulteriormente l'attività luciferasica solo del costrutto 411. Questo suggerisce un effetto positivo di ER α sul promotore F del proprio gene, relativamente alla sequenza -117426/-117014 che può essere mediato da sequenze regolatorie sia ERE (1/2 ERE) che non ERE, come le sequenze AP-1.

Inoltre questi dati inducono a pensare ad una regolazione contesto specifica per studiare la quale sono stati effettuati gli esperimenti di seguito descritti.

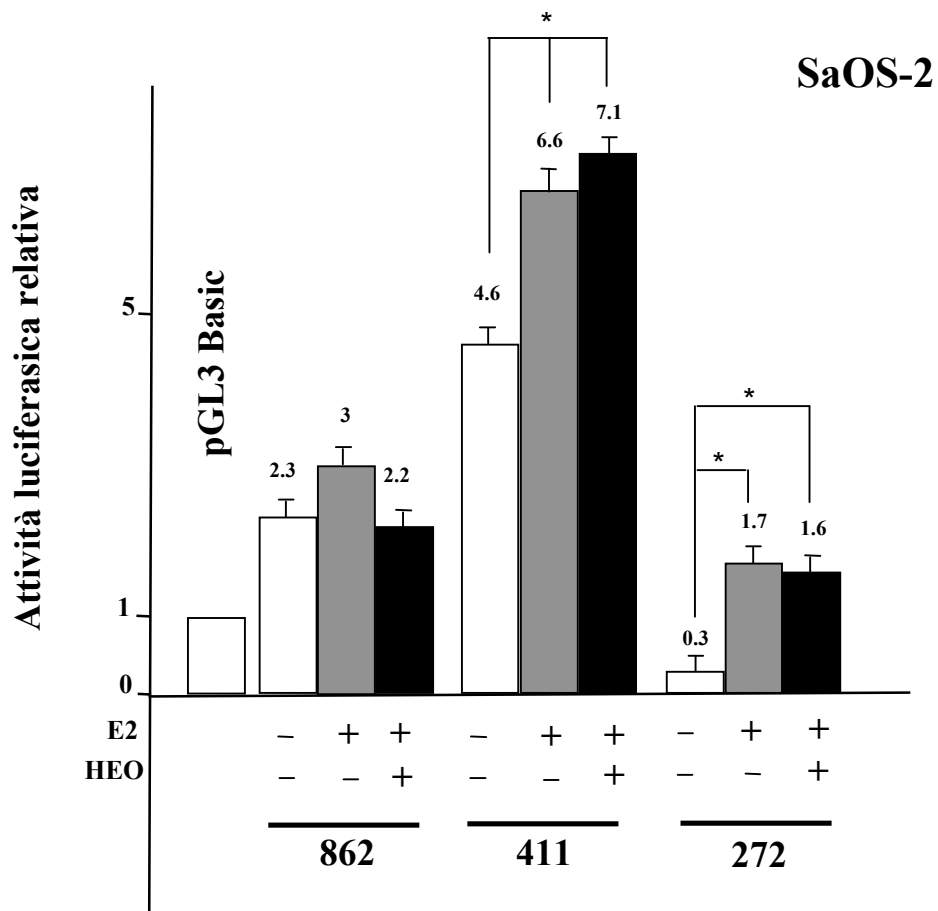


Figura 23. Effetto dell'overespressione di ER α sull'attività del promotore F in cellule SaOS-2. Gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza (-) e in presenza (+) di 17 β -estradiolo (E2) e del vettore di espressione per ER α (HEO). I valori sono espressi in unità relative di luciferasi. Le significatività relative all'overespressione con HEO sono indicate con *= P<0,05

4.2.2 ANALISI *IN VIVO* DELL'INTERAZIONE DI ER α E AP-1 AL PROMOTORE F

lo studio è proseguito con il fare chiarezza sulla situazione *in vivo*, prerequisito fondamentale per qualsiasi successiva interpretazione. Inoltre, la complessità delle possibili interazioni tra ER α e AP-1 ha imposto una preliminare indagine sulla cinetica delle interazioni stesse basate sul tempo di esposizione all'estradiolo, che in qualche modo vuole mimare una possibile risposta fisiologica della cellula all'ormone stesso.

Sono stati pertanto eseguiti esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) su cellule SaOS-2 trattate a tempi diversi con 17- β -estradiolo per 15', 30', 45', 60', 90', O.N., al fine di studiare un possibile ordine nel reclutamento estrogeno-dipendente dei complessi proteici in esame. Secondo la metodica, aliquote uguali di cromatina sonicata, sono state sottoposte a immunoprecipitazione con anticorpi specifici contro ER α , c-jun, c-fos, Fra-2 e ATF-2 o con nessun anticorpo (NoAb). Dopo l'immunoprecipitazione la cromatina è stata estratta e utilizzata come template per l'analisi di PCR. Per eseguire questa indagine è stata usata la coppia di primers indicata in figura 24, specifica per il promotore F, in grado di produrre un frammento di 214 bp. Come è mostrato nella stessa figura, la cromatina ottenuta dai diversi campioni e non sottoposta a immunoprecipitazione (Input) è amplificabile in modo paragonabile. Dai segnali di PCR risulta che le proteine ER α , c-jun, c-fos e ATF-2 sono reclutate a livello del promotore F, al contrario di Fra-2. Come si può notare dai prodotti di PCR la cinetica di reclutamento delle quattro proteine risulta diversa anche se in tutti i casi è estrogeno-dipendente. Infatti, in assenza di estrogeno (tempo 0'), il segnale di PCR è molto debole per ER α e c-fos, assente per gli altri. ER α presenta una dinamica di legame oscillatoria, con due picchi a 30 e 60 min, e che decresce a 90' e O.N. Dopo 15' e 30' dall'aggiunta di estrogeno, si verifica invece il massimo grado di interazione di ATF-2 con la sequenza promotrice. L'intensità dei segnali di PCR suggerisce che ER α e ATF-2 rappresentino i fattori trascrizionali, tra quelli presi in considerazione, più "efficacemente

presenti” sulla sequenza di interesse. A confronto, la capacità di legame di c-jun e c-fos alla sequenza, è decisamente più debole anche se segnali apprezzabili si possono osservare dopo 24 ore e dopo 15 min, rispettivamente, dalla somministrazione di estrogeno.

Questi dati dimostrano che nelle cellule osteoblastiche SaOS-2 trattate con 17- β -estradiolo, ER α e i membri della famiglia AP-1 analizzati, in particolare ATF-2, sono in grado di interagire “in vivo” con la regione del promotore F.

Al fine di studiare le interazioni reciproche tra i fattori trascrizionali presi in esame, sono stati effettuati esperimenti di re-ChIP. Lo scopo è stato quello di verificare la presenza di un fattore nell’immunocomplesso generato dalla immunoprecipitazione con l’anticorpo contro un altro fattore, mediante arricchimento della cromatina associata contemporaneamente con specifici partners proteici. Tuttavia, i dati ottenuti non sono stati soddisfacenti (figura 25) e i tentativi di interpretazione di diversi esperimenti ripetuti hanno portato alla conclusione che l’approccio adottato non risulta essere quello più indicato per questo tipo di indagine. Infatti, l’uso combinato di anticorpi, associato ad un metodo di rilevazione estremamente sensibile come la PCR, può risentire del mascheramento di epitopi specifici, e portare al rafforzamento di segnali precedenti dovuti alla prima interazione e non alla seconda o, al contrario, all’indebolimento di segnali precedenti a causa di affinità di legame che, in qualche modo, possono essere alterate.

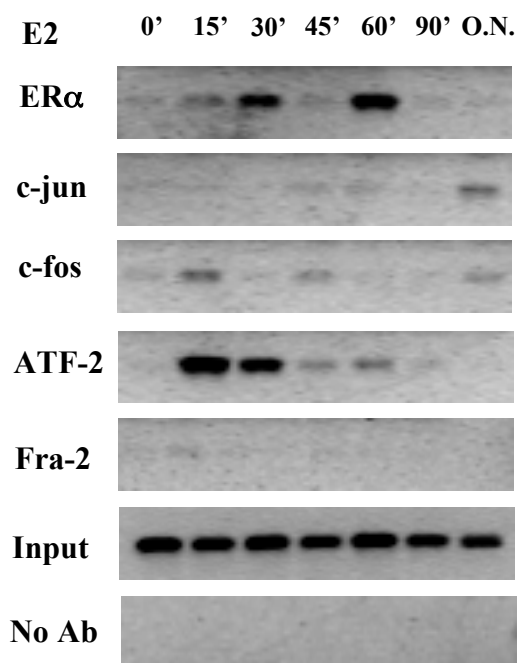
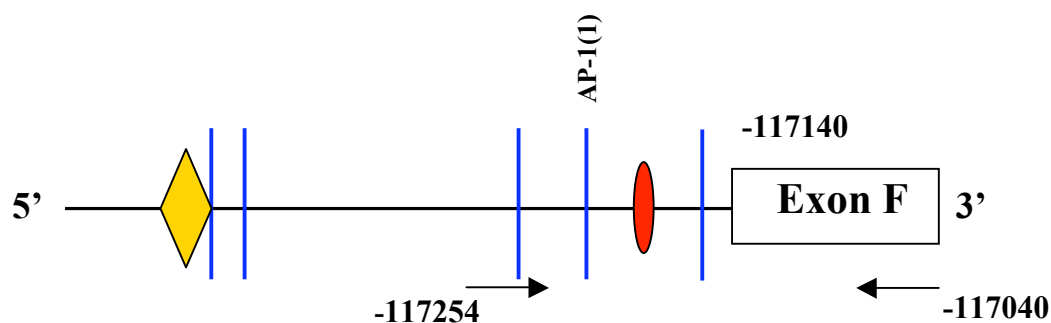


Figura 24. Analisi dell'interazione "in vivo" di ER α e dei fattori AP-1 con il promotore F del gene umano ER α , mediante saggio ChIP. Cellule SaOS-2 coltivate in presenza di 17- β -estradiolo 10 nM (E2) per tempi diversi (0', 15', 30', 45', 60', 90', O.N.), sono state trattate con formaldeide 1% per fissare le proteine al DNA. Un'aliquota, che costituisce la cromatina totale delle cellule, è mantenuta inalterata e viene considerata il controllo positivo (Input). La restante cromatina è immunoprecipitata con gli anticorpi contro ER α , c-jun, c-fos, ATF-2 e Fra-2 e in assenza di anticorpo (No Ab) e sottoposta a una reazione di PCR con primers che amplificano una regione del promotore F compresa tra -117254 e 117049 bp (schema in alto). I prodotti di PCR vengono quindi fatti migrare su gel di agarosio.

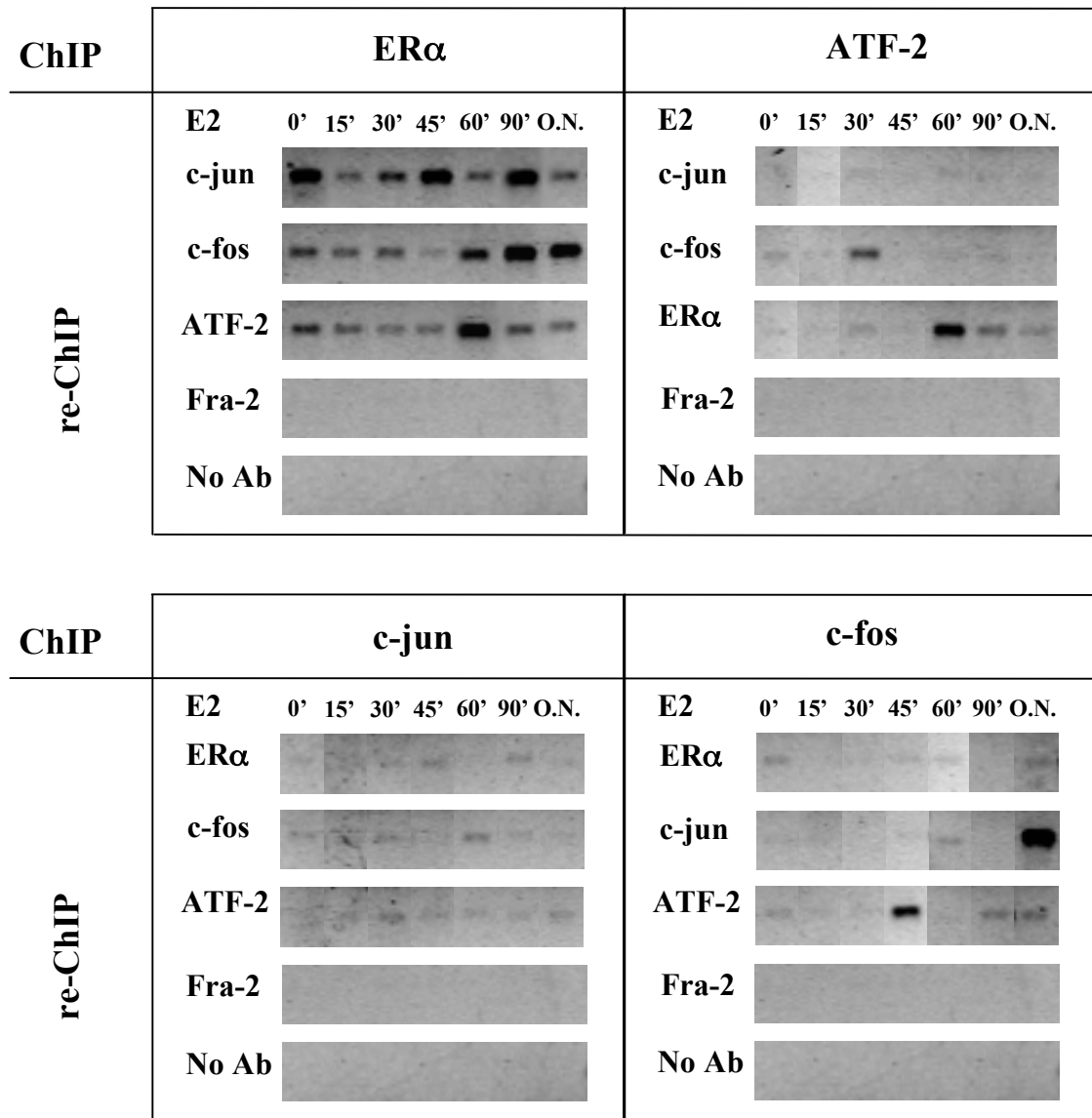


Figura 25. Analisi dell'interazione "in vivo" di ER α e dei fattori AP-1 con il promotore F del gene umano ER α , mediante esperimenti di re-ChIP. La cromatina di cellule SaOS-2 coltivate in presenza di 17- β -estradiolo 10 nM (E2) per tempi diversi (0', 15', 30', 45', 60', 90', O.N.) e immunoprecipitata in assenza di anticorpo (No Ab) o con gli anticorpi contro ER α , ATF-2, c-jun e c-fos, è stata immunoprecipitata, una seconda volta, rispettivamente con gli anticorpi contro c-jun, c-fos, ATF-2, Fra-2 ed ER α .

4.2.3. ANALISI *IN VITRO* DELL'INTERAZIONE DI ER α E AP-1 AL PROMOTORE F

Sulla base dei risultati fin qui descritti si è quindi proceduto alla caratterizzazione, *in vitro*, delle putative sequenze di legame per ER α e AP-1 nel promotore F. A questo scopo sono stati effettuati saggi EMSA combinati con saggi di “supershift” e cross-competizione, impiegando oligonucleotidi specifici per i diversi siti di legame per ER α e AP-1 all'interno del promotore F (Tabella 9).

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando sia estratti nucleari di cellule SaOS-2 coltivate in presenza di 17- β -estradiolo, che proteine ricombinanti ER α , c-jun, c-fos e ATF-2 e anticorpi specifici contro tali fattori.

OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENZA
AP-1 consensus	5'-ttccggct tgactcat caagcg-3'
CRE consensus	5'-agctcctagcct gacgtcag agagagagct-3'
ERE consensus	5'-aattcgtccaaagtcaggt cacagtgac cctgatcaaagtt-3'
AP-1/ERE half site	5'-tttatttt tgagtt actgcatttcctaatttcatt gtca taacagcct-3'
AP-1/ERE half site AP-1 m	5'-tttatttt CAagtAC ctgcatttcctaatttcatt gtca taacagcct-3'
ERE half site	5'-tgcatttcctaatttcatt gtca taacagcct-3'
ERE half site ERE m	5'-tgcatttcctaatttcatt AAtca taacagcct-3'
AP-1(1)	5'-ttatttt tgagtt actgcat-3'
Oligo 2	5'- act gcatttcctaatttcatt-3'
Oligo 3	5'-atttcatt gtca taacagcc-3'
Oligo 3m	5'-atttcatt AAtca taacagcc-3'
Oligo 4	5'- gggtca taacagcctcctgtc-3'
AP-1 38	5'-gatcata tgacaga aggaag-3' -117694 -117674
AP-1 29	5'-agtccatgcct tgagta agaaagtc-3' -117584 -117560

Tabella 9. Rappresentazione delle sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per l'analisi EMSA.

In una prima fase gli esperimenti si sono basati sull'analisi individuale di tre dei potenziali siti di legame per le proteine AP-1 localizzati sul promotore F (AP-1 (1), AP 29, AP-1 38). Come si può osservare dalle Figure 26 e 27, gli oligonucleotidi corrispondenti ai tre siti AP-1, sono in grado di interagire con proteine presenti negli estratti nucleari delle cellule SaOS-2, generando un pattern simile in cui si possono distinguere due principali complessi DNA-proteina. Per individuare tra le proteine nucleari che formano complessi con la sequenza di DNA analizzata, l'eventuale presenza di ER α o da membri della famiglia AP-1 presi in considerazione, le stesse reazioni di EMSA sono state eseguite in presenza di anticorpi che riconoscono in modo specifico queste proteine. L'aggiunta degli anticorpi non altera il pattern di interazione DNA-proteine con le tre sonde oligonucleotidiche. Questo suggerisce, che i fattori trascrizionali analizzati, in tali condizioni, potrebbero interagire con queste sequenze in modo piuttosto debole e/o indiretto. Il risultato viene confermato dal fatto che, l'impiego delle proteine ricombinanti ER α , c-jun, c-fos e ATF-2 in sostituzione degli estratti nucleari, non produce alcuna interazione significativa con le regioni considerate.

La specificità e l'attività delle proteine ricombinanti e degli anticorpi corrispondenti, sono state testate mediante saggi EMSA e oligonucleotidi marcati AP-1 consensus, CRE consensus ed ERE consensus contenenti siti di legame ad alta affinità per le proteine AP-1, CRE ed ER α , rispettivamente (figura 28).

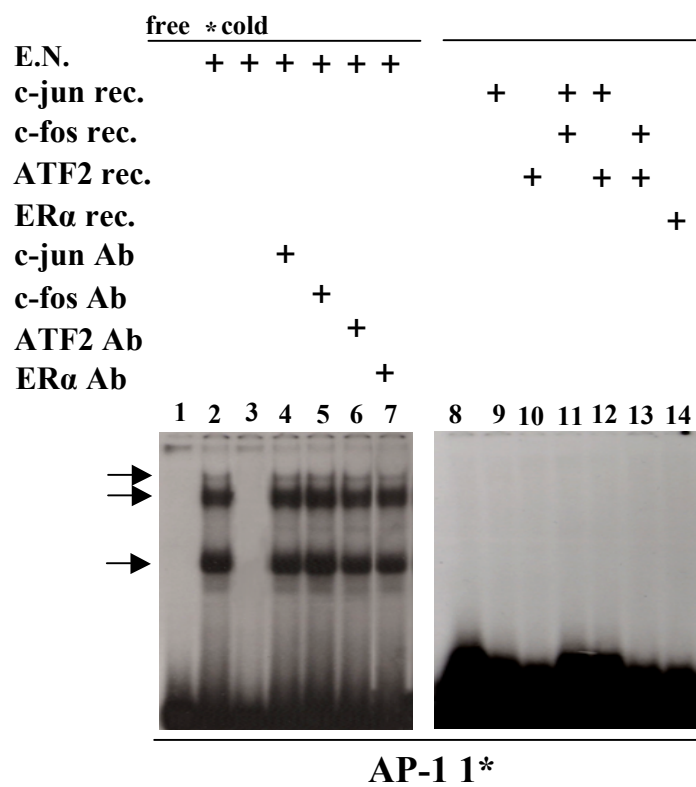


Figura 26. EMSA su AP-1 1* con proteine ricombinanti ed estratti nucleari di SaOS-2. Su gel di poliacrilammide al 6% è stato fatto migrare l'oligonucleotide marcato AP-1 1*, in assenza (linee 1 e 8) e in presenza (linee 2-7) di estratti nucleari (E.N.) di cellule SaOS-2. Gli esperimenti sono stati condotti in presenza di un eccesso (100 volte) dell'oligonucleotide corrispondente non marcato (linea 3), in presenza degli anticorpi contro c-jun (linea 4), c-fos (linea 5), ATF-2 (linea 6), ER α (linea 7) e delle proteine ricombinanti c-jun (linea 9), ATF-2 (linea 10), ER α (linea 14) e c-fos, da sole o in combinazione tra loro (linee 11,12 e 13).

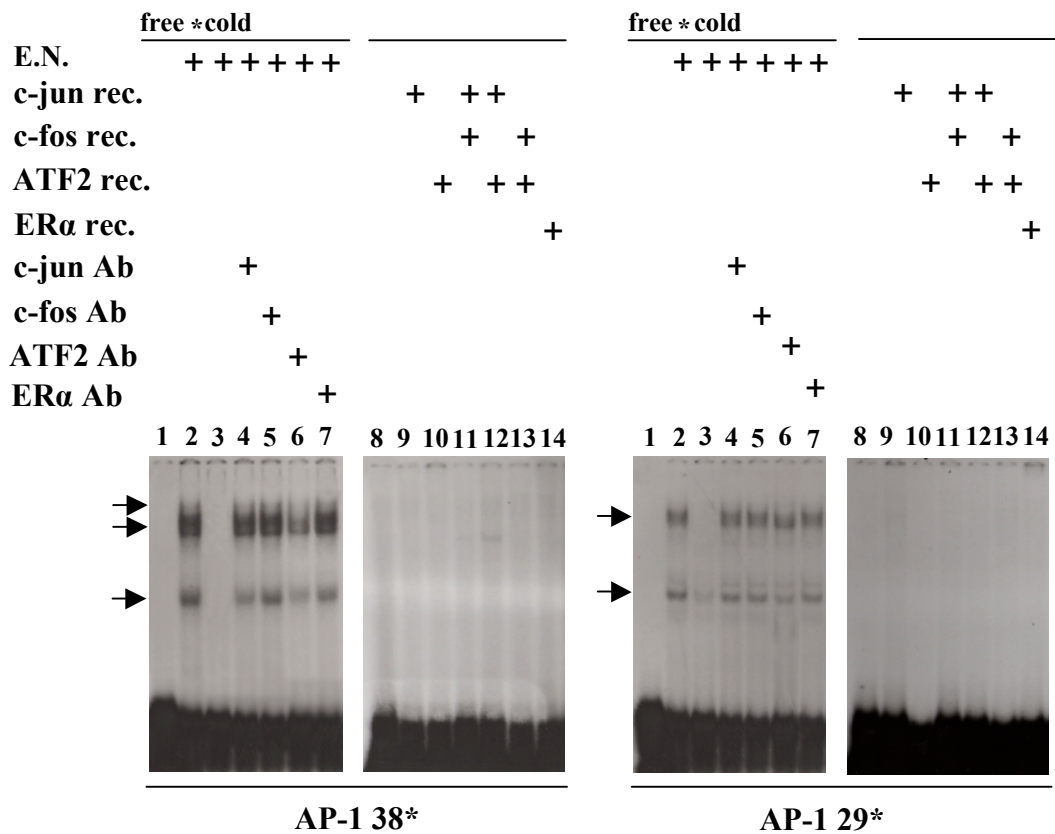


Figura 27. EMSA su AP-1 38* e AP-1 29* con proteine ricombinanti ed estratti nucleari di SaOS-2. Su gel di poliacrilammide al 6% sono stati fatti migrare gli oligonucleotidi marcati AP-1 38* e AP-1 29*, in assenza (linee 1 e 8) e in presenza (linee 2-7) di estratti nucleari (E.N.) di cellule SaOS-2. Gli esperimenti sono stati condotti in presenza di un eccesso (100 volte) dell'oligonucleotide corrispondente non marcato (linee 3), in presenza degli anticorpi contro c-jun (linee 4), c-fos (linee 5), ATF-2 (linee 6), ER α (linee 7) e delle proteine ricombinanti c-jun (linee 9), ATF-2 (linee 10), ER α (linee 14) e c-fos, da sole o in combinazione tra loro (linee 11,12 e 13).

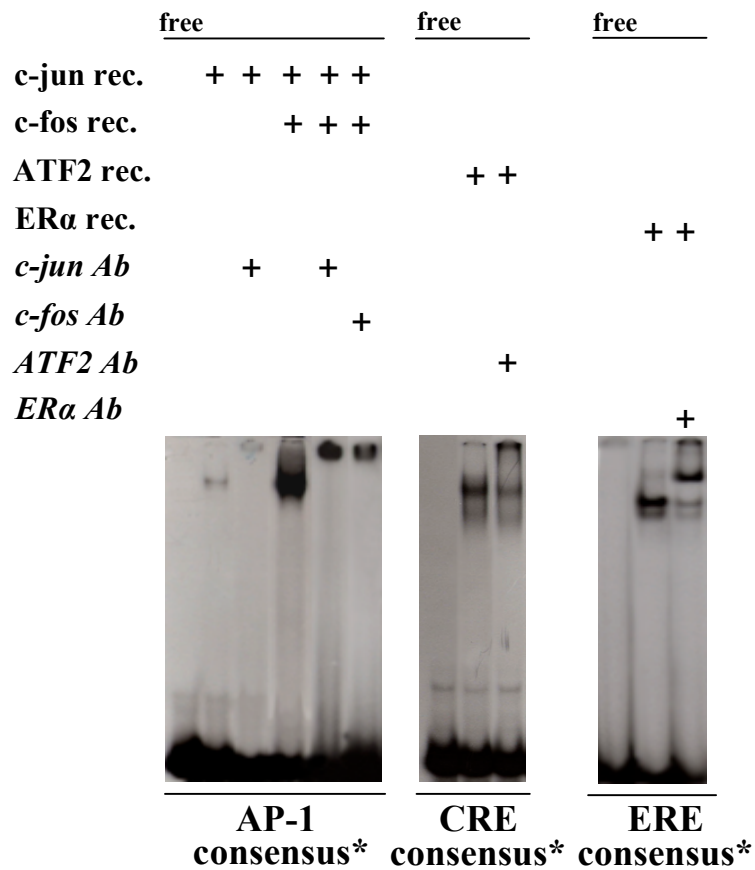


Figura 28. EMSA su AP-1 consensus*, CRE consensus* ed ERE consensus* con proteine ricombinanti. Su gel di poliacrilammide al 6%, sono stati fatti migrare gli oligonucleotidi marcati AP-1 consensus*, CRE consensus* ed ERE consensus* dopo incubazione con le sole proteine ricombinanti c-jun, c-fos, ATF-2 ed ER α e in presenza dei corrispondenti anticorpi specifici.

Questa prima analisi non è stata pertanto molto informativa. L'unica evidenza utile deriva dall'osservazione della capacità dell'oligonucleotide AP-1 (1) di legare le proteine più degli altri due. Abbiamo quindi focalizzato l'attenzione su questo sito AP-1 (1), localizzato in prossimità del mezzo sito ERE e a -117207 bp rispetto al canonico sito di inizio della trascrizione +1.

In ragione dei risultati ottenuti dall'analisi sull'attività del promotore e dai saggi EMSA sopra descritti gli esperimenti sono stati condotti impiegando l'oligonucleotide denominato AP-1/ERE half site, corrispondente ad una regione più ampia compresa tra -117214 e -117167, e comprendente, come riportato in figura 29, sia il sito AP-1 (1) che l'ERE half site coincidente con un mezzo sito AP-1. Se l'ipotesi dell'influenza del contesto del promotore è vera, allora l'indagine su una sequenza più ampia avrebbe dovuto essere più informativa. E così è stato.

Dalla figura si può notare che il pattern risulta essere più complesso rispetto a quello osservato nell'analisi individuale dei tre oligonucleotidi AP-1; infatti, in questo caso si possono distinguere almeno cinque principali specifici complessi DNA/proteina (c1-c5). Inoltre, l'aggiunta di anticorpi specifici contro c-fos e ATF-2 nelle reazioni di EMSA, determina la scomparsa della banda c2, suggerendo così la presenza di questi due fattori trascrizionali nel complesso c2. Diversamente, l'aggiunta di anticorpi contro ER α e c-jun non produce lo stesso effetto. Esperimenti di competizione, utilizzando l'oligonucleotide marcato AP-1/ERE half site in combinazione con gli oligonucleotidi non marcati AP-1/ERE half site, AP-1 (1) e 1/2 ERE evidenziano che, mentre l'oligonucleotide AP-1/ERE half site non marcato spiazza il legame ed indica la specificità delle interazioni, al contrario concentrazioni crescenti (25-, 50-, 100-, 250- volte) di oligonucleotide freddo AP-1 (1) non sono in grado di spiazzare le interazioni. E' interessante notare invece, come l'oligonucleotide non marcato 1/2 ERE determini uno spiazzamento specifico, riducendo in maniera significativa in particolare la formazione dei complessi c1, c2 e c3 (figura 29).

Nell'insieme questi risultati suggeriscono pertanto, che il legame dei fattori trascrizionali alla sequenza AP-1/ERE half site, sia per lo più sostenuto dalla presenza del mezzo sito ERE.

Per verificare che i complessi proteici osservati fossero strettamente dipendenti e specifici di cellule osteoblastiche si è paragonato il pattern di legame prodotto dall'incubazione con estratti nucleari di SaOS-2 a quello ottenuto utilizzando estratti nucleari di cellule di carcinoma mammario ER α positive MCF7. Come si può osservare dalla figura 29 (linea 2) sono evidenti delle differenze tra i due pattern: i complessi c3, c4 e c5 dovuti all'interazione degli estratti di SaOS-2 sono molto più intensi rispetto a quelli prodotti dagli estratti di MCF7; inoltre gli estratti di MCF7 producono un complesso aggiuntivo intermedio tra i complessi c2 e c3.

Gli stessi esperimenti descritti con gli estratti nucleari di SaOS-2 sono stati effettuati anche con estratti nucleari di MCF7 come mostrato in figura 30. Anche in questo caso l'oligonucleotide non marcato $\frac{1}{2}$ ERE determina uno spiazzamento maggiore dei complessi in confronto ad AP-1 (1), a sostegno dell'importanza della sequenza anche in un altro contesto cellulare. L'incubazione con gli anticorpi, però, non provoca alcuna modificazione dei complessi proteici formati, a sostegno della specificità dei complessi proteici relativa al contesto cellulare osseo.

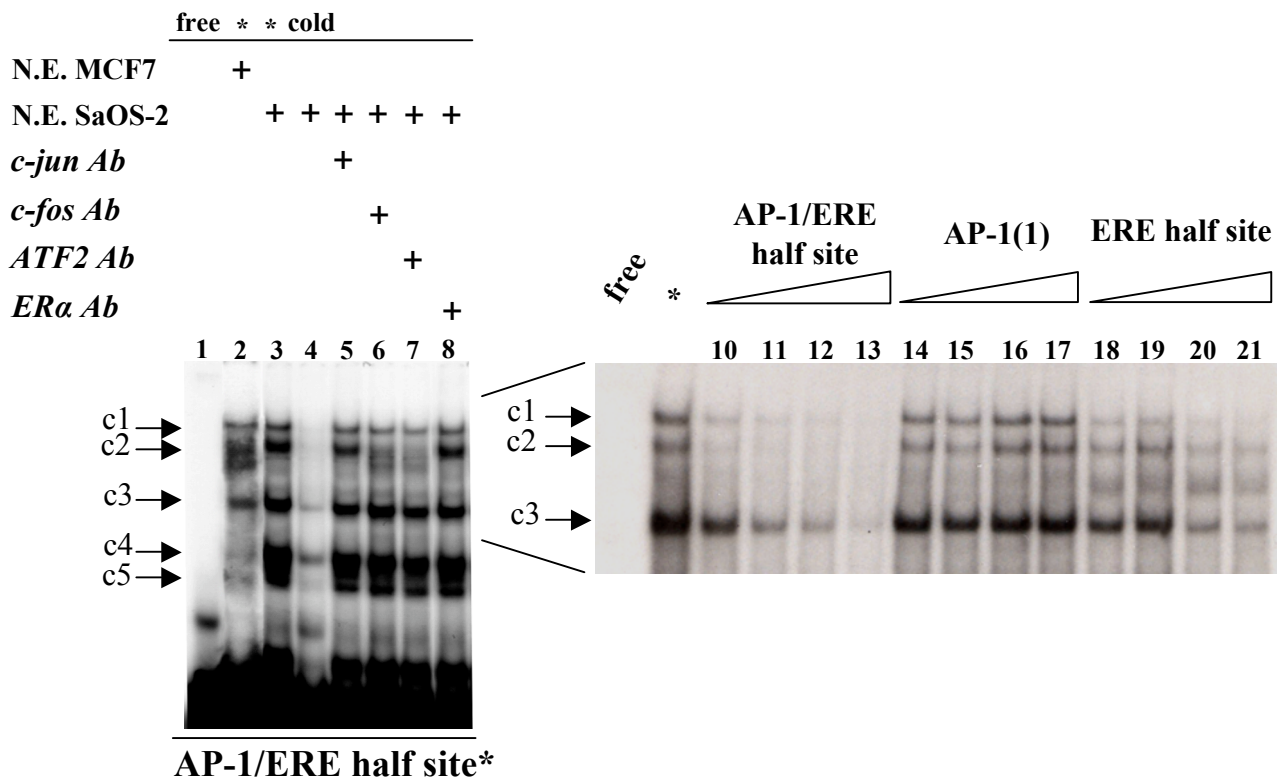
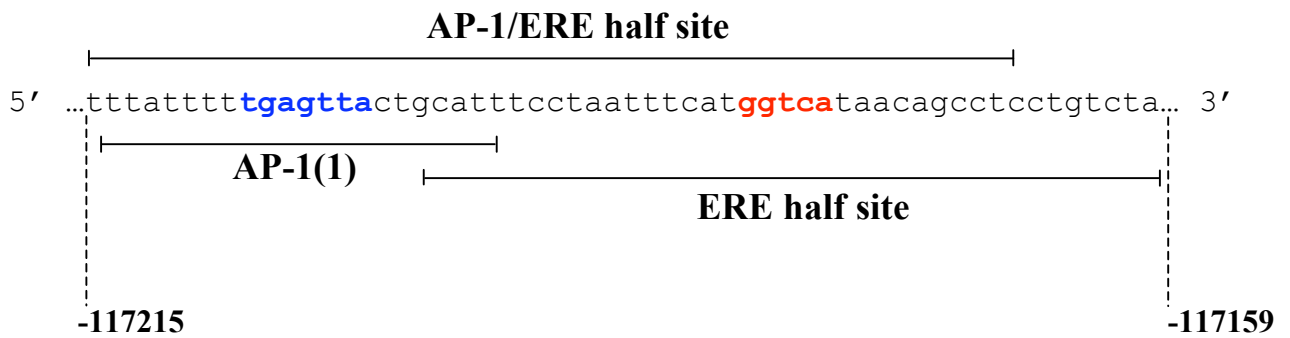


Figura 29. EMSA su AP-1/ERE half site* con estratti nucleari di cellule SaOS-2. Su gel di poliacrilammide al 6% è stato fatto migrare l'oligonucleotide marcato AP-1/ERE half site* in assenza (linea 1) e in presenza di estratti nucleari di cellule MCF7 (2) e di SaOS-2 (3-8) e, dove è indicato, in presenza degli anticorpi specifici contro *c-jun*, *c-fos*, *ATF-2*, *ERα*. I complessi DNA-proteina più rilevanti sono contrassegnati con delle frecce (c1-c5). A fianco è riportato la medesima corsa elettroforetica dove l'esperimento è stato condotto in presenza di un eccesso (25, 50, 100, 250 volte) dell'oligonucleotide corrispondente non marcato (linee 10-13), dell'oligonucleotide AP1(1) non marcato (14-17) e ERE half site (18-21). In alto è riportato lo schema del posizionamento degli oligonucleotidi utilizzati sulla sequenza del promotore F.

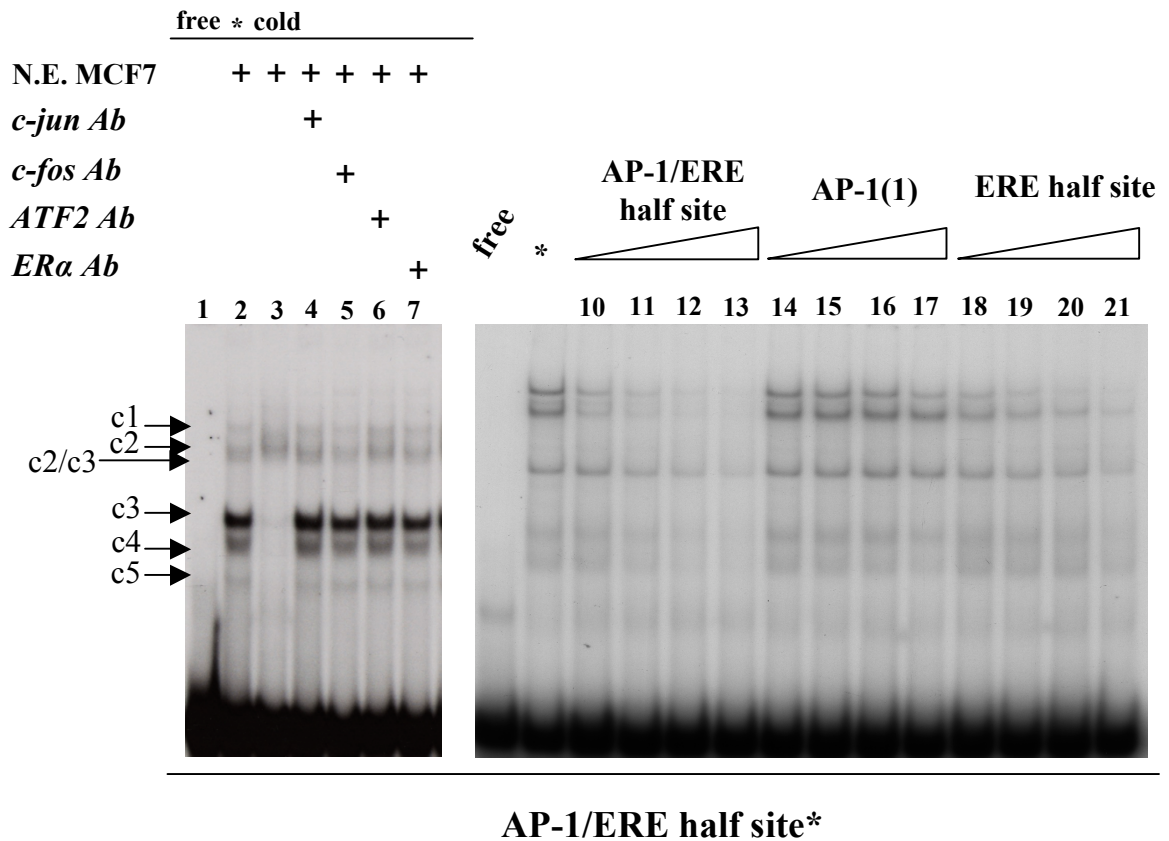


Figura 30. EMSA su AP-1/ERE half site* con estratti nucleari di cellule MCF7. Su gel di poliacrilammide al 6% è stato fatto migrare l'oligonucleotide marcato AP-1/ERE half site* in assenza (linea 1) e in presenza di estratti nucleari di cellule MCF7 (2-7) e, dove è indicato, in presenza degli anticorpi specifici contro *c-jun*, *c-fos*, *ATF-2*, *ERα*. I complessi DNA-proteina più rilevanti sono contrassegnati con delle frecce (c1-c5). A fianco è riportato la medesima corsa elettroforetica dove l'esperimento è stato condotto in presenza di un eccesso (25, 50, 100, 250 volte) dell'oligonucleotide corrispondente non marcato (linee 10-13), dell'oligonucleotide AP1(1) non marcato (14-17) e ERE half site (18-21).

Il passo successivo è stato quello di allestire sulla sequenza AP-1/ERE half site saggi EMSA utilizzando le proteine ricombinanti ER α , c-jun, c-fos e ATF-2, singolarmente o in combinazione tra loro. Come si può vedere dalla figura 31, aggiungendo sia l'anticorpo contro c-jun che quello contro ATF-2, si verifica un rallentamento della corsa elettroforetica ("supershift"), suggerendo, quindi, una possibile interazione c-jun/c-jun, c-jun/ATF-2 e ATF-2/ATF-2. L'aggiunta dell'anticorpo contro c-fos, determina supershift solo nel complesso c-jun/c-fos. L'anticorpo specifico contro ER α interferisce solo parzialmente con il legame della corrispondente proteina ricombinante. Si osserva, invece, la scomparsa della banda, quando a questa stessa reazione si aggiunge la proteina ricombinante ATF-2, suggerendo in maniera piuttosto evidente, la formazione dell'eterodimero ER α /ATF-2. E' importante ricordare che molti ricercatori hanno dimostrato come le interazioni dirette tra ER α e le specifiche sequenze ERE siano difficili da evidenziare mediante esperimenti di EMSA utilizzando sia estratti nucleari che proteine ricombinanti (Petz et al, 2002). Questo potrebbe essere dovuto alla bassa stabilità del complesso DNA-proteina.

Per analizzare le possibili interazioni eterodimeriche, sono stati condotti saggi EMSA impiegando contemporaneamente nella stessa reazione tre diverse proteine ricombinanti. Questo esperimento conferma la capacità della sequenza in esame di legare complessi proteici differenti, costituiti da una varietà di dimeri. In particolare, evidenzia che i complessi c-jun/c-fos, ATF-2/ATF-2 ed ER α /ATF-2 sembrano essere le combinazioni più importanti. Inoltre, sottolinea la capacità di ATF-2 a formare omodimeri o eterodimeri con ER α ma non con c-jun o c-fos, in presenza di ER α stesso.

L'indagine è poi proseguita sottoponendo allo stesso tipo di esperimenti la sequenza più corta $\frac{1}{2}$ ERE. Come risulta dalla Figura 32, le interazioni DNA-proteina che si instaurano in questa regione risultano essere più deboli di quelle osservate in AP-1/ERE half site, suggerendo come, la sequenza più lunga oltre a contenere più possibili "cis elements", sia dotata anche complessivamente di una maggiore affinità di legame. In particolare, il mezzo sito ERE non è in grado di legare la proteina ATF-2 nella forma di omodimero. Tuttavia, per quanto riguarda la formazione dei complessi proteici c-jun/c-jun, c-jun/c-fos e c-jun/ATF-2, si ottengono risultati sovrapponibili a quelli visti per la sequenza AP-1/ERE half site, anche se i segnali risultano più deboli.

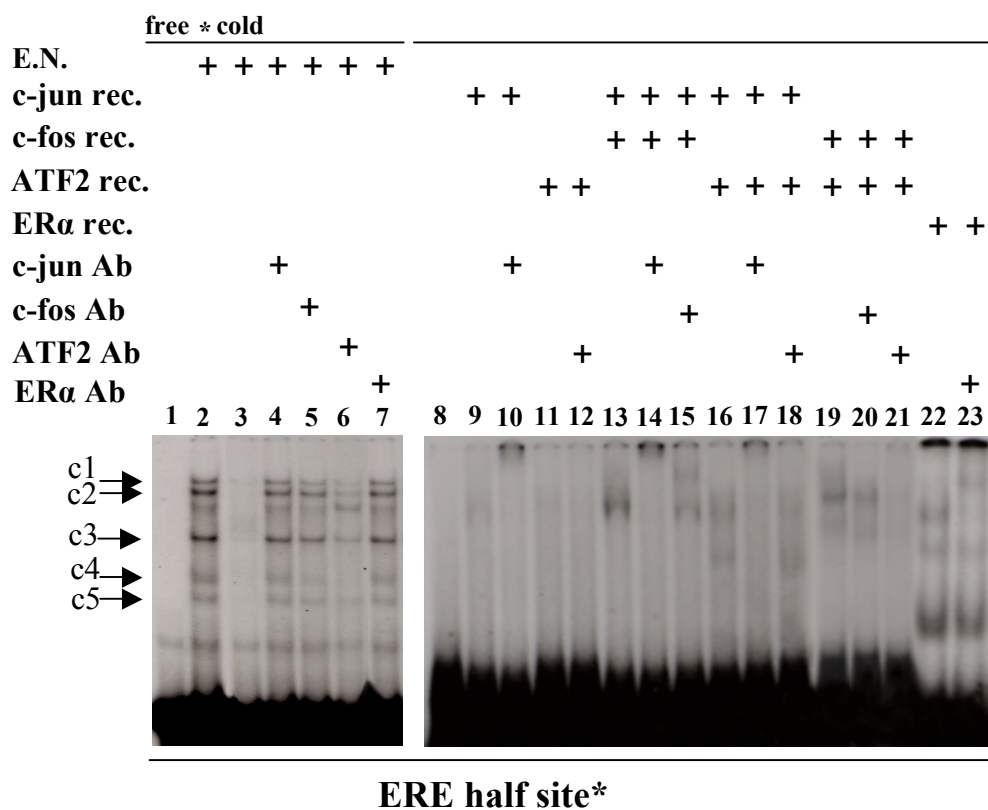


Figura 32. EMSA su ERE half site* con proteine ricombinanti ed estratti nucleari di SaOS-2. Su gel di poliacrilammide al 6% è stato fatto migrare l'oligonucleotide marcato ERE half site* in assenza (linea 1) e in presenza (linee 2-7) di estratti nucleari (E.N.) di cellule SaOS-2. Gli esperimenti sono stati condotti in presenza di un eccesso (100 volte) dell'oligonucleotide corrispondente non marcato (linea 3) e, dove indicato, in presenza delle proteine ricombinanti c-jun, c-fos, ATF-2 ed ER α e degli anticorpi corrispondenti. I complessi DNA-proteina più rilevanti sono contrassegnati con delle frecce (c1-c5).

Allo scopo di comprendere il ruolo di ogni singolo cis-elemento sono stati effettuati esperimenti di EMSA con quattro corti oligonucleotidi che ricoprono interamente la regione AP-1/ERE half site, come riportato in figura 33. Il contatto delle proteine ricombinanti con i singoli oligonucleotidi produce un solo debole complesso nel caso dell'interazione tra l'oligonucleotide 3, che contiene il sito mezzo ERE e la proteina ricombinante ER α . Nel caso in cui venga utilizzato lo stesso oligonucleotide mutato nel sito ERE questa interazione non si verifica più indicando che il sito ERE è sicuramente abile a legare in modo specifico la proteina ER α . Il fatto che non si evidenzia alcuna banda di interazione proteina-DNA con gli altri oligonucleotidi è in accordo con quanto precedentemente proposto. Il reclutamento diretto al promotore F delle proteine della famiglia AP-1 e quello indiretto di ER α mediato da AP-1 stesso richiede l'intera sequenza AP-1/ERE half site.

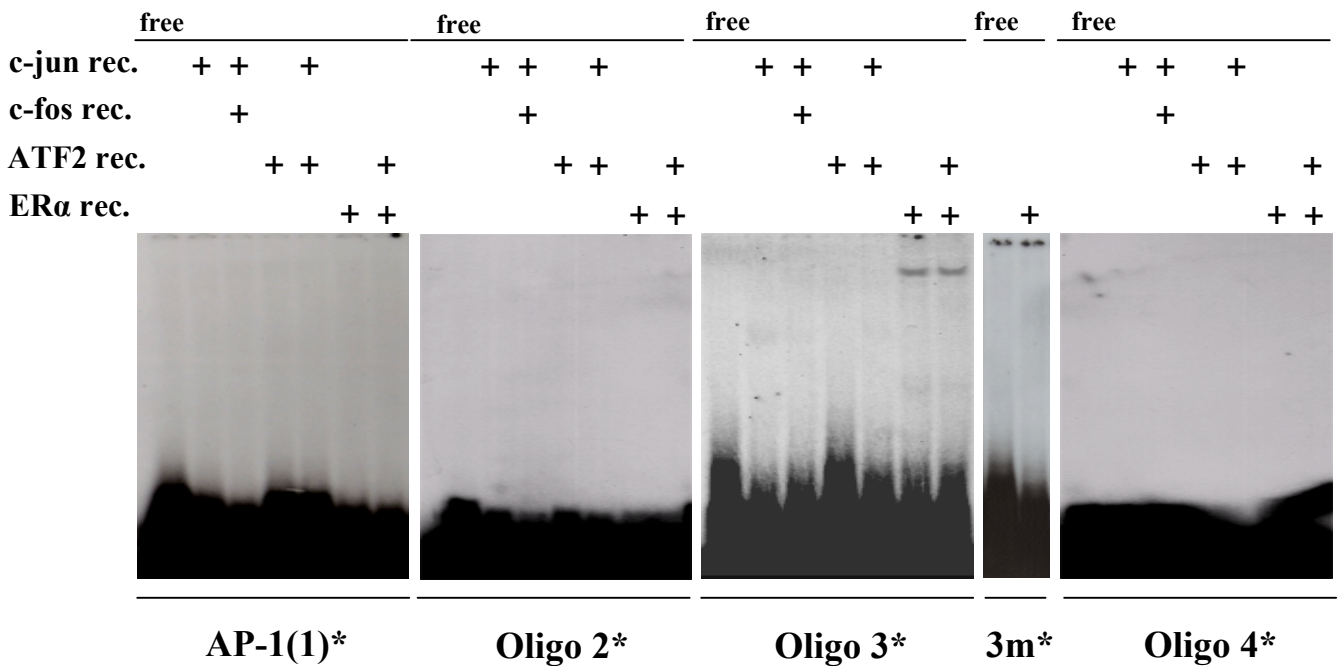
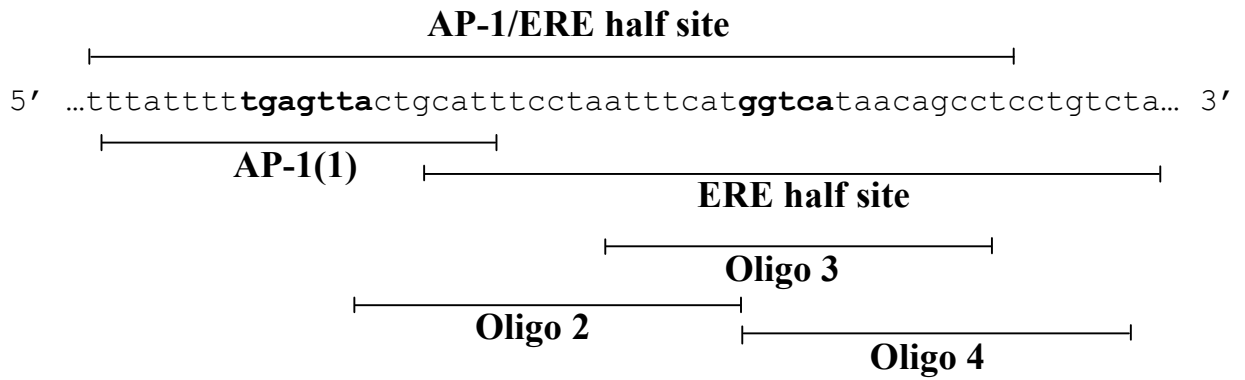


Figura 33. EMSA su AP-1(1)*, Oligo2*, Oligo3*, Oligo3m* e Oligo4* con proteine ricombinanti. Su gel di poliacrilammide al 6%, sono stati fatti migrare gli oligonucleotidi marcati AP-1(1)*, Oligo2*, Oligo3*, Oligo3m* e Oligo4* dopo incubazione con le sole proteine ricombinanti c-jun, c-fos, ATF-2 ed ER α e in presenza dei corrispondenti anticorpi specifici. In alto è riportato lo schema del posizionamento degli oligonucleotidi utilizzati sulla sequenza del promotore F.

4.2.4. VALUTAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE DEI SITI ER α E AP-1 MEDIANTE MUTAGENESI SITO-SPECIFICA

Mediante mutagenesi sito specifica sono state introdotte nei siti AP-1 (1) e ERE half site delle mutazioni (sito AP-1: tgagta \longrightarrow CAagtAC e sito ERE: ggtca \longrightarrow AAtca) che aboliscono la capacità delle sequenze di legare i fattori corrispondenti all'interno dei costrutti 862, 411 e 272. I costrutti mutati sono stati quindi trasfettati in cellule SaOS-2 in presenza e in assenza di 17 β -estradiolo e testati successivamente in saggi di luciferasi. Dal grafico di figura 34 risulta che le mutazioni di entrambi i siti nel costrutto 862 non producano una variazione significativa nell'attività promotrice, mentre provocano una diminuzione considerevole dell'attività del costrutto 411 indipendentemente dalla presenza di estradiolo. Le mutazioni introdotte nel costrutto 272 non variano sostanzialmente rispetto al wt trasfettato in presenza di 17 β -estradiolo (vedi commento a fig 12 A, pag.79). Ripetendo lo stesso esperimento in presenza di 17- β -estradiolo non si osserva più l'induzione dell'attività luciferasica che era invece significativa nei costrutti non mutati.

Questi dati, sono stati rafforzati da dati di EMSA riportati in figura 35.

In figura 35 sono paragonati i saggi EMSA effettuati impiegando gli oligonucleotidi ERE half site ed ERE half site con il sito ERE mutato e le proteine ricombinanti ER α , c-jun, c-fos e ATF-2, singolarmente o nelle combinazioni che si sono dimostrate più efficaci nei precedenti esperimenti. Come si può osservare la mutazione nel sito ERE provoca, come abbiamo già descritto una abolizione totale del legame della proteina ER α (linea 13) ma un rafforzamento dell'interazione di ATF2 e delle sue combinazioni con c-jun ed ER α (linee 11, 12 e 14). Nella stessa figura si paragonano anche gli EMSA, effettuati con le stesse combinazioni di proteine ricombinanti, sugli oligonucleotidi AP-1/ERE half ed AP1/ERE half con il sito AP-1 (1) mutato. In modo paradossalmente opposto in questo contesto si osserva che la mutazione del sito AP-1 provoca un incremento nel legame di ER α (linea 27) mentre diminuisce la forza di

legame dell'interazione di ATF2 e delle sue combinazioni con c-jun ed ER α (linee 25, 26, 28). Questo induce a pensare che esista una certa flessibilità della sequenza analizzata e che si verifichi una sorta di compensazione mediante rafforzamento di alcune interazioni DNA/proteina e proteina/proteina quando altre vengono a mancare, questo spiegherebbe perché non si osservano sostanziali modificazioni nell'attività del promotore quando vengano mutati i siti ERE half site e AP-1 (1) in certi contesti.

La valutazione complessiva di questi dati ci porta ad ipotizzare che anche se i fattori c-jun, c-fos, ATF2 e ER α singolarmente rivestono una certa importanza, è solo attraverso la combinazione dei fattori che si ottiene la massima affinità al DNA e la conseguente regolazione dell'attività del promotore.

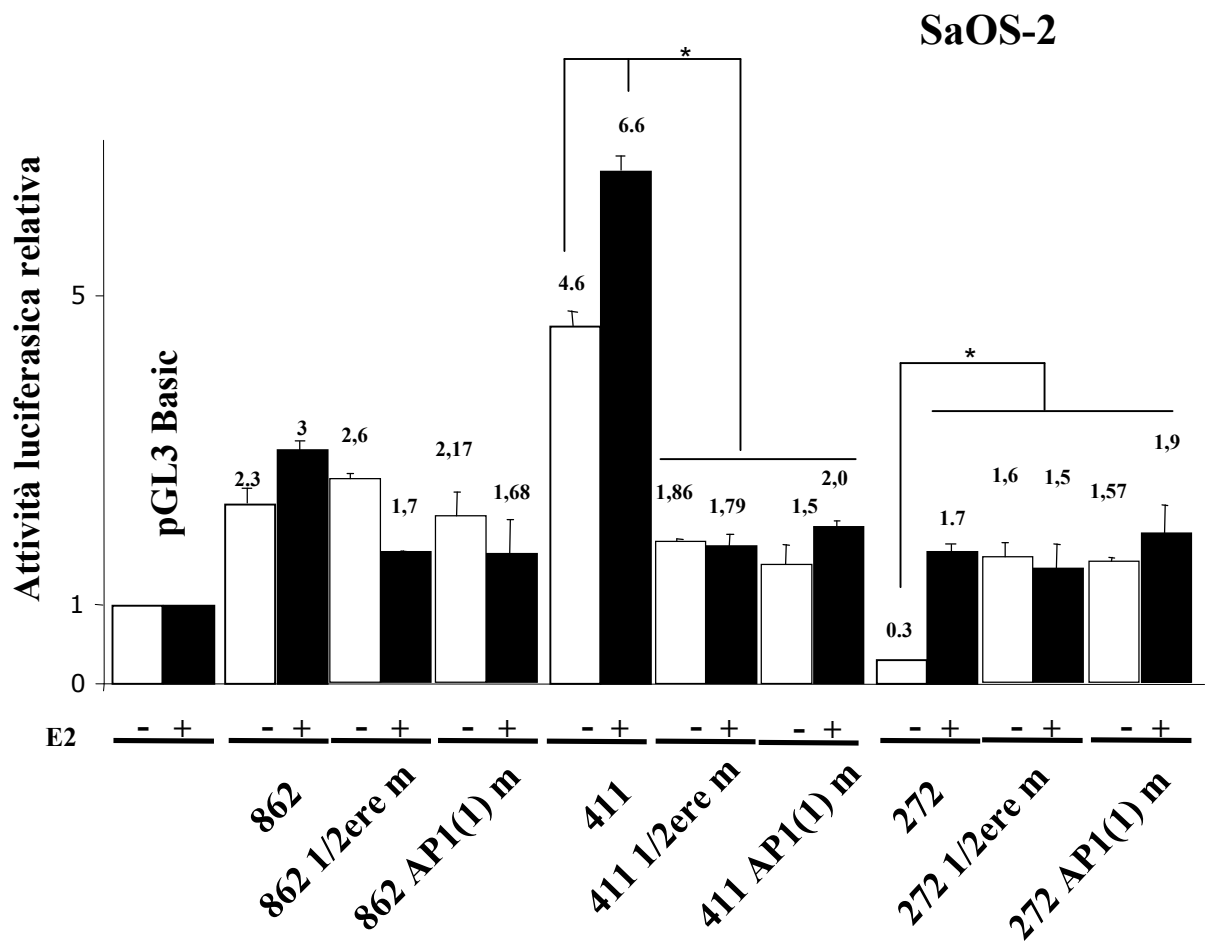


Figura 34. Valutazione dell'attività luciferasica dopo mutazione dei siti AP1 (1) e 1/2ERE. Analisi effettuata dopo trasfezione dei costrutti indicati mutati nei siti AP1 (1) e 1/2ERE o del solo vettore vuoto (pGL3-Basic) in cellule SaOS-2. Gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza (-) o presenza (+) di 17β estradiolo. I valori sono espressi in unità relative di luciferasi. Le significatività relative alle mutazioni sono indicate dove presenti da *= $P < 0,05$

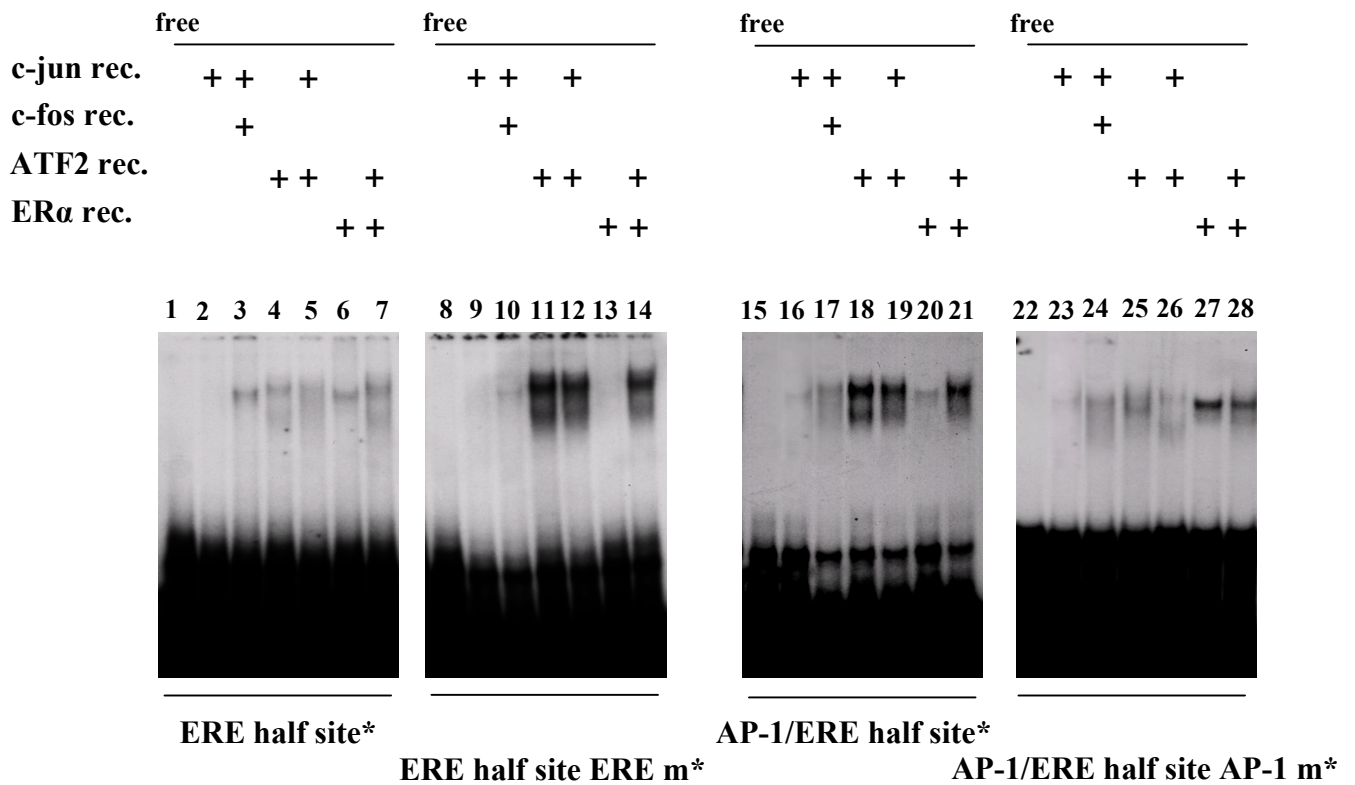


Figura 35. EMSA su EREhalf site*, EREhalf site EREm*, AP-1/ERE half site* e AP-1/ERE half site AP-1 m* con proteine ricombinanti. Su gel di poliacrilammide al 6%, sono stati fatti migrare gli oligonucleotidi marcati ERE half site*, ERE half site EREm*, AP-1/ERE half site* e AP-1/ERE half site AP-1 m* dopo incubazione con le proteine ricombinanti c-jun, c-fos, ATF-2 ed ER α e in presenza dei corrispondenti anticorpi specifici.

4.3 NFATc1

4.3.1. BACKGROUND

Come già descritto nel paragrafo 1, l'analisi per la ricerca di siti per fattori trascrizionali ha individuato nel promotore F sei potenziali siti di legame per il fattore trascrizionale NFATc1 (figura 36 A). Questo fattore viene tradizionalmente descritto come il principale regolatore del differenziamento degli osteoclasti, e poco ancora si conosce riguardo al suo coinvolgimento negli osteoblasti. Solo recentemente, infatti, sono apparsi in letteratura alcuni lavori che descrivono NFATc1 come regolatore di geni espressi negli osteoblasti (pag. 46).

Abbiamo quindi reputato interessante il fatto che nel promotore di un gene espresso sia negli osteoclasti che negli osteoblasti, il gene di $ER\alpha$, si trovino potenziali siti di legame per questo fattore.

Esperimenti precedentemente effettuati nel nostro laboratorio rivolti all'impiego di molecole decoy per la modulazione genica hanno dimostrato che la trasfezione di un corto oligonucleotide double strand (denominato RA4-3') ha un effetto positivo sull'espressione di $ER\alpha$ in cellule di carcinoma mammario $ER\alpha$ negative (MDA-MB-231) e in cellule di osso, sia osteoclasti che osteoblasti (Lambertini et al, 2002; Lambertini et al, 2002a; Lambertini et al, 2005).

La sequenza RA4-3', scelta tra altre che si sono dimostrate meno efficienti, mima una regione regolativa del gene $ER\alpha$. La prima ipotesi formulata è stata quella relativa alla possibilità che questa sequenza induca una modulazione positiva reclutando un fattore di trascrizione negativo. La sequenza RA4-3' è localizzata a -3176/-3157 nt dal sito di inizio della trascrizione (figura 36 B) nel promotore C del gene che è attivo nel carcinoma mammario.

L'evidenza che questa molecola decoy funzionasse anche in cellule di osso che producono mRNA per $ER\alpha$ solo attraverso l'attività del promotore F, ci ha portato a pensare che l'azione di RA4-3' si esplicasse attraverso la sottrazione di un fattore trascrizionale implicato anche

nella regolazione dell'espressione di ER α negli osteoblasti e negli osteoclasti attraverso il riconoscimento di cis-elementi nel promotore F.

Facendo una ricerca di omologia si trova infatti che la sequenza RA4-3' è altamente omologa ad una regione del promotore F (figura 36 B).

L'analisi bioinformatica rivela sulla sequenza RA4-3' la presenza di potenziali siti di legame per: HNF3 (potenziale coregolatore di ER α in cellule di carcinoma mammario), TCF11 (potenziale repressore della trascrizione), NFATc1 e MEF2 (regolatori di geni osso specifici). Esperimenti di EMSA, effettuati utilizzando l'oligonucleotide marcato RA4-3' e una serie di opportuni oligonucleotidi in qualità di sequenze competitive hanno dimostrato che la proteina che con maggiore probabilità è responsabile dell'effetto dell'oligonucleotide RA4-3', è NFATc1.

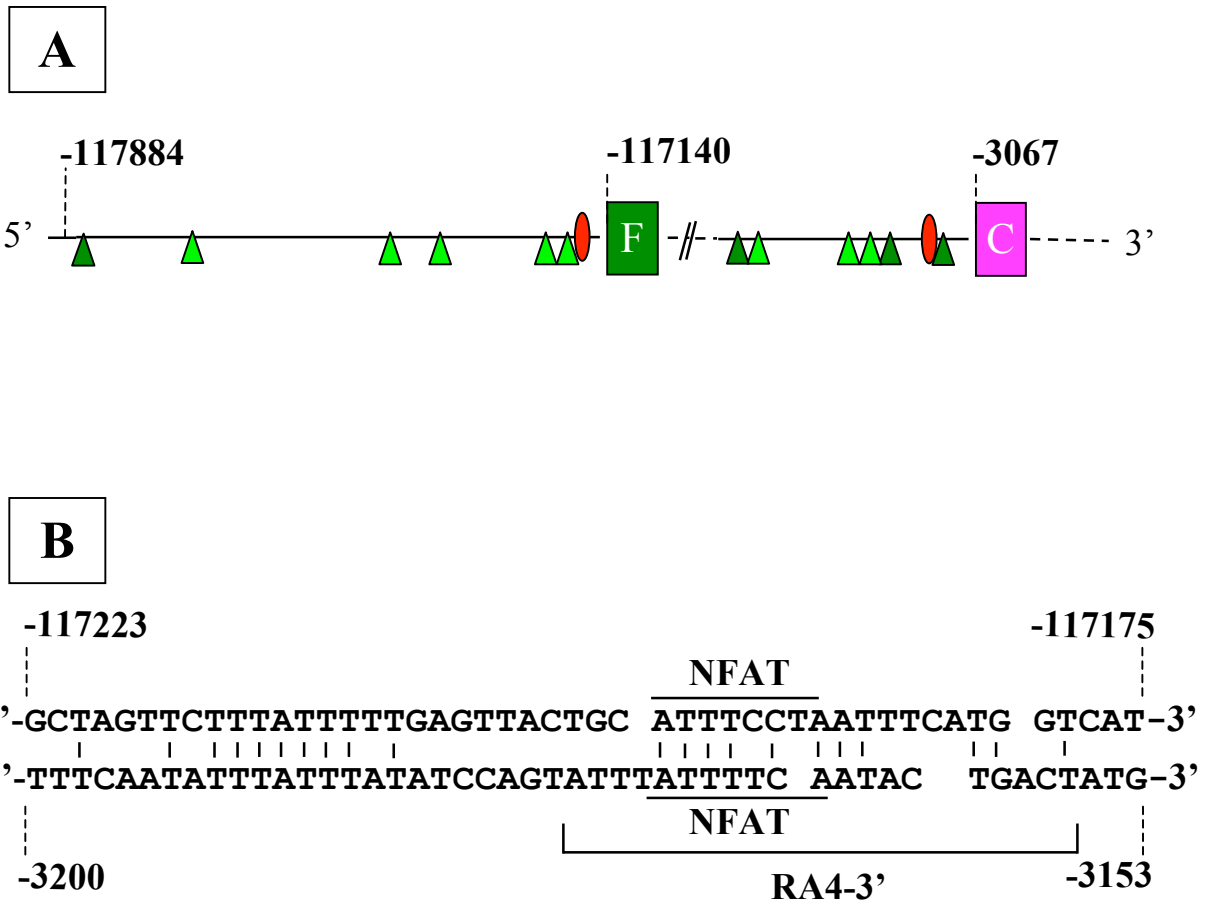


Figura 36. Schema della localizzazione dei potenziali siti di legame per NFATc1 nel promotore F e nel promotore C. **A** Rappresentazione schematica della localizzazione di potenziali siti di legame per NFATc1 nella regione del promotore F e nel promotore C. I siti per NFATc1 sono indicati come triangoli verdi, gli ovali rossi rappresentano gli elementi responsivi all'estrogeno (ERE). Le lettere maiuscole F e C indicano gli esoni F e C. I pesi molecolari dei vari prodotti di PCR sono riportati a lato della figura di immunoprecipitazione. Nella sequenza **B** è riportata la posizione esatta dell'oligonucleotide decoy RA4-3' (appartenente al promotore C) e l'omologia del sito NFATc1 che contiene con il sito NFATc1 situato nel promotore F.

4.3.2. ANALISI *IN VITRO* DELL'INTERAZIONE DI NFATc1 AL PROMOTORE F

Allo scopo di comprendere il ruolo di NFATc1 sono stati allestiti saggi EMSA “ad hoc” con estratti nucleari di cellule SaOS-2 e MDA-MB-231 precedentemente trattate con PMA e ionomicina (figura 37). È noto che questo trattamento (Hogan et al, 2003) provoca l'attivazione di NFATc1 e quindi la sua traslocazione dal compartimento citoplasmatico a quello nucleare. I pattern di interazione RA4-3'/proteine (linee 2 e 10) sono simili nelle due linee cellulari: risultano due principali complessi DNA/proteina (c1 e c2), specifici perché spiazzati da un eccesso dello stesso oligonucleotide freddo (linee 3 e 11) e non da un eccesso di un oligonucleotide non relato (scr linee 4 e 12).

Gli esperimenti di competizione sono stati eseguiti in combinazione con concentrazioni crescenti (5-, 25-, 50-, 100-, 250- volte) di oligonucleotide NFAT “NFATconsensus”. Questo oligonucleotide contiene la sequenza “consensus” di legame di NFATc1 (5' – ggag**ggaaaa**actgtttcatacagaaggcgt-3') presente nel promotore del gene umano di IL-2 (Kaminuma, et al. 2001), ed offre la possibilità di valutare, attraverso un eventuale spiazzamento, il reclutamento di NFATc1 sulla sequenza in esame.

I risultati ottenuti (figura 37) dimostrano che l'oligo “NFAT consensus” è in grado di spiazzare, anche a basse dosi le interazioni con gli estratti nucleari delle cellule SaOS-2 (linee 13-17), riducendo nettamente la formazione del complesso c1 e inibendo completamente la formazione del complesso c2. Al contrario, la stessa competizione funziona solo parzialmente nelle cellule MDA-MB-231. Questo suggerisce che la proteina NFATc1 è presente soprattutto nei complessi delle cellule SaOS-2.

Le potenzialità di legame sono state ulteriormente studiate eseguendo lo stesso tipo di esperimento con l'oligonucleotide marcato “NFAT consensus” e l'oligonucleotide competitore freddo RA4-3'. In questo caso i pattern di interazione sono diversi (figura 38): gli estratti di MDA-MB-231 generano tre principali complessi specifici DNA/proteina (c1-c3), quelli di SaOS-2 due (c2 e c3). In questo caso lo spiazzamento sembra riguardare unicamente

il complesso c3, ed è particolarmente evidente in MDA-MB-231. Una possibile spiegazione di questo fenomeno, in accordo con l'idea che NFATc1 abbia un ruolo preponderante nelle cellule di osso, è che venga reclutato attraverso legami e interazioni particolarmente forti dalla propria sequenza consensus nelle cellule SaOS-2 più difficilmente spiazzabili.

Sono stati tentati diversi esperimenti di supershift, ma la mancanza di anticorpi contro NFATc1 adatti allo scopo non ha prodotto risultati soddisfacenti e dimostrare, in modo diretto, la presenza di NFATc1 nei complessi identificati.

Pertanto l'indagine è proseguita attraverso l'impiego della strategia decoy abbinato a saggi della funzionalità di sequenze regolative promotrici.

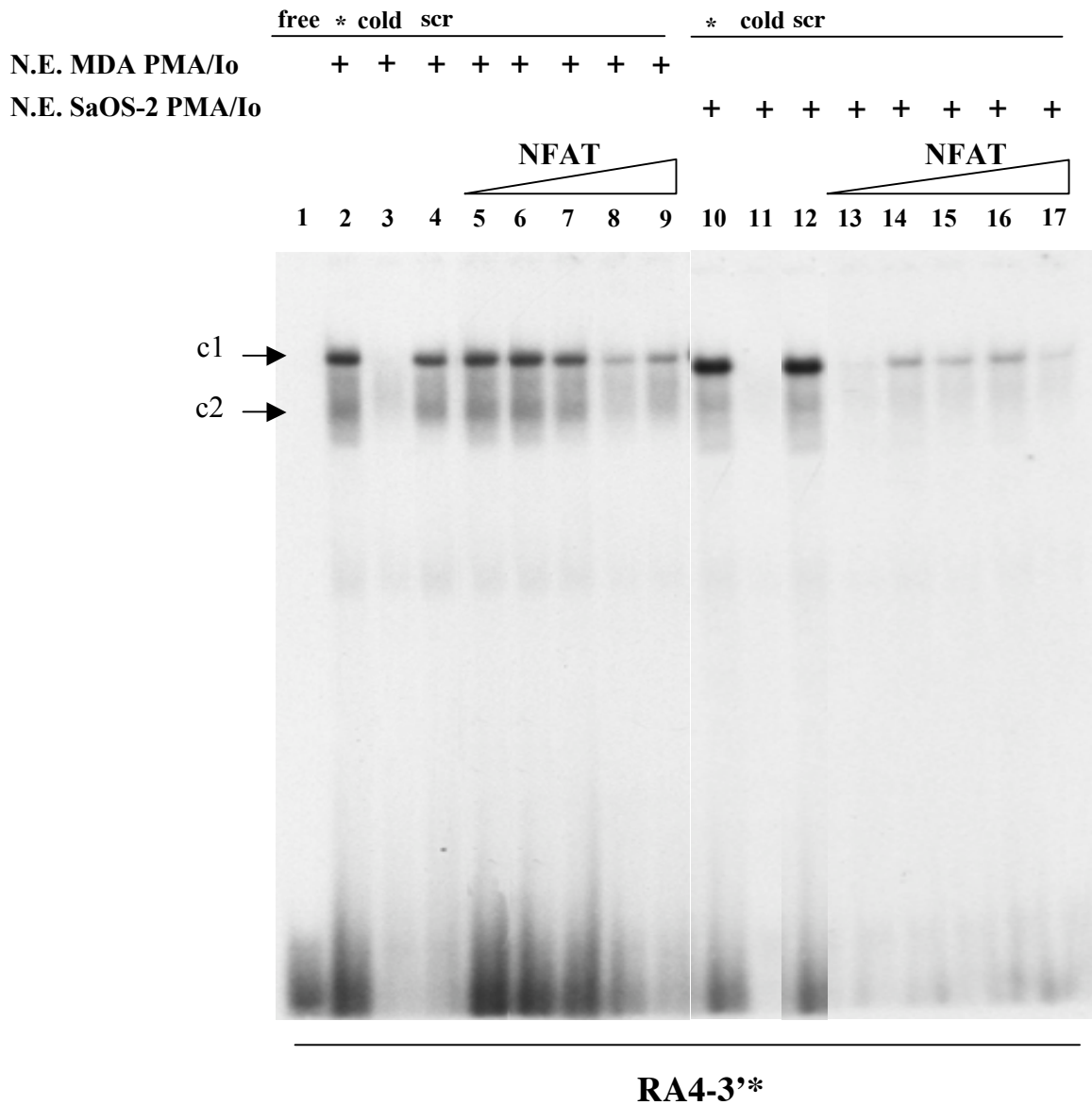


Figura 37. EMSA su RA4-3'* con estratti nucleari di cellule SaOS-2 e MDA-MB-231. Su gel di poliacrilammide al 6% è stato fatto migrare l'oligonucleotide marcato RA4-3'* in assenza (linea 1) e in presenza di estratti nucleari di cellule MDA-MB-231 (2-9) o SaOS-2 (10-17). Nelle linee 3 e 11 gli estratti nucleari sono incubati in presenza dell'oligonucleotide corrispondente non marcato (cold), nelle linee 4 e 12 di un lignonucleotide scramble (scr), nelle linee 5-9 e 13-17 di un eccesso (5, 25, 50, 100, 250 volte) dell'oligonucleotide NFAT non marcato.

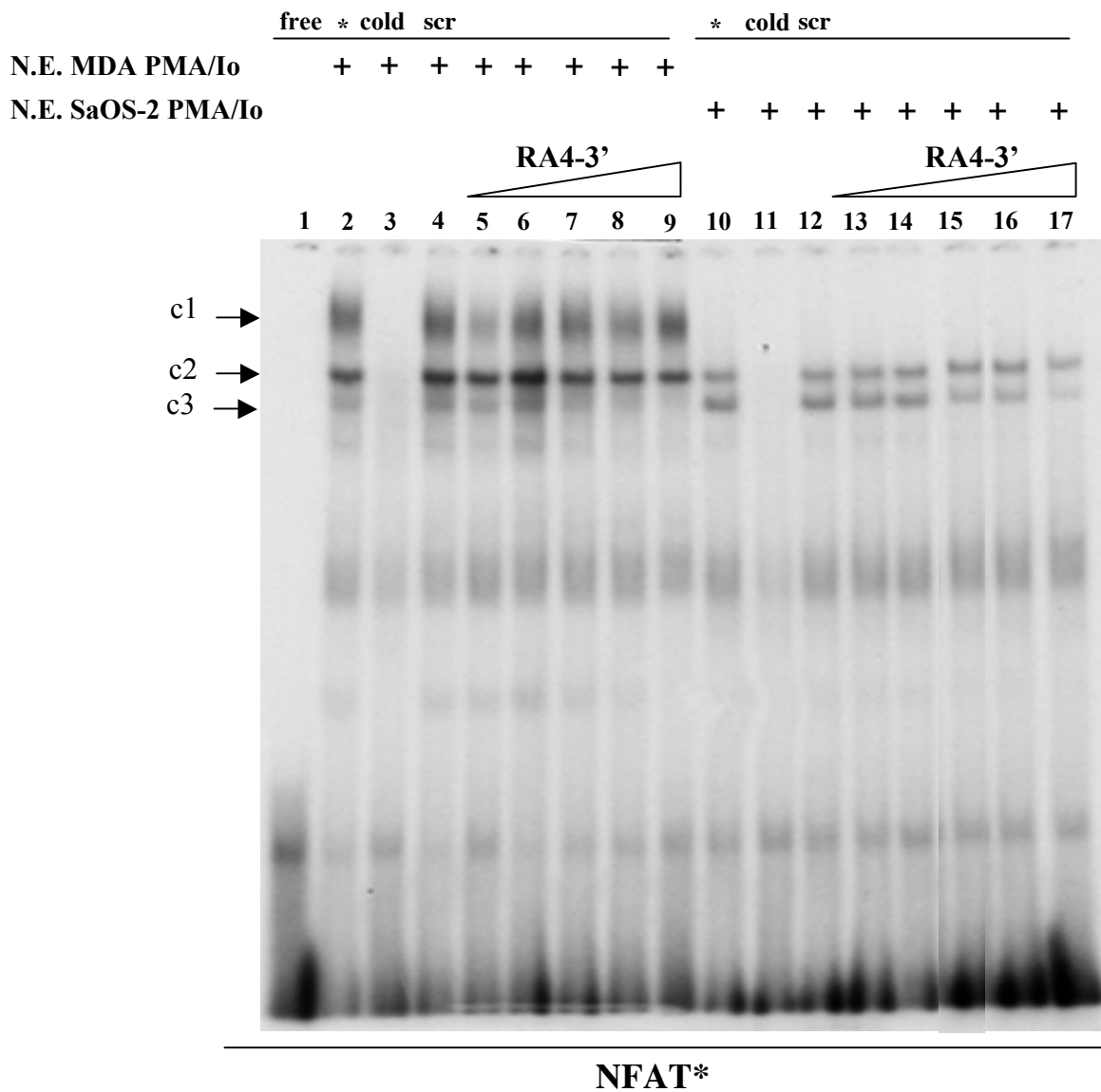


Figura 38. EMSA su NFAT* con estratti nucleari di cellule SaOS-2 e MDA-MB-231. Su gel di poliacrilammide al 6% è stato fatto migrare l'oligonucleotide marcato NFAT* in assenza (linea 1) e in presenza di estratti nucleari di cellule MDA-MB-231 (2-9) o SaOS-2 (10-17). Nelle linee 3 e 11 gli estratti nucleari sono incubati in presenza dell'oligonucleotide corrispondente non marcato (cold), nelle linee 4 e 12 di un oligonucleotide scramble (scr), nelle linee 5-9 e 13-17 di un eccesso (5, 25, 50, 100, 250 volte) dell'oligonucleotide RA4-3' non marcato.

4.3.3. STRATEGIA DECOY

Come schematizzato in figura 39 la strategia “decoy” o TFD (“transcription factor decoy”) è un intervento molecolare che causa un’attenuazione dell’interazione di uno specifico fattore trascrizionale (TF, “transcription factor”) con il suo “cis-element”, ovvero la sequenza a cui si lega fisiologicamente all’interno della cellula. L’oligonucleotide usato come molecola “decoy” contiene una sequenza che mima il “cis-element” endogeno e compete con esso per il legame del TF. Di conseguenza, se trasfettato in eccesso molare nelle cellule, provoca una rimozione del TF dalla sequenza endogena. Conseguentemente l’espressione dei geni direttamente regolati dal TF bersaglio della strategia “decoy” risulterà alterata negativamente o positivamente a seconda che il TF sia un attivatore (A) o un inibitore (B) trascrizionale.

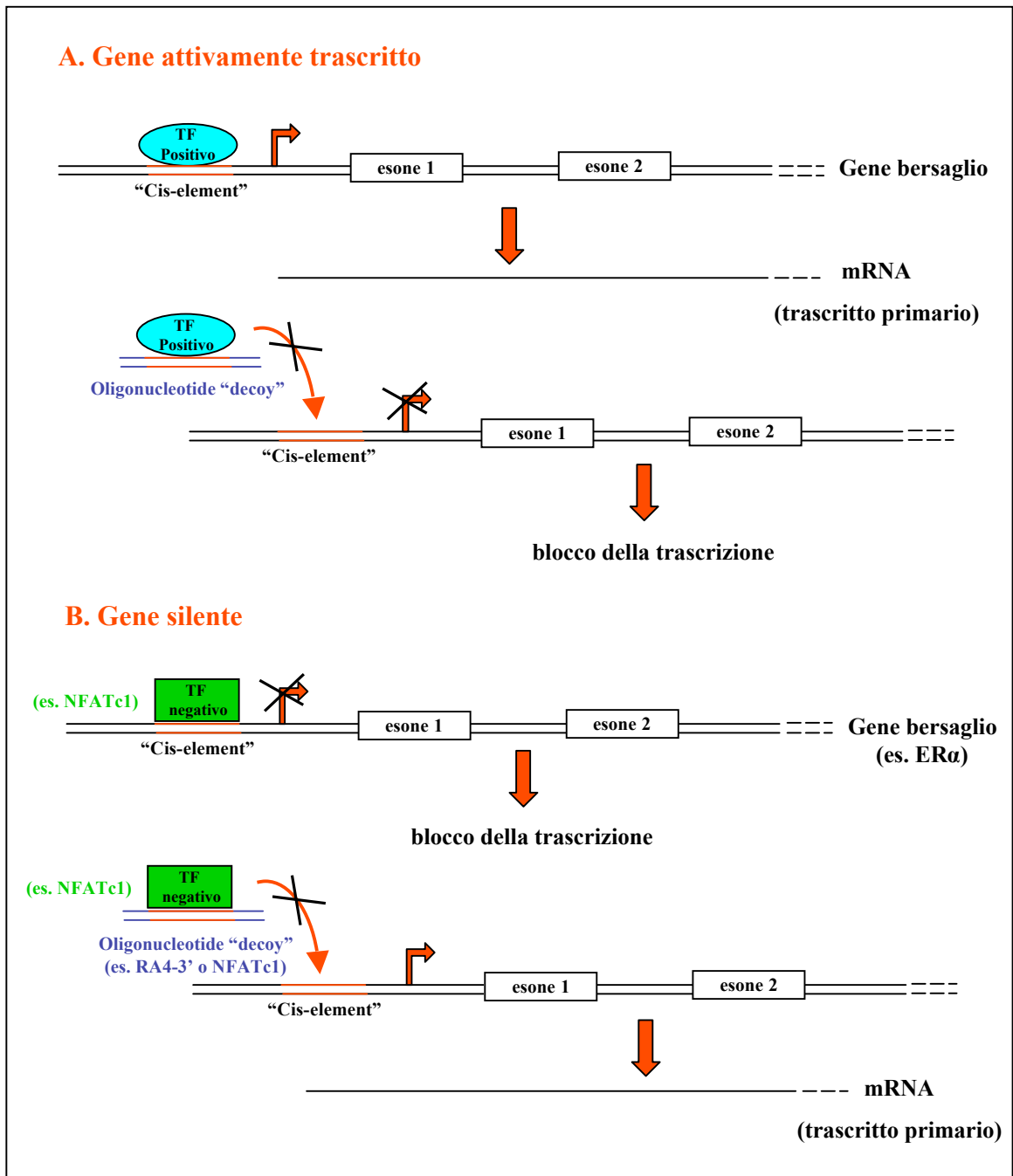


Figura 39. Schema esemplificativo della strategia decoy. In **A** l'oligonucleotide "decoy" sequestra un fattore trascrizionale (TF, "transcriptional factor") positivo inibendone l'interazione con il "cis-element" endogeno e bloccando quindi la trascrizione di un gene che fisiologicamente è attivamente trascritto. In **B** la molecola "decoy" inibisce il legame di un fattore trascrizionale (TF) negativo al relativo elemento consenso sul DNA cellulare, riattivando quindi la trascrizione di un gene normalmente silente.

4.3.4 ANALISI DELL'EFFETTO DELLA DEPLEZIONE DI NFATc1 MEDIANTE DECOY

Negli esperimenti che seguono si sono impiegate due molecole decoy per paragonare le rispettive capacità di modulare l'espressione di ER α e rafforzare l'ipotesi di partenza: l'oligonucleotide RA4-3' e l'oligonucleotide NFAT consensus. Queste molecole sono state trasfettate in cellule SaOS-2 in presenza di 17- β -estradiolo, per monitorare successivamente la funzione di ER α . Dopo 1 giorno e 6 giorni di esposizione al "decoy", è stato valutato l'effetto sull'espressione di ER α a livello di mRNA mediante RT-PCR quantitativa, e a livello di proteina, mediante Western Blot. I risultati riportati in figura 40 A mostrano che gli oligonucleotidi decoy inducono un aumento significativo dei livelli di mRNA per ER α e che questo effetto è marcatamente tempo di esposizione-dipendente. Al contrario l'oligonucleotide scramble (S) non modifica in modo significativo l'espressione del messaggero di ER α .

Queste osservazioni sono confermate dall'analisi Western Blot (figura 40 B) dove l'aumento dell'espressione della proteina ER α rispetto al controllo non trattato (C) è particolarmente evidente al sesto giorno per entrambi gli oligonucleotidi. Anche in questo caso l'oligonucleotide scramble (S) non interferisce con i livelli di espressione della proteina analizzata.

Questi risultati indicano che l'aumento nell'espressione di ER α osservato è strettamente associato ad una sottrazione della proteina NFATc1, la quale è evidentemente responsabile di un controllo negativo sull'espressione del gene ER α .

La sovrapposizione degli effetti dei due oligonucleotidi porta quindi ragionevolmente a confermare il reclutamento proprio di NFATc1 da parte della sequenza RA4-3' (validazione dell'ipotesi di partenza). È interessante notare come l'effetto della molecola decoy, in particolare di RA4-3', sia fortemente potenziato dalla presenza di estrogeno (figura 40 A).

Questo suggerisce almeno due interpretazioni: 1-un'autoregolazione della trascrizione di ER α , 2- una accessibilità alle sequenze endogene lasciate "vuote" da NFATc1 sequestrato dal decoy da parte di fattori che risentono positivamente della presenza dell'estrogeno.

Queste conclusioni sono state corroborate eseguendo gli esperimenti di decoy in associazione con il vettore plasmidico pNFAT-TA-Luc, che è stato cotrasfettato nelle stesse cellule. Questo contiene tre copie in tandem della sequenza NFAT consensus a monte di un promotore minimo TA (sequenza TATA box appartenente al promotore del gene timidina chinasi del virus Herpes Simplex). Cellule SaOS-2 trasfettate con solo questo plasmide mostrano una induzione significativa dell'attività luciferasica, dimostrando che NFATc1 è in grado, legando il suo elemento consensus nel vettore NFAT-luc, di attivarne il promotore (figura 41 A). quando questo plasmide viene trasfettato insieme alla molecola decoy, la combinazione genera, come ci si aspettava, una diminuzione significativa dell'attività luciferasica. L'oligonucleotide scramble (S), invece, non ha alcun effetto dimostrando che l'oligonucleotide RA4-3' è effettivamente in grado di sequestrare il fattore NFATc1.

La conseguenza che il decoy ha sull'aumento dell'espressione di ER α si associa ad un incremento dell'attività funzionale di ER α , come dimostrato cotrasfettando le cellule con RA4-3' e il pGL2-VIT-3ERE contenente in triplice copia elementi consensus responsivi all'estrogeno. Questa combinazione (figura 41 A) provoca, a verifica della nostra ipotesi, un aumento nell'attività luciferasica evento che non si osserva quando si trasfetta con l'oligonucleotide scramble (S).

I livelli basali di espressione delle proteine NFATc1 ed ER α prima e dopo trattamento con PMA e Ionmicina (PMA/Io) sono stati misurati mediante Western Blot (figura 41 B). Si può notare come, dopo trattamento aumenti l'espressione nucleare di NFATc1 in modo apprezzabile, mentre i livelli di ER α tendono a diminuire.

Poiché le conoscenze sul ruolo di NFATc1 sugli osteoblasti sono decisamente parziali, il lavoro è proseguito utilizzando come modello sperimentale gli osteoblasti umani primari, allo scopo di validare le conclusioni a cui si è giunti impiegando le cellule SaOS-2.

Pertanto, gli stessi esperimenti descritti in figura 41 sono stati condotti su quattro colture di osteoblasti primari provenienti da differenti campioni (figura 42). I valori di luciferasi ottenuti non sono significativi a causa della diversità intrinseca alle colture primarie: si osserva pertanto un andamento sufficientemente diverso legato alle caratteristiche di ogni campione che si riflette inevitabilmente sulla deviazione standard calcolata sulla media dei valori ottenuti da ciascuna coltura. Nonostante questo è però possibile osservare la stessa tendenza descritta precedentemente.

Possiamo pertanto concludere che anche in un modello “ex vivo” più vicino alla condizione “in vivo” rispetto ad una linea cellulare è possibile modulare mediante RA4-3’ decoy sia l’espressione che l’attività di ER α e dimostrare che questo è mediato dal fattore NFATc1. L’analisi immunocitochimica per la presenza di ER α in queste cellule (figura 42 B) dimostra un netto aumento di espressione per ER α dopo trattamento con entrambi gli oligo decoy.

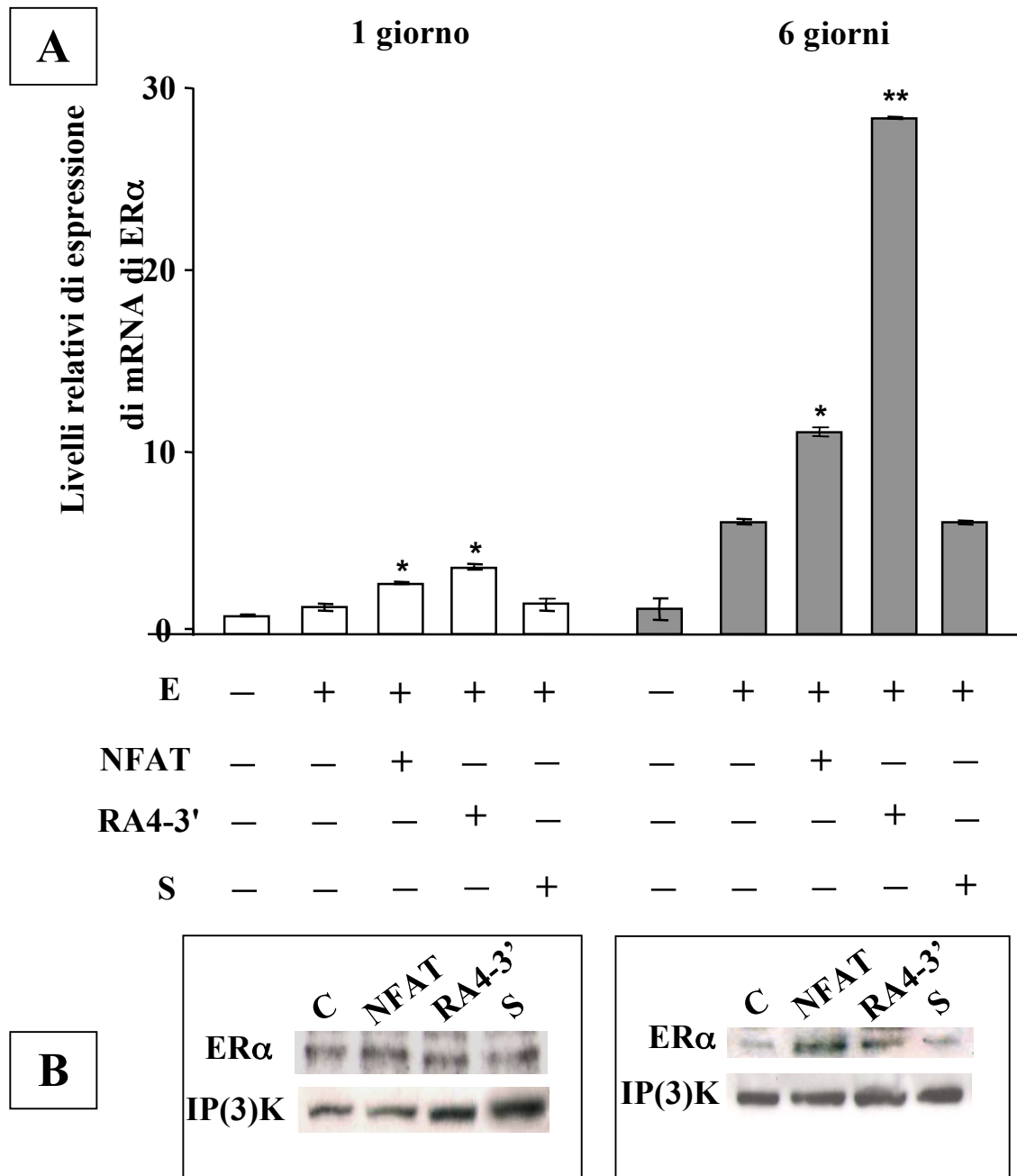


Figura 40. Analisi dell'espressione del gene ER α mediante RT-PCR quantitativa e Western Blot. **A** Il cDNA ottenuto dalle cellule SaOS-2, coltivate in presenza (+) e in assenza (-) di 17 β -estradiolo (E), in presenza (+) e in assenza (-) dell'oligonucleotide NFAT consensus o dell'oligonucleotide RA4-3' o dell'oligonucleotide scramble (S) è stato sottoposto a RT-PCR quantitativa per valutare i livelli di mRNA di ER α . I livelli di espressione sono stati normalizzati sulla base dell'espressione del gene di riferimento GAPDH. La significatività è presente quando indicata * = P<0,05, ** = P<0,01 nei confronti del controllo (non trattato). **B** Le figure illustrano l'analisi dell'espressione delle proteine ER α e IP(3)K mediante Western Blot su estratti cellulari totali di cellule SaOS-2 non trattate (C), trattate con l'oligonucleotide NFAT consensus, l'oligonucleotide RA4-3' e l'oligonucleotide scramble (S). I lisati totali sono caricati in gel di poliaccrilammide al 12% in uguali quantità e le proteine separate con corsa elettroforetica sono state trasferite in PVDF ed è stata poi eseguita una ibridazione con gli anticorpi contro ER α e IP3K. Le analisi sono state effettuate dopo 1 giorno e dopo 6 giorni dei trattamenti indicati.

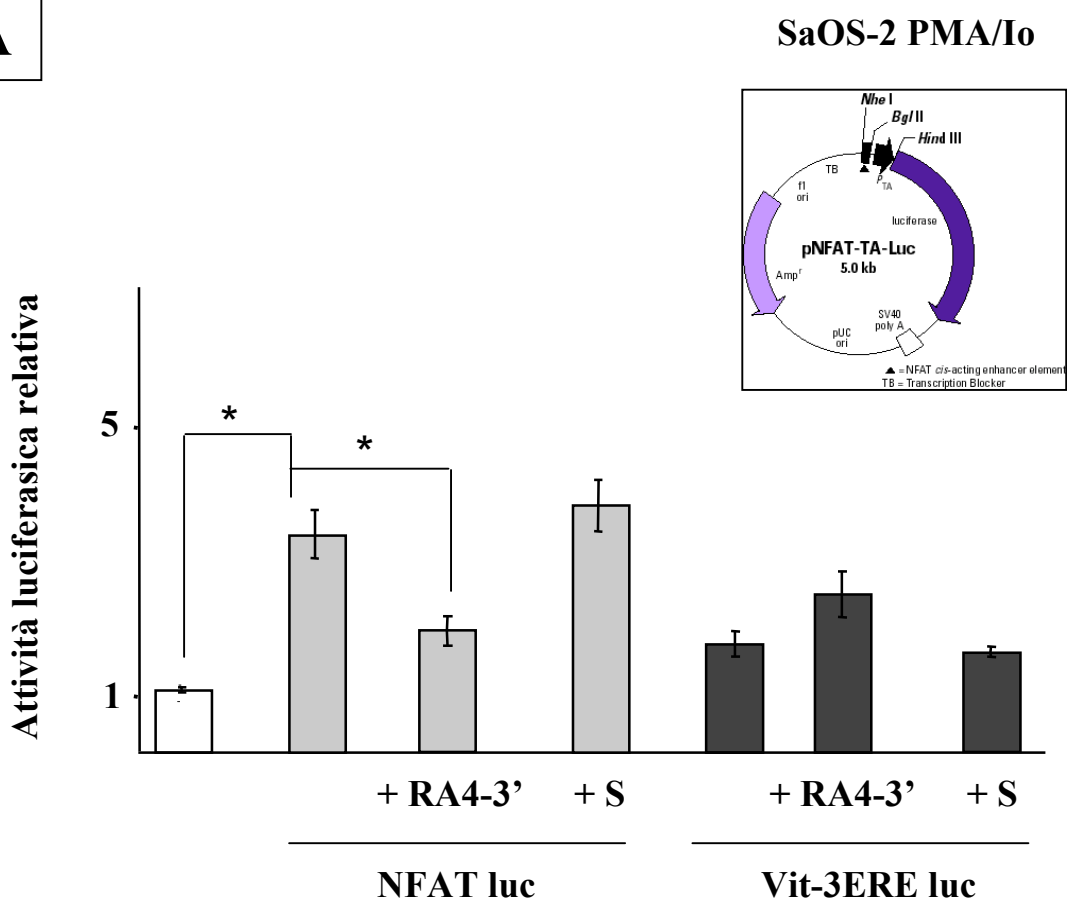
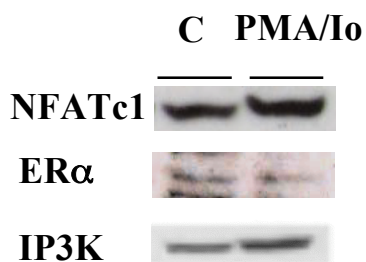
A**B**

Figura 41. Analisi dell'attività luciferasica e dell'espressione di NFATc1 ed ER α . **A** Analisi effettuata dopo trasfezione dei costrutti NFAT luc (nel riquadro in alto è riportato lo schema del vettore) e Vit-3ERE luc o del solo vettore vuoto pGL3-Basic (barra bianca) in cellule SaOS-2. Gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza (-) o presenza (+) dell'oligonucleotide decoy RA4-3' o dell'oligonucleotide scramble (S). I valori sono espressi in unità relative di luciferasi rispetto al controllo pGL3-Basic. La significatività è presente quando riportata e * = $P < 0,05$. **B** La figura illustra l'analisi dell'espressione delle proteine NFATc1, ER α e IP(3)K mediante Western Blot su estratti cellulari totali di cellule SaOS-2 non trattate (C) e trattate con PMA 10 μ g/mL e Ionomicina 0,5 μ M (PMA/Io). I lisati nucleari sono caricati su gel di poliaccrilammide al 12% e le proteine separate con corsa elettroforetica sono state trasferite in PVDF ed è stata poi eseguita una ibridazione con gli anticorpi contro NFATc1, ER α e IP(3)K.

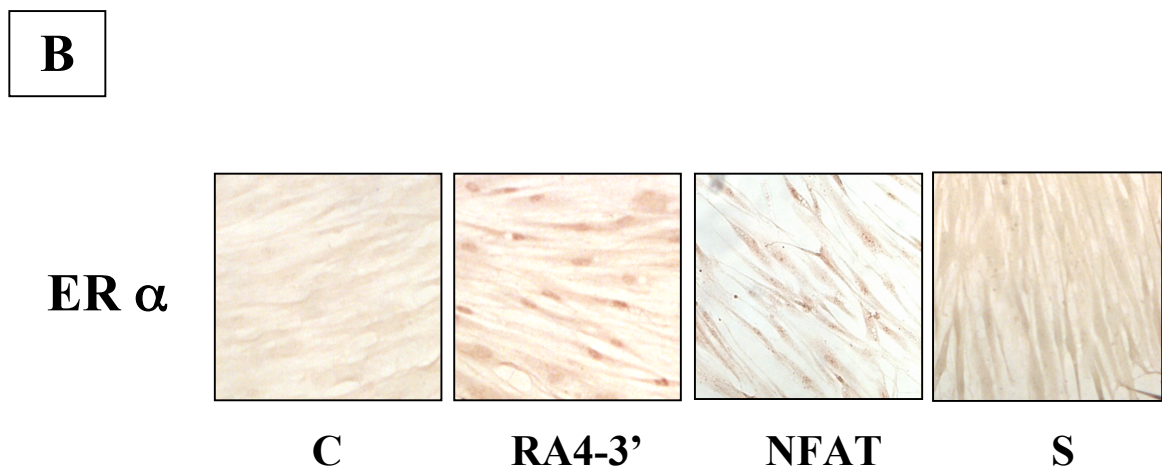
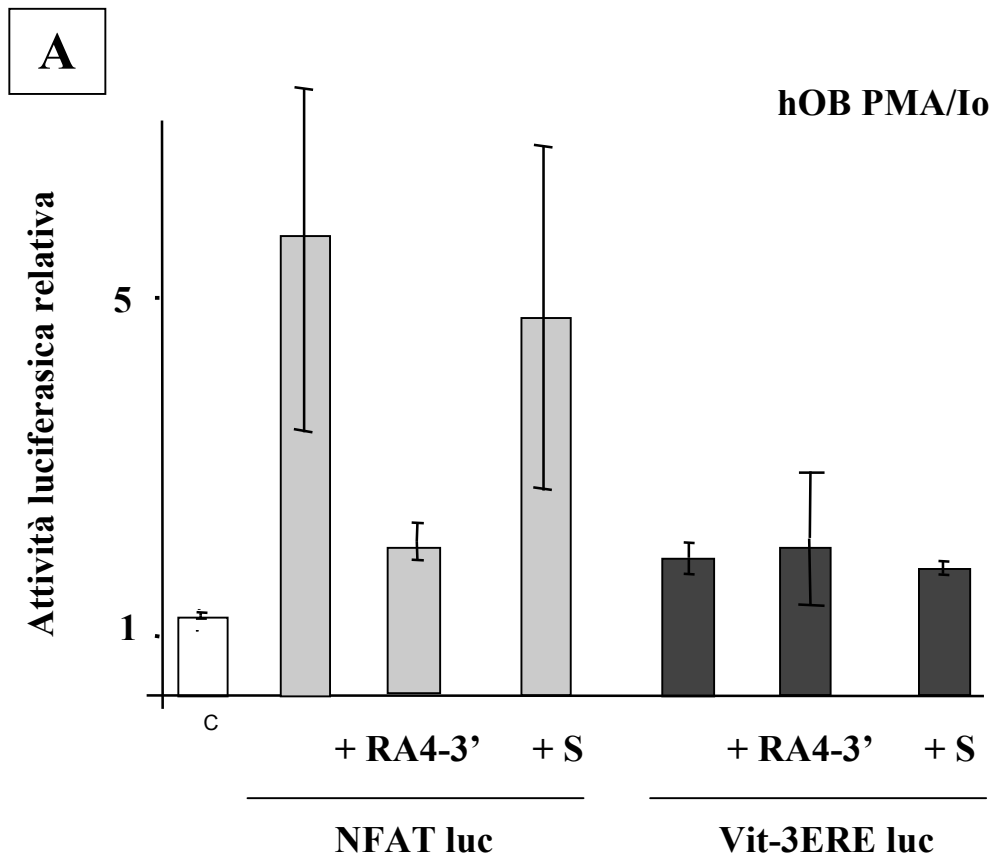


Figura 42. Analisi dell'attività luciferasica. **A** Analisi effettuata dopo trasfezione dei costrutti NFAT luc e Vit-3ERE luc o del solo vettore vuoto pGL3-Basic (barra bianca) in colture primarie di osteoblasti umani. Gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza (-) o presenza (+) dell'oligonucleotide decoy RA4-3' o dell'oligonucleotide scramble (S). I valori sono espressi in unità relative di luciferasi rispetto al controllo pGL3-Basic. **B** Analisi immunocitochimica dell'espressione di ER α in colture primarie di osteoblasti umani non trattate (C), trattate con l'oligonucleotide NFAT consensus, l'oligonucleotide RA4-3' e l'oligonucleotide scramble (S) è stata valutata l'espressione di ER α . Le analisi sono state effettuate dopo 6 giorni dei trattamenti indicati. Le immagini sono state ottenute al microscopio ottico con un ingrandimento 20X.

Il sistema di controllo di questi esperimenti è rappresentato dalle cellule MDA-MB-231, le quali rispondono positivamente al RA4-3' decoy con un aumento dell'espressione e dell'attività di ER α (figura 43 A).

Questo effetto però non è mediato da NFATc1 in quanto la cotrasfezione di RA4-3' decoy con il vettore NFAT-Luc non modifica l'attività di quest'ultimo (figura 43 B).

Pertanto, nonostante le cellule MDA-MB-231 esprimano la proteina NFATc1 (vedi analisi Western Blot, figura 43 C), questo fattore non è coinvolto nel mediare l'azione della molecola decoy in un contesto cellulare non osseo. Si può quindi concludere che NFATc1 agisce in modo specifico negli osteoblasti.

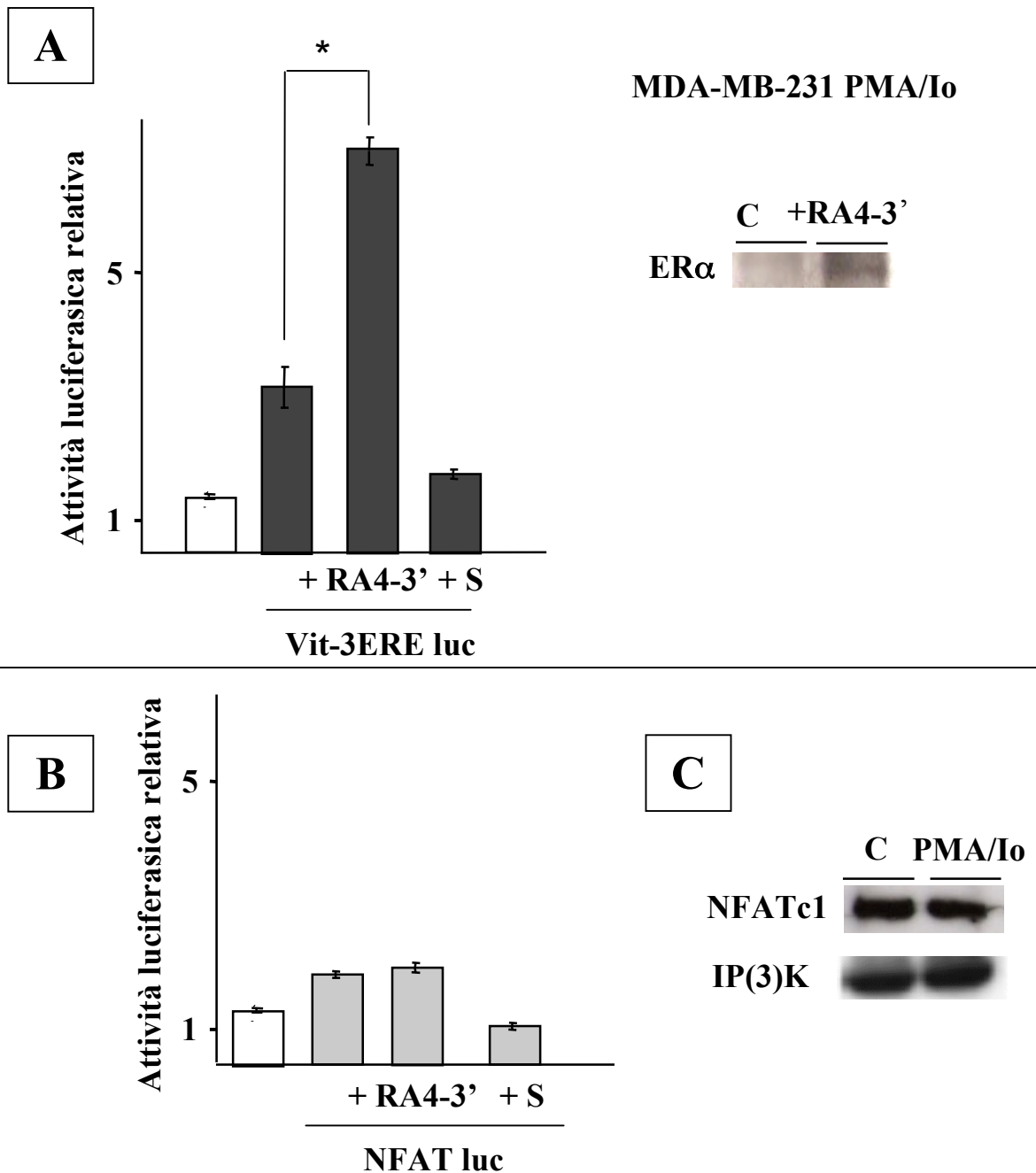


Figura 43. Analisi dell'attività luciferasica e dell'espressione di NFATc1 ed ER α . **A** Analisi effettuata dopo transfezione del costrutto Vit-3ERE luc o del solo vettore vuoto pGL3-Basic (barra bianca) in cellule MDA-MB-231. Gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza (-) o presenza (+) dell'oligonucleotide decoy RA4-3' o dell'oligonucleotide scramble (S). I valori sono espressi in unità relative di luciferasi rispetto al controllo pGL3-Basic. La significatività è presente quando riportata e * = $P < 0,05$. Di fianco è riportata l'analisi dell'espressione della proteina ER α su estratti cellulari totali di cellule MDA-MB-231 non trattate (C) e trattate con la molecola RA4-3'. **B** Analisi effettuata dopo transfezione del costrutto NFAT luc o del solo vettore vuoto pGL3-Basic (barra bianca) in cellule MDA-MB-231. Gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza (-) o presenza (+) dell'oligonucleotide decoy RA4-3' o dell'oligonucleotide scramble (S). I valori sono espressi in unità relative di luciferasi rispetto al controllo pGL3-Basic. La significatività è presente quando riportata * = $P < 0,05$. **C** Analisi dell'espressione delle proteine NFATc1 e IP(3)K su estratti cellulari totali di cellule MDA-MB-231 non trattate (C) e trattate con PMA 10 μ g/mL e Ionomicina 0,5 μ M (PMA/Io).

4.3.5 ANALISI *IN VIVO* DELL'INTERAZIONE DI NFATc1 AL PROMOTORE F E AL PROMOTORE C

Attraverso immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) abbiamo successivamente dimostrato che NFATc1 è in grado di legare sia il promotore C che il promotore F “*in vivo*”.

L'indagine è stata condotta utilizzando cellule umane di osteosarcoma (SaOS-2) esposte a trattamento con 100 µg/mL PMA e 0,5 µM ionomicina. Aliquote uguali di cromatina sonicata, sono state sottoposte a immunoprecipitazione con anticorpi specifici contro NFATc1 ed ER α , o con nessun anticorpo (NoAb). Dopo l'immunoprecipitazione la cromatina è stata estratta dalle biglie e utilizzata come templatato per l'analisi di PCR mediante tre coppie di primers che, come indicato in figura 44 A, amplificano tre regioni distinte appartenenti rispettivamente al promotore F (214 bp), al promotore C (161 bp) e al promotore A (121 bp). La cromatina ottenuta dai diversi campioni e non sottoposta a immunoprecipitazione (Input) è amplificabile in modo paragonabile (figura 44 B). Dai segnali di PCR risulta che le proteine NFATc1 ed ER α sono reclutate a livello del promotore F e del promotore C, ma non a livello del promotore A il quale non presenta alcun sito di legame per NFATc1 o ER α . Non si osserva nessun prodotto di amplificazione nemmeno quando il materiale è immunoprecipitato in assenza di anticorpo (NoAb).

Questo ci consente di affermare che NFATc1 sicuramente è in grado di legare *in vivo* i promotori F e C del gene ER α .

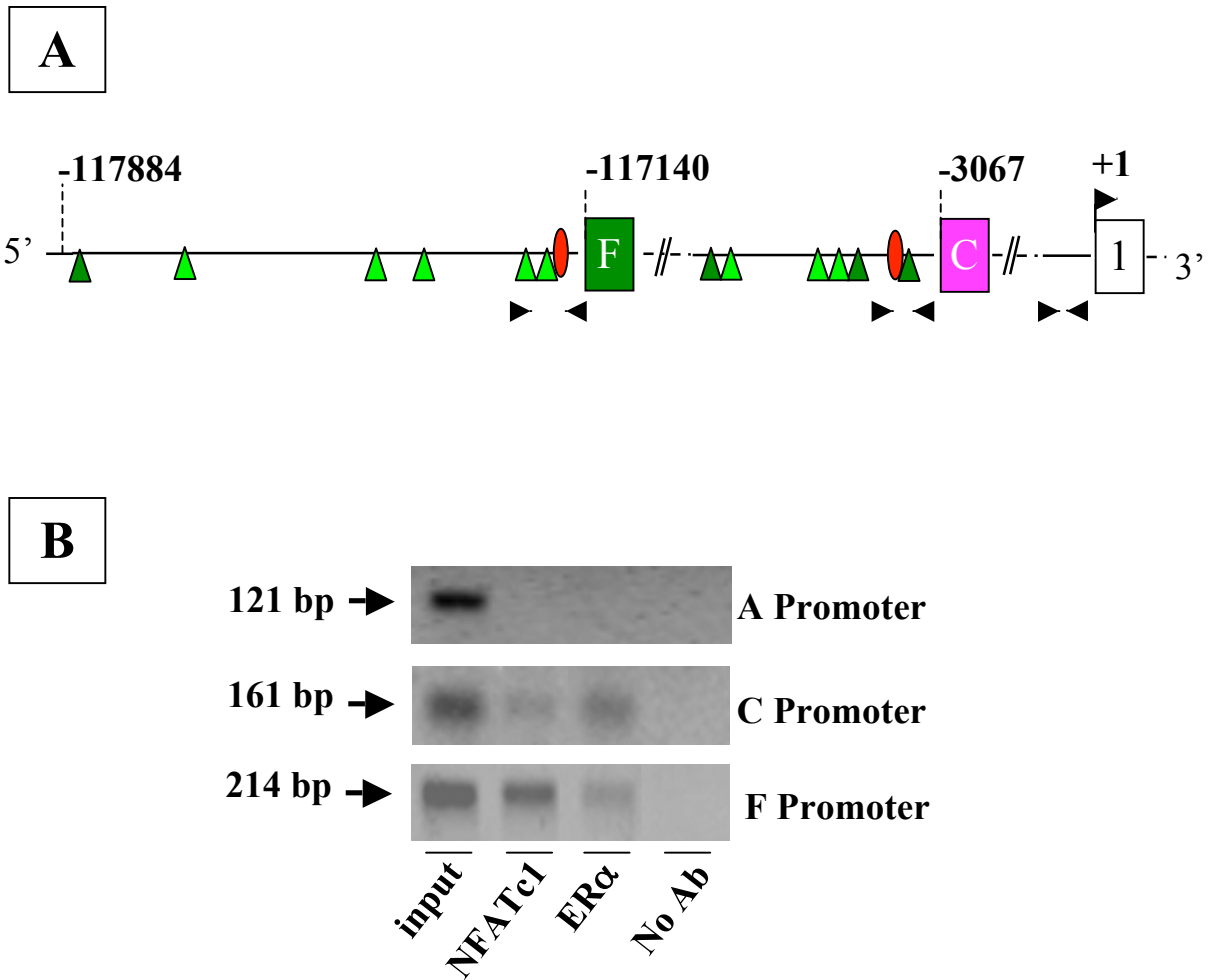


Figura 44. Saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP). C Colture cellulari di SaOS-2 sono trattate con formaldeide all'1% in modo da fissare le proteine al DNA. Un'aliquota è mantenuta inalterata e costituisce il controllo positivo *input* (DNA totale della cellula). La restante cromatina è immunoprecipitata con l'anticorpo Anti-NFATc1 e con l'anticorpo Anti-ER α e in assenza di anticorpo (NoAb). Più reazioni di PCR sono quindi allestite con primers che amplificano rispettivamente una regione del promotore F , una regione del promotore C ed una regione del promotore A. La posizione delle tre coppie di primers è schematizzata nella parte A,

4.3.6 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SULLA FUNZIONE DI ER α

La conseguenza della modulazione positiva sull'espressione di ER α da parte delle due molecole decoy è stata ulteriormente approfondita valutando la funzionalità degli osteoblasti in termini di deposizione di matrice mineralizzata e apoptosi.

La capacità di deporre matrice è considerato uno dei principali marcatori del differenziamento osteoblastico tardivo, per cui risulta particolarmente utile da analizzare per metterla in relazione con un ruolo specifico di NFATc1.

Impiegando la colorazione con “Alizarin Red”, specifica per i sali di calcio nei noduli di mineralizzazione, è stato dimostrato che il trattamento con entrambe le molecole decoy, su colture di osteoblasti primari, induce il processo di mineralizzazione (figura 45). Si può quindi affermare che la molecola decoy agendo come induttore dell'espressione di ER α , è in grado di influenzare il differenziamento degli osteoblasti.

A sostegno di questa evidenza, quando le cellule, sia osteoblasti primari che SaOS-2, vengono sottoposte al trattamento decoy non vanno incontro ad apoptosi. L'analisi è stata eseguita mediante saggio colorimetrico “DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System” che misura il grado di frammentazione del DNA presente in caso di apoptosi. I nuclei apoptotici, quando presenti, risultano intensamente colorati in marrone; l'impiego di una contro-colorazione con ematossilina permette, successivamente, di evidenziare i nuclei delle cellule non apoptotiche che si colorano di viola-blu. La figura 46 mostra come sia cellule di osteosarcoma SaOS-2 che osteoblasti primari non risultano apoptotici dopo il trattamento con entrambe le molecole decoy; infatti i nuclei risultano colorati di viola-blu e questo risultato è sicuramente in linea con quanto osservato nella precedente valutazione.

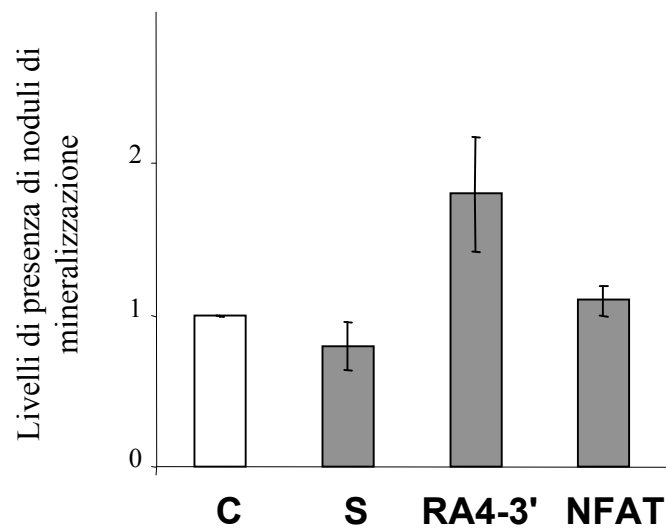
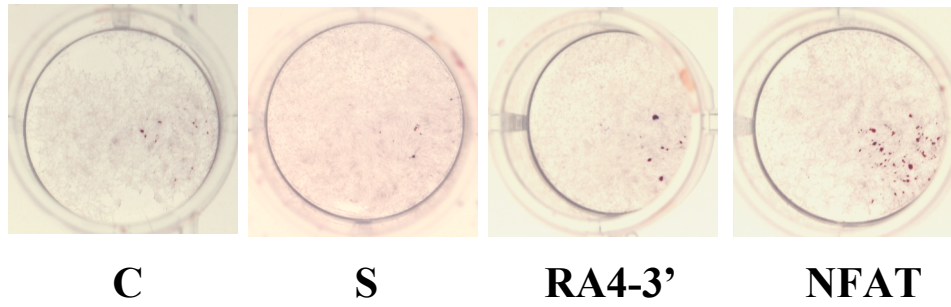


Figura 45. Valutazione dei noduli di mineralizzazione in colture di osteoblasti primari. Visualizzazione della formazione di noduli di mineralizzazione in colture di osteoblasti umani primari non trattati (C) e trattati con con 1 $\mu\text{g/ml}$ di oligonucleotide RA4-3', NFAT e Scramble (S) mediante colorazione con “Alizarin Red Solution”. I noduli, quando presenti, risultano di colore rosso. Lo stesso risultato è espresso come istogramma nel grafico sotto.

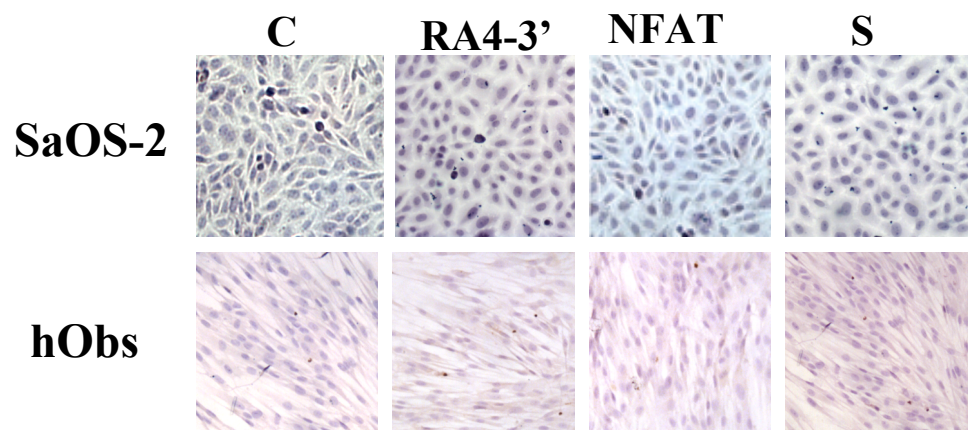


Figura 46. Valutazione dell'apoptosi di cellule SaOS-2 e osteoblasti primari mediante saggio TUNEL. Immagini al microscopio ottico (20X) di cellule SaOS-2 e colture di osteoblasti umani primari non trattate (controllo) e trattate con 1 $\mu\text{g/ml}$ di oligonucleotide RA4-3', NFAT e Scramble (S), sottoposti a valutazione dell'apoptosi mediante saggio colorimetrico TUNEL. Quando presenti i nuclei apoptotici risultano di colore marrone, i nuclei non apoptotici, in seguito a colorazione con ematossilina, sono di colore blu-viola.

DISCUSSIONE

La complessità delle funzioni delle cellule che compongono il sistema scheletrico emerge da numerosi studi a livello molecolare e cellulare condotti su diversi modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo* che ripercorrono il processo differenziativo che si verifica durante l'embriogenesi o i processi di riparo. La corretta osteogenesi ed il mantenimento dello stato di salute dell'osso sono regolati da diverse vie del segnale, solo in parte note. Queste, interagendo fra di loro, modulano vari geni bersaglio, che svolgono una funzione precisa nelle fasi differenziative e proliferative di osteoblasti, osteoclasti e dei loro progenitori.

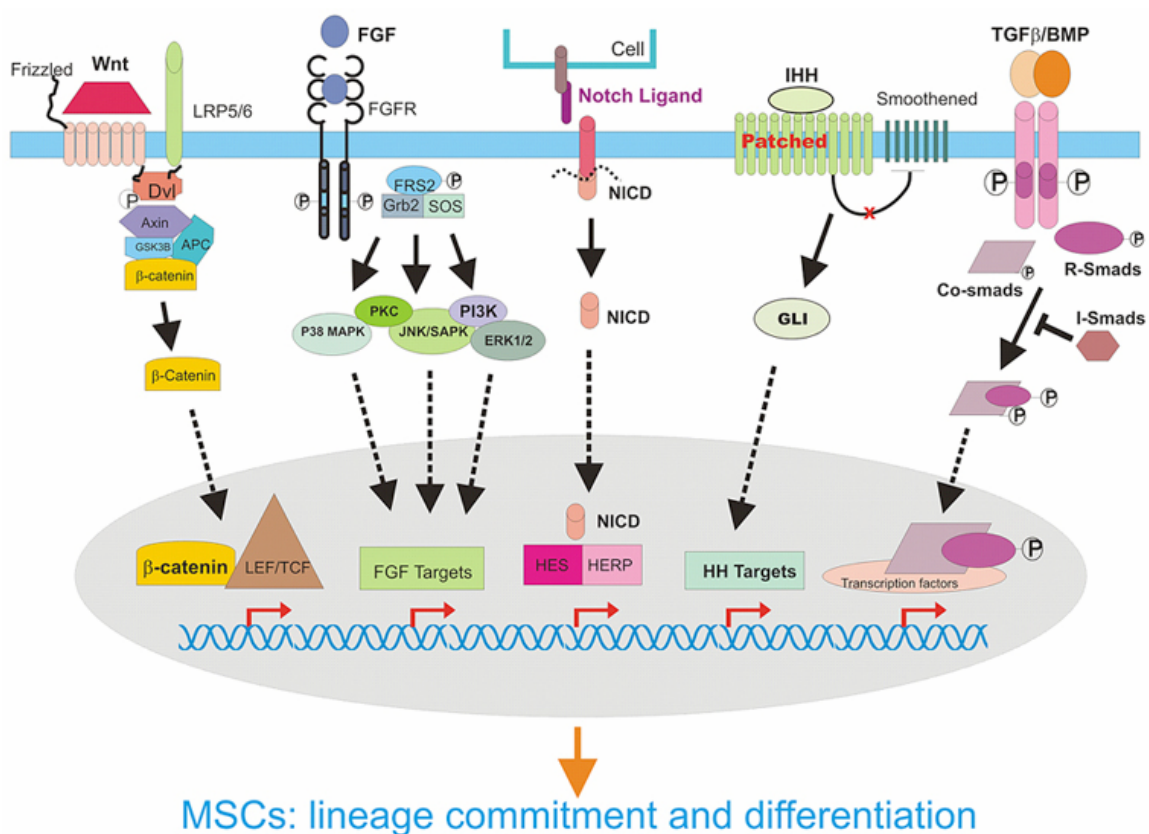


Figura 47. Rappresentazione schematica delle principali vie del segnale che rivestono un ruolo di rilievo nel differenziamento e sviluppo scheletrico. (Fonte: Zhong-Liang et al., 2008)

Il recettore dell'estrogeno ($ER\alpha$), l'effettore della via mediata dall'estrogeno, si colloca in una posizione intermedia, sia come proteina che come gene, poiché è sia un bersaglio di molte molecole con le quali prende contatto e che contribuiscono a modularne l'attività e la stabilità, sia un effettore poiché, comportandosi da fattore trascrizionale, regola direttamente o indirettamente la trascrizione di geni bersaglio.

La scoperta del suo ruolo nel tessuto osseo è relativamente recente se si pensa agli studi molto più datati riguardanti i classici tessuti bersaglio dell'estrogeno, quali mammella, endometrio e ovaio. È stato definito un fattore essenziale per il metabolismo osseo quando si è scoperto l'effetto anabolico dell'estrogeno. Tuttavia, nonostante le scoperte in ambito farmacologico abbiano dato un notevole impulso in questo senso, e la grande mole di studi molecolari su $ER\alpha$, si è ancora lontani dal potere dare una spiegazione completa riguardo alla centralità del ruolo di questa proteina in molti metabolismi, tra cui appunto quello osseo.

Il lavoro di questa tesi non fa altro che aggiungere alcuni tasselli nuovi nell'ambito della regolazione dell'espressione del gene $ER\alpha$, che si prestano però, al tempo stesso, ad aprire nuovi punti interrogativi. Primo tra questi il problema dell'autoregolazione.

Negli anni passati il gruppo di Gannon (Denger et al, 2001) ha sostenuto con esperimenti molto fini l'esistenza dell'autoregolazione dimostrando, per esempio, che la trasfezione della proteina $ER\alpha$ umana esogena insieme con un costrutto luciferasico contenente parte del promotore F fa aumentare di 50 volte l'attività del promotore stesso. In accordo con questi dati, gli esperimenti di questa tesi dimostrano che l'espressione forzata di $ER\alpha$ condiziona l'attività del promotore F in modo estrogeno dipendente. La dimostrazione che il costrutto 272 (caratterizzato dalla maggiore delezione associata ad attività di "promotore minimo") sia quello che risente maggiormente della iperespressione di $ER\alpha$ in presenza di estrogeno (fig. 23) ha indirizzato la nostra attenzione per le successive analisi sugli elementi della sequenza -117254/-117040 nt in cui ritrovano strettamente associati cis elements per AP-1 ed $ER\alpha$.

Questo rafforza l'ipotesi che in questa regione siano localizzati quegli elementi funzionali in grado di mediare l'azione dell'estrogeno negli osteoblasti, attraverso un meccanismo di autoregolazione che, potenzialmente, potrebbe essere esercitato in modo diretto e/o indiretto mediante entrambe le sequenze di regolazione ERE e AP-1.

Per la prima volta con il lavoro di questa tesi viene dimostrato il legame *in vivo* della proteina ER α al promotore F. La stessa analisi dimostra che le proteine c-jun, c-fos e ATF-2, ma non Fra-2, interagiscono "in vivo" con il promotore F in modo oscillatorio e dipendente dall'estrogeno, e che inoltre sono co-associate tra di loro in differenti combinazioni. I nostri dati suggeriscono che il promotore F venga occupato in tempi rapidi e in una successione precisa da fattori di trascrizione che nell'insieme, e solo nell'insieme, sostengono l'autoregolazione. Questo è sostenuto anche dalle evidenze ottenute con gli esperimenti di EMSA che dimostrano che la sequenza in grado di sostenere la maggior parte delle interazioni con le proteine ER α e AP-1 è proprio quella che contiene entrambi i siti (AP-1/ERE half site) in stretta associazione.

Per questa sequenza è stato inoltre possibile dimostrare una sua preferenza verso il legame con complessi c-jun/c-fos, ATF-2/ATF-2 ed ER α /ATF-2 che sembrano pertanto essere le combinazioni più rilevanti.

Ancora una volta, la singola sequenza ERE sembra non essere sufficiente, e l'autoregolazione sembra essere possibile solo attraverso la mediazione di altri fattori, quali di quelli appartenenti alla famiglia AP-1. Come è stato dimostrato in diverse altre situazioni sperimentali sull'indagine di geni estrogeno-sensibili, esperimenti di EMSA eseguiti allo scopo di dimostrare il legame diretto di ER α con la sua specifica sequenza "consensus"legame non sono risultati sufficientemente informativi. Il parere di molti scienziati converge nel sostenere la difficoltà di dimostrare attraverso EMSA l'interazione tra ER α e il proprio elemento consensus. Altre considerazioni che si possono fare al riguardo sono che l'insieme dei fattori presenti negli estratti nucleari può indurre una complessa

combinazione di interazioni tra ER α e altre proteine nucleari mascherando quelle porzioni di ER α impiegate con il legame all'anticorpo specifico che ne permette l'identificazione mediante supershift. Inoltre, l'interazione tra ER α e le sequenze ERE si è dimostrata essere troppo debole dal punto di vista dei legami chimici per una possibile identificazione tramite EMSA, soprattutto quando gli estratti nucleari vengono utilizzati come fonte di proteine (Petz et al, 2002) e, in particolar modo, quando gli estratti nucleari derivano, come nel caso degli osteoblasti, da cellule che presentano bassi livelli di ER α .

Un'importante considerazione da fare riguarda il fatto che le proteine AP-1 sono costituite da una varietà di dimeri, rappresentati dai membri delle famiglie proteiche Fos, Jun e ATF-2, i quali vengono espressi in modo differenziale durante la maturazione degli osteoblasti (McCabe et al, 1996). Pertanto, le interazioni e le combinazioni descritte per le cellule SaOS-2 potrebbero essere fortemente legate allo stadio differenziativo di queste cellule. Per questo motivo, è auspicabile disegnare esperimenti analoghi utilizzando per esempio colture primarie di osteoblasti normali e di loro progenitori indotti al differenziamento, anche se il limite di questi esperimenti è soprattutto legato alla difficoltà di ottenere da queste fonti cellulari cromatina sufficiente per l'intera analisi *in vivo*.

In ogni caso, i dati ottenuti in questa tesi sono in linea con una serie di dati di letteratura. Sono infatti numerosi gli esempi riguardo la partecipazione di ER α nella regolazione dell'attività di promotori contenenti siti di legame per AP-1, attraverso l'interazione diretta con i fattori Jun (Teyssier et al, 2001; Kushner et al, 2000). Interazioni dirette tra ER α e Jun sono state dimostrate in geni che codificano per ovalbumina, collagenasi, recettore del progesterone, c-fos, IGF-1 e BRCA1 (Bergman et al, 2003; Cascio et al, 2007; Gaub et al, 1990; Jeffy et al, 2005; Petz et al, 2002a; Petz et al, 2002b; Weisz and Rosales, 1990). E' stato dimostrato anche che, sebbene il promotore del gene della ciclina D1 sia privo del canonico sito ERE, ER α si associa con i fattori c-jun e ATF-2 a livello di un elemento CRE (cAMP responsive

element), mediando in questo modo gli effetti dell'estrogeno sulla proliferazione delle cellule bersaglio (Sabbah et al, 1999).

Dai dati riportati in questa tesi è evidente che il legame di ER α al promotore F è mediato da AP-1 e che richiede l'intera sequenza AP-1/ERE half site. Non si può però escludere che, in determinate condizioni, queste specifiche interazioni si verifichino solo in parte mentre se ne rafforzino altre capaci di creare una sorta di compensazione: questo potrebbe spiegare il motivo per il quale non si osservano sostanziali modificazioni nell'attività del promotore quando vengono mutati i siti ERE e AP-1 (1) in alcuni contesti cellulari.

Un contributo importante alla comprensione dei meccanismi utilizzati dagli osteoblasti per regolare l'espressione di ER α è derivato dallo studio della correlazione di questa proteina con Runx2, il fattore trascrizionale indicato in modo inequivocabile quale organizzatore del differenziamento osteoblastico. I risultati ottenuti in questo ambito hanno una duplice valenza: da una parte attribuiscono a Runx2 un ruolo fino ad ora non ancora identificato, dall'altra propongono un meccanismo che può essere facilmente responsabile dei livelli di espressione variabili di ER α durante il differenziamento cellulare.

Nella regione distale del promotore F sono stati individuati tre potenziali siti di legame per Runx2 ma solo due si sono dimostrati abili a reclutare sia *in vitro* che *in vivo* il fattore Runx2. Con esperimenti in cui si sono utilizzati costrutti di delezione del promotore F e mutanti nei siti di legame Runx2, uno di questi siti, il cosiddetto "sito a" si è rivelato capace di legare il fattore trascrizionale in qualità di repressore. Silenziando Runx2 si ottiene, infatti, un aumento dell'espressione e dell'attività di ER α . L'analisi, nel suo complesso, suggerisce, però, che l'azione di repressore trascrizionale non sia l'unico ruolo che Runx2 riveste nel contesto del promotore, ma che possa agire attraverso almeno due meccanismi dipendenti dai livelli di Runx2 stesso.

Infatti, anche la forzatura dell'espressione di Runx2, con l'utilizzo di un vettore di espressione, porta sorprendentemente ad un aumento dell'espressione di ER α e della sua attività, ad indicare un 'azione di attivatore trascrizionale di Runx2. Ci siamo pertanto chiesti se il ruolo di fattore trascrizionale positivo o negativo potesse dipendere dai livelli di Runx2 dentro le cellule. I livelli alti di Runx2 potrebbero annullare il ruolo costitutivamente negativo di questo fattore trascrizionale, legato al "sito a".

I dati ottenuti dall'analisi EMSA con l'impiego di oligonucleotidi mutanti nel "sito a" e nel "sito b" insieme ai risultati ottenuti dall'analisi del promotore con costrutti mutanti negli stessi siti sostengono l'ipotesi che i "siti a" e "b" abbiano un ruolo opposto. Pertanto, la sequenza del "sito a", capace di legare il fattore Runx2 con alta affinità rispetto al "sito b" sembra caratterizzata da una funzione negativa mentre la sequenza del "sito b", capace di legare il fattore Runx2 con bassa affinità, sembra esercitare un debole effetto positivo: la combinazione di queste funzioni può essere la principale spiegazione del mantenimento dell'attività del promotore F a livelli bassi.

Ci sono varie ipotesi, supportate da dati di letteratura, che possono spiegare il comportamento di Runx2. È possibile che quando Runx2 è sovraespresso questo possa essere reclutato anche su elementi regolatori che in condizioni basali non legano Runx2, come il "sito c", che, pur presentando la sequenza di legame per questo fattore, non è in grado di legarlo in condizioni normali; oppure possa essere richiamato su altri cis-elements presenti su altre regioni regolative del gene.

È, inoltre, ragionevole pensare che Runx2 possa modulare la trascrizione di ER α interagendo con altri fattori trascrizionali in modo dipendente dai suoi livelli di espressione. Sono presenti in letteratura evidenze (Sasaki-Iwaoka et al, 1999; Javed et al, 2001; Geoffrey et al, 2002; Westendorf et al, 2002) secondo le quali la presenza di siti multipli per Runx2 in un promotore possono contribuire alla formazione di complessi regolatori tra Runx2 ed altre proteine in grado di mediare sia la repressione che l'attivazione. Ad esempio, il promotore

stesso del gene di Runx2 presenta un certo numero di siti di legame per Runx2, ma solo uno di questi, localizzato nella regione prossimale, è sufficiente per un'autoregolazione negativa (Drissi et al, 2000). Anche Thirunavukkarasu (Thirunavukkarasu et al, 2007) ha dimostrato che nel promotore di NFATc2, contenente sette putativi siti di legame per Runx2, questo fattore si comporta in modo differente nella regione distale e nella regione prossimale del promotore, a sostegno del fatto che Runx2 può comportarsi sia da fattore positivo che negativo in dipendenza dei coregolatori con cui è associato in uno specifico momento e in uno specifico contesto cellulare. Questo è in accordo anche con un numero di studi che dimostrano come Runx2 agisca da centro organizzativo in grado di richiamare altri fattori nucleari a formare specifiche unità trascrizionali negli osteoblasti (Lian et al, 2003; Javed et al, 2001; Franceschi 2003; Takahashi et al, 2005). Pertanto, i nostri dati, in accordo con quelli ottenuti da altri studi, forniscono ulteriori evidenze a supporto delle diverse azioni esercitate da Runx2 nelle cellule osteoblastiche.

Ulteriori esperimenti, come studi di espressione basata su microarray e proteomica, saranno necessari per capire come la relazione tra i livelli di Runx2 ed i suoi siti sul promotore F regoli gli effetti dell'estrogeno durante lo sviluppo ed il differenziamento degli osteoblasti e per individuare altre proteine presenti in questa complessa rete di interazioni.

Inoltre, nella complessità della responsività degli osteoblasti sia a Runx2 che all'estrogeno, bisogna tenere in considerazione che se Runx2 è assolutamente richiesto per il differenziamento osteoblastico in quanto regola l'espressione della maggior parte dei geni essenziali per il mantenimento del fenotipo osteoblastico ed i suoi livelli aumentano sempre durante il differenziamento di queste cellule (Prince et al, 2001; Lian et al, 2006; Ji et al, 1998), ER α è invece posto come anello di congiunzione essenziale tra diversi elementi coinvolti nella regolazione dell'apposizione e del riassorbimento osseo (Compston 2001). È quindi probabile che Runx2 sia particolarmente coinvolto nella modulazione dell'espressione di ER α durante momenti specifici che regolano l'omeostasi del tessuto osseo.

A questo proposito, è stato dimostrato che la presenza di Runx2 favorisce la transattivazione mediata da ER α , attraverso un'interazione tra ERE (estrogen responsive elements) ed elementi responsivi a Runx2, integrando, in questo modo, l'attività anabolica dei due fattori trascrizionali sugli osteoblasti (McCarthy et al, 2003).

L'ultimo fattore trascrizionale che, in ordine temporale, è stato preso in considerazione nel lavoro di questa tesi è stato NFATc1. Questo fattore, tradizionalmente descritto come regolatore centrale del differenziamento e attività degli osteoclasti, è stato in realtà recentemente descritto avere un ruolo negli osteoblasti, anche se il suo meccanismo d'azione in queste cellule rimane solo in parte noto. I risultati dal lavoro di questa tesi descrivono in modo inequivocabile un ruolo di modulatore negativo di NFATc1 nella trascrizione di ER α . Il valore legato a questa scoperta si correla sia con l'identificazione di una nuova molecola che a livello del gene, influenza in modo importante l'espressione di ER α , sia con la dimostrazione della relazione tra due vie del segnale che finora non era ancora stata descritta. Infatti, si è dimostrato particolarmente interessante il fatto che si intreccino a livello di regolazione trascrizionale due vie che hanno effetti opposti sul metabolismo osseo. Pertanto, è ipotizzabile che nel microambiente osseo, alti livelli di NFATc1 contribuiscano a tenere bassi i livelli di ER α negli osteoblasti, impedendo un'azione anabolica di queste cellule sulla deposizione di matrice, che viene, al tempo stesso, contrastata dall'effetto positivo di NFATc1 sugli osteoclasti, deputati a riassorbire la matrice.

E' interessante ricordare che recentemente il sistema Ca²⁺/calmodulin/Cn che regola NFATC1 è stato messo in relazione anche con la funzione di ER α (Li et al, 2005). In particolare la calmodulina è in grado di aumentare l'affinità di ER α per gli elementi ERE, riducendo al tempo stesso la degradazione della proteina e influenzando così i livelli di espressione di questo recettore (Li et al, 2006).

Il sistema attraverso il quale siamo arrivati alle conclusioni descritte ci serve anche a proporre un particolare interesse farmacologico a bersagliare NFATc1. Abbiamo infatti dimostrato che è possibile modulare l'espressione di NFATc1 attraverso un "decoy" specifico, e che questo porta ad una riattivazione di ER α , sia in osteoblasti che in osteoclasti e una induzione dell'apoptosi negli osteoclasti ma non negli osteoblasti. Questo sistema sembra pertanto efficace per favorire la deposizione della matrice ossea, e in futuro essere proponibile per esperimenti *in vivo* allo scopo di correggere difetti ossei con deficit di massa ossea.

Come cenno conclusivo, in vista soprattutto di una programmazione futura degli esperimenti, vale la pena ricordare, inoltre, che l'analisi bioinformatica ha rivelato nel promotore F del gene ER α , in prossimità dei siti Runx2, la presenza di due siti di riconoscimento per il fattore trascrizionale Lef-1.

Lef-1 è uno degli effettori nucleari meglio conosciuti della via del segnale mediata da Wnt, ed è stato recentemente descritto come un repressore della trascrizione negli osteoblasti essendo responsabile del mascheramento del dominio di legame al DNA di Runx2 (Kahler and Westendorf, 2003). Durante le prime fasi della maturazione degli osteoblasti, Lef-1 sembra sopprimere l'attività di Runx2 inibendo l'espressione di osteocalcina (Kahler et al, 2006).

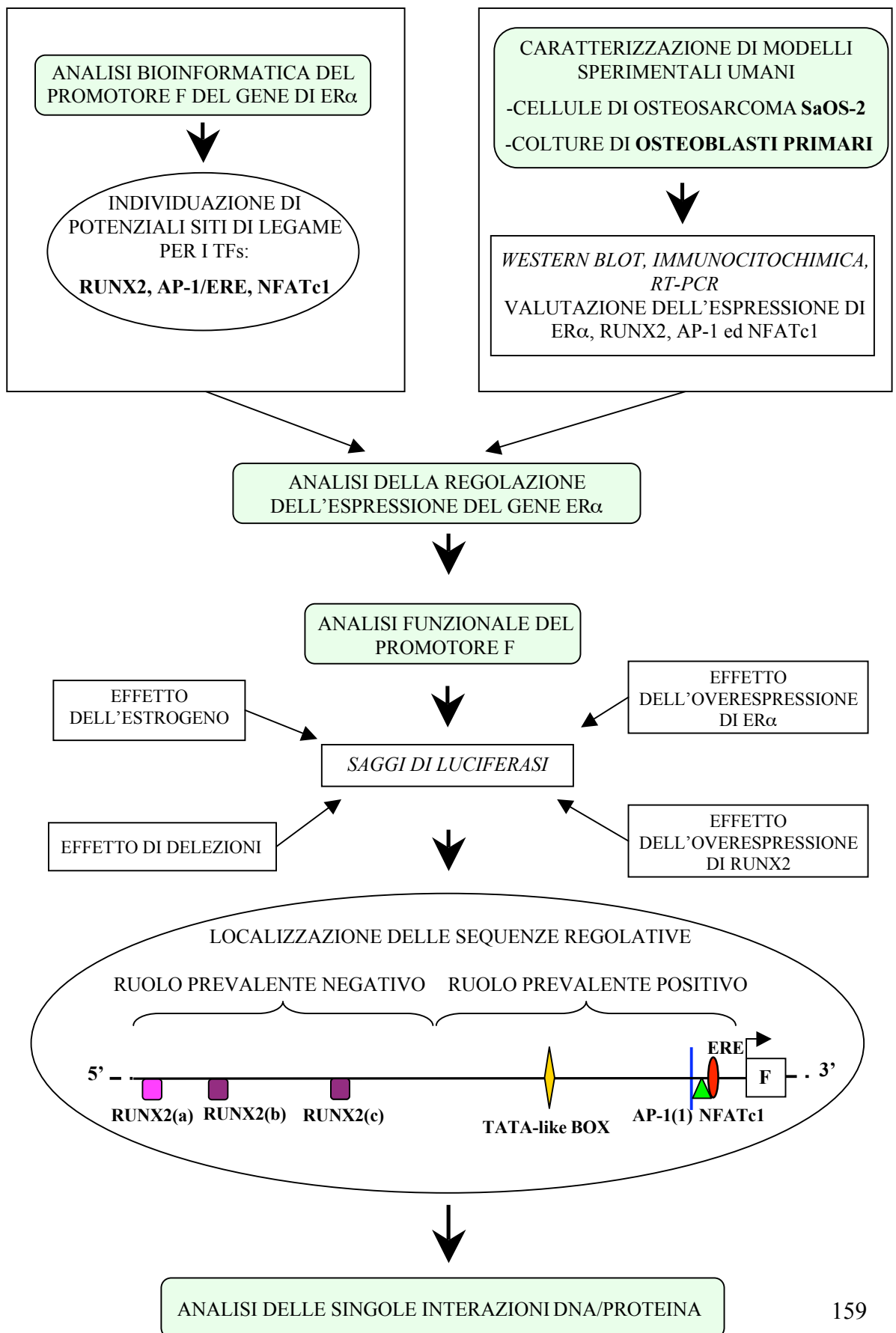
Inoltre, una serie di evidenze sperimentali documentano una stretta relazione tra estrogeno e il Wnt signaling (Westendorf et al., 2004) anche a livello delle cellule dell'osso (Kousteni et al, 2007), così da motivare l'indagine anche sul ruolo di Lef-1 nella regolazione dell'espressione del gene ER α .

Dai nostri studi si delinea, pertanto, sempre più precisamente, l'esistenza di una fine regolazione a carico del gene ER α che codifica per una proteina che, pur espressa a livelli molto bassi, presenta svariate interrelazioni molecolari a sostegno delle sue molteplici funzioni cellulari.

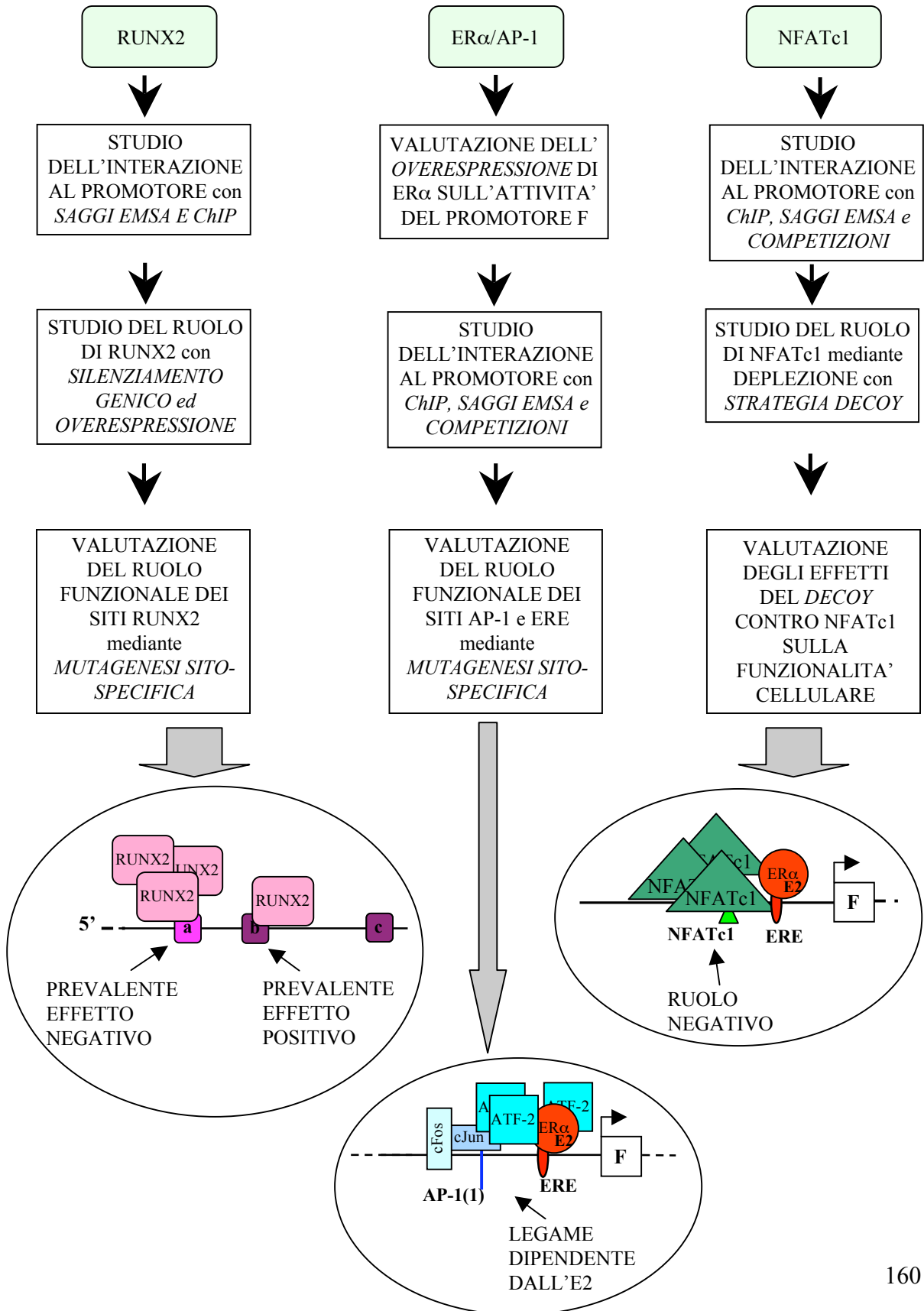
Com'è emerso in più punti di questa tesi, individuare proteine coinvolte strettamente e in modo specifico nella regolazione dell'espressione di ER α , significa anche individuare potenziali bersagli per terapie mirate. Studi di questo tipo hanno pertanto una ricaduta applicativa importante, tenendo soprattutto in considerazione il fatto che ER α gioca un ruolo centrale nell'innescare e sostenere patologie a carico di diversi tessuti compreso quello osseo. Basti pensare a osteoporosi (Stewart and Ralston, 2000), artrite reumatoide (Compston 2001), osteosarcomi e processi metastatici a carico dell'osso (Rucci et al, 2004).

In conclusione, e a sostegno dell'obiettivo perseguito in questa tesi, ricordiamo che è noto che alterazioni a carico della regolazione genica sono spesso associate all'insorgenza di diversi stati patologici; un ampio settore della biologia molecolare è rivolto, infatti, ad identificare e correggere tali modificazioni, mediante l'identificazione delle sequenze geniche di riconoscimento per fattori di trascrizione e l'ideazione di nuove molecole terapeutiche, quali oligonucleotidi antisenso, molecole decoy, e vettori per terapia genica, nel tentativo di ripristinare la condizione fisiologica, attraverso la modulazione dell'espressione di geni specifici.

In quest'ottica, il lavoro presentato in questa tesi è stato orientato ad aumentare la conoscenza riguardo i fattori che intervengono nella regolazione del gene ER α . Attraverso una serie di esperimenti *in vitro* e *in vivo* è stato, almeno in parte, possibile mettere in luce la complessa regolazione dell'espressione di questo gene, la quale deve essere sicuramente mantenuta per garantire un corretto equilibrio tra il processo di deposizione e di riassorbimento osseo.



ANALISI DELLE SINGOLE INTERAZIONI DNA/PROTEINA



BIBLIOGRAFIA

- Aguila HL and Rowe DW. **2005**. Immunol Rev. 208: 7–18. Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis.
- Allan AL, Albanese C, Pestell RG, LaMarre J. **2001**. J. Biol. Chem. 276: 27272-27280. Activating transcription factor 3 induces DNA synthesis and expression of cyclin D1 in hepatocytes.
- Anusaksathien O, Laplace C, Li X, Ren Y, Peng L, Goldring SR, Galson DL. **2001**. J Biol Chem. 276(25): 22663-74. Tissue-specific and ubiquitous promoters direct the expression of alternatively spliced transcripts from the calcitonin receptor gene.
- Aranda A and Pascual A. **2001**. Physiol Rev. 81(3): 1269-304. Nuclear hormone receptors and gene expression.
- Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, Morita I, Wagner EF, Mak TW, Serfling E, Takayanagi H. **2005**. J Exp Med. 202(9): 1261-9. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis.
- Ather MH, Abbas F, Faruqui N, et al. **2004**. BMC Urol. 4:14. Expression of pS2 in prostate cancer correlates with grade and Chromogranin A expression but not with stage.
- Barkhem T, Haldosen LA, Gustafsson JA, Nilsson S. **2002**. Mol Pharmacol. 61(6): 1273-83. pS2 gene expression in HepG2 cells: complex regulation through crosstalk between the estrogen receptor alpha, an estrogen-responsive element and the activator protein 1 response element.
- Barnes GL, Javed A, Waller SM, Kamal MH, Hebert KE, Hassan MQ, Bellahcene A, van Wijnen AJ, Young MF, Lian JB, Stein GS, Gerstenfeld LC. **2003**. Cancer Res. 63: 2631-2637. Osteoblast-related Transcription Factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 Mediate the Expression of Bone Sialoprotein in Human Metastatic Breast Cancer Cells.
- Beier F, Lee RJ, Taylor AC, Pestell RG, LuValle P. **1999**. Proc Natl Acad Sci USA. 96(4): 1433-8. Identification of the cyclin D1 gene as a target of activating transcription factor 2 in chondrocytes.
- Benbrook DM and Jones NC. **1990**. Oncogene. 5(3). Heterodimer formation between CREB and JUN proteins.
- Bergman MR, Cheng S, Honbo N, Piacentini L, Karlner JS, Lovett DH. **2003**. Biochem J. 369(Pt 3): 485-96. A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers.
- Berry M, Nunez AM, Chambon P. **1989**. EMBO J. 9: 2811-2818. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter context dependent agonistic activity of the anyi-oestrogen 4-hidroxytamoxifen.
- Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH. **2002**. Biochem J. 364: 329 –341. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation.

- Boyce BF, Yamashita T, Yao Z, Zhang Q, Li F, Xing L. **2005**. *J. Bone Miner. Metab.* 23, (suppl.) 11–15. Roles for NF-kappaB and c-Fos in osteoclasts.
- Brand H, Kos M, Denger S, Flouriot G, Gromoll J, Gannon F, Reid G. **2002**. *Endocrinology*, 143: 3397-3404. A novel promoter is involved in the expression of estrogen receptor alpha in human testis and epididymis.
- Breen EC, Ignatz RA, McCabe L, Stein JL, Stein GS, Lian JB. **1994**. *J Cell Physiol.* 160(2): 323-35. TGF beta alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype.
- Bryant HU and Dere WH. **1998**. *Proc Soc Exp Biol Med.* 217(1): 45-52. Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy.
- Buttery LD, Bourne S, Xynos JD et al. **2001**. *Tissue Eng.* 7: 89 –99. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells.
- Björnström L and Sjöberg M. **2005**. *Mol. End.* Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Non-Genomic Actions on Target Genes.
- Candelieri GA, Prud'homme J, St-Arnaud R. **1991**. *Mol Endocrinol.* 5(12): 1780-8. Differential stimulation of fos and jun family members by calcitriol in osteoblastic cells.
- Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER. **1997**. *N Engl J Med.* 337(2): 91-5. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency.
- Carrasco D and Bravo R. **1995**. *Oncogene.* 10(6): 1069-79. Tissue-specific expression of the fos-related transcription factor fra-2 during mouse development.
- Cascio S, Bartella V, Garofalo C, Russo A, Giordano A, Surmacz E. **2007**. *J Biol Chem.* 282(6): 3498-506. Insulin-like growth factor 1 differentially regulates estrogen receptor-dependent transcription at estrogen response element and AP-1 sites in breast cancer cells.
- Castels CG, Oesterreich S, Hansen R, Fuqua SAW. **1997**. *Steroid Biochem. Molec. Biol.* 62 (2/3): 155-163. Auto-regulation of the Estrogen Receptor Promoter.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR. **2004**. *Growth Factors.* 22(4): 233-41. Bone morphogenetic proteins.
- Cheng SL, Yang JW, Rifas L et al. **1994**. *Endocrinology.* 134: 277–286. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone.
- Chung KY, Agarwal A, Uitto J, Mauviel A. **1996**. *J Biol Chem.* 271(6): 3272-8. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta.

- Clohisy JC, Scott DK, Brakenhoff KD, Quinn CO, Partridge NC. **1992**. *Mol Endocrinol.* 6(11): 1834-42. Parathyroid hormone induces c-fos and c-jun messenger RNA in rat osteoblastic cells.
- Coffman JA. **2003**. *Cell Biol Int.* 27: 315-324. Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation.
- Cohen MM Jr. **2002**. *Am J Med Genet.* 112(3): 304-13. Some chondrodysplasias with short limbs: molecular perspectives.
- Cohen MM. **2006**. *American Journal of Medical Genetics Part A.* 140 A: 2646-2706. The New Bone Biology: Pathologic, Molecular, and Clinical Correlates.
- Cohn CS, Sullivan JA, Kiefer T, Hill SM. **1999**. *Mol Cell Endocrinol.* 158(1-2): 25-36. Identification of an enhancer element in the estrogen receptor upstream region: implications for regulation of ER transcription in breast cancer.
- Compston **2002**. *Endocrine. Cellular and Structural Mechanisms of Bone Loss in Osteoporosis Mechanisms of Bone Loss and Gain in Untreated and Treated Osteoporosis.*
- Couse JF and Korach KS. **1999**. *Endocrine Rev.* 20: 358-417. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?.
- Craig AM and Denhardt DT. **1991**. *Gene.* 100: 163-71. The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone.
- Crotti TN, Flannery M, Walsh NC, Fleming JD, Goldring SR, McHugh KP. **2006**. *Gene.* 372: 92-102. NFATc1 regulation of the human beta3 integrin promoter in osteoclast differentiation.
- D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Karsenty G, Partridge NC. **2002**. *J Biol Chem.* 277(1): 816-22. Physical interaction of the activator protein-1 factors c-Fos and c-Jun with Cbfa1 for collagenase-3 promoter activation.
- Dang ZC, van Bezooijen RL, Karperien M, Papapoulos SE, Lowik CW. **2002**. *J. Bone Miner. Res.* 17: 394-405. Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis.
- Daughaday WH and Rotwein P. **1989**. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 8(2): 125-40. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structure. Serum, and tissue concentrations.
- Davis VL, Couse JF, Gray TK, Korach KS. **1994**. *J. Bone Miner. Res.* 9: 983-991. Correlation between low levels of estrogen receptors and estrogen responsiveness in two rat osteoblast-like cell lines.
- Day CJ, Kim MS, Lopez CM, Nicholson GC, Morrison NA. **2005**. *J Cell Biochem.* 95(1): 17-23. NFAT expression in human osteoclasts.

- deGrafferiend LA, Hopp TA, Valente AJ, Clark RA, Fuqua SAW. **2004**. Breast Canc.Res.Treat. 85: 111-120. Regulation of the estrogen receptor α minimal promoter by Sp1, USF-1 and ER α .
- Dempster DW. **2006**. The American Society for Bone and Mineral Research. 7-11. Anatomy and Functions of Adult Skeleton. Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metbolism.
- Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, Bennett E, Reid R, Manning D, Xue A, Montag AG, Luu HH, Haydon RC, He TC. **2008**. Front Biosci. 13: 2001-21. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development.
- Denger S, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F. **2001a**. Mol. and Cell. Endocrinol. 178: 155-160. Tissue-specific expression of human ER α and ER β in the male.
- Denger S, Reid G, Kos M, Flouriot G, Parsch D, Brand H, Korach KS, Sonntag-Buck V, Gannon F. **2001**. Mol. Endocrinol. 15: 2064-2077. ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins.
- Detry C, Lamour V, Castronovo V, Bellahcène A. **2008**. Bone. 42(2): 422-31. CREB-1 and AP-1 transcription factors JunD and Fra-2 regulate bone sialoprotein gene expression in human breast cancer cells.
- Dhasarathy A, Kajita M, Wade PA. **2007**. Mol Endocrinol. 21(12): 2907-18. The transcription factor snail mediates epithelial to mesenchymal transitions by repression of estrogen receptor-alpha.
- Drissi H, Luc Q, Shakoori R, Chuva De Sousa Lopes S, Choi JY, Terry A, Hu M, Jones S, Neil JC, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Stein GS. **2000**. J. Cell. Physiol. 184: 341-350. Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. **1997**. Cell. 89: 747-754. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.
- Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P and Heymann D. **2007**. Stem Cells. 25: 544-552. Concise Review: Embryonic Stem Cells: A New Tool to Study Osteoblast and Osteoclast Differentiation.
- Eferl R and Wagner EF. **2003**. Nat Rev Cancer. 3(11): 859-68. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.
- Eferl R, Hoebertz A, Schilling AF, Rath M, Karreth F, Kenner L, Amling M, Wagner EF. **2004**. EMBO J. 23(14): 2789-99. The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation.
- Emmen JM and Korach KS. **2003**. Gynecol Endocrinol. 17(2): 169-76. Estrogen receptor knockout mice: phenotypes in the female reproductive tract.
- Endoh H, Sasaki H, Maruyama K, Takeyama K, Waga I, Shimizu T, Kato S, Kawashima H. **1997**. Biochem Biophys Res Commun. 235(1): 99-102. Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line.

- Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. **1988**. Science. 241: 84-86. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells.
- Ernst M, Parker MG, Rodan GA. **1991**. Mol. Endocrinol. 5: 1597-1606. Functional estrogen receptors in osteoblastic cells demonstrated by transfection with a reporter gene containing an estrogen response element.
- Evans RM. **1988**. Science. 240: 889-895. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.
- Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB, Davidson NE. **1995**. Cancer Res. 55: 2279-2283. Demethylation of the estrogen receptor gene in the estrogen-receptor negative breast cancer cell can reactivate estrogen receptor gene expression.
- Filanti C, Dickson GR, Di Martino D et al. **2000**. J Bone Miner Res; 15: 2154 –2168. The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14.
- Fleischmann A, Hafezi F, Elliott C, Remé CE, Rütther U, Wagner EF. **2000**. Genes Dev. 14(21): 2695-700. Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice.
- Flouriou G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F. **2000**. EMBO J, 19: 4688-4700. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1.
- Flouriou G, Griffin C, Kenealy M-R, Sonntag-Buck V, Gannon F. **1998**. Mol Endocrinol. 12: 1939-1954. Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor- α gene are generated by alternative splicing and promoter usage.
- Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, and Reith E. **2003**. Connect Tissue Res. Suppl 1: 109-116. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation.
- Franchimont N, Durant D, Rydziel S, Canalis E. **1999**. J Biol Chem. 274(10): 6783-9. Platelet-derived growth factor induces interleukin-6 transcription in osteoblasts through the activator protein-1 complex and activating transcription factor-2.
- Frost HM. **1996**. Littel Brown. Boston, MA. 315–333. Dynamics of bone remodeling. *In* Bone Biodynamics. H.M.
- Fu Q, Jilka RL, Manolagas SC, O'Brien CA. **2002**. J Biol Chem. 277(50): 48868-75. Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NFkappa B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein.

- García-Arencibia M, Dávila N, Campión J, Carmen Carranza M, Calle C. **2005**. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 94(1-3): 1-14. Identification of two functional estrogen response elements complexed with AP-1-like sites in the human insulin receptor gene promoter.
- Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P. **1990**. *Cell*. 63: 1267-1276. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex.
- Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyán H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, and Lian JB. **2005**. *J Biol Chem*. 280: 33132-33140. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression.
- Geoffrey V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P. **2002**. *Mol. Cell. Biol*. 22; 6222–6233. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing Cbfa1/Runx2 in cells of the osteoblastic lineage.
- Gillesby BE and Zacharewski TR. **1999**. *Breast Cancer Res Treat*. 56: 253-65. pS2 (TFF1) levels in human breast cancer tumor samples: correlation with clinical and histological prognostic markers.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. **1986**. *Science*. 231: 1150-1154. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA.
- Griffin C, Flouriot G, Sonntag-Buck V, Gannon F. **1999**. *Mol. Endocrinol*. 13: 1571-1587. Two functionally different protein isoforms are produced from the chicken estrogen receptor- α gene.
- Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. **1994**. *Science*. 266(5184): 443-8. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling.
- Gruda MC, Kovary K, Metz R, Bravo R. **1994**. *Oncogene*. 9(9): 2537-47. Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity.
- Gudas JM, Nguyen H, Li T, Cowan KH. **1995**. *Cancer Res*. 55: 4561-4565. Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells.
- Hadjidakis DJ and Androulakis II. **2006**. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1092: 385–396. Bone Remodeling.
- Hadman M, Loo M, Bos TJ. **1993**. *Oncogene*. 8(7): 1895-903. In vivo viral and cellular Jun complexes exhibit differential interaction with a number of in vitro generated AP-1- and CREB-like target sequences.
- Hai T and Curran T. **1991**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(9): 3720-4. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity.

- Hall LJ, Kajimoto Y, Bichell D, Kim SW, Jaames PL, Counts D, Nixon LJ, Tobin G, Rotwein P. **1992**. DNA. Cell. Biol. 11(4): 301-13. Functional analysis of the rat insulin-like growth factor I gene and identification of an IGF-I gene promoter.
- Han Y, Yang L, Suarez-Saiz F, San-Marina S, Cui J, Minden MD. **2008**. Mol Cancer Res. 6(8): 1347-55. Wilms' tumor 1 suppressor gene mediates antiestrogen resistance via down-regulation of estrogen receptor-alpha expression in breast cancer cells.
- Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M. **1999**. J. Biol. Chem. 274: 6972-6978. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation.
- Hart CE, Bailey M, Curtis DA, Osborn S, Raines E, Ross R, Forstrom JW. **1990** Biochemistry. 29(1): 166-72. Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets.
- Hartmann C. **2006**. Trends Cell Biol. 16(3): 151-8. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. **2004**. J Cell Sci. 117: 5965-5973. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings.
- Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. **2003**. Trends. Endocrinol. Metab. 14: 124-129. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans.
- Hirotsu H, Tuohy NA, Woo JT, Stern PH, Clipstone NA. **2004**. J. Biol. Chem. 279: 13984–13992. The calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells.
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. **2003**. Genes Dev. 17(18): 2205-32. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT.
- Hosey AM, Gorski JJ, Murray MM, Quinn JE, Chung WY, Stewart GE, James CR, Farragher SM, Mulligan JM, Scott AN, Dervan PA, Johnston PG, Couch FJ, Daly PA, Kay E, McCann A, Mullan PB, Harkin DP. **2007**. J Natl Cancer Inst. 99(22): 1683-94. Molecular basis for estrogen receptor alpha deficiency in BRCA1-linked breast cancer.
- Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. **2004**. J Clin Invest. 114(4): 475-84. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation.
- Ikeda K and Inoue S. **2004**. Arch.Histol.Cytol. 67 (5): 435-442. Estrogen receptor and their downstream target in cancer.
- Ishida N, Hayashi K, Hoshijima M, Ogawa T, Koga S, Miyatake Y, Kumegawa M, Kimura T, Takeya T. **2002**. J. Biol. Chem. 277: 41147–41156. Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator.
- Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH et al. **1990**. J Immunol. 145: 3297–3303. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption.

- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI et al. **1997**. *J Cell Biochem.* 64: 295–312. Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro.
- Javed A, Barnes GL, Jasanya BO, Stein JL, Gerstenfeld L, Lian JB, Stein GS. **2001**. *Mol. and Cell.Biol.* 21(8): 2891-2905. Runt homology domain transcription factors (Runx, Cbfa, and AML) mediate repression of the bone sialoprotein promoter: evidence for promoter context-dependent activity of Cbfa proteins.
- Jeffy BD, Hockings JK, Kemp MQ, Morgan SS, Hager JA, Beliakoff J, Whitesell LJ, Bowden GT, Romagnolo DF. **2005**. *Neoplasia.* 7(9): 873-82. An estrogen receptor-alpha/p300 complex activates the BRCA-1 promoter at an AP-1 site that binds Jun/Fos transcription factors: repressive effects of p53 on BRCA-1 transcription.
- Jensen EV and DeSombre ER. **1973**. *Science.* 182(108): 126-34. Estrogen-receptor interaction.
- Ji C, Casinghino S, Chang DJ, Chen Y, Javed A, Ito Y, Hiebert SW, Lian JB, Stein GS, McCarthy TL, Centrella M. **1998**. *J. Cell. Biochem.* 69: 353–363. CBFa (AML/PEBP2)-related elements in the TGF-beta type I receptor promoter and expression with osteoblast differentiation.
- Jilka RL. **1998**. *Bone.* 23(2): 75-81. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update.
- Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C. **1999**. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4431-4442. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation.
- Jochum W, Passequé E, Wagner EF. **2001**. *Oncogene.* 20(19): 2401-12. AP-1 in mouse development and tumorigenesis.
- Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V. **1992**. *Cell.* 71(4): 577-86. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene.
- Kahler RA and Westendorf JJ. **2003**. *J Biol Chem.* 278: 11937-11944. Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2- dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter.
- Kahler RA, Galindo M, Lian J, Stein GS, van Wijnen AJ, Westendorf JJ. **2006**. *J Cell Biochem.* 97(5): 969-83. Lymphocyte enhancer-binding factor 1 (Lef1) inhibits terminal differentiation of osteoblasts.
- Kalaitzidis D and Gilmore TD. **2005**. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 16: 46-52. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB.
- Kaminuma O, Deckert M, Elly C, Liu YC, Altman A. **2001**. *Mol Cell Biol.* 21(9): 3126-36. Vav-Rac1-mediated activation of the c-Jun N-terminal kinase/c-Jun/AP-1 pathway plays a major role in stimulation of the distal NFAT site in the interleukin-2 gene promoter.

- Karreth F, Hoebertz A, Scheuch H, Eferl R, Wagner EF. **2004**. *Development*. 131(22): 5717-25. The AP1 transcription factor Fra2 is required for efficient cartilage development.
- Karsenty G and Wagner EF. **2002**. *Dev. Cell*. 2: 389 – 406. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development.
- Karsenty, G. **2000**. *Semin Cell Dev Biol*. 11: 343-346. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function.
- Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG. **2005**. *Bone*. 36: 758 –769. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors.
- Keeting PE, Scott RE, Colvard DS, Han IK, Spelsberg TC, Riggs BL. **1991**. *J Bone Miner. Res*. 6: 297-304. Lack of a direct effect of estrogen on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells.
- Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G. **2001**. *J. Biol. Chem*. 276: 7101-7107. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes.
- Kim Y, Sato K, Asagiri M, Morita I, Soma K, Takayanagi H. **2005**. *J Biol Chem*. 280(38): 32905-13. Contribution of nuclear factor of activated T cells c1 to the transcriptional control of immunoreceptor osteoclast-associated receptor but not triggering receptor expressed by myeloid cells-2 during osteoclastogenesis.
- Kitaura H, Zhou P, Kim HJ, Novack DV, Ross FP, Teitelbaum SL. **2005**. *J Clin Invest*. 115(12): 3418-27. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis.
- Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T. **2004**. *Nature*. 428: 758 –763. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis.
- Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H. **2005**. *Nat Med*. 11(8): 880-5. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation.
- Komarova SV, Pilkington MF, Weidema AF, Dixon SJ, Sims SM. **2003**. *J. Biol. Chem*. 278: 8286–8293. RANK ligand-induced elevation of cytosolic Ca²⁺ from RAW264.7 cells in response to RANK-L.
- Komori T. **2008**. *Frontiers in Bioscience* 13: 898-903. Regulation of bone development and maintenance by Runx2.
- Kondo N, Toyama T, Sugiura H, Fujii Y, Yamashita H. **2008**. *Cancer Res*. 68(13): 5004-8. miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer.
- Kos M, O'Brien S, Flouriot G, Gannon F. **2000**. *FEBS Lett*. 477: 15-20. Tissue-specific expression of multiple mRNA variants of the mouse estrogen receptor α gene.
- Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. **2001**. *Mol. Endocrinol*, 15: 2057-2063. Minireview: Genomic Organization of the Human ER α Gene Promoter Region.

- Kousteni S, Almeida M, Han L, Bellido T, Jilka RL, Manolagas SC. **2007**. *Mol Cell Biol.* 27(4):1516-30. Induction of osteoblast differentiation by selective activation of kinase-mediated actions of the estrogen receptor.
- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P. **1986**. *EMBO J.* 5: 891-897. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with *verbA* and the human oestrogen and glucocorticoid receptors.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. **1997**. *Endocrinol.* 138: 863-870. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta.
- Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. **1987**. *Cell.* 51: 941-951. Functional domains of the human estrogen receptor.
- Kuroda Y, Hisatsune C, Nakamura T, Matsuo K, Mikoshiba K. **2008**. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(33): 12093. Osteoblasts induce Ca^{2+} oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis.
- Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P. **2000**. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74(5): 311-7. Estrogen receptor pathways to AP-1.
- Kveiborg M, Sabatakos G, Chiusaroli R, Wu M, Philbrick WM, Horne WC, Baron R. **2004**. *Mol Cell Biol.* (7): 2820-30. DeltaFosB induces osteosclerosis and decreases adipogenesis by two independent cell-autonomous mechanisms.
- Lambertini E, Penolazzi L, Aguiari G, del Senno L, Pezzetti F, Sollazzo V, Piva R. **2002**. *B.B.R.C.* 292: 761-770. Osteoblastic Differentiation Induced by Transcription Factor Decoy against Estrogen Receptor α Gene.
- Lambertini E, Penolazzi L, Giordano S, del Senno L, Piva R. **2003**. *J.Biochem.* 372: 831-839. Expression of the human oestrogen receptor- α gene is regulated by promoter F in MG-63 osteoblastic cells.
- Lambertini E, Penolazzi L, Magaldi S, Giordano S, Senno LD, Piva R. **2005**. *Breast Cancer Res Treat.* 92(2): 125-32. Transcription factor decoy against promoter C of estrogen receptor alpha gene induces a functional ER alpha protein in breast cancer cells.
- Lambertini E, Penolazzi L, Sollazzo V, Pezzetti F, de Mattei M, del Senno L, Traina GC, Piva R. **2002a**. *J. of End.* 172: 683-693. Modulation of gene expression in human osteoblasts by targeting a distal promoter region of human estrogen receptor- α gene.
- Lee K, Deeds JD, Chiba S, Un-No M, Bond AT, Segre GV. **1994**. *Endocrinology.* 134(1): 441-50. Parathyroid hormone induces sequential c-fos expression in bone cells in vivo: in situ localization of its receptor and c-fos messenger ribonucleic acids.
- Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC. **2000**. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8783-8792. Runx2 is a common target of transforming growth factor b1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12.

- Lees JA, Fawell SE, White R, Parker MG. **1990**. *Mol. Cell Biol.* 10: 5529-5531. A 22-amino-acid peptide restores DNA-binding activity to dimerization-defective mutants of the estrogen receptor.
- Li L, Li Z, and Sacks DB. **2005**. *J Biol Chem* 280:13097–13104. The transcriptional activity of estrogen receptor- α is dependent on Ca^{2+} /calmodulin.
- Li L, Li Z, Howley PM, and Sacks DB. **2006**. *J Biol Chem* 281:1978 –1985. E6AP and calmodulin reciprocally regulate estrogen receptor stability.
- Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Hassan MQ, Gaur T, Lengner CJ, Young DW. **2006**. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 7: 1–16. Network and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis.
- Lian JB, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ, Montecino M, Javed A, Gutierrez S, Shen J, Zaidi SK, and Drissi H. **2003**. *Connect Tissue Res. Suppl* 1: 141-148. Runx2/Cbfa1 functions: diverse regulation of gene transcription by chromatin remodeling and co-regulatory protein interactions.
- Lin Y, Liu LJ, Murray T, Sodek J, Rao L. **2004**. *J Endocrinol Invest.* 27(5): 416-23. Effect of raloxifene and its interaction with human PTH on bone formation.
- Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S et al. **2005**. *Endocrinology.* 146: 1991–1998. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system.
- Lowik CW, van der Pluijm G, Bloys H et al. **1989**. *Biochem Biophys Res Commun.* 162: 1546 –1552. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: A possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis.
- Lu B, Dotzlaw H, Leygue E, Murphy LJ, Watson PH, Murphy LC. **1999**. *Mol Cell Endocrinol.* 158(1-2): 153-61. Estrogen receptor- α mRNA variants in murine and human tissues.
- Lu T, Achari Y, Sciore P, Hart DA. **2006**. *Biochim. Biophys Acta.* 1762(8): 719-31. Estrogen receptor α regulates matrix metalloproteinase-13 promoter activity primarily through the AP-1 transcriptional regulatory site.
- Machwate M, Jullienne A, Moukhtar M, Lomri A, Marie PJ. **1995**. *Mol Endocrinol.* 9(2): 187-98. c-fos protooncogene is involved in the mitogenic effect of transforming growth factor- β in osteoblastic cells.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. **1995**. *Cell.* 83(6): 835-9. The nuclear receptor superfamily: the second decade.
- Manolagas SC. **2000**. *Endocr Rev.* 21(2): 115-37. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis.

- Marie PJ, Hott M, Launay JM et al. **1993**. *J Clin Endocrinol Metab.* 77: 824 – 830. In vitro production of cytokines by bone surface-derived osteoblastic cells in normal and osteoporotic post- menopausal women: Relationship with cell proliferation.
- Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, Miyazaki T, Kitaura H, Nakamura K, Fujita T, Kanatani N, Moriishi T, Yamana K, Liu W, Kawaguchi H, Nakamura K, and Komori T. **2007**. *Dev. Dyn.* 236: 1876-1890. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency.
- Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, Hisatake K, Nogi Y. **2004**. *J Biol Chem.* 279(44): 45969-79. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1.
- Matsuo K and Irie N. **2008**. *Arch Biochem Biophys.* 473(2): 201-9. Osteoclast-osteoblast communication.
- Matsuo K and Ray NK. **2004**. *J Med.* 53(2): 78-84. Osteoclasts, mononuclear phagocytes, and c-Fos: new insight into osteoimmunology.
- Matsuo K, Galson DL, Zhao C, Peng L, Laplace C, Wang KZ, Bachler MA, Amano H, Aburatani H, Ishikawa H, Wagner EF. **2004**. *J Biol Chem.* 279(25): 26475-80. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos.
- Matsuo K, Owens JM, Tonko M, Elliott C, Chambers TJ, Wagner EF. **2000**. *Nat Genet.* 24(2): 184-7. Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation.
- Matsuo N, Tanaka S, Gordon MK, Koch M, Yoshioka H, Ramirez F. **2006**. *J Biol Chem.* 281(9): 5445-52. CREB-AP1 protein complexes regulate transcription of the collagen XXIV gene (Col24a1) in osteoblasts.
- Maurer RA, Notides AC *Mol Cell Biol.* **1987**. Dec;7(12): 4247-54. Identification of an estrogen-responsive element from the 5'-flanking region of the rat prolactin gene.
- McCabe LR, Banerjee C, Kundu R, Harrison RJ, Dobner PR, Stein JL, Lian JB, Stein GS. **1996**. *Endocrinology.* 137(10): 4398-408. Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation.
- McCarthy TL, Chang WZ, Liu Y, Centrella M. **2003**. *J. Biol. Chem.* 27: 43121–43129. Runx2 integrates estrogen activity in osteoblasto.
- McDougall KE, Perry MJ, Gibson RL, Bright JM, Colley SM, Hodgins JB, Smithies O, Tobias JH. **2002**. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 283: E817-E823. Estrogen-induced osteogenesis in intact female mice lacking ER beta.

- McDougall KE, Perry MJ, Gibson RL, Colley SM, Korach KS, Tobias JH. **2003**. *Endocrinology*. 144: 1994-1999. Estrogen receptor-alpha dependency of estrogen's stimulatory action on cancellous bone formation in male mice.
- McNally JG, Muller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL. **2000**. *Science*. 287: 1262-1265. The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells.
- Melvin VS, Harrell C, Adelman JS, Kraus WL, Churchill M, Edwards DP. **2004**. *J. Biol. Chem.* 279: 14763-14771. The role of the C-terminal extension (CTE) of the estrogen receptor alpha and beta DNA binding domain in DNA binding and interaction with HMGB.
- Mengshol JA, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. **2001**. *Nucleic Acids Res.* 29(21): 4361-6172. IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways.
- Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF, Hambor JE. **1996**. *Clin. Investig.* 97(3): 761-768. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage.
- Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. **1995**. *J Clin Endocrinol Metab.* 80(12):3689-98. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens.
- Morooka H, Bonventre JV, Pombo CM, Kyriakis JM, Force T. **1995**. *J Biol Chem.* 270(50): 30084-92. Ischemia and reperfusion enhance ATF-2 and c-Jun binding to cAMP response elements and to an AP-1 binding site from the c-jun promoter.
- Mueller SO and Korach KS. **2001**. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1: 613-619. Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice.
- Mundlos S and Olsen BR. **1997**. *FASEB J.* 11(2): 125-32. Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways.
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. **2000**. *J Cell Sci.* 113: 1161-1166. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model.
- Nakamura T, Okuyama S, Okamoto S, Nakajima T, Sekiya S, Oda K. **1995**. *Exp Cell Res.* 216(2): 422-30. Down-regulation of the cyclin A promoter in differentiating human embryonal carcinoma cells is mediated by depletion of ATF-1 and ATF-2 in the complex at the ATF/CRE site.
- Narayanan K, Ramachandran A, Hao J, George A. **2002**. *Connect Tissue Res.* 43(2-3): 365-71. Transcriptional regulation of dentin matrix protein 1 (DMP1) by AP-1 (c-fos/c-jun) factors.

- Narayanan K, Srinivas R, Peterson MC, Ramachandran A, Hao J, Thimmapaya B, Scherer PE, George A. **2004**. *J Biol Chem*. 279(43): 44294-302. Transcriptional regulation of dentin matrix protein 1 by JunB and p300 during osteoblast differentiation.
- Nishimura R, Kato Y, Chen D et al. **1998**. *J Biol Chem*. 273: 1872–1879. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12.
- Ogasawara A, Arakawa T, Kaneda T, Takuma T, Sato T, Kaneko H, Kumegawa M, Hakeda Y. **2001**. *J Biol Chem*. 276(10): 7048-54. Fluid shear stress-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by C/EBP beta, cAMP-response element-binding protein, and AP-1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells.
- Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T. **2002**. *Endocrinology*. 143: 2349-2356. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta.
- Olivier EN, Rybicki AC, Bouhassira EE. **2006**. *STEM CELLS*. 24: 1914 –1922. Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells.
- O'Lone R, Frith M, Karlsson EK, Hansen U. **2004**. *Mol. Endocrinol*. 18: 1859-1875. Genomic targets of nuclear estrogen receptors.
- Olsen BR, Reginato AM, Wang W. **2000**. *Annu Rev Cell Dev Biol*. (16): 191-220. Bone development.
- Ong DB, Colley SM, Norman MR, Kitazawa S, Tobias JH. **2004**. *J Bone Miner Res*. 19(3): 447-54. Transcriptional regulation of a BMP-6 promoter by estrogen receptor alpha.
- Orimo A, Inoue S, Ikeda K, Noji S, Muramatsu M. **1995**. *J Biol Chem*. 270(41): 24406-13. Molecular cloning, structure, and expression of mouse estrogen-responsive finger protein Efp. Co-localization with estrogen receptor mRNA in target organs.
- Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE. **1994**. *Cancer Res*. 54: 2552-2555. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cell.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. **1997**. *Cell*. 89(5): 765-71. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development.
- Oursler MJ. **1998**. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 8(2): 125-40. Estrogen regulation of gene expression in osteoblasts and osteoclasts.
- Owen TA, Bortell R, Yocum SA, Smock SL, Zhang M, Abate C, Shalhoub V, Aronin N, Wright KL, van Wijnen AJ, et al. **1990**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87(24): 9990-4. Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription.

- Oz OK, Zerwekh JE, Fisher C, Graves K, Nanu L, Millsaps R, Simpson ER. **2000**. *J. Bone Miner. Res.* 15: 507-514. Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency.
- Pacifici R. **1996**. *J Bone Miner Res.* 11(8): 1043-51. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis.
- Palmer G, Manen D, Bonjour JP, Caverzasio J. **2001**. *Gene.* 279(1): 49-62. Species-specific mechanisms control the activity of the Pit1/PIT1 phosphate transporter gene promoter in mouse and human.
- Parker MG. **1993**. *J Neuroendocrinol.* 5(3): 223-8. Mortyn Jones Memorial Lecture. Structure and function of the oestrogen receptor.
- Penolazzi L, Lambertini E, Aguiari G, del Senno L, Piva R. **2000**. *Bioch. et Bioph. Acta.* 560-567. *Cis* element 'decoy' against the upstream promoter of the human estrogen receptor gene.
- Penolazzi L, Lambertini E, Giordano S, Sollazzo V, Traina G, del Senno L, Piva R. **2004**. *J.Ster.Biochem.Mol.Biol.* 91: 1-9. Methylation analysis of the promoter F of estrogen receptor α gene: effects on the level of trascription on human osteoblastic cells.
- Penolazzi L, Magri E, Lambertini E, Bianchini E, Piva R, Gambari R. 2006. *Apoptosis.* 11(9): 1653-6. "In vivo" local transfection of a *cis* element decoy mimicking an estrogen receptor alpha gene promoter region induces apoptosis of osteoclasts following application of orthodontic forces to rat teeth.
- Petz LN and Nardulli AM. **2002a**. *Mol Endocrinol.* 14: 972-985. Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter.
- Petz LN, Ziegler YS, Loven MA, Nardulli AM. **2002**. *Endocrinology.* 143(12): 4583-91. Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells.
- Petz LN, Ziegler YS, Loven MA, Nardulli AM. **2002b**. *Endocrinology.* 143: 4583-4591. Estrogen receptor α and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells.
- Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Kim H, Kemper JK, Nardulli AM. **2004**. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88(2): 113-22. Differential regulation of the human progesterone receptor gene through estrogen response element half site and Sp1 site.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. **1999**. *Science.* 284: 143–147. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.
- Piva R, Penolazzi L, Zennaro M, Bianchini E, Magri E, Borgatti M, Lampronti I, Lambertini E, Tavanti E, Gambari R. **2006**. *Ann N Y Acad Sci.* 1091: 509-16. Induction of apoptosis of osteoclasts by targeting transcription factors with decoy molecules.

- Planas-Silva MD and Weinberg RA. **1997**. Mol. Cell. Biol. 17: 4059-4069. Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution.
- Prall OW, Rogan EM, Southerland RL. **1998**. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 65: 169-174. Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells.
- Prest SJ, May FE, Westley BR. **2002**. FASEB J. 16: 592-4. The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells.
- Prince M, Banerjee C, Javed A, Green J, Lian JB, Stein GS, Bodine PV, Komm BS. Expression and regulation of Runx2/Cbfa1 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts, J. Cell.
- Qu Q, Perala-Heape M, Kapanen A, Dahllund J, Salo J, Vaananen HK, Harkonen P. **1998**. Bone. 22: 201-209. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture.
- Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F. **2003**. Mol. Cell. 11: 695-707. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER on responsive promoters is an integral feature of estrogen signalling.
- Reimold AM, Grusby MJ, Kosaras B, Fries JW, Mori R, Maniwa S, Clauss IM, Collins T, Sidman RL, Glimcher MJ, Glimcher LH. **1996**. Nature. 379(6562): 262-5. Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice.
- Reinhold MI and Naski MC. **2007**. J Biol Chem. 282: 3653-3663. Direct interactions of Runx2 and canonical Wnt signaling induce FGF18.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Endocr Rev. **2002** Jun;23(3): 279-302. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton.
- Rodrigues S, Attoub S, Nguyen QD, et al. **2003**. Oncogene. 22: 4488-97. Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signalling pathways in kidney and colonic cancer cells.
- Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, et al. **2003** a. FASEB J. 17: 7-16. Trefoil peptides as proangiogenic factors *in vivo* and *in vitro*: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signalling.
- Romagnolo D, Annab LA, Thompson TE, Risinger JI, Terry LA, Barrett JC, Afshari CA. **1998**. Mol Carcinog. 22: 102-109. Estrogen upregulation of BRCA1 expression with no effect on localization.
- Rousselle AV and Heymann D. **2002**. Bone. 30: 533-54. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption.
- Rucci N, Ricevuto E, Ficorella C, Longo M, Perez M, Di Giacinto C, Funari A, Teti A, Migliaccio S. **2004**. Bone. 34(4): 697-709. In vivo bone metastases, osteoclastogenic ability, and phenotypic characterization of human breast cancer cells.

- Rudnik V, Sanyal A, Syed FA, Monroe DG, Spelsberg TC, Oursler MJ, Khosla S. **2008**. *J Cell Biochem*. 103(3): 896-907. Loss of ERE binding activity by estrogen receptor-alpha alters basal and estrogen-stimulated bone-related gene expression by osteoblastic cells.
- Rydziel S and Canalis E. **1996**. *Endocrinology*. 137(10): 4115-9. Expression and growth factor regulation of platelet-derived growth factor B transcripts in primary osteoblast cell cultures.
- Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. **2006**. *Gene*. 366: 51–57. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells.
- Sabbah M, Courilleau D, Mester J, Redeuilh G. **1999**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 11217-11222. Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element.
- Safe S. **2001**. *Vitam Horm*. 62: 231-252. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions.
- Santen RJ, Song RX, McPherson R, Kumar R, Adam L, Jeng MH, Yue W. **2002**. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 80(2): 239-56. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer.
- Sasaki-Iwaoka H, Maruyama K, Endoh H, Komori T, Kato S, Kawashima H. **1999**. *J. Bone Miner. Res*. 14: 248–255. A trans acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts.
- Scheven BA, Damen CA, Hamilton NJ, Verhaar HJ, Duursma SA. **1992**. *Biochem. Biophys. Res Commun*. 186: 54-60. Stimulatory effects of estrogen and progesterone on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro.
- Schroeder TM, Jensen ED, and Westendorf JJ. **2005**. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 75: 213-225. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts.
- Schüle R, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Bolado J, Pike JW, Evans RM. **1990**. *Cell*. 61(3): 497-504. Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene.
- Shaulian E, Schreiber M, Piu F, Beeche M, Wagner EF, Karin M. **2000**. *Cell*. 103(6): 897-907. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest.
- Shimizu M, Nomura Y, Suzuki H, Ichikawa E, Takeuchi A, Suzuki M, Nakamura T, Nakajima T, Oda K. **1998**. *Exp Cell Res*. 239(1): 93-103. Activation of the rat cyclin A promoter by ATF2 and Jun family members and its suppression by ATF4.
- Simm PJ, Bajpai A, Russo VC, Werther GA. **2008**. *Pediatr Endocrinol Rev*. 6(1): 32-41. Estrogens and growth.

- Sims NA, Clement-Lacroix P, Minet D, Fraslon-Vanhulle C, Gaillard-Kelly M, Resche-Rigon M, Baron R. **2003**. *J. Clin. Invest.* 111: 1319-1327. A functional androgen receptor is not sufficient to allow estradiol to protect bone after gonadectomy in estradiol receptor-deficient mice.
- Sims NA, Dupont S, Krust A, Clement-Lacroix P, Minet D, Resche-Rigon M, Gaillard-Kelly M, Baron R. **2002**. *Bone*. 30: 18-25. Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males.
- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. **1994**. *N Engl J Med.* 331(16): 1056-61. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man.
- Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S. **1999**. *Mol. Endocrinol.* The Actions and Interactions of Sex Steroids and Growth Factors/Cytokines on the Skeleton.
- St-Arnaud R and Quelo I. **1998**. *Front Biosci.* 3: 838-48. Transcriptional coactivators potentiating AP-1 function in bone.
- Stewart TL and Ralston SH. **2000**. *J Endocrinol.* 166(2): 235-45. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis.
- Storey E. **1972**. *Am J Orthod.* 62(2): 142-65. Growth and remodeling of bone and bones.
- Stossi F, Barnett DH, Frasca J, Komm B, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. **2004**. *Endocrinology.* 145(7): 3473-86. Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) alpha or ERbeta in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors.
- Sun L, Blair HC, Peng Y, Zaidi N, Adebajo OA, Wu XB, Wu XY, Iqbal J, Epstein S, Abe E, Moonga BS, Zaidi M. **2005**. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(47): 17130-5. Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast.
- Takahashi T, Kato S, Suzuki N, Kawabata N, Takagi M. **2005**. *J. Oral Sci.* 47: 199–207. Autoregulatory mechanism of Runx2 through the expression of transcription factors and bone matrix proteins in multipotential mesenchymal cell line, ROB-C26.
- Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. **2002**. *Dev Cell.* 3(6): 889-901. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts.
- Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. **2002**. *Dev Cell.* 3(6): 889-901. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts.
- Takayanagi H. **2005**. *J Mol Med.* 83: 170–179. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology.

- Tang Z, Treilleux I, Brown M. **1997**. *Mol. Cell Biol.* 17: 1274-1280. A transcriptional enhancer required for the differential expression of the human estrogen receptor in breast cancers.
- Tardif G, Pelletier JP, Dupuis M, Hambor JE, Martel-Pelletier J. **1997**. *Biochem. J.* 323: 13-16. Cloning, sequencing and characterization of the 5'-flanking region of the human collagenase-3 gene.
- Teyssier C, Belguise K, Galtier F, Chalbos D. 2001. *J Biol Chem.* 276(39): 36361-9. Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins.
- Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK et al. **2004**. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15: 457– 475. The molecular triad OPG/RANK/ RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling.
- Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. **2000**. *J. Biol. Chem.* 275: 25163-25172. The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contribute to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function.
- Thirunavukkarasu K, Pei Y, Moore TL, Wei T, Wang H, Chandrasekhar S. **2007**. *Mol. Biol. Rep.* 34: 1–10. Regulation of NFATc2 gene expression by the transcription factor Runx2,
- Toft D and Gorski J. **1966**. *Proc Natl Acad Sci USA.* 55(6): 1574-81. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization.
- Tou L, Quibria N, Alexander JM. **2001**. *Mol Cell Endocrinol.* 183(1-2): 71-9. Regulation of human cbfa1 gene transcription in osteoblasts by selective estrogen receptor modulators (SERMs).
- Turner RT. **1999**. *J.Bone Miner.Res.* 14: 187-191. Mice, estrogen and postmenopausal osteoporosis.
- Uchida M, Shima M, Shimoaka T et al. **2000**. *J Cell Physiol.* 185: 207–214. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells.
- Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, Imano E, Iwama N, Morishima T, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Kamada T. **1994**. *J. Biol. Chem.* 269: 16433-16442. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer.
- Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, Imano E, Iwama N, Morishima T, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Kamada T. **1994**. *J. Biol. Chem.* 269: 16433-16442. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer.
- van Dam H and Castellazzi M. **2001**. *Oncogene.* 20(19): 2453-64. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis.

- van den Wijngaard A, Mulder WR, Dijkema R, Boersma CJ, Mosselman S, van Zoelen EJ, Olijve W. **2000**. *Mol Endocrinol.* 14(5): 623-33. Antiestrogens specifically up-regulate bone morphogenetic protein-4 promoter activity in human osteoblastic cells.
- Vincenti MP and Brinckerhoff CE. **2002**. *Arthritis Res.* 3: 157-164. Transcriptional regulation of collagenase (MM-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signalling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors.
- Vincenti MP, Coon CI, Mengshol JA, Yocum S, Mitchell P, Brinckerhoff CE. **1998**. *Biochem. J.* 331 (Pt 1): 341-346. Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from rabbit synovial fibroblasts : differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1).
- Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, et al. **1985**. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(23): 7889-93. Cloning of the human estrogen receptor cDNA.
- Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. **2006**. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(24): 9063-8. A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling.
- Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Rütter U, Wagner EF. **1992**. *Nature.* 360(6406): 741-5. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos.
- Watanabe G, Howe A, Lee RJ, Albanese C, Shu IW, Karnezis AN, Zon L, Kyriakis J, Rundell K, Pestell RG. **1996**. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(23): 12861-6. Induction of cyclin D1 by simian virus 40 small tumor antigen.
- Waters KM, Rickard DJ, Riggs BL, Khosla S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Moore J, Spelsberg TC. **2001**. *J.Cell.Biochem.* 83: 448-462. Estrogen regulation of human osteoblast function is determined by the stage of differentiation and the estrogen receptor isoform.
- Webb P, Lopez GN, Uth RM, Kushner PJ. **1995**. *Mol Endocrinol.* 9: 443-456. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens.
- Weisz A and Rosales R. **1990**. *Nucleic Acids Res.* 18(17): 5097-106. Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor.
- Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. **2004**. *Gene.* 341:19-39. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases.
- Westendorf JJ, Zaidi SK, Cascino JE, Kahler R, van Wijnen AJ, Lian JB, Yoshida M, Stein GS, Li X. **2002**. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7982–7992. Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21CIP1/WAF1 promoter.
- Westendorf JJ. **2006**. *J Cell Biochem.* 98: 54-64. Transcriptional co-repressors of Runx2.
- Winchester SK, Selvamurugan N, D'Alonzo RC, Partridge NC. **2000**. *J Biol Chem.* 275(30):

23310-8. Developmental regulation of collagenase-3 mRNA in normal, differentiating osteoblasts through the activator protein-1 and the runt domain binding sites.

Winslow MM, Pan M, Starbuck M, Gallo E, Deng L, Karsenty G, Crabtree GR. **2006**. Cell. 10: 771–782. Calcineurin/NFAT signaling in Osteoblasts regulates bone mass developmental.

Winslow MM, Pan M, Starbuck M, Gallo EM, Deng L, Karsenty G, Crabtree GR. **2006**. Dev Cell. 10(6): 771-82. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass.

Yamashita T, Yao Z, Li F, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, Takeshita S, Wagner EF, Noda M, Matsuo K, Xing L, Boyce BF. **2007**. J Biol Chem. 282(25): 18245-53. NF-kappaB p50 and p52 regulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1.

Yao Z, Li P, Zhang Q, Schwarz EM, Keng P, Arbini A, Boyce BF, Xing L. **2006**. J. Biol. Chem. 281: 11846 –11855. Tumor necrosis factor-alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression.

Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, AbuAmer Y. 2001. J. Biol. Chem. 276: 563–568. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways.

Zhuang Y, Katzenellenbogen BS, Shapiro DJ. 1995. Mol. Endocrinol. 9: 457-466. Estrogen receptor mutants which do not bind 17 beta-estradiol dimerize and bind to the estrogen response element in vivo.