



Université de Montréal

**Régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs  
des estrogènes (ER) par le récepteur à chimiokine CXCR4  
et les récepteurs à activité tyrosine kinase ErbB2 et ErbB3**

par

Karine Sauvé

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

En Biochimie

Août, 2013

© Karine Sauvé, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes (ER)  
par le récepteur à chimiokine et les récepteurs à activité tyrosine kinase  
ErbB2 et ErbB3**

Présentée par :  
Karine Sauvé

Évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gerardo Ferbeyre, président-rapporteur  
André Tremblay, directeur de recherche  
Audrey Claing, membre du jury  
Nicolas Gévry, examinateur externe  
Lise Coderre, représentante du doyen de la FES

## Résumé

La régulation de la transcription des gènes par les récepteurs des estrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  joue un rôle important dans la croissance cellulaire et dans le développement du cancer du sein. Une augmentation de l'expression de CXCR4 et de son ligand SDF-1/CXCL12 corrèle avec un phénotype plus agressif du cancer du sein. Ici, nous démontrons un mécanisme de boucle de régulation positive entre la signalisation de CXCR4/SDF-1 et l'activité transcriptionnelle des ERs dans des cellules cancéreuses mammaires. L'activité transcriptionnelle de ER et l'expression de gènes cibles de ER, dont SDF-1 lui-même, sont augmentées dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 en réponse à SDF-1. Ces effets sont bloqués par l'anti-estrogène fulvestrant et par la délétion de CXCR4. Par ailleurs, l'expression des gènes et la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 en réponse à l'estrogène sont altérées par l'inhibition de CXCR4. La signalisation par les facteurs de croissance joue un rôle important dans le cancer du sein. La surexpression et la dérégulation de la signalisation par le récepteur à activité tyrosine kinase ErbB2 corrèlent avec un phénotype tumoral mammaire plus agressif et un moins bon pronostic. Cependant, comment la signalisation de ErbB2 et de CXCR4 sont fonctionnellement reliées dans la régulation de la réponse de ER dans les cellules cancéreuses mammaires n'est pas connue. Nous démontrons ici que CXCR4 régule négativement l'expression protéique de ErbB2 et de son partenaire d'interaction ErbB3 ainsi que la phosphorylation de ErbB2. CXCR4 altère l'activation de la voie PI3-K/Akt par le dimère ErbB2/ErbB3 en réponse à héréguline alors qu'en présence de SDF-1, les niveaux d'activation sont récupérés. Nous avons trouvé que héréguline- $\beta$  promouvoit la phosphorylation de la sérine 339 de CXCR4, un site important pour l'internalisation et la signalisation du récepteur. De plus, le recrutement de ErbB2 à CXCR4 est favorisé par ErbB3 et héréguline- $\beta$ . L'activité transcriptionnelle ainsi que l'expression des gènes cibles de ER en réponse à l'héréguline sont relevées avec l'expression de CXCR4 et partiellement récupérées avec l'addition de SDF-1. Ces résultats démontrent que le recrutement de CXCR4 à ErbB2 altère la signalisation médiée par ErbB2/ErbB3 ainsi que l'activité hormonale de ER dans des cellules cancéreuses mammaires. Nos travaux ont permis d'identifier et de caractériser l'impact de la signalisation médiée par des récepteurs membranaires sur la réponse transcriptionnelle de ER dans des cellules cancéreuses mammaires. La signalisation

membranaire est un facteur pouvant contribuer à la résistance aux thérapies endocriniennes et donc cibler les récepteurs impliqués s'avèrerait utile pour améliorer les traitements existants et mettre au point de nouvelles approches.

**Mots-clés** : ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AF-1, AF-2, SDF-1, CXCR4, MAPK/ERK, MCF-7, BT-474, ErbB2/Her-2/Neu, ErbB3, Héréguline, PI3-K/Akt, cancer du sein.

## Abstract

Induction of estrogen-regulated gene transcription by estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  plays an important role in breast cancer development and growth. High expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12/SDF-1 has also been correlated with aggressive breast tumor phenotypes. Here, we describe a positive regulatory loop between CXCR4/SDF-1 signaling pathway and ER transcriptional competence in human breast cancer cells. Treatment of breast carcinoma MCF-7 cells with SDF-1 increased ER transcriptional activity and expression of ER target genes, including SDF-1 itself. These effects were blocked by the antiestrogen ICI-182780 and by CXCR4 silencing, and conversely, estrogen-induced gene expression and growth of MCF-7 cells were impaired upon CXCR4 inhibition. Growth factor signaling also plays an important role in breast cancer. Overexpression and deregulated signaling of receptor tyrosine kinase ErbB2 correlate with aggressive breast tumor phenotype and poor outcomes. However, how ErbB2 and CXCR4 signaling is functionally related to regulate ER response in breast cancer cells is not known. Here we show that steady-state levels of ErbB2 and its dimeric partner ErbB3, as well as ErbB2 tyrosine phosphorylation were negatively regulated with the expression of CXCR4. CXCR4 downregulated ErbB2/ErbB3 dimer activation of the PI3-K/Akt pathway in response to ErbB3 ligand heregulin- $\beta$ , whereas addition of SDF-1 restored activation levels. We found that heregulin- $\beta$  promoted CXCR4 phosphorylation at serine 339, an important site for CXCR4 internalization and signaling. In addition, ErbB2 recruitment to CXCR4 was enhanced by ErbB3 and heregulin- $\beta$ . Transcriptional activity and gene expression measurement showed that the hormonal repression of ER was relieved with the expression of CXCR4 and partially recuperated with the addition of SDF-1. Together, these results show that CXCR4 recruitment to ErbB2 alters ErbB2/ErbB3 signaling pathway and downstream regulation of ER hormonal activity in breast cancer cells. Our work has enabled us to identify and characterize the impact of membrane receptors signaling on ER transcriptional response in breast cancer cells. Membrane signaling is one of the factors involved in endocrine therapy resistance and targeting the receptors implicated could be beneficial to improve existing treatments and to work on the creation of new ones.

**Keywords:** ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AF-1, AF-2, SDF-1, CXCR4, MAPK/ERK, MCF-7, BT-474, ErbB2/Her-2/Neu, ErbB3, Heregulin, PI3-K/Akt pathway, breast cancer.

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux .....	xii
Liste des figures .....	xiii
Liste des abréviations .....	xiv
Remerciements.....	xxi
Chapitre 1-Introduction .....	1
1 Les hormones stéroïdiennes.....	1
2 Identification des récepteurs stéroïdiens .....	2
3 Les estrogènes .....	3
3.1 Les récepteurs des estrogènes .....	3
3.1.1 Structure .....	4
3.1.2 Les isoformes ER $\alpha$ et ER $\beta$ .....	6
3.1.3 Les variants de ER $\alpha$ et ER $\beta$ .....	8
3.1.4 Rôles physiologiques de ER $\alpha$ et ER $\beta$ .....	10
3.1.4.1 Distribution tissulaire.....	11
3.1.4.2 Études de souris 'knock-out'.....	12
4 Les modifications post-traductionnelles des ERs .....	15
4.1 Acétylation.....	15
4.2 Glycosylation.....	16
4.3 Méthylation .....	16
4.4 Myristoylation.....	16



4.5 Nitrosylation .....	17
4.6 Palmitoylation .....	17
4.7 Phosphorylation.....	18
4.8 Sumoylation .....	22
4.9 Ubiquitination .....	23
5 Action génomique des ERs.....	24
5.1 Interaction ER-ADN directe (activation classique).....	24
5.2 Association ER-ADN indirecte (activation non-classique).....	25
6 Co-facteurs transcriptionnels des ERs .....	28
6.1 Co-activateurs.....	29
6.2 Co-répresseurs.....	32
6.3 ER $\alpha$ et ER $\beta$ : Préférence et sélectivité pour le recrutement de co-régulateurs.....	33
7 Action non-génomique et rapide des ERs.....	34
8 Signalisation par le récepteur couplé aux protéines G GPR30 .....	36
9 Régulation de l'expression des gènes par les ERs.....	37
9.1 Régulation des gènes en réponse à l'hormone .....	37
9.2 Cistrome : nouveau concept dans la régulation des gènes .....	40
9.3 ER $\beta$ : quel rôle joue-t-il dans la régulation des gènes?.....	42
9.4 Régulation par l'hétérodimère ER $\alpha$ /ER $\beta$ .....	43
10 Convergence entre la signalisation membranaire et la réponse génomique des ERs.....	44
10.1 Signalisation membranaire de l'estrogène.....	44
10.2 Phosphorylation des ERs et impact génomique .....	45
11 ER et le cancer.....	48
11.1 ERs et le cancer du sein .....	49
12 Approches pour antagoniser les ERs .....	52

12.1 Thérapies endocriniennes.....	53
12.2 Autres approches envisageables .....	54
13 Les chimiokines et leurs récepteurs.....	55
13.1 Les chimiokines .....	56
13.2 Les récepteurs à chimiokines.....	58
14 Le récepteur à chimiokine CXCR4.....	60
14.1 Identification.....	60
14.2 Structure .....	61
14.3 Expression.....	62
14.3.1 Régulation de l'expression de CXCR4 .....	62
15 La chimiokine SDF-1.....	64
15.1 Identification.....	64
15.2 Expression .....	65
15.2.1 Régulation de l'expression de SDF-1.....	65
16 Liaison de SDF-1 à CXCR4.....	66
17 Rôles physiologiques de l'axe SDF-1/CXCR4.....	67
18 Signalisation du récepteur à chimiokine CXCR4 .....	68
18.1 Protéines G dépendante.....	68
18.2 Protéines G-indépendante.....	72
18.2.1 $\beta$ -arrestines.....	72
18.2.2 JAK/STATS .....	73
19 Modulation de l'activité de CXCR4 .....	73
19.1 Protéolyse du récepteur CXCR4 et de son ligand SDF-1.....	73
19.2 Modifications post-traductionnelles .....	74
19.2.1 Glycosylation.....	74

19.2.2 Sulfatation.....	74
19.2.3 Phosphorylation.....	74
19.2.3.1 Phosphorylation ligand dépendante de CXCR4 .....	75
19.2.3.2 Phosphorylation ligand indépendant .....	76
19.2.3.2.2 Phosphorylation par PKC .....	76
19.2.3.2.3 Phosphorylation par des facteurs de croissance .....	76
20 Internalisation et dégradation de CXCR4.....	76
21 Rôles de l'axe SDF-1/CXCR4 dans des pathologies .....	79
21.1 Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) .....	79
21.2 Syndrome de WHIM .....	79
21.3 Cancer du sein.....	80
22 CXCR7, un deuxième récepteur pour la chimiokine SDF-1.....	84
22.1 Identification.....	84
22.2 Expression .....	85
22.3 Signalisation.....	85
22.4 Rôles physiologiques.....	87
23 Les récepteurs à activité tyrosine kinase ErbBs.....	89
23.1 Ligands .....	89
23.2 Structure des récepteurs .....	89
24 Identification et caractérisation des ErbBs.....	91
24.1 EGFR.....	91
24.2 ErbB2/Her2/Neu .....	92
24.3 ErbB3/ErbB4.....	93
25 Rôles physiologiques dans le développement.....	94
25.1 Système cardiovasculaire .....	94
25.2 Système nerveux.....	95

25.3 Développement épithélial .....	95
25.4 Glande mammaire .....	96
26 Signalisation .....	96
26.1 Voies de signalisation .....	97
26.2 Transactivation par des RCPGs .....	98
26.3 Terminaison de la signalisation.....	100
27 Les fonctions cellulaires des ErbBs .....	101
27.1 ErbBs, régulateurs du cycle cellulaire et des voies de survie cellulaire.....	101
27.2 Autres fonctions cellulaires des ErbBs.....	102
27.2.1 Motilité cellulaire.....	102
27.2.2 Progression métastatique.....	103
28 L'hétérodimérisation .....	104
28.1 L'hétérodimère ErbB2/ErbB3 .....	104
28.2 Coopération entre ErbB2 et ErbB3 dans le cancer du sein.....	105
29 Approches thérapeutiques ciblant les ErbBs.....	107
30 Relation entre ErbB2/ErbB3/héréguline et les récepteurs des estrogènes .....	108
31 Hypothèses et objectifs .....	111
Chapitre 2 : Résultats.....	113
1 – 1 <sup>ère</sup> publication.....	113
Positive Feedback Activation of Estrogen Receptors by the CXCL12-CXCR4 Pathway.....	113
2 – 2 <sup>ième</sup> publication .....	150
Interplay between CXCR4 and ErbB2/ErbB3 signaling regulates the hormonal response of estrogen receptors $\alpha$ and $\beta$ .....	150
Chapitre 3 : Discussion générale, perspectives et conclusion .....	196
Discussion .....	196

1 Boucle de rétroaction positive entre la réponse transcriptionnelle des ERs et l'axe SDF/CXCR4....	197
1.1 L'expression du gène SDF-1 est régulée par ER et CXCR4 .....	197
1.2 La signalisation de CXCR4 régule l'activité ligand-dépendante des ERs.....	199
1.3 La chimiokine SDF-1 régule l'activité ligand-indépendante des ERs .....	200
1.4 SDF-1, via la voie ERK 1/2/MAPK, cible la portion N-terminale de ER $\beta$ .....	201
2 CXCR4/SDF-1 régule la prolifération des cellules MCF-7.....	203
3 Le récepteur CXCR4 régule l'activité des ERs en absence de SDF-1 .....	205
3.1 CXCR4 augmente l'activité basale et hormonale des ERs .....	205
3.2 CXCR4 relève la répression hormonale des ERs en réponse à ErbB2/ErbB3.....	205
3.2.1 La phosphorylation de CXCR4 est régulée par la signalisation de ErbB2 .....	207
3.2.2 CXCR4 régule la signalisation de ErbB2/ErbB3 .....	209
3.2.3 CXCR4 régule la stabilité de ErbB2 et ErbB3 et la phosphorylation de ErbB2. ....	212
3.2.4 CXCR4 et ErbB2/ErbB3 forment un complexe .....	214
4 La chimiokine SDF-1 : Ligand pour les récepteurs CXCR4 et CXCR7 .....	215
5 Comment l'axe CXCR4/SDF-1 est couplé à d'autres récepteurs stéroïdiens.....	217
Perspectives.....	220
1 Implication de la sérine 87 de ER $\beta$ dans la régulation des gènes.....	220
2 ER $\beta$ et plus particulièrement la serine 87 de ER $\beta$ modulent-ils la prolifération de cellules cancéreuses mammaires et la tumorigénèse? .....	221
3 Implication de CXCR4/SDF-1 dans la résistance acquise au tamoxifène .....	222
4 CXCR7 peut-il influencer le couplage entre CXCR4 et ER?.....	223
5 Analyse du profil des gènes cibles de ER modulé par CXCR4 en réponse à la signalisation de ErbB2/ErbB3. ....	223
6 Tenter de comprendre comment CXCR4 régule la transcription de ER $\alpha$ et ER $\beta$ en réponse à la signalisation de ErbB2/ErbB3.....	224
7 Étudier les mécanismes derrière la régulation de l'expression de ErbB2 et ErbB3 par CXCR4. ....	226

8 Déterminer l'impact de la serine 339 de CXCR4.....	227
9 Régulation de la signalisation PI3-K/Akt -ErbB2/ErbB3 dépendante par CXCR4.....	228
10 Évaluer l'impact de CXCR4 sur la prolifération des cellules en réponse à la signalisation de ErbB2/ErbB3. ....	229
Conclusion.....	231
Liste des références .....	232

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> Les récepteurs à chimiokines et leurs ligands (Tiré de Allen et al., 2007).....	60
--	----

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> Biosynthèse des hormones stéroïdiennes (Adapté de Payne and Hales, 2004).....	1
<b>Figure 2</b> Mode d'action des hormones stéroïdiennes.....	3
<b>Figure 3</b> Schématisation de la structure des récepteurs des estrogènes (Adapté de Ascenzi et al., 2006) .....	7
<b>Figure 4</b> Structure chimique de certains ligands des ERs (Tiré de Ascenzi et al., 2006) .....	8
<b>Figure 5</b> Représentation de quelques variants de ER $\alpha$ et ER $\beta$ (Tiré de Le Romancer et al., 2011) .....	10
<b>Figure 6</b> Distribution de ER $\alpha$ et ER $\beta$ chez l'humain (Tiré de Nilsson and Gustafsson, 2011).....	12
<b>Figure 7</b> Mode d'action génomique des ERs (Adapté de Ascenzi et al, 2006) .....	28
<b>Figure 8</b> Co-facteurs impliqués dans l'initiation de la transcription par des récepteurs nucléaires (Tiré de Xu et al, 2009).....	32
<b>Figure 9</b> Le repliement de la chromatine met à proximité des régions régulatrices distales avec le site d'initiation de la transcription (Tiré de Carroll and Brown, 2006) .....	41
<b>Figure 10</b> La signalisation membranaire converge vers les ERs dans le noyau (Adapté de Sanchez et al., 2010) .....	48
<b>Figure 11</b> Représentation schématique de la structure des chimiokines (Tiré de Kohidai, 1999) .....	57
<b>Figure 12</b> Représentation schématique de CXCR4 (Tiré de De Clerq, 2003 .....	62
<b>Figure 13</b> Signalisation du récepteur CXCR4 (Adapté de Debnath et al, 2013.....	72
<b>Figure 14</b> Fonctions de CXCR4 et SDF-1 dans le cancer du sein (Tiré de Luker and Luker, 2006) .....	84
<b>Figure 15</b> Schématisation de la structure des récepteurs de la famille ErbB (Tiré de Hubert, 2006) .....	91
<b>Figure 16</b> Membres de la famille des ErbB, leurs ligands et leurs effecteurs.....	94
<b>Figure 17</b> Signalisation de l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 .....	105



## Liste des abréviations

15d-PGJ2: 15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2

5-FU: 5-Fluorouracile

8-Bromo-cAMP: 8-bromo-adenosine-3',5'-cyclic monophosphate

a.a.: acide aminé

A: Alanine

ACTH: Adrenocorticotropic hormone

AD: activation domain

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire

AF: Activation function

AIP4: atrophin-1-interacting protein 4

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

AP: activator protein

AR: Androgen receptor

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

Arp: actin-related protein

Asn: Asparagine

Asp: Acide aspartique

ATF: Activating transcription factor

ATP: Adenosine triphosphate

Bad: Bcl-2-associated death promoter

Bax: Bcl-2-associated X protein

Bcl: B-cell lymphoma

bFGF: basic fibroblast growth factor

BRCA1: breast cancer 1

BTG: B cell translocation gene

CARM1: coactivator-associated arginine methyltransferase 1

CBP: CREB-binding protein  
CCND1: cycline D1  
Cdc42: Cell division control protein 42  
Cdk: Cyclin-dependent kinase  
CHIP: carboxy terminus of Hsp70-interacting protein  
ChIP: Chromatine immunoprecipitation  
ChIP-Seq Chromatine immunoprecipitation sequencing  
CISK: cytokine-independent survival kinase  
c-Jnk: c-Jun N-terminal kinase  
CREB: c-AMP Response Element-binding protein  
Cys: Cystéine  
D: acide aspartique  
DAG: diacylglycérol  
DAX-1: dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1  
DBD: DNA binding domain  
D-box: Distal box  
DHCR7: 7-dehydrocholesterol reductase  
DPN: diarylpropionitrile  
DRIP: thyroid hormone receptor- associated protein  
E: acide glutamique  
E2: Estradiol  
E2F1: E2F transcription factor 1  
E6-AP: ubiquitin ligase E6 associated protein  
EGF: Epidermal growth factor  
EGFR: epidermal growth factor receptor  
eIF4E: Eukaryotic translation initiation factor 4E  
eNOS: endothelial nitric oxide synthase  
EPS15: Epidermal growth factor receptor substrate 15  
ER: Estrogen receptor  
ERE: Estrogen response element

ERK: Extracellular signal-regulated kinases  
ERR: Estrogen-related receptor  
F: Phenylalanine  
FAK: Focal adhesion kinase  
FDA: Food and Drug Administration  
FOXA: Forkhead box A  
FoxO3: Forkhead box O3  
FRET: Förster resonance energy transfer  
FSH: Hormone folliculo-stimulante  
G: Glycine  
GAGs: glycosaminoglycans  
G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor  
GEF: Guanine Exchange Factor  
Gi: inhibitory regulative G-protein  
Glu: Acide glutamique  
Gly: Glycine  
GTPase : guanosine triphosphatase  
GR: Glucocorticoid receptor  
GRE: glucocorticoid response element  
GREB1: growth regulation by estrogen in breast cancer 1  
GRK: G protein receptor kinase  
Gs: stimulative regulative G-protein  
GSK-3: Glycogen synthase kinase 3  
HAT: Histone acetyltransferase  
HB-EGF: Heparin-binding epidermal growth factor  
hCG: hormone gonadotropine chorionique  
HDAC: Histone déacetylase  
HGF: Hepatocyte Growth Factor  
HIF-1 $\alpha$ : Hypoxia-inducible factor 1 alpha  
HNSCC: carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou  
HPTE : 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-Hydroxyphenyl)ethane

Hrg: Heregulin  
Hsp: heat shock protein  
hTERT: human telomerase reverse transcriptase  
IGF: facteur de croissance apparenté à l'insuline  
IGF-1R: Insulin-like growth factor 1 receptor  
IKK: I $\kappa$ B kinase  
IL: Interleukine  
Ile: Isoleucine  
IL-R: Interleukine receptor  
INF: interferon  
IP3: inositol triphosphate  
ITAC: Interferon inducible T-cell alpha chemoattractant  
JAK: Janus kinase  
K: Lysine  
kb: kilobase  
KD: Kinase dead  
KO: Knock-out  
LCoR: Ligand-dependent nuclear receptor corepressor  
LDB: Ligand binding domain  
LDL-R: récepteur à lipoprotéine de basse densité  
LESTR: leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor  
Leu: Leucine  
LH: hormone lutéinisante  
LPA: Lysophosphatidic acid receptor  
Lys: Lysine  
MAPK: Mitogen-activated protein kinase  
MAPKKK1: Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1  
Mdm2: Mouse double minute 2 homologue  
MEK: MAP kinase kinase  
Memo: mediator of ErbB2-driven motility  
MIP-1 $\alpha$ : macrophage inflammatory protein 1 alpha

MMP: métalloprotéinase matricielle  
MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus  
MNAR: Modulator of non-genomic activity of ER  
MTA1: metastasis associated 1  
mTOR: mammalian target of rapamycin  
N: Acide aspartique  
NCoR: Nuclear receptor co-repressor 1  
NFAT: Nuclear factor of activated T cells  
NF- $\kappa$ B: nuclear factor-kappa B  
NGF: Nerve growth factor  
NLS: séquence de localisation nucléaire  
NR: Nuclear receptor  
NR-box: Nuclear receptor box  
NRF-1: Nuclear respiratory factor-1  
NRG: neuregulin  
NRIP1: Nuclear receptor-interacting protein 1  
NSCLC: Non-small-cell lung carcinoma  
OSCC: Oral Squamous Cell Carcinoma  
PAK: p21-activated protein kinase  
P-box: Proximal box  
PDGF: platelet-derived growth factor  
PDK1: PI3-K-dependent kinase 1  
PERC: PGC-1 $\alpha$ -related co-activator  
PEST: Proline-Glutamine-Asparagine-Threonine  
PGC: primordial germ cell  
PH: Pleckstrin Homology  
PI3-K: Phosphoinositide 3-kinase  
PIAS: protein inhibitor of activated STAT  
Pin1: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1  
PIP2: phosphatidylinositol 4', 5' biphosphate

PKA: Protein kinase A  
PKC: Protéine kinase C  
PLC: Phospholipase C  
PMA: phorbol myristate acetate  
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor  
PPT: propyl pyrazole triol  
PR: Progesterone receptor  
PRMT1: Protein arginine N-methyltransferase  
PTB: phosphotyrosine binding  
PTEN: Phosphatase and Tensin homolog  
PTP1B: Protein tyrosine phosphatase 1B  
Pyk-2: proline-rich tyrosine kinase 2  
R: Arginine  
RAR: retinoic acid receptor  
RBP1: retinoblastoma binding protein 1  
RCPG: Récepteur couple aux protéines G  
RDC1: Receptor Dog cDNA  
Rho-GDI: Rho GDP-dissociation inhibitor  
Rho-GEF: Rho Guanine Exchange Factor  
RIP-140: receptor-interacting protein 140  
Robo: Roundabout  
ROCK: Rho-dependent coiled-coil kinase  
RSK: ribosomal s6 kinase  
RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase  
Runx1: Runt-related transcription factor 1  
S: Serine  
SCID : severe combined immunodeficient  
S6K: ribosomal protein S6 kinase  
SDF-1: Stromal cell-derived factor 1  
Ser: Serine  
SERD: selective estrogen receptor down-regulator

SERM: Selective Estrogen Receptor Modulator  
SH2: Src homology domain  
Shc: Src homology 2 domain-containing  
SHP: small heterodimer partner  
siRNA: small interfering RNA  
shRNA: small hairpin RNA  
SMRT: silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor  
Sp: specificity protein  
SRA: steroid receptor coactivator  
SRC: steroid receptor coactivator  
SRE: Sterol Regulatory Element  
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription  
SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier  
SWI/SNF: SWItch/Sucrose NonFermentable  
TAT: tyrosine aminotransferase  
TFF1: Trefoil factor 1  
TGF: Transforming growth factor  
TIEG: TGF-beta-inducible early-response gene  
TNF: tumor necrosis factor  
TR: thyroid hormone receptor  
TRAP: thyroid hormone receptor- associated protein  
TSA: Trichostatin A  
Tyr: Tyrosine  
Ucn2: Urocortin 2  
UTR: Untranslated region  
VDR: vitamin D receptor  
VEGF: Vascular endothelial growth factor  
VHL: von Hippel-Lindau  
VIH: virus de l'immunodéficience humain  
WHIM: Warts, Hypogammaglobulinemia, Immunodeficiency, and Myelokathexis  
Y: Tyrosine

YY1: Ying Yang 1

## Remerciements

Je voudrais dans un premier temps remercier mon superviseur, Dr. André Tremblay, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour ma maîtrise et ensuite mon doctorat. Je voudrais le remercier pour son encadrement, sa disponibilité et la liberté qu'il m'a laissée dans mes projets de recherche. André tient à ce que l'on s'approprie notre projet et c'est très stimulant ainsi. Je voudrais aussi le remercier pour sa patience et sa compréhension lors de moments difficiles que j'ai eu à traverser.

Je veux aussi remercier le Dr Nikolaus Heveker, qui a été mon co-directeur lors de ma maîtrise. Je voudrais le remercier d'avoir toujours trouvé du temps pour parler avec moi lorsque j'avais des questions et toujours avoir rapidement répondu à mes emails. Merci également d'avoir participé aux rencontres de comité de thèse Je voudrais aussi remercier une de ses étudiantes, Stéphanie Gravel qui a toujours été très gentille et serviable lorsque j'avais besoin de quelque chose.

Je voudrais également remercier Dr. Hugo Soudeyns pour sa participation aux rencontres de comité de thèse mais également à mon examen pré-doctoral. Merci également au Dre. Julie Carrier pour sa participation comme membre externe à mon examen pré-doctoral.

Un énorme merci à toutes les collègues que j'ai côtoyées. Lorsque j'ai débuté ma maîtrise au laboratoire, j'étais entouré d'étudiantes avec beaucoup d'expérience, Julie qui terminait sa maîtrise et Mélanie, Nathalie, Amélie et Annie qui étaient au doctorat. Vous avez été mes mentors et m'avez appris tant de choses. Merci pour toutes les discussions scientifiques et non-scientifiques! Votre présence était très agréable et vous m'avez beaucoup fait rire. Mélanie, ma voisine de bench, qui a cédé la moitié de son bench pour moi ! Merci pour ton support et tous tes conseils, même après ton départ du labo. Nous sommes parfois restées tard au labo et ta compagnie rendait les longues journées plus agréables.



Merci aussi à Meryl, une étudiante de passage au labo pour un post-doc ainsi qu'aux membres actuels dans le labo : Stéphanie, Sarah, Véro, Samira et Lydia. Merci de votre aide, votre support et vos encouragements.

Je voudrais remercier aussi Pauline, Sandy et Dominika du centre de recherche. Merci d'avoir à cœur les étudiants du centre.

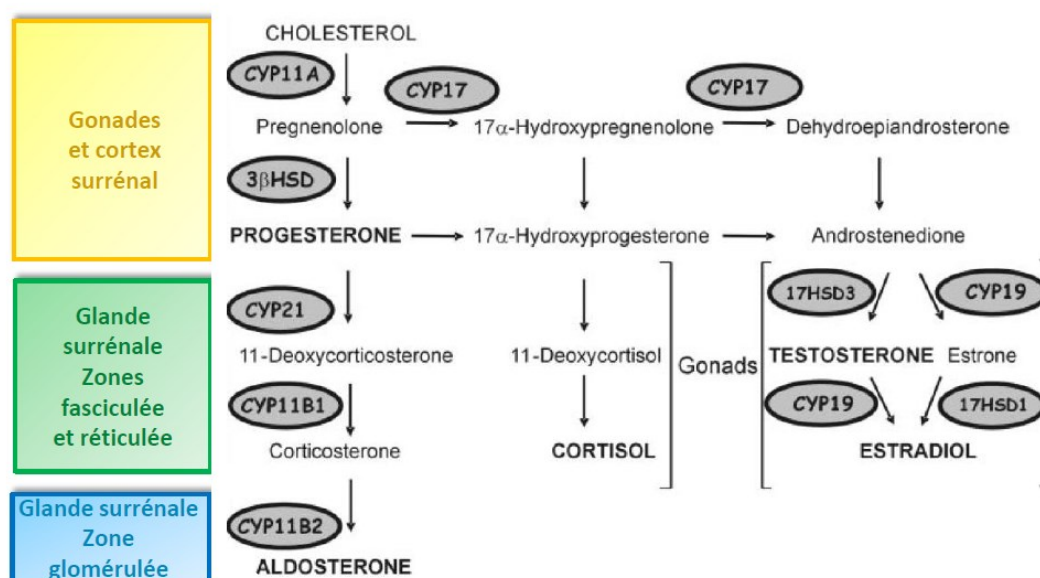
Merci à mes amis(es), particulièrement à Marie-Josée et Mathieu. Merci de vos encouragements et d'avoir été là même dans des moments difficiles.

Merci à mes parents qui ont toujours été là pour me supporter et m'encourager. Je n'aurais pas pu passer au travers sans vous. Un grand merci également à mon chum qui m'endure et me supporte dans mes hauts et mes bas. Merci d'être dans ma vie et à mes côtés. Je sais que je peux toujours compter sur toi. Merci aussi à sa famille, particulièrement ses parents et sa sœur Geneviève. Merci beaucoup pour vos encouragements.

## Chapitre 1-Introduction

### 1 Les hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes actives sont synthétisées à partir du cholestérol dans les gonades, les glandes surrénales et le placenta. Plusieurs enzymes interviennent dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes adrénales corticostérone, cortisol et aldostérone et des hormones stéroïdiennes gonadales progestérone, estradiol et testostérone. Ces enzymes appartiennent à deux principales classes de protéines : les cytochromes P450 et les hydroxy stéroïdes déshydrogénases (Payne and Hales, 2004)(Fig.1).



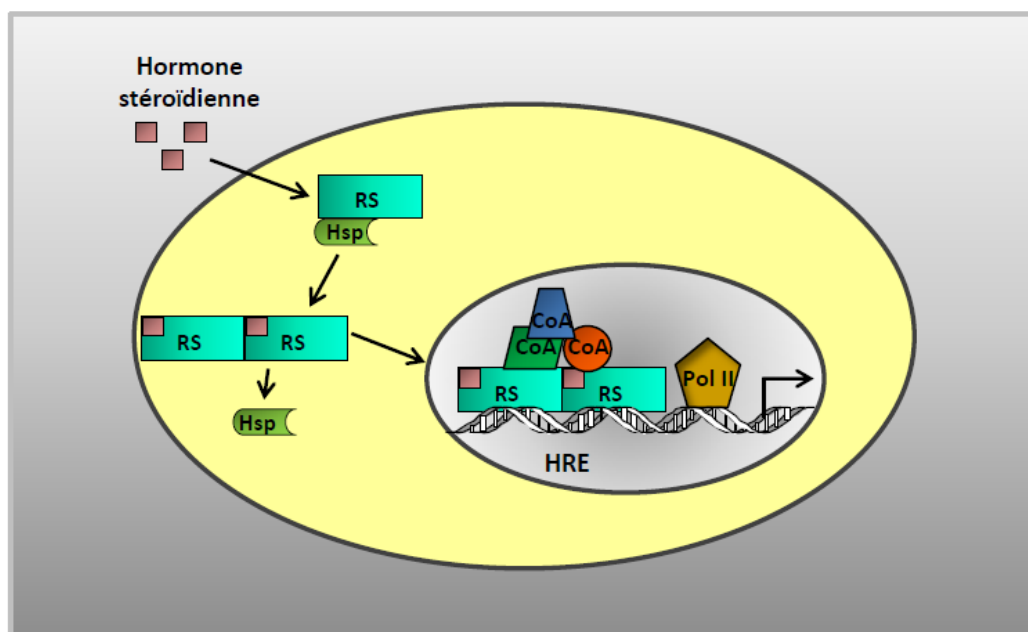
**Figure 1** Biosynthèse des hormones stéroïdiennes (Adapté de Payne and Hales, 2004)

## 2 Identification des récepteurs stéroïdiens

La recherche de récepteurs s'est déroulée en injectant des hormones marquées dans un animal, en préparant des extraits de tissus et en regardant la liaison de l'hormone marquée par autoradiographie ou fractionnement protéique radioactive après une ultracentrifugation sur gradient de sucrose. Par cette approche, les récepteurs de cinq classes d'hormones stéroïdiennes ont été identifiés par I. Edelman et G. Sharp (minéralocorticoïdes), J. Gorski, R. King, E. Jensen et E. Baulieu (estrogènes), S. Liao et W. Mainwaring (androgènes), O'Malley (progestines) et C. Sekeris, A. Munck et G. Tomkins (glucocorticoïdes) (Rousseau, 2013).

Les analyses ont confirmé que ces récepteurs appartiennent à une famille de protéines présentant des domaines impliqués dans la liaison du ligand et de Hsp90, la dimérisation du récepteur, la localisation nucléaire, la liaison à l'ADN (domaine de liaison à l'ADN) et la transactivation (Fig.2).

Les récepteurs stéroïdiens appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. Ils forment la sous-famille 3 des récepteurs nucléaires (NR3), comprenant trois groupes : A, B et C. NR3 comprend deux récepteurs des estrogènes ( $ER\alpha$  et  $ER\beta$  ou NR3A1 et NR3A2), trois récepteurs nucléaires orphelins ( $ERR\alpha$ ,  $ERR\beta$ , et  $ERR\gamma$ , ou NR3B1, NR3B2 et NR3B3) et les autres récepteurs pour les classes d'hormones stéroïdiennes : glucocorticoïdes (GR ou NR3C1), minéralocorticoïdes (MR ou NR3C2), progestagènes (PR ou NR3C3) et androgènes (AR ou NR3C4).



**Figure 2** Mode d'action des hormones stéroïdiennes

### 3 Les estrogènes

Dans les glandes surrénales et les gonades, l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et l'hormone lutéinisante (LH) mobilisent le cholestérol dans la voie stéroïdogénèse. L'hormone folliculo-stimulante (FSH) promouvoit le développement des cellules granulaires et la synthèse d'estradiol durant l'ovulation. Dans le placenta, la production est moins pulsatile et dépend de l'hormone gonadotropine chorionique (hCG) au début de la gestation (Ghayee and Auchus, 2007).

#### 3.1 Les récepteurs des estrogènes

Le récepteur des estrogènes (aujourd'hui nommé ER $\alpha$ ) a été originalement isolé et caractérisé à partir d'utérus de rat (Toft and Gorski, 1966). ER $\alpha$  humain a été cloné à partir d'une librairie de cDNA de la lignée cancéreuse mammaire humaine MCF-7 (Walter et al., 1985). Un deuxième récepteur des estrogènes, nommé ER $\beta$ , a été originalement identifié chez le rat (Kuiper et al., 1996). Par la suite, ER $\beta$  a été cloné chez l'humain (Mosselman et al., 1996) et la souris (Tremblay et al., 1997). Les deux récepteurs lient les ligands physiologiques estradiol, estriol et estrone.

Chez l'humain, ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont encodés par deux gènes distincts (*ESR1* et *ESR2*) situés sur le chromosome 6 et le chromosome 14 respectivement (Green et al., 1986, Enmark et al., 1997). Les gènes *ESR1* et *ESR2* sont formés de 8 exons qui encodent pour les différents domaines structuraux caractéristiques des récepteurs nucléaires, soient les domaines A à F (Aranda and Pascual, 2001).

### 3.1.1 Structure

Les ERs sont organisés en cinq domaines : La région N-terminale A/B possédant le domaine d'activation 1 (AF-1) et régulée de manière ligand-indépendante, un domaine de liaison à l'ADN (DBD), une région charnière, le domaine E comprenant le domaine de liaison au ligand (LBD) et le domaine d'activation 2 (AF-2) et finalement la région F, localisée dans la région C-terminale du récepteur.

La région N-terminale possède plusieurs résidus principalement ciblés par la phosphorylation dans le domaine AF-1 qui contribue au recrutement de cofacteurs transcriptionnels et est responsable de l'activité ligand-indépendante du récepteur (Wärnmark et al., 2003, Kumar and Litwack, 2009). Toutefois, l'activation optimale de ER $\alpha$  et ER $\beta$  requiert une synergie fonctionnelle entre les domaines AF-1 et AF-2 (Kumar and Thompson, 1999, Kumar and Thompson, 2003, Kumar et al., 2004). Le domaine AF-1 ne possède pas de

structure spécifique. Toutefois, il a la capacité à former des régions d'hélices alpha (Kumar and Thompson, 1999, Kumar and Thompson, 2003).

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) de ER s'associe à un élément de réponse à l'estrogène (ERE) constitué de deux demi-sites répétés inversés séparés par trois nucléotides. La séquence ERE consensus minimale est constituée ainsi : AGGTCAnnnTGACCT où n correspond à n'importe quel nucléotide. Chaque demi-site est reconnu par un récepteur monomère et l'homodimère ou l'hétérodimère lié est orienté de manière 'tête-à-tête' (Ascenzi et al., 2006). Le DBD a une longueur d'environ 80 acides aminés qui comprend la région C plus 14 acides aminés de la région D. Le domaine C possède deux motifs à doigts de zinc de type Cys2-Cys2 coordonnés avec un atome de zinc ionisé (Kumar and Thompson, 1999). Seulement quelques acides aminés compris dans le premier doigt de zinc, appelé proximal box (P-box), sont responsables de la reconnaissance spécifique au ERE. Une deuxième série d'acides aminés comprise dans le deuxième doigt de zinc appelés distal box (D-box), forme l'interface de dimérisation du DBD (Schwabe et al., 1993, Ruff et al., 2000, Gearhart et al., 2003).

La région charnière ou domaine D est une région flexible qui contient un signal de localisation nucléaire (NLS) et relie le domaine C au domaine C-terminal E/F (Ascenzi et al., 2006). Cette région possède également des sites d'acétylation et de symoylation (McEwan, 2004, Sentis et al., 2005). La région charnière de ER $\alpha$  serait également impliquée dans la synergie entre l'AF-1 et l'AF-2 en réponse à l'estrogène (Zwart et al., 2010).

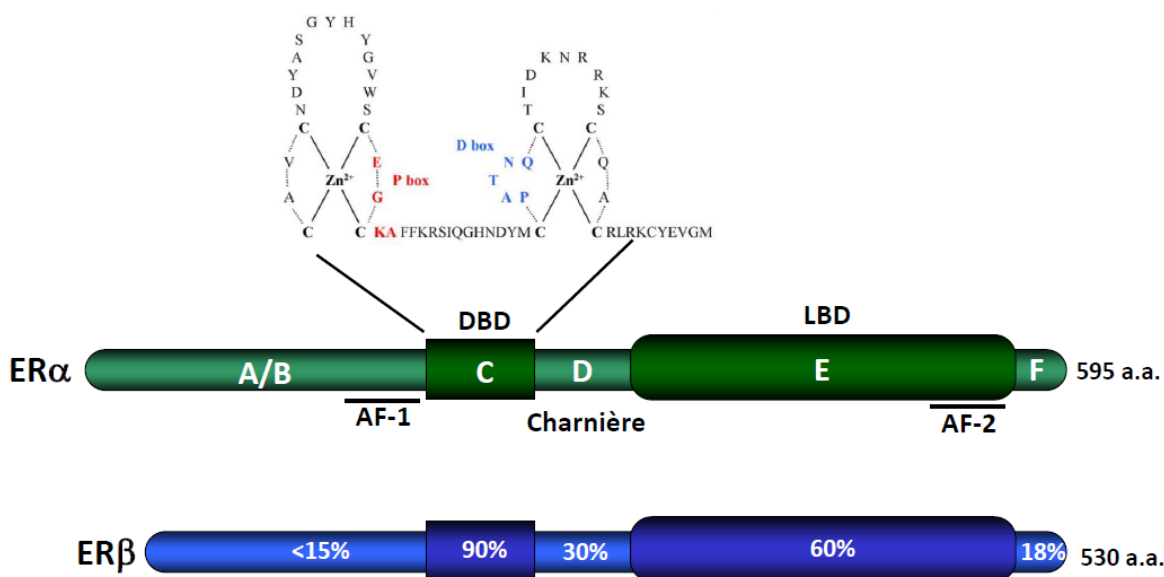
La région C-terminale E/F de ERs comprend le domaine de liaison au ligand (LBD), le domaine AF-2, le domaine d'homo ou d'hétérodimérisation et une partie de la région de la localisation nucléaire. ER possède un signal de localisation au niveau des a.a. 256-303 entre le DBD et le LBD mais ne possède pas un deuxième signal de localisation membranaire dans le

LBD comme le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) (Picard et al., 1990). Cela fait en sorte que même en absence de ligand, ER est principalement nucléaire, contrairement à d'autres récepteurs stéroïdiens comme GR (Picard et al., 1990). Pour ER $\alpha$ , la structure tridimensionnelle de son domaine de liaison au ligand (ou domaine E) en présence d'estradiol ou de l'anti-estrogène raloxifène a été déterminée. Le LBD est structuré en sandwich comprenant trois couches d'hélices alpha antiparallèles, un centre de trois hélices alpha et finalement deux couches supplémentaires d'hélices alpha. Cet arrangement hélical crée une structure moléculaire qui maintient la cavité de liaison du ligand. Cette cavité est isolée de l'environnement externe et est fermée par l'hélice 12 du LBD suite à l'entrée de l'hormone dans la cavité. La fermeture de l'hélice 12 amphipathique sur la cavité génère une interface qui permet la liaison de co-facteurs au LBD, régulant ainsi l'activité du domaine AF-2 (Ascenzi et al., 2006).

La région adjacente F, localisée dans la région C-terminale du récepteur, est un domaine variable dont la fonction n'a pas été complètement élucidée. Elle serait requise pour l'activité agoniste de l'anti-estrogène tamoxifène et régulerait l'interaction avec des corégulateurs tels que SRC-1 (Skafar and Zhao, 2008).

### **3.1.2 Les isoformes ER $\alpha$ et ER $\beta$**

L'isoforme ER $\alpha$  (66 kDa) et l'isoforme ER $\beta$  (60 kDa) possèdent une forte homologie au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN (95%) mais seulement 15 % d'homologie pour la région N-terminale (Marino et al., 2006), suggérant qu'ils doivent recruter des cofacteurs différents. Les domaines AF-1 de ER $\alpha$  et ER $\beta$  diffèrent dans la longueur et la séquence en acides aminés (Nilsson et al., 2001). La séquence en acides aminés de la P-box est identique entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  ce qui fait en sorte que les deux récepteurs s'associent aux éléments de réponse à l'estrogène (ERE) avec une affinité similaire (Klinge, 2001) (Fig.3).



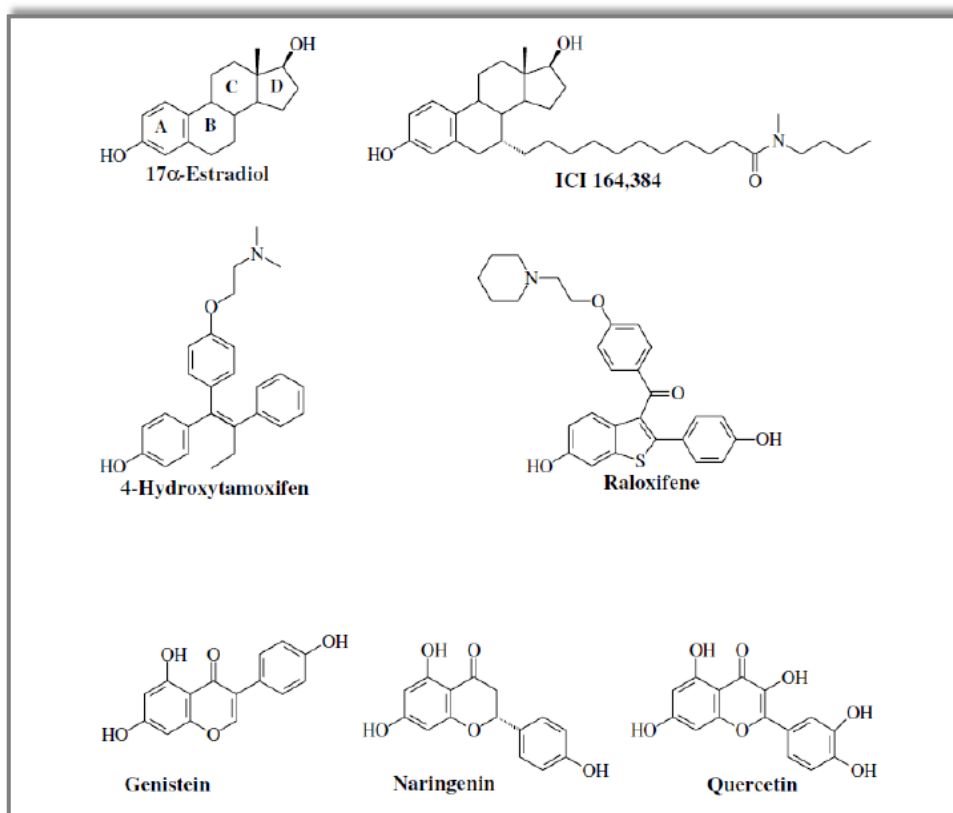
**Figure 3** Schématisation de la structure des récepteurs des estrogènes (Adapté de Ascenzi et al., 2006)

Même si les deux isoformes lient l'estrogène, l'activité transcriptionnelle de ERβ est plus faible que celle de ERα en réponse à l'hormone (Nilsson et al., 2001). Les deux isoformes lient l'estradiol (E2) avec la même affinité mais présentent des différences d'affinité pour d'autres ligands naturels ou synthétiques (Fig.4). ERβ possède une plus forte affinité pour les phytoestrogènes tels que genistein, quercetin ou coumestrol que ERα (Miodini et al., 1999, Mageea and Rowlanda, 2004). La réponse des deux isoformes est également différente en réponse à des ligands synthétiques tels que tamoxifène, raloxifène et fulvestrant. Ces ligands sont des agonistes partiels pour ERα mais des antagonistes purs pour ERβ.

ERα et ERβ régulent différemment certains gènes en réponse à l'estrogène et aux anti-estrogènes (Kian Tee et al., 2004). Cette différence pourrait s'expliquer par des différences au niveau des domaines d'activation (AF) (Pettersson et al., 2000). L'activation optimale de ERα est atteinte lors d'une synergie entre les domaines AF-1 et AF-2 (Mérot et al., 2004). L'AF-1 et l'AF-2 de ERα sont tous deux requis pour l'effet agoniste de E2 et partiellement agoniste du tamoxifène (McDonnell et al., 1995). ERβ possède un domaine AF-1 plus faible que ERα



et cette région de ER $\beta$  possède une activité répressive (Ogawa et al., 1998, St-Laurent et al., 2005, Picard et al., 2008, Picard et al., 2012). La régulation des gènes par ER $\alpha$  et ER $\beta$  est discutée plus en détail dans la section 9.



**Figure 4** Structure chimique de certains ligands des ERs (Tiré de Ascenzi et al., 2006)

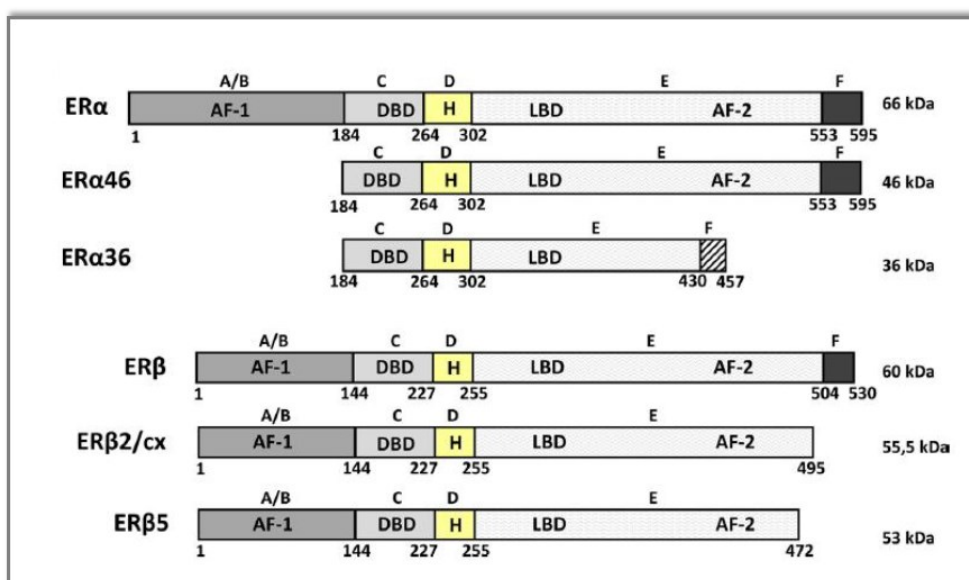
### 3.1.3 Les variants de ER $\alpha$ et ER $\beta$

Des variants de ER $\alpha$  ou ER $\beta$  résultant d'un épissage alternatif ou de l'utilisation de promoteurs alternatifs ont été décrits. ER $\alpha$  pleine longueur est produit à partir de l'ARNm transcrit à partir du gène *ER $\alpha$*  qui contient au moins sept promoteurs en amont (Koř et al., 2001). Le variant ER $\alpha$ 46 ne possède pas de domaine AF-1 et a été identifié dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Trivedi et al., 1996), les ostéoblastes (Denger et al., 2001),

les macrophages (Murphy et al., 2009) et les cellules endothéliales (Li et al., 2003). ER $\alpha$ 46 réprime l'activité AF-1 de ER $\alpha$  pleine longueur (Flouriot et al., 2000) et inhibe la transcription du gène *pS2/Trefoil factor 1(TFF1)* induite par l'estrogène en recrutant des co-répresseurs (Penot et al., 2005). Dans des lignées mammaires, ce variant inhibe l'action de ER $\alpha$  type sauvage en affectant la liaison de l'estrogène (Garcia et al., 1988) et la réponse transcriptionnelle (McGuire et al., 1991, Fuqua et al., 1992). Le variant ER $\alpha$ 36 ne possède pas les domaines AF-1 et AF-2 et est présent dans des lignées cancéreuses mammaires (Wang et al., 2005). Cet isoforme initie l'activation de la voie MAPK à la membrane plasmique en réponse à l'estrogène (Wang et al., 2006, Zhang et al., 2011). Des mutations ponctuelles dans la séquence de ER $\alpha$  ont été rapportées. Les mutations qui altèrent la séquence protéique de ER $\alpha$  ont été détectées dans plusieurs tissus et pathologies, incluant le cancer du sein, le cancer de l'endomètre et des désordres physiologiques. Plusieurs de ces mutations ont été identifiées chez des patientes atteintes du cancer du sein dont le type de cancer avait été cliniquement classé comme ER $\alpha$  négatif (Herynk and Fuqua, 2004).

Des variants de ER $\beta$  ont été retrouvés dans divers tissus normaux et dans des pathologies. La première caractérisation du promoteur de ER $\beta$  a mené à l'identification d'une région nommée exon 0N (Li et al., 2000) et ensuite à l'identification d'une seconde région promotrice en amont nommée exon 0K (Hirata et al., 2001). Le projet du génome humain a mené à l'identification d'au moins 5 exons additionnels localisés entre les régions 0N et 0K, suggérant une régulation complexe comme ER $\alpha$  (Matthews and Gustafsson, 2003). Divers variants d'épissage alternatif ont été rapportés, certains avec une extension de la portion N-terminale et d'autres avec des délétions et/ou des insertions dans le LBD (Enmark et al., 1997, Maruyama et al., 1998). Le niveau d'expression de plusieurs de ces isoformes est plus élevé dans les tissus mammaires que ER $\beta$  type sauvage (Nilsson et al., 2001, Matthews and Gustafsson, 2003, Herynk and Fuqua, 2004). Des variants de ER $\beta$  ne possédant pas l'exon 5 et/ou 6 ont été identifiés dans des cancers humains et dans diverse lignées cellulaires (Vladusic et al., 1998). La perte de l'exon 5 (ER $\beta$ 5) produit un récepteur tronqué qui ne possède plus une bonne partie du LBD. La co-expression de cet isoforme avec ER $\beta$  ou ER $\alpha$  type sauvage inhibe

l'activité E2-dépendante de gènes ERE-dépendant. Cet isoforme pourrait donc agir comme inhibiteur des ERs *in vivo*. Un autre isoforme de ER $\beta$ , ER $\beta$ 2/cx, est similaire à ER $\beta$  type sauvage sauf que l'exon 9 remplace l'exon 8 (Ogawa et al., 1998). ER $\beta$ 2/cx, tout comme ER $\beta$ 5, ne possède pas la région F et manque une portion du domaine AF-2. ER $\beta$ 2/cx ne lie pas E2 et n'active pas la transcription d'un gène rapporteur ERE. ER $\beta$ 2/cx s'associe préférentiellement en hétérodimère avec ER $\alpha$  que avec ER $\beta$ , ce qui entraîne une inhibition de la liaison de ER $\alpha$  à l'ADN. ER $\beta$ 2/cx exerce également un effet dominant négatif sur l'activité ligand-dépendante de ER $\beta$  sur un gène rapporteur (Ogawa et al., 1998). De plus, ER $\beta$ 2/cx inhibe l'activité transcriptionnelle médié par le complexe raloxifène-ER $\alpha$  sur le promoteur de *transforming growth factor beta 3 (TGF- $\beta$ 3)* (Peng et al., 2003) (Fig.5).



**Figure 5** Représentation de quelques variants de ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Tiré de Le Romancer et al., 2011)

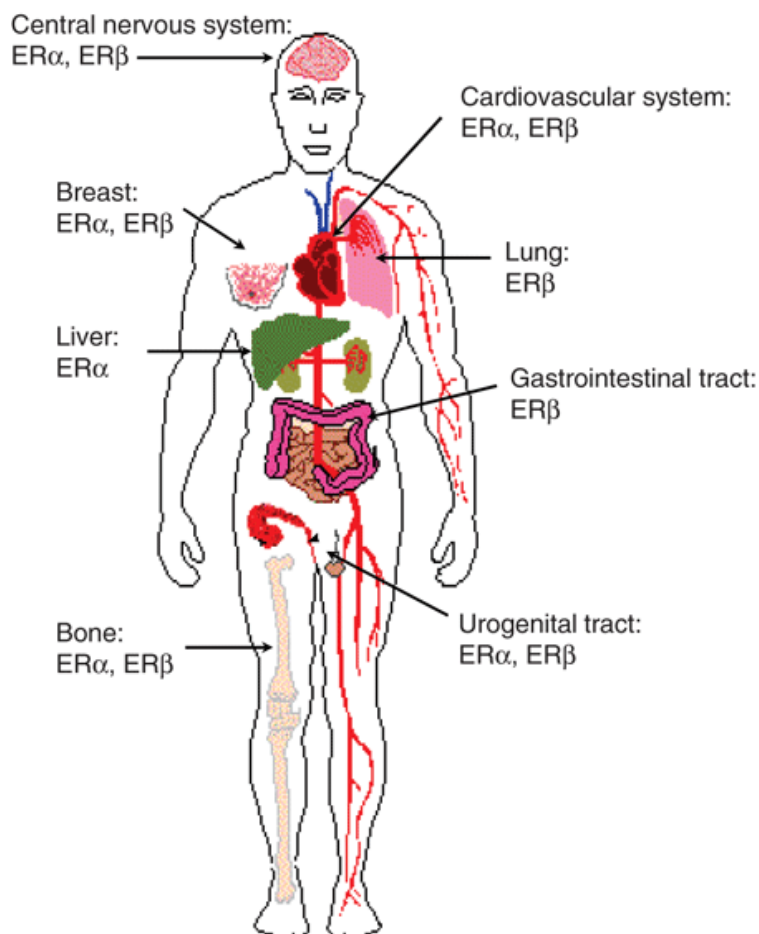
### 3.1.4 Rôles physiologiques de ER $\alpha$ et ER $\beta$

ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont exprimés dans les tissus reproducteurs mais également dans des sites périphériques. Certains tissus n'expriment qu'un isoforme ou l'autre alors que d'autres co-

expriment les deux. Des études d'invalidation des gènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont permis d'évaluer les rôles de chaque isoforme.

#### **3.1.4.1 Distribution tissulaire**

Bien que les deux isoformes présentent une certaine redondance fonctionnelle, une différence dans leur distribution et leur abondance tissulaire suggère qu'ils doivent exercer des fonctions distinctes. ER $\alpha$  est préférentiellement exprimé dans l'utérus, la prostate (stroma), les ovaires (thèque), les testicules (cellules de Leydig), les os, les seins, le foie, les reins, les tissus adipeux, le cœur, la vessie, le thymus et dans certaines régions du cerveau. Quant à ER $\beta$ , on le retrouve principalement dans les ovaires (granulosa), les poumons, l'épididyme, la prostate (épithélium), le colon, la moelle osseuse, les glandes salivaires, le cerveau, l'endothélium vasculaire, la vessie, la rate, l'hypothalamus et le thymus (Nilsson and Gustafsson, 2011) (Fig.6).



**Figure 6** Distribution de ERα et ERβ chez l'humain (Tiré de Nilsson and Gustafsson, 2011)

### 3.1.4.2 Études de souris 'knock-out'

Le développement de souris 'knock-out' (KO) a permis de comprendre les rôles relatifs et les fonctions biologiques de ERα et ERβ. Ces modèles ont permis d'étudier l'impact de l'inactivation du gène *ERα* seul ( $\alpha$ ERKO), de *ERβ* seul ( $\beta$ ERKO) ainsi que la délétion de *ERα* et *ERβ* (DERKO) (Couse and Korach, 1999, Curtis et al., 2000).

La délétion de ERα et/ou ERβ n'engendre pas de mort embryonnaire et les souris peuvent survivre à l'âge adulte (Deroo and Korach, 2006). Toutefois, plusieurs défauts développementaux surviennent. Les souris  $\alpha$ ERKO présentent des défauts dans les tissus où

l'expression de ER $\alpha$  prédomine tels que l'utérus et les glandes mammaires mais aussi au niveau des ovaires et présentent également un comportement sexuel anormal (Lubahn et al., 1993). Les femelles adultes  $\alpha$ ERKO présentent une hypoplasie utérine et ne répondent pas à l'estrogène tel qu'observé par exemple par l'absence de l'augmentation du poids utérin. Les femelles ne présentent pas un comportement sexuel normal, ce qui indique une perte de réponse à l'estrogène dans le système nerveux central. Dus à ces phénotypes, la femelle  $\alpha$ ERKO est infertile (Lubahn et al., 1993).

Les femelles  $\beta$ ERKO présentent des problèmes au niveau de la maturation des follicules ovariens (Krege et al., 1998). Ces femelles, quoique ayant un comportement sexuel normal (Ogawa et al., 1999), ont moins de portées et moins de petits par portée. ER $\beta$  serait essentiel à la parturition (Wu et al., 2000) et à l'implantation du fœtus (Tessier et al., 2000). Les femelles  $\beta$ ERKO sont donc moins fertiles (Pearce and Jordan, 2004, Imamov et al., 2005, Koehler et al., 2005). Les femelles  $\beta$ ERKO présentent une structure des glandes mammaires normale (Ogawa et al., 1999). Les jeunes femelles DERKO présentent une différenciation normale de l'utérus, du vagin et du col de l'utérus. Toutefois avec l'âge, elles développent une hypoplasie utérine, le même phénomène observé chez les femelles  $\alpha$ ERKO (Pearce and Jordan, 2004).

Les femelles adultes  $\alpha$ ERKO présentent une structure des glandes mammaires rudimentaire, indiquant que la différenciation des glandes requiert ER $\alpha$  (Bocchinfuso and Korach, 1997). ER $\beta$  est plus abondant que ER $\alpha$  dans le tissu mammaire normal et l'examination de l'épithélium canalaire chez les souris  $\beta$ ERKO suggère que ER $\beta$  est un facteur pro-différenciation (Förster et al., 2002). ER $\alpha$  est essentiel à la croissance des canaux mammaires puisque les souris  $\alpha$ ERKO présentent peu de canaux (Lubahn et al., 1993).

Les mâles  $\alpha$ ERKO présentent une diminution de la mobilité des spermatozoïdes, un faible compte de spermatozoïdes et un faible poids des testicules, ce qui fait en sorte qu'ils sont moins fertiles (Lubahn et al., 1993). Leur comportement sexuel n'est également pas normal non plus (Ogawa et al., 1997), ce qui contribue également à la diminution de leur

fertilité. Les mâles  $\beta$ ERKO sont fertiles et présentent un comportement sexuel normal (Ogawa et al., 1999). Toutefois il a été rapporté qu'ils peuvent développer une hyperplasie de la prostate avec l'âge (Weihua et al., 2001, Weihua et al., 2003). Les mâles DERKO sont infertiles (Couse and Korach, 1999).

Les souris  $\beta$ ERKO présentent des défauts au niveau du cerveau menant à une dégénération des neurones avec l'âge (Wang et al., 2001). Chez les souris  $\beta$ ERKO, les neurones des nouveau-nés générés dans la zone ventriculaire ne peuvent pas se positionner correctement dans les couches du cortex et plusieurs neurones meurent durant le processus (Wang et al., 2003). La survie neuronale est donc compromise chez les souris adultes  $\beta$ ERKO et cela engendre une importante neurodégénérescence (Wang et al., 2003). ER $\beta$  exercerait également des effets importants au niveau de la prostate et du côlon. Les souris ER $\beta$ KO développent des cancers du côlon et de la prostate (Harris, 2007).

Les femelles et les mâles  $\alpha$ ERKO présentent une diminution de la longueur et du diamètre fémoral en plus d'une réduction de la densité osseuse (Curtis et al., 2000). Les souris  $\beta$ ERKO présentent une longueur et une densité osseuse normale (Curtis et al., 2000).

Tel que prédit au départ, la perte de ER a plus d'impact chez la femelle. Il a été rapporté que la différenciation précoce du tract reproductif est indépendante de ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Plus tard dans la vie, les deux récepteurs sont nécessaires à la fonction ovarienne alors que ER $\alpha$  serait critique pour la physiologie utérine. ER $\alpha$  mais pas ER $\beta$  est requis pour le développement des glandes mammaires et la fonction osseuse. Pour ce qui est de la fonction cardiovasculaire, ER $\alpha$  et ER $\beta$  semblent jouer des rôles redondants dans la cardioprotection médiée par l'estrogène (Pearce and Jordan, 2004).

Des comparaisons entre les phénotypes observés chez les souris KO et l'humain peuvent être faites. Un homme présentant une substitution cytosine en thymine à la position 157 de ER $\alpha$ , engendrant l'apparition d'un codon stop prématuré, exprime une protéine ER $\alpha$  tronquée ne possédant pas de DBD ou de LBD. Cet homme souffre d'ostéoporose, ses

épiphyes ne sont pas fusionnées et il présente un taux élevé d'estrogène dans le sang. De plus, il présente une fonction cardiaque altérée puisque qu'il présente des signes d'athérosclérose (Sudhir et al., 1997) et une dilation des artères brachiales altérée (Sudhir et al., 1997).

## 4 Les modifications post-traductionnelles des ERs

Plusieurs types de modifications post-traductionnelles régulant les fonctions des ERs ont été rapportées.

### 4.1 Acétylation

L'acétylation est une modification importante dans la régulation de l'activité de facteurs de transcription. L'acétylation peut induire ou inhiber la transcription (Bannister and Miska, 2000).

ER $\alpha$  est acétylé par l'histone acétylase (HAT) cAMP responsive element binding protein (CREB)/p300. Les lysines (K) 266 et 268 sont ciblées par l'acétylation par p300. p300 peut acétyler directement des résidus de ER $\alpha$ , soit K266, 268, 299, 302 et 303 (Wang et al., 2001, Kim et al., 2006). L'effet de l'acétylation sur l'activité de ER $\alpha$  varie selon la lysine ciblée. L'acétylation de K299, K302 et K303 inhibe l'activité transcriptionnelle du récepteur (Wang et al., 2001) alors que l'acétylation de K266 et K268 favorise celle-ci (Kim et al., 2006). La substitution de K266 et K268 par un résidu glutamine augmente la liaison de ER $\alpha$  à l'ADN et l'activité E2-dépendente de ER $\alpha$  (Wang et al., 2001, Kim et al., 2006). L'acétylation de K299, K302 et K303 est constitutive alors que celle de K266 et K268 est induite en réponse à E2. K266 et K268 peuvent également être sumoylées (Reid et al., 2002, Sentis et al., 2005).

La protéine breast cancer 1 (BRCA1) pourrait inhiber l'activité de ER $\alpha$  en interférant avec l'acétylation de ER $\alpha$  médiée par p300 (Ma et al., 2010). Par ailleurs, l'exposition de



cellules cancéreuses mammaires ER positives à un inhibiteur d'histone déacetylase (HDAC) mène à la dégradation de ER $\alpha$  de manière protéasome dépendante (Margueron et al., 2004, Urbinati et al., 2010).

Pour ER $\beta$ , aucune acétylation a été décrite jusqu'à maintenant. Toutefois, des inhibiteurs des HDACs augmentent la stabilité protéique de ER $\beta$  (Duong et al., 2005).

## 4.2 Glycosylation

La glycosylation est une modification retrouvée au niveau des protéines nucléaires, cytoplasmiques et membranaires et dirige les protéines vers leur destination intracellulaire finale (Medzihradzky, 2005). ER $\beta$  possède plusieurs sites potentiels de N-glycosylation : Asn17, Asn55, Asn61 localisés dans la région A/B et Asn407 dans la région E (Nealen et al., 2001).

## 4.3 Méthylation

ER $\alpha$  est monométhylé sur la lysine 302, un processus médié par la lysine methyltransférase SET7. Cette modification agit sur la stabilité de ER $\alpha$  et facilite le recrutement de ER $\alpha$  à ses gènes cibles (Subramanian et al., 2008). Une étude a rapporté que ER $\alpha$  est méthylé sur l'arginine 260 localisée dans le DBD par la protéine arginine N-methyltransferase (PRMT1) (Le Romancer et al., 2008). Cette méthylation se passe exclusivement dans le cytoplasme de cellules épithéliales mammaires. Cette méthylation régule une fonction extranucléaire de ER $\alpha$  en favorisant l'interaction du récepteur avec la sous-unité p85 de PI3-K, Src et la protéine d'adhésion focale (FAK), permettant ainsi l'activation en aval de voies de signalisation (Le Romancer et al., 2010).

## 4.4 Myristoylation

L'attachement d'acides gras aux protéines influence leurs interactions avec les membranes et les microdomaines membranaires en plus de la transduction du signal. La modification la plus commune est la N-myristoylation qui cible les résidus glycines dans la région N-terminale des protéines (Resh, 1999, Resh, 2004). Trois sites potentiels ont été identifiés chez le variant ER $\alpha$ 36 (Acconcia et al., 2003, Acconcia and Marino, 2003, Acconcia et al., 2004, Acconcia et al., 2005). Cela suggère que ER $\alpha$ 36 localiserait à des sites de la membrane plasmique et pourrait initier une signalisation E2-dépendante à la membrane (Wang et al., 2005).

## 4.5 Nitrosylation

L'oxide nitrique (NO) exerce ses actions dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques par l'interaction spécifique avec des molécules cibles telles que des métalloprotéines. La nitrosylation des résidus cystéines formant les deux doigts de zinc du DBD de ER $\alpha$  induit la relâche du métal entraînant une perte de la capacité à lier l'ADN. La nitrosylation de ER $\alpha$  altère donc son action génomique. ER $\beta$  est également nitrosylé, modulant ainsi son activité (Marino et al., 2006).

## 4.6 Palmitoylation

La palmitoylation est l'attachement d'acides gras saturés à des résidus cystéines sur une protéine. L'ajout de palmitate facilite les interactions protéine-membrane, le trafic des protéines et module les interactions protéine-protéine, ainsi que l'activité enzymatique. La palmitoylation est une modification réversible qui agit comme mécanisme de régulation de l'activité d'une protéine (Smotrys and Linder, 2004).

ER $\alpha$  est palmitoylé sur la cystéine 447 localisée dans le LBD par la palmitoyl acetyltransférase (PAT) (Acconcia et al., 2004). La palmitoylation de Cys447 de ER $\alpha$  est catalysée par la palmitoyl acyl-transférase. La dé-palmitoylation est facilitée par la liaison de

plusieurs ligands tels que E2, des flavonoïdes et des modulateurs de l'activité des ERs (SERMs) (Acconcia et al., 2004, Acconcia et al., 2005, (Pietras et al., 2005) et régule la localisation de ER $\alpha$ , sa dimérisation, son association avec d'autres protéines telle que cavéoline-1 et sa signalisation (Acconcia et al., 2004, Acconcia et al., 2005, Levin, 2005, Pietras et al., 2005, Marino et al., 2006). Par exemple, suite à la liaison de E2, ER $\alpha$  est dépalmitoylé et se dissocie de caveoline-1, ce qui facilite l'association de ER $\alpha$  aux molécules signalitiques Src et PI3-K. Un mutant de ER $\alpha$  non-palmitoylable n'induit pas d'effets prolifératifs en réponse à E2 (Song et al., 2004, Acconcia et al., 2005). La cystéine 447 de ER $\alpha$  présente une forte homologie avec la région entourant la cystéine 339 de ER $\beta$  (Acconcia et al., 2003).

Une population de ER $\beta$  est également présente à la membrane plasmique où il est palmitoylé (Pedram et al., 2007). Contrairement à ER $\alpha$ , la dépalmoylation de ER $\beta$  en réponse à E2 augmente l'association du récepteur avec cavéoline-1. La palmitoylation de ER $\beta$  est nécessaire à l'activation de cascades pro-apoptotiques via la voie p38 (Galluzzo et al., 2007).

## 4.7 Phosphorylation

La phosphorylation est une modification commune chez les protéines et représente un mécanisme important dans la régulation de leur activité. ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont tous deux phosphorylés.

La phosphorylation de ER $\alpha$  est augmentée suite à sa liaison avec E2 mais peut être observée de manière ligand-indépendant. ER $\alpha$  est phosphorylé sur les résidus serines (Ser) 104, 106, 118, 137 et 167 tous localisés dans la région A/B, la serine 236 localisée dans le DBD et la tyrosine 537 localisée dans le LBD (Weigel and Zhang, 1998, Nilsson et al., 2001, Dutertre and Smith, 2003). En réponse à E2, la Ser118 de ER $\alpha$  est phosphorylée de manière prédominante. La Ser118 est importante pour la dimérisation de ER $\alpha$  et l'épissage de l'ARN médié par ER $\alpha$  (Sheeler et al., 2003, Masuhiro et al., 2005). La phosphorylation de ce site est également importante pour la liaison aux promoteurs et la régulation de gènes cibles (Cheng et

al., 2007). La phosphorylation de la Ser118 facilite l'interaction avec des co-activateurs tels que CREB binding protein (CBP)/p300 (Dutertre and Smith, 2003) et SRC-1 (Shah and Rowan, 2005) et régule l'activité ligand-dépendante et ligand-indépendante du récepteur (Ali et al., 1993, Bunone et al., 1996). Les estrogènes et les facteurs de croissance tels que le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance apparenté à l'insuline (IGF-1) induisent la phosphorylation de la Ser118 (Chen et al., 2002). Les facteurs de croissance régulent la phosphorylation de la Ser118 via la cascade Ras-Mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Kato et al., 1995). Plusieurs kinases seraient responsables pour la phosphorylation induite par l'estrogène : cycline dependent kinase 7 (Cdk7) (Chen et al., 2002), I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) (Park et al., 2005) et glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) (Medunjanin et al., 2005). Cet effet est médié par la liaison de ER $\alpha$  avec une composante du complexe spliceosome, le facteur SF3a, qui est dépendant de la phosphorylation de la Ser118 de ER $\alpha$  par MAPK (Masuhiro et al., 2005).

Il avait été rapporté au départ que la phosphorylation des Ser104/106 était induite exclusivement par l'estrogène et que les kinases GSK-3 et Cdk2 (Rogatsky et al., 1999) sont impliquées dans la phosphorylation de ces sites. Toutefois, il a été rapporté que les Ser104/106 peuvent être phosphorylées de manière ligand-indépendante par extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) (Thomas et al., 2008). Les Ser104/106 sont requises pour l'activité agoniste du tamoxifène, suggérant que ces sites pourraient contribuer à la résistance au tamoxifène dans le cancer du sein (Thomas et al., 2008). Les Ser104/106 sont requises pour l'activité agoniste du tamoxifène, suggérant que ces sites pourraient contribuer à la résistance au tamoxifène dans le cancer du sein (Thomas et al., 2008).

La Ser167 est également impliquée dans l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  (Joel et al., 1998). La combinaison de deux voies de signalisation contribue à la phosphorylation de ce site : MAPK/ribosomal S6 kinase (RSK) et mammalian target of rapamycin/S6 kinase 1 (mTOR/S6K1) (Yamnik and Holz, 2010). La phosphorylation de la Ser167 régule l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et la prolifération de cellules cancéreuses mammaires ER positives (Yamnik et al., 2009). La Ser236 de ER $\alpha$ , localisée dans le DBD, est phosphorylée *in vitro* par

la protéine kinase A (PKA). La phosphorylation de ce site inhibe la dimérisation de ER $\alpha$ . La mutation de ce site réduit l'activité de ER $\alpha$  en réponse à E2 et au tamoxifène (Chen et al., 1999). La phosphorylation de la Ser236 protégerait ER $\alpha$  contre la dégradation protéosomale (Tsai et al., 2004). La Ser305 est également phosphorylée par PKA *in vitro* (Michalides et al., 2004). Le mutant S305E, qui mimique la phosphorylation, augmente la dimérisation et la liaison de ER $\alpha$  aux promoteurs en présence d'estrogène (Tharakan et al., 2008). L'activation de ER $\alpha$  par la phosphorylation de la Ser305 est suffisante pour induire l'expression de gènes cibles comme *CCND1* (Balasenthil et al., 2004). Il a été démontré dans un modèle murin que p21-activated protein kinase 1 (PAK1) régule la phosphorylation de la Ser305. La phosphorylation de la Ser305 facilite l'interaction de ER $\alpha$  avec steroid receptor coactivator 1 (SRC-1) et l'activation de la transcription en réponse au tamoxifène (Zwart et al., 2007). La Ser305 serait aussi phosphorylée par Akt en réponse à IGF-1 (Barone et al., 2010).

De nouveaux sites de phosphorylation de ER $\alpha$  ont été identifiés: Ser46/47, 282, 294 et 559. La phosphorylation de ces sites a été détectée à l'aide d'anticorps phospho-spécifiques dans les cellules MCF-7, MCF-7-LCC2 et les cellules Ishikawa. La substitution des Ser282 et 559 de ER $\alpha$  en alanine augmente l'activité ligand-indépendante de ER $\alpha$  en essai luciférase dans des cellules HeLa, suggérant que la phosphorylation de ces sites régule négativement l'activité de ER $\alpha$ . La substitution des Ser46/47 et 294 en alanine réduit l'activité E2-dépendante en essai luciférase, suggérant que ces sites régulent positivement l'activité de ER $\alpha$ . La créatine kinase 2 (CK2) a été identifiée comme la kinase phosphorylant les Ser282 et 559. La Ser559 est le premier site de phosphorylation identifié dans le domaine F d'un récepteur stéroïdien (Williams et al., 2009).

ER $\alpha$  peut également être phosphorylé sur un résidu tyrosine (Tyr). La phosphorylation de Tyr537 régule la liaison à E2 dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 et l'interaction de ER $\alpha$  avec des kinases possédant des domaines Src Homology 2 (SH2) (Migliaccio et al., 1986, Pietras et al., 1995). Des expériences *in vitro* suggèrent que des tyrosines kinases Src seraient responsables de cette phosphorylation (Arnold et al., 1995). Une étude effectuée avec un peptide comprenant la Tyr537 phosphorylée a démontré que celui-ci inhibe la transition

G1/S en prévenant l'interaction entre ER $\alpha$  et Src suite à la stimulation de cellules MCF-7 avec E2 (Auricchio et al., 2008). Ce peptide inhibe également la croissance de cellules cancéreuses mammaires dans un modèle animal de xéno greffe (Varricchio et al., 2007, Auricchio et al., 2008). D'autres résidus tyrosines seraient également phosphorylés par Src (Likhite et al., 2006).

La phosphorylation de ER $\beta$  en réponse à E2 n'a pas été beaucoup examinée mais elle est augmentée suite à l'activation de la voie MAPK (Sanchez et al., 2010). La Ser80 chez le récepteur murin correspondant à la Ser60 chez l'humain a été identifiée comme site potentiel de phosphorylation et de O-GlcNAcylation. La Ser80 est localisée dans une région proline-glutamine-asparagine-thréonine (PEST), responsable de la dégradation protéique, suggérant que la modification de ce site pourrait être impliquée dans la stabilité de ER $\beta$  (Cheng and Hart, 2001). Le mutant S80E qui mimique la phosphorylation induit rapidement la dégradation de ER $\beta$  (Cheng and Hart, 2001). La phosphorylation de la Ser94 chez le récepteur murin correspondant à la Ser75 chez l'humain régule la mobilité et l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$  de manière protéasome-dépendant (Picard et al., 2008). De plus, la phosphorylation des Ser94 et 106, des sites consensus pour MAPK, recrute l'ubiquitine ligase ubiquitin ligase E6 associated protein (E6-AP) et régule les niveaux cellulaires de ER $\beta$  (Picard et al., 2008). Ces résultats démontrent que des résidus situés dans le domaine AF-1 de ER $\beta$  régulent le cycle activation-dégradation du récepteur de manière ligand-indépendante. Les Ser106 et 124 chez le récepteur murin, correspondant aux Ser87 et 124 chez l'humain, sont ciblées directement par ERK/MAPK en réponse à EGF et à l'oncogène Ras. Cette modification favorise le recrutement de SRC-1 et de CBP au domaine AF-1 de ER $\beta$  (Tremblay et al., 1999, Tremblay and Giguère, 2001). De plus, ces deux sites sont partiellement responsables de la répression hormonale de ER $\beta$  par la signalisation par les récepteurs à activité tyrosine kinase ErbB2/ErbB3 (St-Laurent et al., 2005). La Ser87 de ER $\beta$  humain serait également phosphorylée en réponse à p38 (Lam et al., 2012). La Ser255 chez le récepteur murin est phosphorylée directement par Akt suite à l'activation des récepteurs ErbB2/ErbB3 (Sanchez et al., 2007). Cette phosphorylation engendre une répression de l'activité transcriptionnelle hormonale de ER $\beta$  en réponse à l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 via le recrutement de

CBP et de l'ubiquitine ligase mouse double minute 2 homologue (Mdm2) engendrant la dégradation de ER $\beta$  (Sanchez et al., 2013). La Tyr507 chez le récepteur murin est également impliquée dans l'activation transcriptionnelle ligand-indépendante de ER $\beta$  (Tremblay et al., 1998). Récemment, deux nouveaux sites dans ER $\beta$  humain ont été identifiés comme étant ciblés par la phosphorylation par ERK 1/2 et p38, soient les Ser75 et 105 (Lam et al., 2012). La phosphorylation de la Ser105 a été détectée dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et BT-474. Un mutant phospho-mimétique pour le site 105 présente une plus forte activité transcriptionnelle que ER $\beta$  de type sauvage. La surexpression de ce mutant inhibe la migration et l'invasion cellulaire mais n'affecte pas la croissance cellulaire des lignées MDA-MB-231 et BT-474 (Lam et al., 2012).

## 4.8 Sumoylation

La sumoylation mène à l'attachement d'une molécule *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO) sur des résidus lysines spécifiques de protéines cibles (Hay, 2005). La sumoylation régule plusieurs processus cellulaires, incluant la transactivation hormone-dépendante de certains récepteurs nucléaires.

ER $\alpha$  et ER $\beta$ , contrairement à d'autres récepteurs stéroïdiens, ne possèdent pas de site accepteur consensus pour SUMO (Faus and Haendler, 2006). Malgré cela, ER $\alpha$  a été décrit comme étant sumoylé par SUMO-1 (Sentis et al., 2005). Cette sumoylation est dépendante de la présence de ligands comme E2 ou tamoxifène et cible cinq lysines (K) dans la région charnière : K266, K268, K299, K302 et K303. De plus, la sumoylation de ER $\alpha$  est stimulée par la présence de SUMO E3 ligases protein inhibitor of activated STAT 1 et 3 (PIAS1 et 3). La sumoylation de ER $\alpha$  engendre une augmentation de l'activité transcriptionnelle du récepteur (Sentis et al., 2005).

La lysine 4 de ER $\beta$  humain est sumoylée par SUMO-1 en présence d'estrogène (Picard et al., 2012). Cette sumoylation est maximisée par la phosphorylation d'une serine adjacente par la kinase GSK-3 $\beta$ . Ainsi, notre laboratoire a identifié un nouveau site de reconnaissance

pour SUMO soit phosphorylated sumoylation motif (pSuM). La sumoylation de ER $\beta$  diminue l'occupation de ER $\beta$  aux promoteurs de gènes cibles et l'activité transcriptionnelle E2-dépendante du récepteur dans des cellules cancéreuses mammaires (Picard et al., 2012).

## 4.9 Ubiquitination

L'ubiquitination est une modification qui implique l'attachement covalente de polypeptides ubiquitines aux protéines cibles. L'ubiquitine est un polypeptide de 76 acides aminés possédant un motif di-Glycine dans sa portion C-terminale et qui s'attache aux résidus lysines des protéines cibles. Cette modification cible les protéines pour la dégradation mais est également importante dans la régulation du trafic des protéines (Staub and Rotin, 2006).

Les lysines présentes dans le LBD de ER $\alpha$  sont ciblées par l'ubiquitination ce qui engendre la dégradation du récepteur en absence de ligand (Reid et al., 2003, Tateishi et al., 2004). La dégradation de ER $\alpha$  en réponse à E2 est inhibée par des inhibiteurs du protéasome MG132 et lactocystin, démontrant que le mécanisme d'atténuation de l'expression de ER $\alpha$  en présence du ligand est médiée par la voie du protéasome (Alarid et al., 1999, El Khissiin and Leclercq, 1999, Nawaz et al., 1999). L'ubiquitination de ER $\alpha$  affecte également sa compétence transcriptionnelle et sa mobilité (Stenoien et al., 2001). La dégradation de ER $\alpha$  permet de libérer les promoteurs et de nouvelles rondes de transcription (Reid et al., 2003). L'inhibition de l'activité ubiquitine-protéasome bloque ce cycle et l'activation de l'expression des gènes (Stenoien et al., 2001). Une étude a rapporté que les étapes initiales de la transcription de ER $\alpha$  sont liées à la monoubiquitination de ER $\alpha$  lié à E2 et ce processus augmenterait l'interaction du récepteur avec l'ADN ou des co-activateurs (Métivier et al., 2003).

K302 et 303 de ER $\alpha$  ont été identifiées comme régulant la stabilité du récepteur. Ces deux lysines protègent ER $\alpha$  contre la dégradation basale et sont nécessaires pour le cycle de renouvellement ('turnover') du récepteur en réponse à E2 ou au fulvestrant dans des cellules



cancéreuses mammaires (Berry et al., 2008). Des essais d'ubiquitination *in vitro* ont démontré qu'en présence de E2, K302 et K303 sont monoubiquitinées (Eakin et al., 2007, Ma et al., 2010).

Notre laboratoire a démontré que ER $\beta$  est ubiquitiné suite à la phosphorylation de ses résidus Ser94 et 106 par la voie ERK/MAPK et dégradé via la voie protéosomale (Picard et al., 2008). La phosphorylation des Ser94 et 106 restreint ou maintient une réponse adéquate du récepteur en réponse à MAPK via l'ubiquitination et la dégradation du récepteur. Nous avons également démontré que la phosphorylation de la Ser255 de ER $\beta$  murin en réponse à Akt et en présence de CBP engendre une augmentation de l'ubiquitination et de la dégradation du récepteur. Cela a pour effet d'inhiber la réponse transcriptionnelle E2-dépendante de ER $\beta$  (Sanchez et al., 2013).

## 5 Action génomique des ERs

Le groupe de O'Malley a démontré que ER agit comme facteur de transcription (revue dans O'Malley, 2005). Les effets biologiques des ERs sont régulés par des modifications du patron d'expression de gènes cibles spécifiques. La régulation transcriptionnelle des ER se fait par le recrutement de ER à une région promotrice d'un gène cible, soit par l'interaction directe avec une séquence d'ADN (ERE) ou par l'interaction protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription (Fig.7).

### 5.1 Interaction ER-ADN directe (activation classique)

L'activité de ER est initiée par la liaison du récepteur lié à un ligand à un élément de réponse à l'estrogène (ERE) situé dans des régions régulatrices des gènes cibles (Beato, 1989). L'élément ERE consensus a été initialement basé sur la séquence 'estrogen-responsive' dans le promoteur du gène de la *vitellogénine A2* (Klein-Hitpaß et al., 1986, Ponglikitmongkol et

al., 1990). Lorsque ER s'associe à un promoteur, la liaison à un ERE semble être le mode dominant d'interaction avec l'ADN.

Il existe plusieurs exemples où ER s'associe à des demi-sites ERE également (Kato et al., 1992, Porter et al., 1996, Klinge et al., 1997, Porter et al., 1997). Seulement une fraction des éléments de liaison par ER chez les mammifères correspond aux ERE consensus. Plusieurs variations de cette séquence existent. Une étude portant sur 38 gènes régulés par l'estrogène a démontré que la majorité des EREs localisés dans le promoteur ou en 3'UTR ne correspondent pas à la séquence consensus traditionnelle (Klinge, 2001). L'introduction de variations nucléotidiques à l'intérieur des demi-sites de ERE a révélé que ER $\alpha$  est en mesure de lier ces variants (Deegan et al., 2011). L'équipe de Bourdeau a criblé le génome humain et de la souris et a identifié 17 000 ERE, dont plus de 17 000 situés dans une région de 15 kb des sites d'initiation de la transcription des ARNm (Bourdeau et al., 2004). L'élimination de EREs qui ne sont pas conservés entre l'humain et la souris a réduit le nombre à environ 660 EREs. Un nombre de ces sites ont été validés comme étant des sites d'interaction pour ER (Carroll and Brown, 2006).

Il a été démontré que la séquence de l'élément de réponse affecte l'affinité du récepteur au site d'ADN en question. ER $\alpha$  lie avec une meilleure affinité la séquence ERE consensus du gène de la *vitellogénine A2* que les EREs imparfaits trouvés dans les gènes *vitellogénine B1*, *pS2/TFF1* et *oxytocine* (Loven et al., 2001). La séquence de l'élément de réponse peut donc influencer l'expression de gènes régulés par ER (Wood et al., 2001, Yi et al., 2002). De plus, la séquence des éléments de réponse peut également exercer des effets sur la conformation de ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Ikeda et al., 1996, Loven et al., 2001, Hall et al., 2002). Des EREs consensus ou imparfait peuvent influencer l'habilité des ERs à lier des co-activateurs. Par exemple, le co-activateur SRC-2 interagit mieux avec ER $\alpha$  lié aux EREs du gène *vitellogénine A2* que *vitellogénine B1* (Wood et al., 2001).

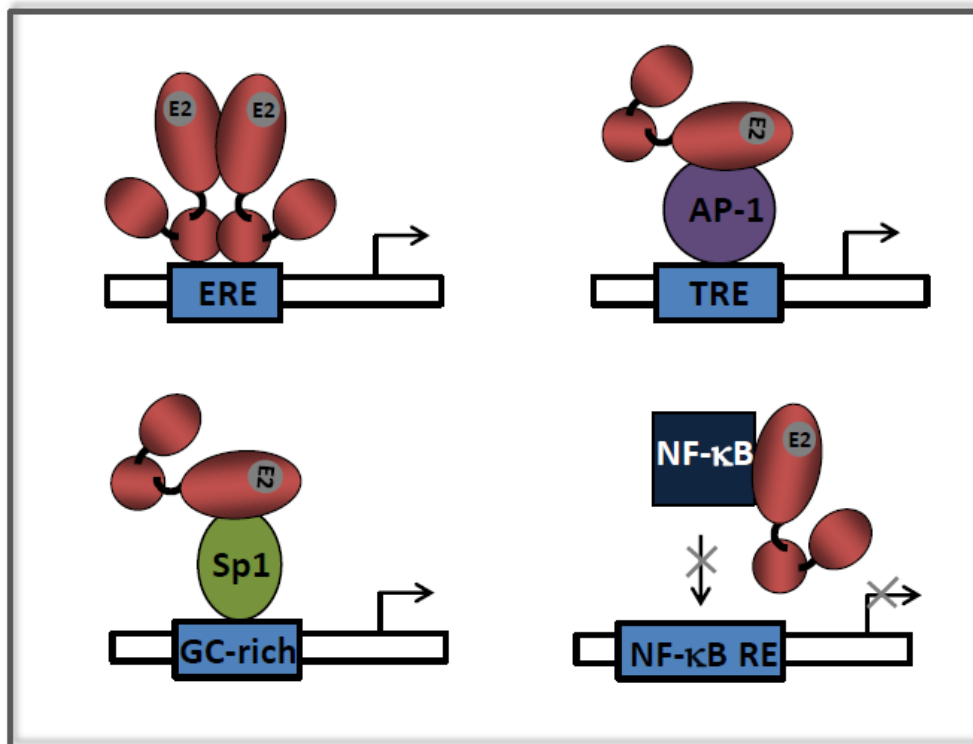
## **5.2 Association ER-ADN indirecte (activation non-classique)**

Il existe une autre catégorie d'élément de réponse au niveau de l'ADN régulée par l'estrogène mais qui n'a pas de similarité avec des ERE et ne fait pas intervenir la liaison directe avec ERs. Les promoteurs qui ne possèdent pas de séquence 'ERE-like' requiert la liaison à l'ADN d'un second facteur de transcription pour médié l'association de ER à l'ADN (O'Lone et al., 2004). Par exemple, ER $\alpha$  s'associe à la sous-unité c-rel du complexe nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B). Cette interaction prévient la liaison de NF- $\kappa$ B au promoteur de l'interleukine-6, bloquant ainsi la stimulation de l'expression de l'interleukine 6 (IL-6) (Galien and Garcia, 1997). De cette manière, E2 inhibe l'expression de IL-6 (Ray et al., 1994). La régulation de gènes par l'interaction indirecte de ERs fait intervenir principalement specificity protein-1 (Sp1) (O'Lone et al., 2004). Sp1 s'associe à des régions 'estrogen-reponsive' et ER augmente la liaison de Sp1 à l'ADN et contribue au recrutement de co-activateurs (Batistuzzo de Medeiros et al., 1997, Porter et al., 1997, Qin et al., 1999, O'Lone et al., 2004). La transcription du récepteur à lipoprotéine de basse densité (LDL-R) (Li et al., 2001), de endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Duan et al., 1998, Chambliss and Shaul, 2002), de c-fos (Duan et al., 1998), de cycline D1 (*CCND1*) (Castro-Rivera et al., 2001) et du récepteur de l'acide rétinoïque  $\alpha$ 1 (RAR $\alpha$ 1) (Sun et al., 1998, Zhang et al., 1999) induite en réponse à E2 fait intervenir la formation d'un complexe ER-Sp1 sur des sites Sp1 riches en GC dans le promoteur du gène (Porter et al., 1997). Contrairement à ER $\alpha$ , l'interaction ER $\beta$ -E2 ne génère pas de complexes actifs sur des éléments Sp1. D'autres facteurs intermédiaires contribuent à l'association de ER de manière indirecte tels que activating transcription factor (ATF-1)/c-jun ou activating transcription factor (ATF-2)/CREB pour le gène codant pour *CCND1*, ATF-1/CREB pour le gène codant pour *Bcl-2* et le facteur de transcription facteur Y pour le gène murin codant pour *E2F transcription factor 1* (E2F1) (O'Lone et al., 2004).

ER $\alpha$  et ER $\beta$  peuvent interagir avec les facteurs de transcription fos/jun sur des sites activating protein 1 (AP-1) pour stimuler l'expression des gènes. En présence de ER $\alpha$ , E2 agit comme agoniste dans la voie AP-1 alors que le raloxifène et le tamoxifène agissent comme agonistes partiels. En présence de ER $\beta$ , le raloxifène et le tamoxifène se comportent comme des agonistes pour la voie AP-1 alors que E2 seul n'agit pas sur ER $\beta$  dans un contexte AP-1 mais antagonise l'activité du raloxifène et du tamoxifène (Paech et al., 1997). ER $\alpha$  et ER $\beta$

exercent des effets opposés sur la régulation du promoteur de CCND1 (Liu et al., 2002). CCND1 est important pour la progression des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire et est une cible de ER $\alpha$  dans les cellules cancéreuses mammaires en réponse à E2 (Altucci et al., 1996, Staal et al., 1996, Prall et al., 1997) malgré l'absence de ERE parfait ou de séquences 'ERE-like' dans le promoteur de CCND1 (Herber et al., 1994). La délétion des éléments AP-1 et Sp1 dans le promoteur de CCND1 atténue la transcription du gène en réponse à E2 (Marino et al., 2002). Contrairement à ER $\alpha$ , ER $\beta$  réprime l'expression de CCND1 en présence d'estrogène (Acconcia et al., 2005) et bloque l'induction par ER $\alpha$ -E2 lorsque les deux récepteurs sont présents (Matthews and Gustafsson, 2003).

La mutation du DBD de ER $\alpha$  dans le but d'étudier la régulation de la liaison indirecte de ER $\alpha$  dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 a mené à l'identification d'un enrichissement de motifs Runt-related transcription factor 1 (Runx1) aux régions liées par ER $\alpha$ . ER $\alpha$  interagit avec Runx1 et cette interaction est augmentée par E2. Ces résultats identifient Runx1 comme un médiateur de la régulation transcriptionnelle indirecte de ER $\alpha$  (Stender et al., 2010).



**Figure 7** Mode d'action génomique des ERs (Adapté de Ascenzi et al, 2006)

## 6 Co-facteurs transcriptionnels des ERs

Que ce soit dans le mode d'action direct ou indirecte, ER doit interagir avec des protéines co-régulatrices (co-activateurs ou co-répresseurs) pour former un complexe qui sert de plateforme pour l'assemblage de protéines additionnelles (McKenna and O'Malley, 2002). La majorité des facteurs interagissant avec les récepteurs nucléaires ont été identifiés en utilisant le LBD comme appât. C'est pourquoi le domaine AF-2 est considéré comme le domaine le plus important dans le recrutement de co-activateurs.

Suite à la liaison d'agonistes ou d'antagonistes, ER subit des réarrangements structuraux. Ces réarrangements sont critiques pour la régulation de la transcription ligand-dépendante puisqu'ils exposent une surface du récepteur qui recrute des co-activateurs ou

d'autres protéines co-régulatrices (Brzozowski et al., 1997, Zhou et al., 1998, Jordan, 2003, Jordan, 2003). L'hélice 12 joue un rôle critique dans la régulation des interactions entre les co-activateurs et le LBD (Danielian et al., 1992, Henttu et al., 1997, Shiao et al., 1998).

## 6.1 Co-activateurs

Les membres de la famille steroid receptor coactivator (SRC) (SRC-1 à 3) ont été les premiers co-activateurs identifiés et caractérisés (McKenna et al., 1999). Les SRC possèdent un domaine d'interaction avec ER qui comprend trois motifs Leu-Xxx-Xxx-Leu-Leu aussi appelés nuclear box (NR-box) (NR-box 1 à 3) (Xu et al., 1999). Ces motifs représentent les sites d'attache au domaine AF-2 (Leers et al., 1998). Pour SRC-1 et SRC-2, c'est le NR-box 2 qui présente le plus d'affinité pour l'AF-2 de ER $\alpha$  alors que pour SRC-3, c'est le NR-box 1 qui s'associe (Chen and Evans, 1995, Suen et al., 1998). Tous les co-activateurs SRC possèdent deux domaines d'activation de la transcription, AD-1 et AD-2. AD-1 est impliqué dans le recrutement des co-activateurs et acétyltransférases CBP/p300 et AD-2 dans le recrutement de coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) (Chen et al., 1999). La méthylation de CBP par CARM1 le libère de son association avec CREB. La région C-terminale de SRC-1 et SRC3 possède une activité lysine acétyltransférase intrinsèque. La fonction primaire des co-activateurs SRC-1 serait de recruter des protéines permettant le remodelage de la chromatine au site du récepteur nucléaire activé. L'acétylation de résidus lysines adjacents au centre de NR-box1 de SRC-3 abolit l'interaction avec l'AF-2 de ER $\alpha$  ce qui représenterait un mécanisme d'atténuation de l'activité de ER $\alpha$  (Chen et al., 1999).

Les co-activateurs CPB/p300 sont des co-activateurs qui possèdent une activité acétyltransférase et des sites d'attache pour ERs via les NR-boxes. Les co-activateurs SRC seraient requis pour le recrutement de CBP/p300 aux récepteurs (Zhou et al., 1998).

Un large complexe de co-activateurs, thyroid hormone receptor-associated protein 220/: thyroid hormone receptor-associated protein 205 (TRAP220/DRIP205), ferait le lien direct entre ER et la machinerie transcriptionnelle de base. L'acétylation du motif NR-box de

SRC serait un mécanisme permettant la dissociation des co-activateurs SRC de ER, permettant ainsi la liaison de d'autres complexes tels que TRAP/DRIP (Chen et al., 1999, Ito et al., 1999, Smith and O'Malley, 2004).

L'ARNm mature fonctionnel steroid receptor RNA activator (SRA), qui agit comme co-régulateur pour les récepteurs nucléaires, agit comme protéine d'échafaudage et s'associe à des complexes de co-activateurs (Colley et al., 2008). Il a la capacité de co-activer plusieurs récepteurs nucléaires incluant ER $\alpha$  et ER $\beta$ , AR, GR, RAR, peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR $\delta$ ), le récepteur thyroïdien (TR) et le récepteur de la vitamine D (VDR) (Colley et al., 2008). La fonction co-activatrice de SRA ne requiert pas l'expression de la protéine SRA. D'autres facteurs, comme Med-20 et Brg1/Brm, composantes importantes du complexe de remodelage SWItch/Sucrose NonFermentable (SWI/SNF), servent de pont entre les récepteurs nucléaires activés et les complexes de co-activateurs (Acevedo and Kraus, 2004).

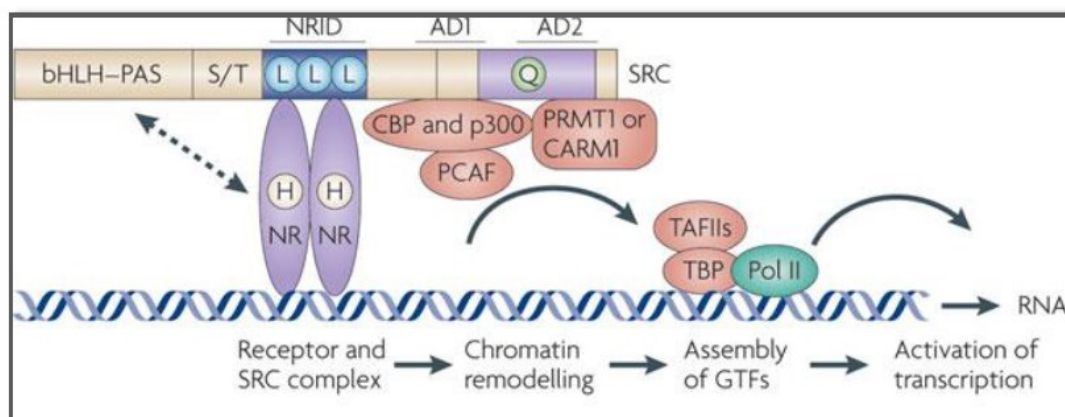
En plus du LDB, les co-activateurs peuvent s'associer à d'autres domaines structuraux des récepteurs stéroïdiens. Par exemple, les co-activateurs de la famille SRC et CBP/p300 lient la région A/B de ER $\alpha$  et ER $\beta$  de manière ligand-indépendante (Lavinsky et al., 1998, Webb et al., 1998, Tremblay et al., 1999, Tremblay and Giguère, 2001). De plus, notre laboratoire a démontré que l'AF-1 de ER $\beta$  recrute l'ubiquitine ligase E6-AP, qui régule l'activité de ligand-indépendante de ER $\beta$  (Picard et al., 2008)

Il y aurait une régulation temporelle dans l'association de co-régulateurs aux promoteurs de gènes cibles (Métivier et al., 2003, Metivier et al., 2006). Des essais transcriptionnels *in vitro* ont indiqué que SRC-1 doit être recruté avant p300 pour permettre l'expression des gènes de manière efficace (Liu et al., 2001). De plus, il a été rapporté que SRC-1 et le complexe TRAP220/DRIP205 s'associent et se dissocient du promoteur pS2 de manière cyclique en réponse à E2. Lorsque SRC-1 est présent, TRAP220/DRIP205 est absent et vice versa (Burakov et al., 2002).

Une fois aux promoteurs, les co-activateurs recrutent des protéines possédant des activités enzymatiques cruciales pour l'expression des gènes comme le complexe de remodelage de la chromatine Brg-1/Baf57, homologue humain du complexe SWI/SNF identifié chez la levure, des acétyltransférases comme CBP/p300, SRCs, des méthyltransférases comme CARM-1 et des ubiquitine ligases comme E6-AP et Rsp-5 (Imhof and McDonnell, 1996, Chen et al., 1999, Nawaz et al., 1999, Chen et al., 2000). Une fois les récepteurs nucléaires activés par leur ligand associé à l'ADN, l'interaction avec le complexe Brg-1/Baf57 et des acétyltransférases engendrent une altération locale au niveau de la structure nucléosomale. Le complexe TRAP/DRIP recruté aux promoteurs de gènes cible s'associe directement avec des composantes de la machinerie transcriptionnelle de base pour initier la transcription (Fig.8). Des molécules co-activatrices additionnelles régulent des processus durant la transcription comme l'épissage de l'ARN (Monsalve et al., 2000, Auboeuf et al., 2002) et le cycle de renouvellement ('turnover') du complexe récepteur-co-activateurs (Lonard et al., 2000).

Plusieurs mécanismes existent pour atténuer la transcription des gènes régulés par ERs. Il a été rapporté que les protéines chaperones telles que p23 et Hsp90 promouvoient la dissociation de récepteurs nucléaires et de l'ARN polymérase II de l'ADN (Acevedo and Kraus, 2004). La terminaison de la transcription ferait également intervenir des modifications post-traductionnelles de ERs et des co-activateurs, qui peuvent réguler les interactions protéines-protéines. Par exemple, il a été démontré que l'acétylation de SRC-3 par p300 perturbe les complexes récepteur-co-activateurs, ce qui engendre une diminution dans l'activation des gènes. ER $\alpha$  est également un substrat pour p300. L'acétylation de ER $\alpha$  modifie son association avec d'autres co-activateurs et donc son activité (Acevedo and Kraus, 2004, Smith and O'Malley, 2004). De plus, le cycle de renouvellement ('turnover') impliquant la voie ubiquitine-protéasome représente un mécanisme pour l'atténuation de la transcription ER-dépendente (Reid et al., 2003, Picard et al., 2008).





**Figure 8** Co-facteurs impliqués dans l'initiation de la transcription par des récepteurs nucléaires (Tiré de Xu et al, 2009)

## 6.2 Co-répresseurs

Les co-répresseurs sont des protéines exerçant des rôles importants dans la régulation négative de l'expression de gènes. Les protéines receptor-interacting protein 140 (RIP-140) et small heterodimer partner (SHP), qui s'associent au domaine AF-1, possèdent des fonctions co-régulatrices négatives puisqu'elles antagonisent le co-activateur SRC-1 *in vivo* et compétitionnent avec la liaison de l'AF-2 *in vitro* (Cavaillès et al., 1995, Treuter et al., 1998, Treuter et al., 1999, Johansson et al., 2000). SHP est un récepteur nucléaire orphelin qui possède un LBD mais pas de DBD (Seol et al., 1996, Johansson et al., 1999). SHP et la protéine apparentée dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 (DAX-1) interagissent avec plusieurs récepteurs nucléaires et inhibent leur activité transcriptionnelle (Seol et al., 1996, Seol et al., 1997, Crawford et al., 1998). SHP interagit directement avec le domaine AF-2 de ER via deux motifs NR-box et fonctionne donc par le même mécanisme des co-facteurs AF-2 (Johansson et al., 1999, Johansson et al., 2000).

Les co-répresseurs s'associeraient avec ERs seulement en présence de leurs antagonistes (Smith and O'Malley, 2004). Il a été démontré que le tamoxifène et le raloxifène recrutent nuclear receptor co-repressor 1 (NCoR) et silencing mediator of retinoic acid and

thyroid hormone receptor (SMRT) au niveau de certains promoteurs de gènes cibles (Shang et al., 2000, Shang and Brown, 2002). Un peptide de la NCoR box s'associerait à ER en présence de tamoxifène (Huang et al., 2002). Les co-répresseurs NCoR et SMRT peuvent réprimer de manière sélective l'activité agoniste du tamoxifène sur ER $\alpha$  (Jackson et al., 1997, Smith et al., 1997). Les co-répresseurs NCoR et SMRT recruteraient des complexes de co-répresseurs incluant le complexe Sin3/HDAC. Ce complexe possède une activité histone déacétylase et renverse l'action des complexes possédants des histones acétyltransférases (Glass and Rosenfeld, 2000).

Il a été rapporté que les co-régulateurs DEAD box ARN helicase DP97 et ligand-dependent nuclear receptor corepressor (LCoR) inhiberaient l'activité ligand-dépendante des récepteurs stéroïdiens et nucléaires (Fernandes et al., 2003, Rajendran et al., 2003). Le co-répresseur SAP30 est important pour la répression antagoniste-dépendante de ER $\alpha$  par NCoR. La protéine Sharp, quant à elle, réprimerait l'activité E2 dépendante de ER $\alpha$  via ses effets sur le co-activateur SRA (Heinzel et al., 1997, Nagy et al., 1997, Laherty et al., 1998, Shi et al., 2001). Le co-facteur repressor of ER activity (REA) présente une fonction co-répressive autant en présence d'estrogène que d'anti-estrogène. Le co-facteur RPF1 réprime spécifiquement l'activité agoniste du tamoxifène sur ER $\alpha$  (Norris et al., 1999). La protéine metastasis associated 1 (MTA1) est une composante du complexe HDAC et du remodelage des nucléosomes. Elle agit comme co-répresseur en inhibant la transcription ERE dépendante en réponse à E2 en recrutant des HDACs au site de liaison (Mazumdar et al., 2001).

### **6.3 ER $\alpha$ et ER $\beta$ : Préférence et sélectivité pour le recrutement de co-régulateurs**

La différence dans l'activité de ER $\alpha$  et ER $\beta$  en réponse à E2 et aux SERMs pourrait être explicable par une interaction différentielle pour des protéines co-régulatrices. ER $\beta$  interagirait davantage avec TRAP220 que ER $\alpha$  en présence d'estrogène (Wärnmark et al., 2001). À l'opposé, le co-activateur PGC-1 $\alpha$ -related co-activator (PERC) co-active ER $\alpha$  mais pas ER $\beta$  (Kressler et al., 2002). Il y a aussi des co-activateurs spécifiques pour le domaine AF-

1 tels que p68/p72 et MMS19 qui augmentent l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  mais pas celle de ER $\beta$  (Endoh et al., 1999, Watanabe et al., 2001, Wu et al., 2001). Un co-activateur sélectif pour ER $\beta$  dans l'ovaire a été identifié, nommé GIOT-4. Son expression est induite par la FSH et il est impliqué dans le recrutement ligand indépendant du complexe SWI/SNF aux promoteurs de gènes cibles de ER $\beta$  dans des cellules ovariennes (Kouzu-Fujita et al., 2009). Une différence d'affinité est également observable entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  pour les co-activateurs de la famille SRC. En présence d'estrogène, ER $\alpha$  interagit avec la région NR-box des membres SRC avec plus d'affinité que ER $\beta$  (Liu et al., 2001).

## 7 Action non-génomique et rapide des ERs

Un groupe a observé qu'une exposition de rates ovariectomisées à E2 augmente le niveau d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) à l'intérieur d'une fenêtre de 15 secondes, un effet trop rapide pour impliquer une action génomique (Szego and Davis, 1967). Seulement quelques secondes d'exposition à E2 sont requises pour induire une augmentation de calcium intracellulaire dans des cellules granulosa (Morley et al., 1992) et pour augmenter la production d'inositol triphosphate (IP3) dans le foie et la lignée cellulaire hépatique HepG2 (Marino et al., 1998, Marino et al., 2001). Ces observations ont mis en lumière un mode d'action rapide de l'estrogène médié par une signalisation membranaire.

L'activation rapide de la voie AMPC/PKA a été démontrée dans divers tissus. À l'intérieur d'une fenêtre de 5 minutes, E2 active eNOS et promouvoit la relâche d'oxide nitique (NO) dans les cellules endothéliales. E2 stimule rapidement la phospholipase C (PLC) et la production d'IP3, l'influx calcique et l'activation de la protéine kinase C alpha (PKC $\alpha$ ) dans plusieurs cellules isolées. E2 stimule également la voie MAPK, en diminuant l'activité de la MAPK phosphatase-1, menant à une augmentation de l'activité de ERK (Razandi et al., 2004). Toutefois, E2 coopère également avec la protéine suppresseur de tumeur BRCA1 dans la modulation de la production de la MAPK phosphatase-1 (Miki et al., 1994). E2 promouvoit aussi l'activation de MAPK/p38 ainsi que la voie PI3-K/Akt.

ER $\alpha$  localisé à la membrane s'associe avec modulator of non-genomic activity of ER (MNAR), Src homology 2 domain-containing (Shc), les récepteurs à l'EGF (EGFR) et IGF-1 (IGF-1R) et la striatine. Shc et la striatine interagissent avec le domaine A/B de ER $\alpha$  (Lu et al., 2004) alors que MNAR sert d'adaptateur pour permettre le couplage entre ER et la kinase Src (Greger et al., 2006). Des éléments du domaine D seraient requis pour l'activation de ERK, phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) et eNOS dans des cellules COS transfectées (Chambliss et al., 2005). ER $\alpha$ , suite à son activation par E2, interagit avec le récepteur à l'IGF-1 ce qui engendre l'activation de IGF-1R et accentue l'activation de la voie MAPK (Kahlert et al., 2000). ER $\alpha$  interagit également directement avec ErbB2 (Chung et al., 2002, Shou et al., 2004). ER $\alpha$  en réponse à E2 active également le récepteur à l'EGF par un mécanisme impliquant l'activation de protéines G, de la kinase Src et de métalloprotéinases matricielles, engendrant une augmentation de l'activité de MAPK et de Akt (Razandi et al., 2003).

La transfection de ER $\beta$  dans des cellules CHO induit la production de IP3 et la phosphorylation de ERK/MAPK et *c-Jun* N-terminal kinase (*c-Jnk*) (Razandi et al., 1999). Toutefois, la stimulation de ER $\beta$  par E2 dans des cellules musculaires lisses de porc réduit l'activité de ERK/MAPK (Geraldès et al., 2003). Il a été rapporté que ER $\beta$ -E2 active p38/MAPK dans des cellules cancéreuses du colon (Acconcia et al., 2005). ER $\beta$  interagirait avec p38/MAPK. Il a été rapporté que ER $\beta$  co-localise avec MNAR dans le carcinome des canaux salivaires (Vadlamudi et al., 2005) mais l'impact sur la signalisation de ER $\beta$  n'est pas connu. En plus de l'estrogène, d'autres ligands de ER peuvent induire une cascade de signalisation rapide. Une étude a démontré que le tamoxifène et le raloxifène stimulent ERK de manière rapide et transitoire (Singleton et al., 2003).

Les flavonoïdes quercétin et naringénin perturbent l'activation rapide des kinases MAPK/ERK et PI3-K/Akt dans des cellules Hela transfectées avec ER $\alpha$  (Virgili et al., 2004). Dans le même système cellulaire, naringénin induit rapidement la phosphorylation de p38/MAPK et la cascade pro-apoptotique. Naringénin altère donc la prolifération cellulaire

médiée par ER $\alpha$  et favorise une réponse apoptotique. Naringenin prévient la palmitoylation de ER $\alpha$  et réduit l'association du récepteur avec cavéoline-1, perturbant ainsi la signalisation rapide de ER $\alpha$  (Marino et al., 2006). Certains flavonoïdes mimiquent l'estrogène en présence de ER $\beta$  et induisent une activation rapide de p38/MAPK (Totta et al., 2004, Totta et al., 2005). Ces composés agiraient comme antagonistes sur la réponse rapide de ER $\alpha$  et comme agoniste pour la signalisation pro-apoptotique médiée par la signalisation de ER $\beta$ .

## 8 Signalisation par le récepteur couplé aux protéines G GPR30

La signalisation de l'estrogène de manière protéines G-dépendante et la localisation de sites de liaison à E2 à la membrane ont mené à spéculer sur l'existence d'un ER transmembranaire, possiblement appartenant à la famille des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G.

GPR30 a été cloné la fin des années 90 (Owman et al., 1996, Carmeci et al., 1997, Takada et al., 1997, O'Dowd et al., 1998) et présente peu d'homologie avec d'autres RCPGs. L'ARNm de GPR30 a été détecté dans divers tissus tels que le placenta, les poumons, le foie, la prostate et les ovaires mais toutefois des contradictions dans le profil d'expression ont été rapportées (Owman et al., 1996, Carmeci et al., 1997, Takada et al., 1997, O'Dowd et al., 1998). Puisque qu'aucun ligand n'était connu pour ce récepteur, il a été classé comme récepteur orphelin. Les études ne s'accordent pas sur la localisation cellulaire de GPR30. Alors que les résultats d'un groupe rapportent que GPR30 est exprimé au niveau du réticulum endoplasmique et n'est pas détecté à la membrane plasmique (Revankar et al., 2005), d'autres ont montrés l'expression de GPR30 à la surface cellulaire (Thomas et al., 2005, Funakoshi et al., 2006). Un groupe a testé la liaison de l'estrogène au récepteur GRP30 en synthétisant un dérivé fluorescent de l'estradiol (Prossnitz et al., 2007). L'estrogène fluorescent colocalise avec ER dans le noyau et GPR30 dans le réticulum endoplasmique. La liaison serait spécifique puisque E2 compétitionne avec celle-ci. Un autre groupe a également rapporté la liaison de l'estradiol tritiée à des préparations de membranes plasmiques (Thomas et al., 2005). GPR30 présente une faible affinité pour d'autres stéroïdes tels que l'estrone et l'estriol et aucune

liaison n'est observée avec la progestérone, la testostérone ou le cortisol (Thomas et al., 2005). Les anti-estrogènes tamoxifène et fulvestrant lient également GPR30 (Thomas et al., 2005).

Une possible fonction pour ce récepteur a été établie en 2000 par des expériences démontrant l'activation de ERK1/2 en réponse à E2 mais aussi aux anti-estrogènes fulvestrant et tamoxifène. Ces réponses ont été observées dans des cellules cancéreuses mammaires exprimant GPR30 seulement (Filardo et al., 2000). La signalisation E2-dépendante est dépendante de l'activation de la protéine Gi et implique la transactivation du récepteur à activité tyrosine kinase EGFR via la relâche du ligand EGF. Une autre étude a rapporté une seconde phase de signalisation GPR30-dépendante qui engendre l'activation de l'adénylate cyclase (Filardo et al., 2002).

Il a également été rapporté que GPR30 promouvoit l'inhibition E2-dépendante de l'apoptose induite par le stress oxydatif (Kanda and Watanabe, 2003, Kanda and Watanabe, 2003) et stimule la croissance cellulaire des kératinocytes (Kanda and Watanabe, 2004). GPR30 augmente la production de nerve growth factor (NGF) dans les macrophages (Kanda and Watanabe, 2003, Kanda and Watanabe, 2003). Il a également été démontré que GPR30 participe à la prolifération de cellules cancéreuses de l'endomètre en réponse à E2 et au tamoxifène (Vivacqua et al., 2006) et à celle des cellules cancéreuses de la thyroïde (Vivacqua et al., 2006).

## **9 Régulation de l'expression des gènes par les ERs**

### **9.1 Régulation des gènes en réponse à l'hormone**

Les gènes 'E2-responsive' sont désignés comme gènes primaires ou secondaires. L'expression des gènes primaires est activée par la liaison directe/indirecte de ER à l'ADN. L'expression des gènes secondaires est dépendante d'un facteur de transcription activé par ERs.

Les gènes primaires ont été principalement identifiés dans des cellules cancéreuses mammaires et quelques études ont été effectuées à partir d'os, de cellules neuronales et de foie. ER $\alpha$  et ER $\beta$  représentent eux-mêmes des gènes régulés par l'estrogène (Castles et al., 1997, Denger et al., 2001, Matthews and Gustafsson, 2003). L'exposition à l'estrogène diminue l'expression du gène ER $\alpha$  (Castles et al., 1997). Une exposition temps dépendant à l'estrogène augmente le niveau de l'ARNm de ER $\beta$  dans la lignée cancéreuse mammaire T47D et dans des cellules cancéreuses du colon (Vladusic et al., 1998).

Environ 35% des gènes primaires chez l'humain sont transcrits via un mécanisme d'association indirecte de ER à l'ADN (O'Lone et al., 2004). Les gènes *collagénase*, *IGF-1R*, *ovalbumine* et *CCND1* sont quelques exemples de gènes régulés par ER $\alpha$ -E2 via un élément AP-1 (Marino et al., 2002, Fujimoto et al., 2004). Les protéines AP-1 seraient également impliquées dans la répression des gènes par ER $\alpha$ . Suite à stimulation de 6 heures et 12 heures à l'estrogène, un groupe a observé que les gènes dont l'expression est augmentée par E2 possèdent des sites EREs et les gènes dont l'expression est inhibée par E2 possèdent généralement des éléments AP-1. Cette même étude a rapporté que le co-répresseur nuclear receptor-interacting protein 1 (NRIP1) s'associe aux complexes ER $\alpha$ -AP-1 (Carroll et al., 2006).

Il a été rapporté que la coopération entre des sites de liaison indirecte et directe est importante pour la régulation de certains gènes en réponse à E2. Par exemple, le gène VEGF possède un ERE qui lie ERs activés par E2 et des séquences riches en GC liant ER-Sp1 et ER-Sp3 (Mueller et al., 2000, Stoner et al., 2000). Un certain nombre de gènes activés par E2 possèdent des demi-sites ERE à proximité de sites Sp1 et l'occupation des deux types de sites est nécessaire pour l'expression optimale des gènes, tels que *RAR $\alpha$*  (Rishi et al., 1995), *TGF- $\alpha$*  (Vyhlidal et al., 2000) et *PR* (Petz and Nardulli, 2000). La coopération entre des sites AP-1 et ERE est importante dans la régulation des gènes par ER $\beta$  en réponse à E2 (Zhao et al., 2010).

L'action des ERs est associée au développement de cancers gynécologiques hormono-dépendants. Des analyses de puce à l'ADN (microarray) effectuées à partir de la lignée

cancéreuse mammaire MCF-7 traitée à l'estrogène ont permis d'identifier des gènes E2-dépendant (Frasor et al., 2003, Terasaka et al., 2004). Parmi les gènes associés aux tumeurs, l'expression d'oncogènes et de promoteurs de tumeurs est généralement augmentée, alors que l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs est diminuée (Inoue et al., 2002). L'expression de régulateurs positifs de la prolifération tels que survivin, divers facteurs de croissance et des gènes impliqués dans le cycle cellulaire est augmentée alors que l'expression de répresseurs transcriptionnels tels que *Mad4* et *JunB* et des gènes antiprolifératifs et pro-apoptotiques tels que B cell translocation gene-1 -2 (*BTG1* et *BTG2*), *cycline G2*, B-cell lymphoma-2 (*Bcl-2*) *antagonist/killer 1*, *Bcl 2-interacting killer*, *caspase 9* et les facteurs de croissance de la famille *TGF- $\beta$*  est diminuée (Frasor et al., 2003). L'expression de plusieurs transporteurs, synthétases, facteurs de transcription, gènes régulés par des facteurs de croissance et des gènes structuraux est augmentée favorisant ainsi la croissance cellulaire et la prolifération (Terasaka et al., 2004). De plus, l'estrogène modulerait sa propre production en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la production et la signalisation de la prostaglandine E, ce qui pourrait induire l'expression de l'aromatase et la production de E2 (Frasor et al., 2003). Ces observations corrélerent avec la fonction de l'estrogène dans la promotion de la croissance (Castagnetta et al., 2004, Yager and Davidson, 2006). Par ailleurs, l'expression de gènes liés à la différenciation cellulaire est généralement diminuée (Terasaka et al., 2004).

E2F1 a été identifié comme un gène précoce en réponse à E2 et le site de liaison pour E2F est surexprimé dans les régions régulatrices de plusieurs gènes liés au cycle cellulaire. E2F1 représente une composante importante dans la régulation de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (Stender et al., 2007). Il a aussi été rapporté que les facteurs membres des familles Forkhead box A (FOXA) et GATA sont cruciaux dans les cancers hormonaux-dépendants. Dans le cancer du sein, GATA3 et FoxA1 sont requis pour la transcription et la croissance cellulaire médiée par ER $\alpha$  (Perou et al., 2000).

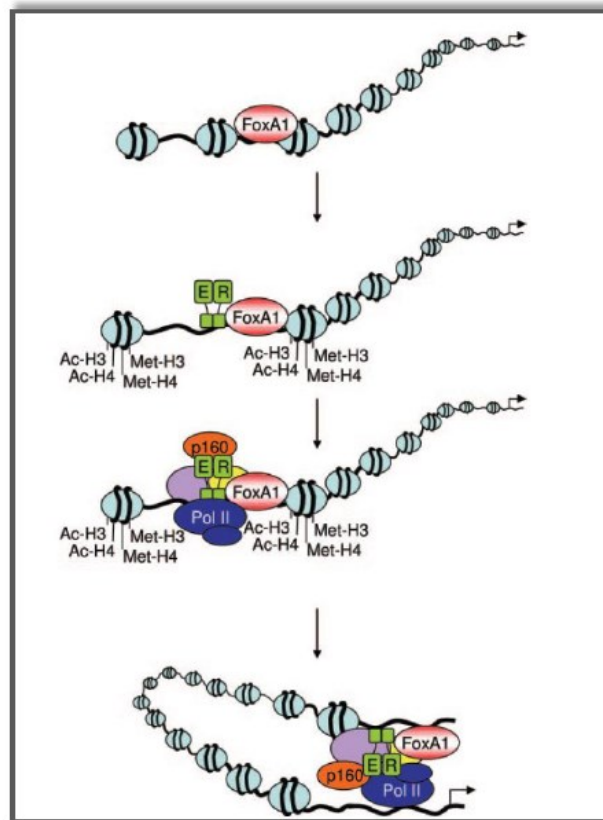
D'autres études ont identifié un médiateur important impliqué dans la prolifération E2-dépendante. La variante d'histone H2A.Z est incorporée aux régions promotrices de gènes



cibles de ER $\alpha$  suite à l'activation des gènes. Des membres du complexe de remodelage p400 sont également recrutés aux promoteurs. La déplétion de H2A.Z ou p400 inhibe la prolifération E2-dépendante de cellules cancéreuses mammaires et altère l'expression de gènes cibles de ER $\alpha$  (Gévry et al., 2009). La surexpression ectopique de H2A.Z dans les cellules MCF-7 augmente la prolifération dans des conditions où les niveaux d'estrogène sont bas. De plus, ER $\alpha$  s'associe au promoteur de H2A.Z et module son expression (Svotelis et al., 2010). L'expression de la variante d'histone H2A.Z est induite par l'estrogène suite à la stimulation de c-Myc dans les cellules cancéreuses et est fortement exprimée dans des tumeurs primaires. H2A.Z est une nouvelle cible de l'action de E2 dans les cellules cancéreuses mammaires et corrèle avec l'agressivité de la tumeur. L'expression de H2A.Z corrèle avec une augmentation des probabilité de métastases et une diminution de la survie (Hua et al., 2008).

## 9.2 Cistrome : nouveau concept dans la régulation des gènes

Dans les dernières années, les concepts entourant la régulation des gènes par des facteurs de transcription ont évolué. De nouvelles approches expérimentales ont permis d'évaluer la régulation de la transcription à plus grande échelle et ainsi d'étendre l'étude des mécanismes de la régulation des gènes au-delà des régions promotrices et proximales. Des distances importantes peuvent séparer des facteurs de transcription de la machinerie transcriptionnelle et une conformation spatiale flexible de l'ADN permet de rapprocher des éléments régulateurs en *cis* (cistrome) à proximité des promoteurs des gènes (Pan et al., 2008) (Fig.9). Environ un tiers des gènes induit par E2 possèdent des éléments de liaison situé à 50 kb du site d'initiation de la transcription. Les autres gènes régulés par l'estrogène qui ne possèdent pas un site de liaison à 50 kb utilisent des sites plus loin que 50 kb du gène dits 'enhancers'. Des études ont démontré que ER $\alpha$  occupe des éléments de liaisons distaux (enhancers) requis pour l'expression de gènes cibles (Carroll et al., 2005, Lin et al., 2007, Welboren et al., 2009).



**Figure 9** Le repliement de la chromatine met à proximité des régions régulatrices distales avec le site d'initiation de la transcription (Tiré de Carroll and Brown, 2006)

L'autorégulation du gène *ER $\alpha$*  serait médiée par des sites de liaison situés 150 à 192 kb en amont du gène. Le gène codant pour le récepteur de la progestérone, possède deux sites EREs situés 168 à 206 kb en amont du gène. Environ la moitié des gènes induit par l'estrogène possède des sites ERE situés dans une région de 100 kb en amont des gènes. Par exemple, le gène *growth regulation by estrogen in breast cancer 1 (GREB1)* possède un 'cluster' de cinq éléments de liaison à ER en amont du gène, et *GATA2* possède un élément de liaison à ER près de la région 3' du gène. Il a également été démontré que le gène *Myc*, dont la région proximal du promoteur ne présente pas de ERE, possède un ERE situé 67 kb en amont du gène (Carroll et al., 2006). Une autre étude a mis en évidence l'implication d'un élément distal dans la régulation du gène *c-Myc* par l'estrogène. L'estrogène augmente l'activité d'un rapporteur luciférase comprenant un enhancer situé à 67 kb en amont du gène de *c-Myc*. L'induction de

l'activité luciférase de ce rapporteur dépend d'un demi-site ERE et d'un site AP-1 situés à l'intérieur de l'enhancer.

### 9.3 ER $\beta$ : quel rôle joue-t-il dans la régulation des gènes?

Lorsque co-exprimé avec ER $\alpha$ , ER $\beta$  cause une diminution de l'activation transcriptionnelle de ER $\alpha$  de manière dose-dépendante (Pettersson et al., 2000). Il a été rapporté que ER $\beta$  serait un régulateur négatif de l'activité de ER $\alpha$  et de la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses en réponse à E2 (Hall and McDonnell, 1999, Pettersson et al., 2000, Liu et al., 2002, Paruthiyil et al., 2004, Ström et al., 2004, Gougelet et al., 2007). ER $\alpha$  est essentiel à la prolifération cellulaire alors que ER $\beta$  au contraire aurait un rôle anti-prolifératif (Krege et al., 1998, Monroe et al., 2003, Shim et al., 2003, Kian Tee et al., 2004).

Des études effectuées à partir de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 ER $\alpha$  positives surexprimant ER $\beta$  ont démontré que ER $\beta$  interfère avec l'expression de gènes régulés par ER $\alpha$  en réponse à E2. ER $\beta$  inhibe la prolifération des cellules MCF-7 en réponse à E2 en réprimant la transcription des gènes *c-myc*, *CCND1* et *cycline A* et en induisant l'expression des gènes *p21<sup>Cip1</sup>* et *p27<sup>Kip1</sup>* menant ainsi à un arrêt du cycle cellulaire en G2 (Paruthiyil et al., 2004). La surexpression de ER $\beta$  dans les cellules cancéreuses mammaires T47D ER $\alpha$ + inhibe également la régulation de gènes médiés par ER $\alpha$  (Williams et al., 2008). ER $\beta$  exercerait un effet répressif sur l'expression des gènes régulés par ER $\alpha$  en s'associant avec des facteurs de transcription (AP-1 et Sp1), prenant ainsi la place de ER $\alpha$  sur ces sites de liaison et perturbant ainsi la transcription indirecte de ER $\alpha$  (Matthews et Gustafsson 2003). La surexpression ER $\beta$  présentant une mutation dans le DBD dans les cellules T47D peut encore antagoniser certains gènes régulés par ER $\alpha$ , appuyant le mécanisme par lequel ER $\beta$  altère la transcription indirecte de ER $\alpha$  (Williams et al., 2008).

Tel que décrit plus haut, les études sur l'impact de ER $\beta$  sur la régulation des gènes ont principalement été effectuées à partir de modèles de surexpression de ER $\beta$  dans des cellules

co-exprimant les deux isoformes (i.e. MCF-7 et T47D). Ces études ont pour la plupart conclu que ER $\beta$  agit comme régulateur négatif ou comme récepteur secondaire en réponse à E2. Toutefois, ER $\beta$  est associé à la régulation de la transcription spécifique de gènes. Les gènes régulés par ER $\beta$  sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, la survie et la différenciation et la motilité, la migration et l'adhésion cellulaire (Grober et al., 2011). L'introduction de ER $\alpha$  ou ER $\beta$  dans des cellules ER négatives a permis d'évaluer séparément le comportement de chaque isoforme et de distinguer le profil des gènes pour ces deux récepteurs.

Une régulation différentielle des gènes par ER $\alpha$  et ER $\beta$  est également observable. ER $\alpha$  induit alors que ER $\beta$  réprime des gènes impliqués dans la prolifération, le métabolisme des stéroïdes/xénobiotiques et dans le transport ionique (Williams et al., 2008). L'expression de CCND1, une cible bien connue de l'estrogène et impliquée dans la prolifération induite par E2, est positivement régulée par ER $\alpha$ -E2 alors que ER $\beta$ -E2 réprime l'expression de ce gène (Liu et al., 2002, Acconcia et al., 2005). Dans la lignée d'ostéosarcome U2OS transfecté avec ER $\alpha$  ou ER $\beta$ , il a été démontré que ER $\beta$  peut réguler des gènes en absence de E2, contrairement à ER $\alpha$  (Vivar et al., 2010). ER $\alpha$  et ER $\beta$  régulent également des gènes distincts en réponse à E2 dans les lignées cancéreuse mammaire Hs578T et MDA-MB-231 exprimant stablement ER $\alpha$  ou ER $\beta$  (Secreto et al., 2007). Dans des cellules d'ostéosarcome exprimant stablement ER $\alpha$  ou ER $\beta$ , plusieurs gènes associés à la motilité cellulaire sont régulés de manière ER $\beta$  spécifique (Vivar et al., 2010).

## 9.4 Régulation par l'hétérodimère ER $\alpha$ /ER $\beta$

ER activé s'associe en dimère sur un élément de liaison ERE. Plusieurs groupes ont montrés que ER $\alpha$  et ER $\beta$  forment des hétérodimères fonctionnels *in vitro* et *in vivo* et que lorsque les deux isoformes sont présents, l'hétérodimère prédomine (Pettersson 1997, Matthews and Gustafsson 2003). E2 et tamoxifène régulent un groupe de gènes uniques dans les cellules U2OS-ER $\alpha$ /ER $\beta$  comparativement aux cellules U2OS exprimant seulement ER $\alpha$  ou ER $\beta$ . Une centaine de gènes ont été identifiés comme étant régulés uniquement par

l'hétérodimère ER $\alpha$ /ER $\beta$ . Deux nouveaux gènes régulés par E2 ont été identifiés soient *retinoblastoma binding protein 1 (RBP1)* et *7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7)*. Ces gènes possèdent des séquences EREs qui lient des hétérodimères ER $\alpha$ /ER $\beta$  (Monroe et al., 2005). La liaison de l'hétérodimère a été détectée sur une région promotrice du gène *pS2/TFF1* ainsi que douze autres gènes dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 (Papoutsi et al., 2009).

Une autre étude rapporte que la co-expression de ER $\alpha$  et ER $\beta$  cause une compétition pour les mêmes sites et que ER $\alpha$  a un effet dominant et déplace ER $\beta$ . La liaison d'un isoforme restreint l'occupation de l'autre isoforme et ER $\alpha$  semble avoir un effet dominant. Les sites de liaison de ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont enrichis en ERE mais lorsque ER $\beta$  est surexprimé, ER $\alpha$  déplace ER $\beta$  et ER $\beta$  est relocalisé vers d'autres sites moins riches en ERE en présence de E2. L'utilisation de ligands sélectifs a déterminé que c'est la liaison de l'isoforme lié à son ligand respectif qui prédomine sur la chromatine (Charn et al., 2010).

## **10 Convergence entre la signalisation membranaire et la réponse génomique des ERs**

La signalisation induite par l'activation de certains récepteurs membranaires affecte l'activité transcriptionnelle des ERs (Fig.10).

### **10.1 Signalisation membranaire de l'estrogène**

L'activation de ERK en réponse à E2 augmente l'expression de gènes sous le contrôle d'un élément AP-1 (Lopez et al., 2001, Yamakawa and Arita, 2004) via la translocation nucléaire de Elk-1 (Levin, 2005). De plus, l'activation d'éléments SRE en réponse à E2 qui est dépendante de ER requiert l'activité MAPK (de Jager et al., 2001, Duan et al., 2001, Song et al., 2002, Kousteni et al., 2003). L'activité transcriptionnelle du complexe ER-AP-1 est également régulée par l'activité MAPK (Karin, 1995). L'activation de la voie MAPK par E2

augmente la liaison du facteur AP-1 à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$ -E2 (Garcia Dos Santos et al., 2002, Marino et al., 2002, Bjornstrom and Sjoberg, 2004).

## 10.2 Phosphorylation des ERs et impact génomique

Tel que décrit précédemment, la phosphorylation des ERs régule leur activité transcriptionnelle, leur liaison à l'ADN, leur dimérisation, leur cycle de renouvellement ('turn-over'), etc. Des études ont permis de déterminer l'implication de la signalisation intracellulaire sur la régulation des gènes cibles des ERs.

La phosphorylation de la serine 118 de ER $\alpha$  en réponse aux facteurs de croissance EGF ou IGF permet à ER $\alpha$  d'activer la transcription des gènes même en absence de E2 (Kato et al., 1995, Kato, 2001). L'utilisation de 8-bromo-cAMP, un activateur de protéine kinase, augmente la phosphorylation de ER $\alpha$  et l'expression du gène *PR* (Denner et al., 1990). IGF-1 augmente également l'expression du gène *PR* dans des cellules utérines de rate, qui est médiée par l'augmentation de la phosphorylation de ER $\alpha$  (Aronica and Katzenellenbogen, 1993). La phosphorylation de la serine 118 de ER $\alpha$  est importante dans la régulation des gènes qui sont réprimés en réponse à E2 et au tamoxifène (Cheng et al., 2007).

La phosphorylation de la serine 167 de ER $\alpha$  semble jouer un rôle dans la liaison optimale de ER $\alpha$  aux promoteurs endogènes de gènes cibles (Shah and Rowan, 2005, Likhite et al., 2006). L'expression de gènes cibles de ER $\alpha$  ou de gènes régulés par la signalisation de ER $\alpha$  est altéré dans les cellules exprimant ER $\alpha$ S118A et ER $\alpha$ S167A, ce qui démontre que la phosphorylation de ER $\alpha$  est importante dans la régulation de l'expression des gènes dans des cellules cancéreuses mammaires (Hudson et al., 2012).

Les serines 282 et 559 de ER $\alpha$  ont été identifiées comme des nouveaux sites de phosphorylation de ER $\alpha$  et seraient ciblées par la kinase CK2. L'expression des mutants ER $\alpha$ S282A et ER $\alpha$ S559A dans les cellules HeLa augmente l'expression du gène *pS2* en absence de ligand (Williams et al., 2009).

L'expression du gène *TGF-beta-inducible early-response gene (TIEG)* en réponse à E2 est régulée par ER $\beta$  de manière AF-1 dépendante (Hawse et al., 2008). 15d-PGJ2 (prostaglandine J2) induit l'apoptose dans des cellules cancéreuses pancréatiques en diminuant l'expression du gène *human telomerase reverse transcriptase (hTERT)* médiée par ER $\beta$  via une diminution de la phosphorylation de ER $\beta$  (Kondoh et al., 2007). L'inhibition de MEK réduit la phosphorylation de ER $\beta$  ainsi que sa liaison au promoteur du gène *hTERT* et l'expression de la protéine *hTERT* suggérant que 15d-PGJ2 altère la phosphorylation de ERK 1/2 affectant ainsi la transcription par ER $\beta$ .

L'activation de la voie p38 par l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 en réponse au facteur de croissance héréguline- $\beta$ 1 réprime l'activité E2-dépendante de ER $\beta$  dans des cellules cancéreuses mammaires (St-Laurent et al., 2005). La répression de ER $\beta$  est dépendante du domaine AF-1 qui incluent les sérines 106 et 124, des sites ciblés par ERK et impliqués dans le recrutement du co-activateur SRC-1. Héréguline- $\beta$ 1 altère la liaison de ER $\beta$  au promoteur du gène *EBI* en présence d'estrogène et cet effet est renversé par l'inhibition de ERK ou p38 (St-Laurent et al., 2005). La signalisation par héréguline- $\beta$ 1 altère également l'activité hormone-dépendante de ER $\alpha$  (Pietras et al., 1995, Tang et al., 1996) et sa liaison au promoteur du gène *EBI* (St-Laurent et al., 2005). Cependant pour ER $\alpha$ , le mécanisme ne fait ni intervenir la voie p38 ni la région N-terminale du récepteur (St-Laurent et al., 2005).

L'activation de la voie PI3-K/Akt par l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 réprime l'activité hormone-dépendante de ER $\beta$  via la phosphorylation de la serine 255 localisée dans la région charnière de ER $\beta$  murin (Sanchez et al., 2007). Héréguline- $\beta$ 1 réprime l'activation de l'expression des gènes *PR* et *CCND1* en réponse à E2 dans les cellules cancéreuses mammaires Hs578T exprimant stablement ER $\beta$ . De plus, héréguline- $\beta$ 1 atténue la liaison de ER $\beta$  aux promoteurs des gènes *pS2/TFF1*, *PR*, *fos* et *CCND1* en présence d'estrogène dans des cellules cancéreuses mammaires Hs578T où ER $\beta$  a été introduit (Sanchez et al., 2013).

La phosphorylation des ERs en réponse à signalisation intracellulaire affecte leur activité transcriptionnelle en modulant leur interaction avec des co-régulateurs. Dans les

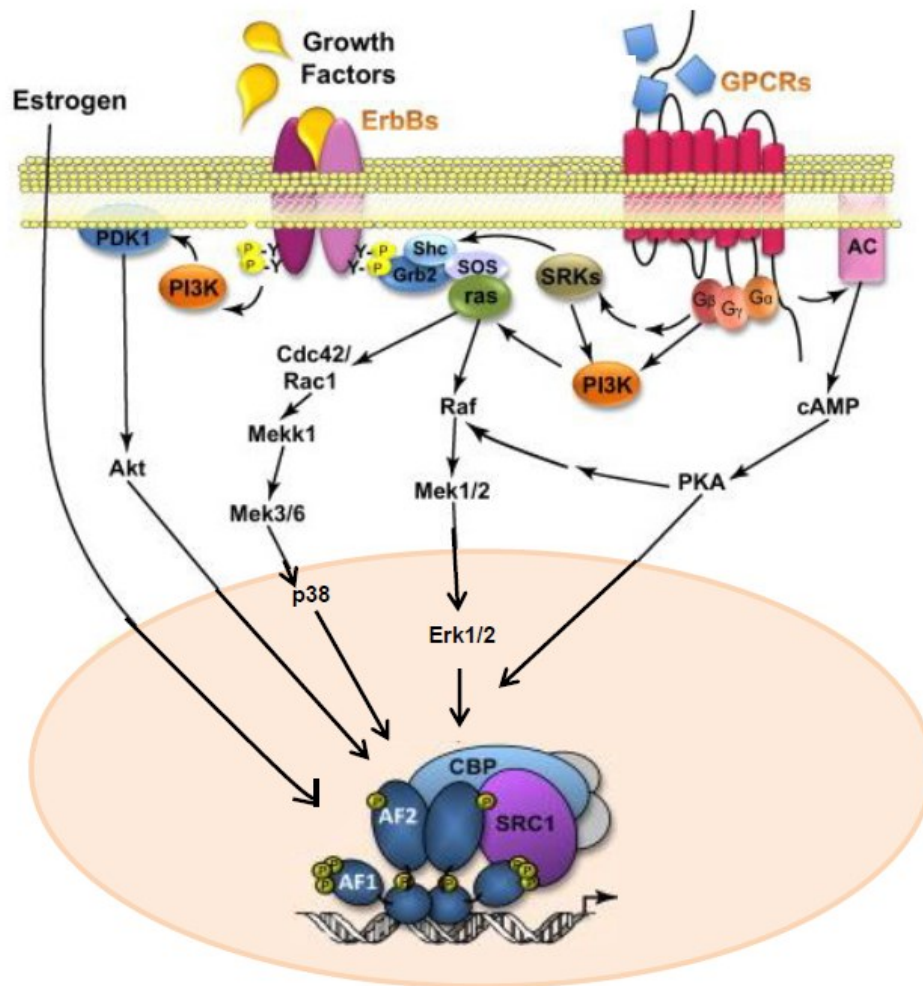
cellules cancéreuses mammaires, la phosphorylation de la serine 118 de ER $\alpha$  engendre une diminution de l'interaction avec le co-répresseur SMRT (Lavinsky et al., 1998). Cette modification post-traductionnelle est également requise pour l'interaction de la région N-terminale de ER $\alpha$  avec le co-activateur p68 (Endoh et al., 1999). La phosphorylation des serines 104, 106 et 118 de ERs régule positivement l'interaction du récepteur avec les co-activateurs SRC et CBP/p300 (Dutertre and Smith, 2003). La phosphorylation de résidus situés dans la région N-terminale de ER $\beta$  augmente également l'interaction de ce récepteur avec SRC-1 et CBP (Tremblay et al., 1999). De plus, notre laboratoire a démontré que la phosphorylation de résidus de l'AF-1 de ER $\beta$  engendre le recrutement de l'ubiquitine ligase E6-AP (Picard et al., 2008). Par ailleurs, nous avons également démontré que la phosphorylation d'un résidu situé dans la région charnière de ER $\beta$  par la kinase Akt entraîne le recrutement du co-activateur CBP (Sanchez et al., 2013).

### **10.3 Signalisation par des récepteurs couplés aux protéines G**

Un régulateur négatif des petites protéines G de la famille Rho, RhoGDI $\alpha$ , peut réguler l'activité de ER $\alpha$ . La déplétion de RhoGDI $\alpha$  augmente l'expression de l'ARNm de PR et pS2/TFF1 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 en réponse à E2, indiquant que RhoGDI $\alpha$  régule négativement la transcription médié par ER $\alpha$  (El Marzouk et al., 2007)

Le récepteur de la mélatonine peut inhiber la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Hill et al., 1992, Kiefer et al., 2005) en réprimant l'expression de l'ARNm et de la protéine ER $\alpha$  (Molis et al., 1994). La mélatonine diminue spécifiquement l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  sur des éléments ERE et AP-1. La réponse à la mélatonine semble dépendre du ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  puisque les cellules MCF-7 surexprimant ER $\beta$  sont insensibles à la mélatonine (del Río et al., 2004).





**Figure 10** La signalisation membranaire converge vers les ERs dans le noyau (Adapté de Sanchez et al., 2010)

## 11 ER et le cancer

L'estrogène est associé avec des complications pathologiques gynécologiques incluant le cancer du sein et le cancer de l'endomètre. L'estrogène est considéré comme un facteur classique étiologique pour ces cancers. En 2002, le 'US National Toxicology Program' a ajouté l'estrogène à sa liste de carcinogènes. La thérapie de substitution hormonale est associée à une augmentation du risque et de l'incidence du cancer de l'endomètre en plus d'une augmentation, toutefois moindre, du risque de cancer du sein. Les ERs sont également

impliqués dans le développement et la progression du cancer de l'ovaire, du colon et de la prostate (Shang, 2007).

## 11.1 ERs et le cancer du sein

Des études cliniques et à partir de modèles animaux ont démontré que les estrogènes sont impliqués dans le développement du cancer du sein suite à une exposition cumulative de l'épithélium mammaire à E2 (Henderson and Feigelson, 2000, McEwan, 2004). La liaison de l'estrogène à ER stimule la prolifération des cellules mammaires. L'augmentation de la division cellulaire et de la synthèse d'ADN augmente les risques d'erreurs de réplication ce qui peut engendrer des mutations qui perturbent des processus cellulaires comme l'apoptose, la prolifération cellulaire ou la réparation de l'ADN. De plus, le métabolisme de l'estrogène engendre la production de sous-produits génotoxiques qui pourraient induire des dommages à l'ADN et ainsi causer des mutations.

ER $\alpha$  est responsable de l'initiation et du développement du cancer du sein E2-dépendant (Castoria et al., 2001). Il est souvent sur-exprimé lors du premier stade de la maladie et stimule la prolifération, la motilité ainsi que l'invasion des cellules cancéreuses en réponse à E2. D'ailleurs, ER $\alpha$  est un marqueur pronostique dans le cancer du sein.

L'association entre ER $\beta$  et le cancer du sein est toutefois beaucoup moins claire. Le tissu mammaire normal exprime un niveau plus élevé de ER $\beta$  que dans les premiers stades du cancer du sein, suggérant que la perte de ER $\beta$  pourrait contribuer au développement du cancer (Leygue et al., 1998, Iwao et al., 2000, Roger et al., 2001). D'ailleurs, une diminution progressive de l'expression de ER $\beta$  a été observée au cours de l'avancement des stades de la carcinogénèse mammaire (Roger et al., 2001). La prolifération de cellules mammaires est observable en absence de l'expression de ER $\beta$ , ce qui suggère que ER $\beta$  ne serait pas essentiel à la prolifération. Toutefois, la prolifération des cellules mammaires en réponse à E2 serait déterminée par le ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  (Matthews and Gustafsson, 2003). Notre laboratoire a démontré que le traitement des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 au facteur de

croissance héréguline- $\beta$ 1 engendre une diminution de l'expression de ER $\beta$  dans ces cellules. Cette diminution de ER $\beta$  engendre une augmentation de la prolifération des cellules MCF-7 en réponse à héréguline- $\beta$ 1, ce qui suggère que le ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  affecte la prolifération des cellules cancéreuses mammaires en réponse à un facteur de croissance (Sanchez et al., 2013).

ER $\beta$  semble agir comme régulateur de la signalisation de l'estrogène (Koehler et al., 2005) et lorsque co-exprimé avec ER $\alpha$ , réduit l'activation de la transcription de manière dose-dépendante (Matthews and Gustafsson, 2003). Des études ont démontré que ER $\beta$  atténue l'activité de ER $\alpha$  (Korach 2003, Koehler 2005). Les effets répressifs de ER $\beta$  sur ER $\alpha$  se reflètent sur la prolifération cellulaire (Weihua et al., 2003, Ström et al., 2004, Koehler et al., 2005). Des études ont démontré que l'introduction de ER $\beta$  dans des lignées cancéreuses mammaires ER négatives affecte la prolifération cellulaire. Il a été rapporté qu'en réponse à E2, la lignée Hs578T exprimant ER $\beta$  diminue la prolifération cellulaire (Secreto et al., 2007). Nous avons observé au laboratoire que l'introduction de ER $\beta$  dans les cellules cancéreuses mammaires Hs578T diminue le prolifération basale (Sanchez et al., 2013). Toutefois, contrairement à Secreto et al., nous avons observé que les cellules Hs578T exprimant stablement ER $\beta$  prolifèrent en réponse à E2 (Sanchez et al., 2013). Il a été rapporté que la surexpression de ER $\beta$  dans les cellules MCF-7 entraîne une diminution de la prolifération cellulaire en réponse à E2 (Paruthiyil et al., 2004, Grober et al., 2011). De plus, l'introduction de ER $\beta$  dans les cellules MCF-7 prévient la formation de tumeurs dans un modèle murin de xénogreffe en réponse à E2 (Paruthiyil et al., 2004). La surexpression de ER $\beta$  inhibe également la prolifération des cellules T47D en réponse à E2 (Williams et al., 2008). À l'opposé, la déplétion de ER $\beta$  dans des cellules épithéliales mammaires et dans des lignées cancéreuses mammaires engendre une augmentation de la croissance cellulaire accompagnée d'une augmentation de l'expression de cycline A2 et une diminution de l'expression de p21/WAF, un régulateur négatif de la croissance cellulaire (Treeck et al., 2010). Des résultats similaires ont été observés avec la lignée épithéliale mammaire murine HC11, qui exprime ER $\alpha$  et ER $\beta$ . E2 stimule la prolifération et la croissance sur gélose suite à la déplétion de ER $\beta$ .

Inversement, la déplétion de ER $\alpha$  engendre une mort cellulaire E2-dépendante via la stimulation de voies apoptotiques par ER $\beta$ .

Par ailleurs, ER $\beta$  agirait sur la prolifération cellulaire, non seulement en agissant comme régulateur négatif de ER $\alpha$ , mais également en induisant des signaux pro-apoptotiques (Acconcia et al., 2005). L'activation de ER $\alpha$  par l'agoniste de ER $\alpha$ , le PPT, induit une réponse proliférative alors que le traitement avec l'agoniste de ER $\beta$  diminue le nombre de cellules due à l'apoptose (Helguero et al., 2005).

En plus d'agir sur la prolifération cellulaire, ER $\beta$  agit également sur l'adhésion et la migration cellulaire. L'analyse de souris  $\beta$ ERKO a révélé une réduction de l'expression de protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire. À l'opposé, la surexpression de ER $\beta$  induit l'expression de l'ARNm et de la protéine intégrine  $\alpha$ 1. L'expression de ER $\beta$  augmente la formation de complexes focaux et de filaments d'actine. Des essais d'adhésion cellulaire ont confirmé que ER $\beta$  augmente l'adhésion à plusieurs protéines de la matrice extracellulaire. De plus, l'expression de ER $\beta$  est associée avec une diminution de la migration cellulaire (Lindberg et al., 2010). Un modèle murin de xénogreffe a démontré que l'introduction de ER $\beta$  dans les cellules T47D réduit la croissance tumorale et le nombre de vaisseaux sanguins dans les tumeurs (Hartman et al., 2009). La surexpression de ER $\beta$  dans les cellules cancéreuses mammaires T47D réduit également la croissance tumorale et l'angiogénèse dans un modèle murin de xénogreffe (Williams et al., 2008). De plus, l'introduction de ER $\beta$  dans la lignée ER négative MDA-MB-231 diminue la motilité et l'invasion cellulaire (Lazennec et al., 2001). Ces résultats ont suggéré que ER $\beta$  agirait comme inhibiteur dans la progression du cancer du sein.

Environ 58% des tumeurs mammaires co-expriment ER $\alpha$  et ER $\beta$  et environ 18% n'expriment que ER $\beta$  seul (Murphy et al., 2003). Le patron d'expression de ER $\beta$  et de ses variants est différent entre les tumeurs ER $\alpha$  positives et les tumeurs ER $\alpha$  négatives et ces

différences pourraient être associées avec des rôles différents des protéines ER $\beta$  lorsque exprimé seul ou co-exprimé avec ER $\alpha$  dans les tumeurs mammaires (Murphy and Watson, 2006, Skliris et al., 2006, Skliris et al., 2007). Une étude a suggéré que l'expression de ER $\beta$  est associée avec une plus grande fraction de cellules en phase S seulement chez les patientes dont les tumeurs sont ER $\alpha$  négatives (Gruvberger-Saal et al., 2007). L'expression de ER $\beta$ 1 serait associée au marqueur de prolifération Ki-67 mais seulement en absence de l'expression de ER $\beta$ 2/cx (Skliris et al., 2006). Ces observations ont été confirmées par une autre étude démontrant que la plus forte expression de Ki-67 ou cycline A se trouve dans les tumeurs qui expriment seulement ER $\beta$  (Jensen et al., 2001). Ces résultats suggèrent que ER $\beta$  serait relié à la prolifération dans le cancer du sein.

Une étude a démontré que les tumeurs mammaires exprimant seulement ER $\beta$  serait associé à un phénotype plus agressif que des tumeurs ER $\alpha$ -/ER $\beta$  - (Fuqua et al., 2003). L'expression de ER $\beta$  seul serait associée à des marqueurs suggérant une progression plus agressive de la maladie. Comme mentionné auparavant, l'expression de ER $\beta$  seul serait associée à une plus grande fraction de cellules en phase S mais serait également associée avec une plus longue période d'absence de la maladie lorsque les patientes sont traitées au tamoxifène (Gruvberger-Saal et al., 2007). Ces résultats supportent la relation entre ER $\beta$  et la prolifération faisant en sorte que l'inhibition de la signalisation par ER $\beta$  inhiberait la croissance des cellules tumorales. Une altération de la balance des isoformes ER $\beta$  ou le profil d'expression de co-régulateurs pourrait avoir un impact sur l'activité de ER $\beta$ 1, qui passerait d'inhibiteur de la croissance à promoteur de la croissance (Osborne et al., 2003, Peng et al., 2003). De plus, le profil de p53 influencerait l'activité de ER $\beta$  (Skliris et al., 2006).

## **12 Approches pour antagoniser les ERs**

Dans le contexte du cancer du sein, il existe des approches thérapeutiques déjà mises en place et d'autres qui ne sont pas encore utilisées mais pourraient s'avérer prometteuses.

## 12.1 Thérapies endocriniennes

Environ 70% des tous les cancers du sein sont dépendants de l'estrogène et d'un ER $\alpha$  fonctionnel pour la croissance. Les cancers du sein ER $\alpha$ -positifs sont généralement traités avec des anti-estrogènes (Ali and Coombes, 2002). Les approches incluent l'inhibition de l'activité de ER $\alpha$  par des modulateurs sélectifs de l'activité de ER (SERMs) comme le tamoxifène (Macgregor and Jordan, 1998) ou par la déstabilisation et la dégradation de ER par des 'down-regulators' sélectifs de l'activité des ERs (SERDs) comme le fulvestrant (Nawaz et al., 1999, Lonard et al., 2000, Wijayaratne and McDonnell, 2001, Marsaud et al., 2003). L'effet des thérapies endocrines est largement médié par l'inhibition de la transcription par ER. Les SERMs comme le tamoxifène lie et antagonise ER mais ne bloque que la transcription médiée par le domaine AF-2 et donc inhibe que partiellement la transcription régulée par ER (Tzukerman et al., 1994, McDonnell et al., 1995). Le fulvestrant au contraire bloque l'AF-1 et l'AF-2 et donc engendre une inhibition complète de la transcription de ER (Wakeling et al., 1991, Dowsett et al., 2005). Depuis plus de 20 ans, le tamoxifène est le composé le plus largement utilisé comme thérapie endocrine pour les cancers du sein au stade précoce et avancé et a contribué à diminuer la mortalité des patientes atteintes (Jensen and Jordan, 2003). Toutefois, environ la moitié des patientes présentant un cancer à un stade avancé ne répondent pas au tamoxifène et presque toutes les patientes avec des métastases rechutent ou meurent (Ali and Coombes, 2002).

Deux classes de SERMs sont présentement utilisées en clinique soit des dérivés triphényléthylène, comme le tamoxifène, qui est utilisé pour la prévention et le traitement du cancer du sein et des dérivés benxothiophène comme le raloxifène qui est utilisé pour le traitement et la prévention d'ostéoporose et la prévention du cancer du sein aux États-Unis. Les deux classes de SERMs augmentent le risque de thromboembolie veineuse et de bouffées de chaleur. De plus, le tamoxifène augmente le risque de cancer de l'endomètre. Le développement de d'autres SERMs n'engendrant pas d'effets secondaires s'avère très important (Palacios, 2010).

Une deuxième approche consiste à réduire la production d'estrogène dans les tissus périphériques et dans la tumeur par l'utilisation d'inhibiteurs d'aromatase (IA) comme anastrozole, letrozole ou exemestane (Johnston and Dowsett, 2003, Jordan, 2004). Les IA inhibent la croissance tumorale et présentent une efficacité supérieure au tamoxifène chez certains sous-groupes de patientes (Goss et al., 2005).

## 12.2 Autres approches envisageables

ER $\beta$  dans le cancer du sein est exprimé dans les lymphocytes infiltrant, les fibroblastes et les cellules endothéliales, tous des types cellulaires qui influencent la croissance tumorale. Les phytoestrogènes ont une préférence pour ER $\beta$  et plusieurs études épidémiologiques indiquent que ces composés auraient un effet préventif du cancer du sein. Des études expérimentales, épidémiologiques et de diagnostic pointent ER $\beta$  comme représentant un facteur important dans le cancer du sein, ouvrant la possibilité de développer des thérapies ER $\beta$ -sélectives pour le traitement du cancer du sein (Hartman et al., 2009).

Il a été démontré que le traitement de deux lignées cancéreuses mammaires ER positives MCF-7 et ZR-75 avec des ligands synthétiques ou naturels du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  inhibent la signalisation de ER $\alpha$  en induisant sa dégradation protéosomale. La prolifération des cellules MCF-7 et ZR-75 est inhibée après 24 h suite à ces traitements. La dégradation de ER $\alpha$  a lieu malgré la déplétion de PPAR $\gamma$ , démontrant que le mécanisme est PPAR $\gamma$ -indépendant (Lecomte et al., 2008). L'utilisation de dérivés de thiazolidinedione capable d'induire la dégradation de ER $\alpha$  de manière PPAR $\gamma$  indépendante pourrait représenter un outil intéressant dans le traitement du cancer du sein. De plus, une autre étude a démontré que le ligand synthétique de PPAR $\gamma$ , troglitazone, augmente l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses mammaires induite par l'anti-estrogène tamoxifène (Yu et al., 2008).

Le facteur de transcription Forkhead box O3 (FOXO3a) interagit avec ER $\alpha$  et ER $\beta$  et inhibe leurs activités transcriptionnelles hormone-dépendante. À partir de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 surexprimant FOXO3a, il a été démontré que ce facteur engendre une

diminution de l'expression de divers gènes régulés par ER, certains ayant des rôles dans la prolifération cellulaire. FOXO3a augmente l'expression d'inhibiteurs de Cdk p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup>. FOXO3a réprime la croissance et la survie des cellules MCF-7. Dans un modèle murin de xéno greffe, la surexpression de FOXO3a dans les MCF-7 supprime la tumorigénèse induite par E2 (Zou et al., 2008). L'utilisation d'agents pouvant activer FOXO3a pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique pour le cancer du sein.

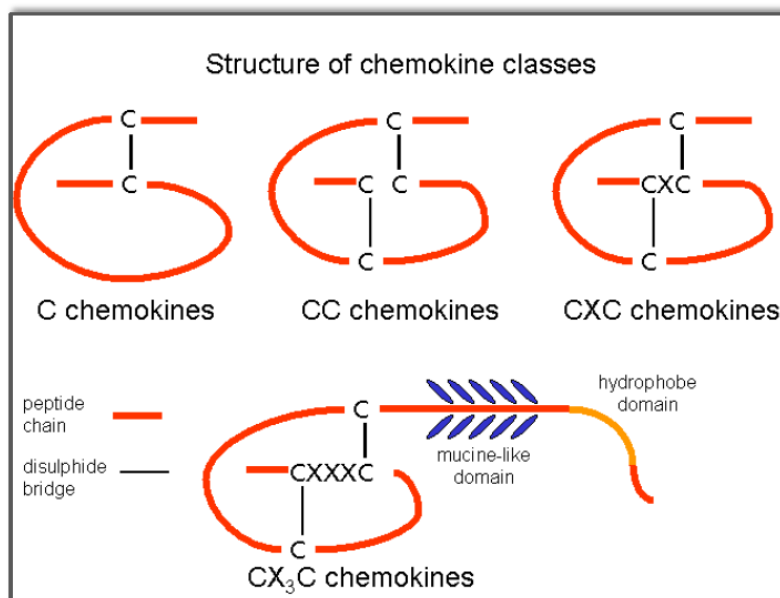
Plusieurs inhibiteurs des HDACs comme le trichostatin A (TSA) modifient de manière réversible ou irréversible la balance entre l'activité des HAT et des HDACs (Marks et al., 2000). Les inhibiteurs des HDACs induisent l'arrêt de la croissance, la différenciation et/ou l'apoptose de diverses lignées cellulaires transformées et inhibent le développement de tumeurs chez des rongeurs (Cohen et al., 1999, Margueron et al., 2004). Plusieurs études dans des modèles animaux ont rapporté que ces inhibiteurs bloquent la croissance tumorale (Marks et al., 2000), particulièrement celle des tumeurs mammaires (Vigushin et al., 2001). Une étude a démontré que le traitement de plusieurs cellules cancéreuses avec de l'inhibiteur de HDAC TSA augmente l'activité ligand-dépendante de ER $\beta$  de manière plus prononcée que ER $\alpha$ . Le TSA augmente l'expression de l'ARNm de ER $\beta$  alors qu'il diminue l'expression de l'ARNm de ER $\alpha$ . L'expression de ER $\beta$  module les effets transcriptionnels de TSA sur plusieurs gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire. La combinaison de l'expression de ER $\beta$  et de TSA améliore l'inhibition de la prolifération cellulaire dans des cellules HeLa infectées avec ER $\beta$ . En présence de TSA, les cellules HeLa ER $\beta$  induisent l'expression de p21WAF1/CIP1 plus efficacement que les cellules HeLa ER $\alpha$ . Ces résultats suggèrent que l'amélioration de l'effet anti-prolifératif médié par la combinaison de ER $\beta$  et TSA pourrait être attribuable au fait que ER $\beta$  affecte la régulation des gènes impliqués dans le prolifération cellulaire médiée par TSA (Duong et al., 2005).

### **13 Les chimiokines et leurs récepteurs**



## 13.1 Les chimiokines

Les chimiokines sont une famille de protéines de 8-12 kDa qui possèdent entre 1 à 3 ponts disulfures. L'homologie entre les chimiokines est très variable allant de 20 à 90%, mais elles partagent une structure tertiaire très semblable (Allen et al., 2007). Elles sont définies par quatre cystéines et catégorisées selon la séquence des deux premières cystéines et divisées en quatre classes : CXCL, CCL, CL et CX3CL où X désigne n'importe quel acide aminé et L 'ligand' (Murphy et al., 2000) (Fig.11). De plus, la classe CXC a été divisée en deux groupes selon la présence du motif ELR précédent la première cystéine (Rossi and Zlotnik, 2000). Les chimiokines CXC possédant ce motif sont des facteurs angiogéniques, alors que celles ne présentant pas ce motif agissent comme facteurs angiostatiques. La portion N-terminale avant la première cystéine est peu structurée. La portion C-terminale après la dernière cystéine forme une hélice alpha. Le reste de la molécule est stabilisée par des ponts disulfures entre la première et la troisième cystéine et la deuxième et quatrième cystéine et contient 3 feuillets beta séparés par une longue boucle nommée 'boucle N' (Fernandez and Lolis, 2002). Les chimiokines sont produites comme pro-peptides débutants avec un signal peptide d'environ 20 acides aminés qui se fait cliver pour obtenir la forme mature et active. Après synthèse, la majorité des chimiokines matures sont sécrétées hors de la cellule (Allen et al., 2007).



**Figure 11** Représentation schématique de la structure des chimiokines (Tiré de Kohidai, 1999)

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques qui sont impliquées dans plusieurs processus biologiques : hématopoïèse, angiogénèse/angiostatisme, trafic des lymphocytes et infiltration des tissus par des leucocytes en réponses à des agents inflammatoires, dommages tissulaires ou infection bactérienne ou virale (Fernandez and Lolis, 2002). Les chimiokines doivent former un gradient de concentration pour permettre une migration cellulaire directionnelle. Ce processus semble faire intervenir la liaison des chimiokines à des glycosaminoglycans (GAGs) exprimés à la surface de cellules endothéliales pour permettre leurs rétentions à un site précis (Proudfoot et al., 2003). L'action des chimiokines peut mener à d'autres effets incluant l'exocytose granulaire, l'initiation de la transcription génique, la prolifération et l'apoptose (Thelen, 2001).

Les chimiokines exercent leurs effets en se liant à des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Il a été démontré que la liaison des

chimiokines à leurs récepteurs implique la boucle N et pour certaines chimiokines le segment N-terminal serait aussi impliqué (Wells et al., 1995, Pakianathan et al., 1997, Blanpain et al., 2001, Laurence et al., 2001, Mayer and Stone, 2001, Bondue et al., 2002, Blanpain et al., 2003). La délétion du domaine N-terminal non-structuré des chimiokines génère dans la majorité des cas des antagonistes ou des agonistes partiels démontrant ainsi le rôle de ce domaine dans l'activation du récepteur (Gong and Clark-Lewis, 1995, Wells et al., 1995, Gong et al., 1996, Clark-Lewis et al., 2003).

## 13.2 Les récepteurs à chimiokines

Les chimiokines exercent leurs effets en se liant à des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques et possèdent des caractéristiques de la famille des RCPG 'rhodopsin-like' (Murphy et al., 2000). Les récepteurs à chimiokines possèdent un court domaine N-terminal extracellulaire plutôt acide qui peut être sulfaté sur des résidus tyrosines et qui contient des sites de glycosylation. La queue C-terminale possède des résidus serines et thréonines qui servent de sites de phosphorylation pour la régulation du récepteur. Le récepteur est composé de sept passages transmembranaires de type hélices alpha avec trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires possédant des résidus hydrophobes et sont orientés perpendiculairement à la membrane plasmique. Comme la plupart des récepteurs de la famille rhodopsin-like, un pont disulfure relie les cystéines entre les boucles extracellulaires 1 et 2. Toutefois, les récepteurs à chimiokines présenteraient la caractéristique de posséder un deuxième pont disulfure entre la troisième boucle extracellulaire et la partie N-terminale du récepteur (Springael et al., 2005). Ces ponts disulfures sont importants pour l'interaction avec le ligand, la structure et la signalisation du récepteur (Tournamille et al., 1997, Blanpain et al., 1999, Ai and Liao, 2002). Les protéines G sont couplées à la queue C-terminale et possiblement à la troisième boucle extracellulaire (Murdoch and Finn, 2000). Une autre caractéristique propre aux récepteurs à chimiokine est le motif TXP (Thréonine-X-Proline)

présent dans le deuxième passage transmembranaire qui semble important pour la structure du récepteur. La mutation de la proline chez le récepteur CCR5 diminue la liaison au ligand et abolie pratiquement toute réponse fonctionnelle du récepteur (Govaerts et al., 2001). La majorité des récepteurs des chimiokines possèdent le motif DRYLAIV situé dans la deuxième boucle intracellulaire, hautement conservé parmi les RCPGs (Murphy et al., 2000).

Les récepteurs à chimiokines sont classés en 4 classes selon le ligand qu'il lie : CCR, CXCR, CX3CR et XCR , R désignant 'receptor' (Horuk, 2001). Plusieurs ligands lient le même récepteur et un récepteur peut lier plusieurs ligands (Allen et al., 2007) (Tableau 1). Les conséquences fonctionnelles d'une telle redondance sont peu comprises. Cette redondance permettrait une fine régulation des réponses immunitaires (Devalaraja and Richmond, 1999, Mantovani, 1999). Des études effectuées à partir de modèles de souris invalidées pour des récepteurs à chimiokines ont démontré que la délétion d'un seul récepteur engendre une léthalité embryonnaire (Power, 2003). Ceci suggère qu'une compensation doit avoir lieu pour la perte d'un récepteur et que l'embryogénèse est due à la redondance des ligands et de leurs récepteurs. Toutefois, des résultats basés sur des modèles pathologiques ont fait émerger des rôles spécifiques pour certains récepteurs (Horuk, 2001, Power, 2003).

**Tableau 1** Les récepteurs à chimiokines et leurs ligands (Tiré de Allen et al., 2007)

Receptor	Ligands
CCR1	CCL3,CCL5,CCL7,CCL13,CCL14,CCL15,CCL16,CCL23
CCR2	CCL2,CCL7,CCL8,CCL13,CCL16
CCR3	CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL15,CCL16,CCL24,CCL26,CCL28
CCR4	CCL17,CCL22
CCR5	CCL3,CCL4,CCL5,CCL8,CCL11,CCL14,CCL16
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19,CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27,CCL28
CXCR1	CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR2	CXCL1,CXCL2,CXCL3,CXCL5,CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR3-A	CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR3-B	CXCL4,CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
CXCR7	CXCL12
XCR1	XCL1,XCL2
CX <sub>3</sub> CR1	CX <sub>3</sub> CL1
CCX-CR	CCL19,CCL21,CCL25
D6	CCL2,CCL3L1,CCL4,CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL17, CCL22
DARC/Duffy	CCL2,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL16,CCL17,CXCL1,CXCL5, CXCL6,CXCL7,CXCL8,CXCL9,CXCL11,CXCL13

## 14 Le récepteur à chimiokine CXCR4

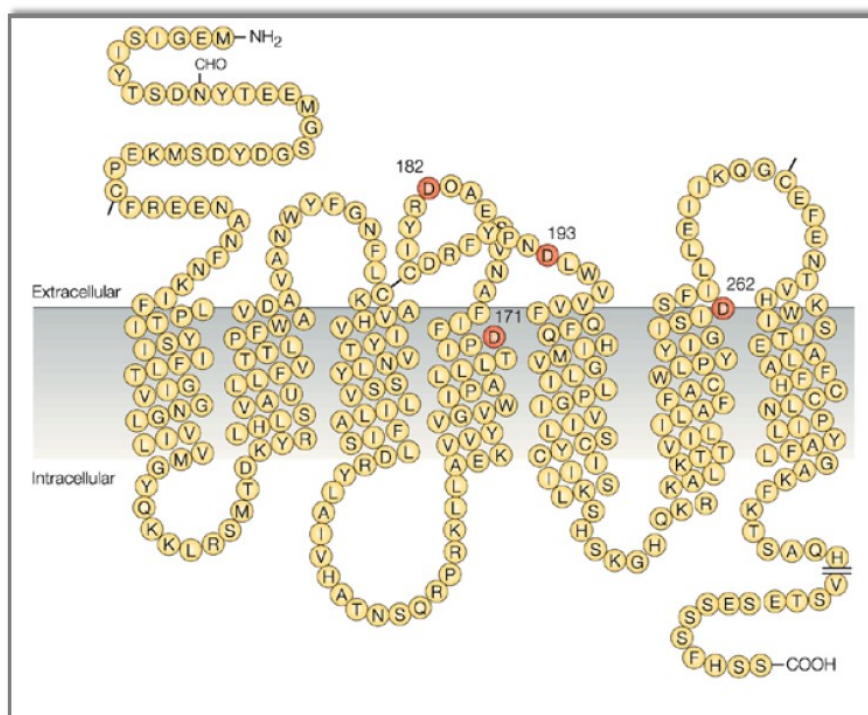
### 14.1 Identification

CXCR4 a été cloné à partir d'une librairie d'ADNc de monocytes humains. Le clone d'une longueur de 352 acides aminés a été nommé leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor (LESTR). Une grande homologie entre cette protéine et le récepteur de l'IL-8 a été trouvée. Malgré le fait qu'aucun ligand pour LESTR n'avait été identifié à ce moment, sa forte expression dans les globules blancs et la similitude de sa séquence avec IL-8R1 et IL-8 $\beta$  suggéra qu'il devait avoir un rôle dans l'activation des cellules inflammatoires (Loetscher

et al., 1994). Plus tard, une protéine codant pour un récepteur à sept passages transmembranaires et agissant comme cofacteur pour la fusion et l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été identifiée et le récepteur a été renommé fusin (Feng et al., 1996). Par la suite, SDF-1 a été identifié comme ligand pour le récepteur LESTR/fusin et le récepteur a été classé parmi la famille des récepteurs à chimiokines et renommé CXCR4 en suivant la nomenclature des chimiokines (Bleul et al., 1996).

## 14.2 Structure

Le récepteur CXCR4 présente une structure telle que décrite pour les autres récepteurs à chimiokines (Fig.12). Plus spécifiquement, il a été démontré que la queue C-terminale du récepteur, qui possède la majorité des sites de phosphorylation par les GRKs, est essentielle à l'endocytose du récepteur (Roland et al., 2003). Le résidu arginine du motif DRY situé dans la deuxième boucle intracellulaire, hautement conservé parmi les RCPG, est important pour l'activation des protéines G (Berchiche et al., 2007). Le résidu asparagine à la position 119 situé dans le troisième domaine transmembranaire est également important pour l'activation de la sous-unité G $\alpha$ i ((Zhang et al., 2002). Les signaux transmis par la sous-unité G $\alpha$ i nécessitent une troisième boucle intracellulaire intacte (Roland et al., 2003). Cette boucle contient le motif BBXXB où B est un acide aminé basique et X n'importe quel acide aminé, qui est le déterminant structural pour la fonction de stimulation par la protéine G $\alpha$ i (Okamoto et al., 1990). Toutes les boucles intracellulaires de CXCR4 à l'exception de la première s'avèrent importantes pour la migration cellulaire (Roland et al., 2003).



**Figure 12** Représentation schématique de CXCR4 (Tiré de De Clerq, 2003)

## 14.3 Expression

CXCR4 est exprimé de manière ubiquitaire sur plusieurs types cellulaires incluant la majorité des cellules hématopoïétiques (Bleul et al., 1997). Il est aussi fortement exprimé sur les cellules endothéliales vasculaires (Gupta et al., 1998), les neurones (Hesselgesser et al., 1997), les microglies et les astrocytes (He et al., 1997). CXCR4 est également exprimé dans plusieurs tissus et organes tels que le tissu neural, le muscle squelettique, le cœur, le foie, l'endothélium, le tubule rénal et l'épithélium pigmentaire rétinien.

### 14.3.1 Régulation de l'expression de CXCR4

La transcription basale est principalement contrôlée par l'action de deux régulateurs transcriptionnels. La caractérisation du promoteur de CXCR4 a révélé que nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) est le facteur de transcription qui régule positivement la transcription de

CXCR4 (Moriuchi et al., 1997, Wegner et al., 1998). Le facteur de transcription Sp1 semble également réguler CXCR4 (Wegner et al., 1998). Il existe également un élément de régulation négative en amont (environ - 300) qui serait modulé par le facteur Ying Yang 1 (YY1) (Moriuchi et al., 1999).

L'expression de CXCR4 peut également être induite par des seconds messagers tels que le calcium (Moriuchi et al., 1997), l'AMPc (Cristillo et al., 2002), des cytokines interleukines (Moriuchi et al., 1997, Jourdan et al., 2000, Wang et al., 2001), TGF-1 $\beta$ , la stimulation simultanée de CD3 et CD28 (Moriuchi et al., 1997) et par des facteurs de croissance tels que basic fibroblast growth factor (bFGF) (Feil and Augustin, 1998, Salcedo et al., 1999), vascular endothelial growth factor (VEGF) (Salcedo et al., 1999, Hong et al., 2006) et EGF (Phillips et al., 2005). À l'opposé, les cytokines inflammatoires telles que tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ) et IL-1 $\beta$  diminuent l'expression de CXCR4 (Feil and Augustin, 1998, Gupta et al., 1998, Han et al., 2001).

L'expression de CXCR4 est également régulée par des stress cellulaires tels que l'hypoxie, des dommages tissulaires et une réponse inflammatoire. Le promoteur de CXCR4 possède des éléments de liaison pour hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) qui régulent positivement la transcription de CXCR4 (Schioppa et al., 2003, Ceradini et al., 2004). La transcription de CXCR4 est également positivement régulée par le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B impliqué dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Les sous-unités p65 et p50 de NF- $\kappa$ B lient directement des régions promotrices de CXCR4 (Helbig et al., 2003). De plus, il a été rapporté que l'inhibition de NF- $\kappa$ B réduit l'expression de l'ARNm de CXCR4 dans la lignée cancéreuse de la prostate PC-3 (Kukreja et al., 2005).

L'expression de CXCR4 et de d'autres récepteurs à chimiokines est régulée de manière hormone-dépendante durant les divers stades de cycle menstruel et dans le développement embryonnaire. L'expression de CXCR4 est détectable tout au long du cycle menstruel mais est plus prononcée à la moitié de la phase lutéale. Cela signifie que CXCR4, qui est localisé dans



l'épithélium endométrial, est spécifiquement induit lors de la fenêtre d'implantation. (Dominguez, 2003, Dominguez et al., 2003). L'expression de CXCR4 dans les cellules cancéreuses mammaires serait également régulée par les ERs. Il a été rapporté que le tamoxifène diminue l'expression de CXCR4 au niveau transcriptionnel et protéique dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 (Kubarek et al., 2009). Un autre étude a rapporté que les ERs semblent réguler positivement l'expression de CXCR4 en induisant des modifications post-traductionnelles du récepteur et en induisant la transcription de celui-ci dans des cellules cancéreuses mammaires (Boudot et al., 2011).

## **15 La chimiokine SDF-1**

### **15.1 Identification**

Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) et l'isoforme SDF-1 $\beta$  dérivé par épissage alternatif ont été originalement clonés dans une lignée murine de cellules stromales de la moelle osseuse (Tashiro et al., 1993). Basé sur l'homologie de séquence avec les cytokines IL-8 et macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) et la présence de quatre résidus cystéines, SDF-1 a été classé parmi les chimiokines CXC (Oppenheim et al., 1991). Les séquences d'ADNc de SDF-1 $\alpha$ / $\beta$  présentent une forte homologie entre la souris et l'humain et proviennent du même gène (Jiang et al., 1994). SDF-1 $\alpha$  est constitué de 89 acides aminés incluant un peptide signal de 19 acides aminés (Tashiro et al., 1993 (Jiang et al., 1994, Nagasawa et al., 1994). L'épissage alternatif de l'exon suivant le codon 89 de SDF-1 $\alpha$  produit l'isoforme  $\beta$  qui possède quatre acides aminés de plus dans sa portion C-terminale (Tashiro et al., 1993 (Shirozu et al., 1995). Il ne semble pas y avoir une différence au niveau de la fonction et de la régulation de ces deux isoformes (Shirozu et al., 1995). Un troisième isoforme de SDF-1, SDF-1 $\gamma$ , a été cloné à partir d'une librairie d'ADNc de nerf sciatique de rats adultes (Gleichmann et al., 2000). L'ADNc de SDF-1 $\gamma$  représente la séquence complète en nucléotide de SDF-1 $\beta$  plus une insertion dans le cadre de lecture de 2572 nucléotides en aval

du codon 89, ce qui mène à une extension de 30 acides aminés dans la portion C-terminale (Gleichmann et al., 2000).

## 15.2 Expression

SDF-1 est exprimé dans les cellules stromales et endothéliales. L'ARNm de SDF-1 $\alpha/\beta$  est fortement détecté dans les nodules lymphatiques, la rate, le moelle osseuse, les ovaires, les intestins, le thymus, les reins, les poumons, le cœur, l'estomac et le foie (Shirozu et al., 1995). L'ARNm de SDF-1 $\gamma$  a été détecté dans le cœur, les poumons, le cerveau et le nerf périphérique (Gleichmann et al., 2000). L'expression de SDF-1 $\alpha$  a également été retrouvée en grande quantité dans le système nerveux central du rat en développement et à l'âge adulte, plus précisément dans le cortex, l'hypothalamus et l'hippocampe (Tham et al., 2001). SDF-1 $\beta$  est l'isoforme prédominant dans le tissu nerveux lors du développement embryonnaire et dans les premiers stades de vie alors que SDF-1 $\gamma$  est hautement exprimé dans ce tissu à l'âge adulte. Les neurones et les cellules Schwann seraient les principales sources de SDF-1 $\beta$  et SDF-1 $\gamma$  dans le système nerveux (Gleichmann et al., 2000).

### 15.2.1 Régulation de l'expression de SDF-1

La chimiokine SDF-1 est constitutivement exprimée dans divers tissus et organes contrairement aux autres chimiokines qui sont produites en réponses à des signaux inflammatoires ou qui ont une distribution restreinte (Shirozu et al., 1995). L'activité basale du promoteur est régulée par le facteur de transcription Sp1.

Malgré une activité constitutive, l'expression de SDF-1 peut être induite. Lors de dommages tissulaires ou à des organes, l'expression de SDF-1 est fortement induite pour diriger les cellules souches neurales CXCR4 positives vers les lésions pour la régénération des organes et des tissus (Kucia et al., 2005).

L'expression de SDF-1 peut également être induite suite à un stress cellulaire tel que l'hypoxie. L'expression de SDF-1 est augmentée dans les cellules endothéliales par le facteur HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  lie des sites dans le promoteur de SDF-1 (Ceradini et al., 2004). Des stress cellulaires induits par des agents antimétaboliques comme l'irradiation  $\gamma$  et le *5-Fluorouracile* (5-FU) mènent à une augmentation de la production de SDF-1 dans les cellules de la moelle osseuse (Ponomaryov et al., 2000). Lors d'irradiation, les principaux facteurs de transcription qui semblent être associés avec une réponse transcriptionnelle sont Sp1, AP-1 et PR (García-Moruja et al., 2005).

Des agents mitogènes tels que le phorbol myristate acetate (PMA), l'ionomycine, l'interféron  $\gamma$ , les interleukines 1 $\beta$ , 6 et 7, bFGF et TNF $\alpha$  ont un impact sur l'expression de SDF-1. Toutefois, la régulation de l'activité du promoteur SDF-1 dans ces conditions semble être dépendante du type cellulaire. Deux sites de liaison de Sp1 seraient essentiels pour l'induction de l'activité du promoteur en réponse à des agents mitogéniques. D'autres facteurs de transcription tels que nuclear factor of activated T cells (NFAT), AP-1, AP-2 et EGR-2 sont associés à une augmentation de la prolifération ou de l'hypersensibilité suite à une stimulation mitogénique (García-Moruja et al., 2005). Le facteur de croissance VEGF augmente la transcription de SDF-1 dans des cellules gliales humaines (Hong et al., 2006).

L'expression de SDF-1 est aussi régulée négativement par la protéine suppresseur de tumeurs von Hippel-Lindau (VHL). La perte de fonction de VHL dans les hémangioblastomes et le cancer du rein mène à une augmentation de l'expression de SDF-1. L'expression de SDF-1 est également régulée négativement par des stéroïdes, la cytokine granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) et le facteur de croissance TGF- $\beta$ 1.

## **16 Liaison de SDF-1 à CXCR4**

La région RFFESH de la chimiokine SDF-1 (résidus 12-17) interagit avec la région N-terminale du récepteur CXCR4 (résidus 2-36), ce qui constitue une étape d'ancrage (Huang et

al., 2003). Cette étape entraînerait un changement conformationnel des deux molécules permettant ainsi la liaison des huit premiers résidus de la région N-terminale du SDF-1 à une poche de CXCR4 qui implique la deuxième (Asp187) et la troisième (Glu268) boucle extracellulaire (Brelot et al., 2000, Zhou et al., 2001). Un autre changement de conformation aurait lieu par la suite permettant la signalisation intra-cellulaire du récepteur (Crump et al., 1997). Des résidus glutamine et tyrosine de la région N-terminale de CXCR4 sont requis pour la liaison de SDF-1 mais pas pour son activation. De plus, des résidus acides dans la deuxième boucle extracellulaire et dans les domaines transmembranaires 2 et 7 sont impliqués dans la liaison de SDF-1 et l'activation du récepteur (Brelot et al., 2000).

## **17 Rôles physiologiques de l'axe SDF-1/CXCR4**

L'axe SDF-1/CXCR4 est primordial pour un développement normal. Des souris invalidées pour le gène CXCR4 subissent une mort embryonnaire avec de sévères altérations au niveau du système hématopoïétique, cardiaque, vasculaire et nerveux (Tachibana et al., 1998, Zou et al., 1998). Des études de délétion du gène SDF-1 ont permis de déterminer que celui-ci joue également un rôle important dans le développement embryonnaire. La délétion de SDF-1 dans les souris mène à une mort embryonnaire avec de sévères malformations cardiaques et une diminution du nombre de lymphocytes B (Nagasawa et al., 1996). L'absence de l'axe SDF-1/CXCR4 lors du développement embryonnaire mène à des défauts dans la formation de cellules souches myéloïdes, des dysfonctions cardiaques dues à une altération de la formation du septum ventriculaire et des défauts au niveau du cervelet et de la vasculature du tractus intestinal (Nagasawa et al., 1996, Tachibana et al., 1998, Zou et al., 1998). La délétion de CXCR4 ou SDF-1 présente donc des phénotypes semblables ce qui a longtemps mener au concept que SDF-1 et CXCR4 forment une paire ligand-récepteur spécifique et mutuellement exclusive. Cependant, des résultats récents indiquent que SDF-1 sert aussi de ligand pour le récepteur CXCR7 (Balabanian et al., 2005, Burns et al., 2006).

Chez l'adulte, SDF-1 et CXCR4 sont impliqués dans le homing et la rétention de cellules souches hématopoïétiques et progénitrices dans des niches de la moelle osseuse. Ces cellules expriment fortement CXCR4 et sont attirées par le SDF-1 produit par les cellules

stromales dans des niches de la moelle osseuse (Aiuti et al., 1997). De plus, SDF-1 permet également la rétention des cellules B précurseurs en proximité des cellules stromales dans le microenvironnement hématopoïétique. Son expression est essentielle au développement normal des cellules B (Ma et al., 1999, Egawa et al., 2001). SDF-1 agit aussi comme chimioattractant pour les cellules souches et pour certaines cellules différenciées dans un contexte pathologique d'inflammation ou de régénération/réparation tissulaire (Imitola et al., 2004, Kucia et al., 2005, Gao and Li, 2007, Kajiyama et al., 2007, Moyer et al., 2007).

En plus de son rôle important dans le chimiotactisme, l'activation de CXCR4 par SDF-1 régule également d'autres réponses comme l'invasion cellulaire. L'exposition des cellules à SDF-1 induit l'expression de métalloprotéinases matricielles (MMPs) telles que MMP-2 et MMP-9 (Bartolomé et al., 2004, Hao et al., 2007). De plus, SDF-1 augmente l'adhésion à des composantes de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, la laminine et le collagène de types I/II ou à d'autres types cellulaires, comme les cellules endothéliales ou les cellules stromales de la moelle osseuse (Libura et al., 2002, Cardones et al., 2003, Hartmann et al., 2005). Ces changements sont régulés en grande partie par la signalisation par les intégrines.

Plusieurs études supportent la fonction de SDF-1 dans la survie et la prolifération cellulaire dans plusieurs types cellulaires normaux et malins, incluant les cellules progénitrices hématopoïétiques (Lataillade et al., 2002), les cellules germinales (Molyneaux et al., 2003), les cellules B leucémiques (Burger et al., 2000) et les cellules de carcinome mammaire (Orimo et al., 2005). À l'opposé, SDF-1 peut également entraîner la mort de certains types cellulaires comme les neurones (Hesselgesser et al., 1998). L'activation simultanée de voies anti- et proapoptotique par SDF-1/CXCR4 assurerait une balance afin de bien contrôler la survie cellulaire.

## **18 Signalisation du récepteur à chimiokine CXCR4**

### **18.1 Protéines G dépendante**

Le récepteur CXCR4 est principalement couplé à la sous-unité  $G\alpha_i$  (Fig.13). La majorité de la signalisation et des réponses biologiques engendrées par CXCR4 en réponse à SDF-1 sont sensibles à l'inhibiteur de la protéine Gi (Di Salvo et al., 2000). Toutefois, des études récentes ont démontré que CXCR4 peut s'associer aux autres sous-unités  $G\alpha$  soit  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_{12}$  (Rubin, 2009). L'activation du récepteur CXCR4 par son ligand engendre l'activation de plusieurs voies de signalisation qui mène ultérieurement à la régulation de processus tels que la transcription génique, la migration cellulaire et l'adhésion cellulaire.

L'activation de  $G\alpha_i$  inhibe l'adénylate cyclase et active les tyrosines kinases de la famille Src (Busillo and Benovic, 2007). Src active la cascade MAPK ERK 1/2 en activant MEK. L'activation des kinases ERK 1/2 régule la migration et la prolifération de plusieurs types cellulaire en réponse à SDF-1. ERK 1/2 peut également transloquer dans le noyau et réguler la transcription. Quoique la phosphorylation de ERK 1/2 n'implique pas nécessairement sa translocation dans le noyau, il a été démontré que l'activation de CXCR4 par SDF-1 induit la translocation nucléaire de ERK 1/2 dans le noyau et la phosphorylation du facteur de transcription Elk, qui régule des gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (Zhao et al., 2006).

La sous-unité  $G\alpha_s$  stimule l'adénylate cyclase et la production d'AMPc qui mène à l'activation de PKA et du facteur de transcription CREB. CREB transloque dans le noyau et régule la transcription de gènes cibles.

Les sous-unités  $G\alpha_i$  et  $G\alpha_q$  activent PLC- $\beta$  qui par sa cascade de signalisation mobilise le calcium intracellulaire, produit du diacylglycérol (DAG) et induit l'activation de PKC. Cette voie de signalisation est impliquée dans la réponse chimiotactique et l'adhésion cellulaire (Wang et al., 2000, Palm et al., 2005).

La sous-unité  $G\alpha_{12}$  active les guanine exchange factor (GEFs) pour la famille des guanosine triphosphatases (GTPases) de la famille Rho. Une cible en aval de Rho est Rho-

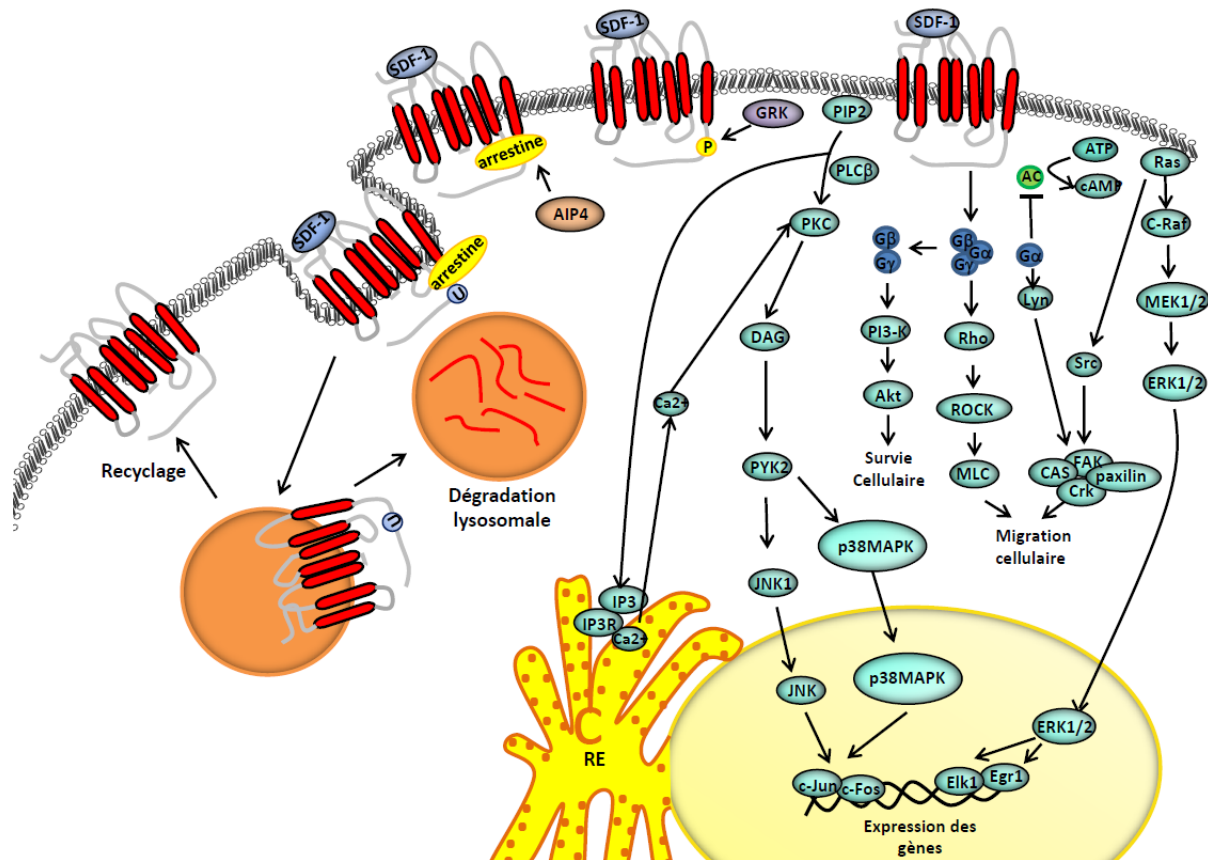
dependent coiled-coil kinase (ROCK) qui active la myosine II non-musculaire stimulant ainsi la migration cellulaire (Bastian et al., 2005).

L'activation de la sous-unité  $G\alpha$  libère le dimère  $G\beta\gamma$ . En réponse à SDF-1, les sous-unités  $G\beta\gamma$  activent la voie PI3-K/Akt qui promouvoit la survie cellulaire. L'activation de PKC $\zeta$ , indépendante du calcium et du DAG et activée par PI3-K, régule la motilité, l'adhésion et la prolifération cellulaire. Elle est impliquée dans la polymérisation des filaments d'actine et la formation de pseudopodes (Petit et al., 2005) et dans la signalisation médiée par les intégrines et proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) (Mallat, 2008). De plus, elle active ERK 1/2 et augmente la sécrétion de la métalloprotéase matricielle MMP-9, une enzyme de dégradation de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi la chimio-invasion cellulaire (Urtreger et al., 2005). L'activation de PI3-K est également impliquée dans le chimiotactisme, par l'activation de petites protéines G dont Rho, Rac et cell division control protein 42 (Cdc42) qui sont importantes dans la modification du cytosquelette (Bug et al., 2002) et via l'activation de PKC $\zeta$  (Mallat, 2008). De plus, l'activation de PI3-K engendre également l'activation de la cascade MAPK ERK 1/2. CXCR4 induit également l'activation des intégrines à la surface des cellules immunitaires (Ley et al., 2007). Les intégrines jouent un rôle important dans le chimiotactisme en favorisant le contact cellule-cellule (Ley et al., 2007). La stimulation de CXCR4 par SDF-1 augmente également la phosphorylation de la tyrosine kinase cytoplasmique Pyk2 qui régule les kinases d'adhésion focaux FAK, CT10 regulator of kinase (Crk) et paxilline (Ganju et al., 1998). Ces points d'adhésion focaux sont des points d'ancrage du cytosquelette avec la matrice cellulaire et permettent de réguler la migration cellulaire. SDF-1 induit également l'activation de NF- $\kappa$ B via la voie PI3K/Akt (Ganju et al., 1998). NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription important pour l'expression de gène proviral du VIH (Nabel and Baltimore, 1987). Il régule la transcription des gènes, dont l'expression de plusieurs chimiokines en s'associant au promoteur de ceux-ci (Oliveira et al., 1994) et est associé à la survie cellulaire (Beg and Baltimore, 1996, Wang et al., 1996). L'activation de NF- $\kappa$ B régule également l'expression des MMPs (Ganju et al., 1998).

SDF-1/CXCR4 activent également les tyrosines phosphatases CD45 (Okabe et al., 2006) et SHP2 (Chernock et al., 2001). La phosphatase CD45 régule l'activité des protéines de la famille Cbl, qui servent de molécules adaptatrices et qui sont rapidement phosphorylées sur des résidus tyrosines par des membres de la famille Src suite à la stimulation de récepteurs membranaires. Ces protéines exercent un rôle fonctionnel dans la migration des cellules en réponse à SDF-1 (Okabe et al., 2006). En plus de son activité tyrosine phosphatase, la protéine SHP2 peut servir de molécule adaptatrice. Il a été démontré que small heterodimer partner 2 (SHP2) s'associe avec SHIP, cbl et fyn suite à la stimulation par SDF-1. Ce complexe régule la réponse chimiotactique induit par SDF-1 (Chernock et al., 2001).

La terminaison de la signalisation par les protéines G est régulée par la liaison de la  $\beta$ -arrestine au récepteur. L'encombrement stérique apporté par la présence de la  $\beta$ -arrestine empêcherait le couplage ultérieur des protéines G au récepteur.





**Figure 13** Signalisation du récepteur CXCR4 (Adapté de Debnath et al, 2013)

## 18.2 Protéines G-indépendante

### 18.2.1 $\beta$ -arrestines

Le récepteur internalisé, quoique découplé des protéines G, peut encore induire une signalisation. Les arrestines peuvent agir comme protéines adaptatrices pour plusieurs molécules signalétiques (Krupnick and Benovic, 1998). Il a été rapporté que  $\beta$ -arrestine 1 et 2 peuvent induire l'activation de ERK 1/2 médiée par CXCR4 (Cheng et al., 2000). La co-expression du mutant dominant négatif de la  $\beta$ -arrestine 2  $\beta$ 2V54D avec CXCR4 dans les

cellules HEK 293 altère l'internalisation et mais également l'activation de ERK 1/2 (Cheng et al., 2000). Une étude récente a révélé la  $\beta$ -arrestine 1 serait principalement impliquée, avec GRK3 et GRK6, dans la régulation positive de la voie ERK 1/2. À l'opposé, GRK2 régulerait négativement la voie ERK 1/2 (Busillo et al., 2010). La  $\beta$ -arrestine 2 est également impliquée dans l'activation de MAPK p38 et la migration cellulaire suite à une stimulation par SDF-1 (Sun et al., 2002). L'activation de la kinase p38 est également impliquée dans la régulation de la survie cellulaire en favorisant une réponse proapoptotique (Vlahakis et al., 2002).

### **18.2.2 JAK/STATS**

L'activation de la voie Janus kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT) par CXCR4 représente un mécanisme indépendant des protéines G (VILA-CORO et al., 1999). SDF-1 induit l'association transitoire de JAK2 et JAK3 avec CXCR4 menant à l'activation et la translocation nucléaire des protéines STAT. L'activation de la voie JAK/STAT est un processus protéine G indépendant mais le pré-traitement avec l'inhibiteur de la sous-unité  $G_i$ , PTX, prolonge l'association de JAK avec CXCR4 (VILA-CORO et al., 1999). Cette observation suggère que le couplage du récepteur aux protéines G est impliqué dans le recyclage du complexe JAK/STAT-CXCR4.

## **19 Modulation de l'activité de CXCR4**

### **19.1 Protéolyse du récepteur CXCR4 et de son ligand SDF-1**

Le récepteur CXCR4 est sujet à la dégradation protéolytique par diverses protéases exprimées dans le microenvironnement hématopoïétique et dans le sérum, telles que la cathepsine G, l'élastase et la dipeptidylpeptidase (Lapidot et al., 2005).

Lors d'une réponse inflammatoire, la cathepsine G et l'élastase relâchées par les neutrophiles ont l'habileté de cliver des résidus de la portion N-terminale de SDF-1 nécessaires

à l'interaction avec CXCR4 (Delgado et al., 2001, Valenzuela-Fernández et al., 2002). De plus, la protéase CD26 (dipeptidase 26) exprimée à la surface cellulaire peut également cliver et inactiver SDF-1 (Christopherson et al., 2002).

## **19.2 Modifications post-traductionnelles**

### **19.2.1 Glycosylation**

Plusieurs modifications apportées à CXCR4 régulent sa fonction. On retrouve deux sites de N-glycosylation, Asn11 et Asn176, dans le domaine extracellulaire de CXCR4 (Berson et al., 1996). Les deux sites sont glycosylés dans les cellules d'insectes Sf9 (Zhou and Tai, 1999) mais seulement le site Asn11 semble être glycosylé dans les cellules de mammifères (Chabot et al., 2000). La substitution de Asn11 en glutamine ou leucine altère la liaison de SDF-1 et diminue la transduction du signal (Zhou and Tai, 1999, Wang et al., 2004).

### **19.2.2 Sulfatation**

CXCR4 possèdent trois résidus tyrosines extracellulaires, Tyr7, Tyr12 et Tyr21, qui représentent des sites de sulfatation. Cette modification est catalysée par la protéine tyrosyl sulfotransférase de la face trans du réseau de Golgi. Cette modification est importante pour la liaison de SDF-1 (Farzan et al., 2002). La tyrosine 21 sulfatée lie un site spécifique sur SDF-1 (Veldkamp et al., 2006).

### **19.2.3 Phosphorylation**

L'activation des RCPGs par leurs ligands initie la phosphorylation de résidus sérines/thréonines dans la troisième boucle intracellulaire ou dans la queue C-terminale par des GRKs (G-protein receptor kinase). La phosphorylation par le ligand entraîne une désensibilisation homologue du récepteur. Elle engendre la liaison de  $\beta$ -arrestine 2 et/ou  $\beta$ -arrestine 3, permet la terminaison de la signalisation protéines G-dépendante et mène souvent

à l'internalisation du récepteur (Krupnick and Benovic, 1998). Plusieurs RCPGs subissent également un processus appelé désensibilisation hétérologue, qui est régulée par l'activation de seconds messagers comme PKA et PKC.

### **19.2.3.1 Phosphorylation ligand dépendante de CXCR4**

Suite à l'activation par SDF-1, CXCR4 est rapidement phosphorylé et internalisé (Haribabu et al., 1997, Signoret et al., 1997, (Signoret et al., 1998, Orsini et al., 1999). L'élimination de la queue C-terminale de CXCR4, qui contient 15 serines et 3 thréonines, empêche la phosphorylation induite par SDF-1, augmente l'activité du récepteur et atténue l'internalisation du récepteur (Haribabu et al., 1997, Signoret et al., 1997). La substitution des serines 338 et 339 en alanine ainsi que l'élimination de 7 acides aminés de la queue C-terminale comprenant les serines 346, 347, 348, 351 et 352 réduisent la phosphorylation de CXCR4 par SDF-1 (Orsini et al., 1999). La mutation des serines 338 et 339 réduit également l'internalisation de CXCR4 en réponse à SDF-1. Un anticorps spécifique pour la phospho-Ser339 de CXCR4 a révélé une augmentation de la phosphorylation de la serine 339 en réponse à SDF-1 (Woerner et al., 2005). La mutation de la serine 341 réduit également la phosphorylation et l'internalisation de CXCR4 en réponse à SDF-1 (Benovic, 2007, Busillo and Benovic, 2007).

Jusqu'à tout récemment, les GRK responsables de la phosphorylation de CXCR4 en réponse à SDF-1 n'avaient pas été identifiées. Une étude a révélé l'identité des GRK impliquées dans la phosphorylation de résidus serines du domaine N-terminale de CXCR4 en réponse à son ligand. Les serines 324/325 sont rapidement phosphorylées par PKC et GRK6 en réponse à SDF-1, alors que la serine 339 est spécifiquement phosphorylée par GRK6. La serine 330 serait aussi phosphorylée par GRK6 mais avec une cinétique plus lente (Busillo et al., 2010).

SDF-1 induit également la phosphorylation de CXCR4 sur des résidus tyrosines (VILA-CORO et al., 1999). La phosphorylation tyrosine servirait à promouvoir l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT (VILA-CORO et al., 1999, Zhang et al., 2001(Zhang et al., 2001)

### **19.2.3.2 Phosphorylation ligand indépendant**

#### **19.2.3.2.2 Phosphorylation par PKC**

L'analyse de la séquence de la portion C-terminale de CXCR4 suggère la présence de plusieurs sites potentiels de phosphorylation par PKC. L'activation directe de PKC par l'utilisation de PMA entraîne une phosphorylation (Haribabu et al., 1997) et une internalisation de CXCR4 (Signoret et al., 1997, Signoret et al., 1998, Orsini et al., 1999). Il a été démontré que le traitement par PMA augmente la phosphorylation de la serine 339 de CXCR4 (Woerner et al., 2005).

#### **19.2.3.2.3 Phosphorylation par des facteurs de croissance**

Des études ont démontré que certains facteurs de croissance induisent la phosphorylation de CXCR4 en absence de son ligand. Le traitement de la lignée de cellules de glioblastome LN428 GBM à l'EGF augmente la phosphorylation de la serine 339 (Woerner et al., 2005). Le facteur de croissance héréguiline, qui lie le récepteur à activité tyrosine kinase ErbB3, augmente la phosphorylation en tyrosine et des serines 324/325 ainsi que 330 de CXCR4 dans des lignées cancéreuses mammaires. Cette phosphorylation est dépendante de ErbB3 et de l'activité de EGFR (Sosa et al., 2010). Ces études suggèrent que la signalisation de CXCR4 peut être régulée de manière ligand-indépendante par un mécanisme de transphosphorylation par des récepteurs à activité tyrosine kinase.

## **20 Internalisation et dégradation de CXCR4**

Les arrestines non visuelles (arrestines 2 et 3 ou  $\beta$ -arrestines 1 et 2) servent de molécules adaptatrices dans l'endocytose de RCPGs en interagissant avec la clathrine (Goodman et al., 1996), AP2 (Laporte et al., 1999) et des phosphoinositides (Gaidarov et al., 1999), ce qui dirige le récepteur vers un puits de clathrine. Les RCPGs peuvent aussi être internalisés via des rafts lipidiques ou des cavéoles (Neel et al., 2005).

Suite à son activation par SDF-1, CXCR4 est rapidement phosphorylé et endocyté dans un puits de clathrine (Neel et al., 2005). L'activation de PKC induit également l'internalisation de CXCR4 (Signoret et al., 1997, Signoret et al., 1998, Orsini et al., 1999). Le domaine C-terminal de CXCR4 serait impliqué dans l'internalisation en réponse à SDF-1 (Signoret et al., 1997) et à PMA, un activateur de PKC (Haribabu et al., 1997, Signoret et al., 1997). Les résidus requis pour l'internalisation en réponse au ligand seraient : Ser324, 325, 330, 338, 339, Ile328, Leu329 et Lys331 (Futahashi et al., 2007). La mutation de certains sites de phosphorylation dans la partie C-terminale du récepteur diminue l'internalisation de CXCR4 en réponse à SDF-1 et PMA (Signoret et al., 1998, Orsini et al., 1999). La substitution des serines 324/325 et 338/339 situées dans la queue C-terminale en alanine diminue l'internalisation de CXCR4 par SDF-1 et PMA (Signoret et al., 1998).

La  $\beta$ -arrestine joue un rôle important dans l'internalisation du récepteur CXCR4 (Cheng et al., 2000). La queue C-terminale de CXCR4 ne serait toutefois pas critique pour l'internalisation du récepteur médiée par  $\beta$ -arrestine (Cheng et al., 2000). Il a été démontré *in vitro* que la  $\beta$ -arrestine interagit avec la portion C-terminale mais également avec la troisième boucle intracellulaire de CXCR4 (Cheng et al., 2000). Ce résultat suggère que la  $\beta$ -arrestine régule peut-être l'internalisation de CXCR4 via l'implication de plus d'un domaine.

Malgré le fait que le ligand de CXCR4 et l'activation de PKC mènent à l'internalisation de CXCR4, des différences dans la régulation de l'endocytose dans ces deux conditions ont été observées. Il a été rapporté qu'un motif Ser/Ile/Leu serait requis l'internalisation du

récepteur par PMA mais pas par le ligand (Signoret et al., 1998). De plus, la  $\beta$ -arrestine ne serait pas impliquée dans l'internalisation médiée par PKC, contrairement à SDF-1 (Orsini et al., 1999). Ensuite, le domaine C-terminal de CXCR4 serait critique pour l'internalisation en réponse à PMA alors qu'il semble jouer un rôle partiel pour l'internalisation par SDF-1 (Haribabu et al., 1997).

Le récepteur CXCR4 serait également constitutivement internalisé en absence de stimulation (Tarasova et al., 1998, Futahashi et al., 2007). Un motif déterminé soit Ser344-Glu345-Ser346 et les 17 derniers acides aminés du domaine C-terminal seraient responsables de l'internalisation ligand-indépendante de CXCR4 (Futahashi et al., 2007).

Suite à l'internalisation de CXCR4, la vésicule endocytée fusionne avec l'endosome précoce. À ce stade, un récepteur peut être recyclé à la membrane plasmique et être resensibilisé ou transporté dans les lysosomes et dégradé ce qui mène à une atténuation à long terme de la signalisation (Marchese et al., 2003). Suite à l'activation par SDF-1, CXCR4 est rapidement ubiquitiné et dégradé en empruntant la voie lysosomale (Tarasova et al., 1998). L'ubiquitination de CXCR4 jouerait un rôle dans le transport endocytaire vers la voie lysosomale. Un motif de dégradation (SSLKILSKGK) a été identifié dans le domaine C-terminal de CXCR4. La substitution des trois lysines présentes dans ce motif (K327/331/334) inhibe complètement la dégradation du récepteur. La E3 ubiquitine ligase atrophia-1-interacting protein 4 (AIP4) a été identifiée comme étant impliquée dans l'ubiquitination de CXCR4 (Marchese et al., 2003). La mutation des serines 324-325 (Signoret et al., 1998) et 330 (Marchese and Benovic, 2001) affecte également la dégradation de CXCR4 par le ligand. Le sort de CXCR4 en réponse à l'activation par PKC serait différent de celui réservé en réponse au ligand. Il a été démontré que CXCR4 est recyclé suite à son internalisation engendrée par PKC (Signoret et al., 1997).

La dégradation de CXCR4 en réponse à son ligand peut être contrée dans certains contextes. Suite à forte stimulation de la voie PI3-K, la protéine kinase cytokine-independent survival kinase (CISK) est activée en aval de la protéine kinase PI3-K-dependent kinase 1 (PDK1) à la surface de l'endosome et régule négativement la dégradation lysosomale de CXCR4. Suite à son activation, CISK interagit et inhibe la E3 ubiquitine ligase AIP4 à la surface de l'endosome et prévient la dégradation de CXCR4 en réponse à son ligand en inhibant le transit de l'endosome précoce aux lysosomes (Slagsvold et al., 2006). Par ailleurs, la surexpression du récepteur à activité tyrosine kinase ErbB2 dans des lignées cancéreuses mammaires favorise la réexpression de CXCR4 en réponse à SDF-1 (Li et al., 2004). La protéine sérine/thréonine kinase PIM1 agit également en favorisant le recyclage de CXCR4 dans des blastes leucémiques primaires en réponse à SDF-1 (Grundler et al., 2009).

## **21 Rôles de l'axe SDF-1/CXCR4 dans des pathologies**

### **21.1 Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)**

En 1996, le récepteur CXCR4 a été identifié comme second récepteur, après CD4, pour l'entrée du VIH-1 (Feng et al., 1996). Un an après, c'était au tour de CCR5 d'être identifié comme deuxième co-récepteur du VIH. La protéine virale gp120 interagit avec la glycoprotéine CD4 et un co-récepteur soit CXCR4 ou CCR5, ce qui permet à l'enveloppe virale de fusionner avec la membrane plasmique et permettre l'entrée du virus dans la cellule (Clapham, 1997, Kwong et al., 1998).

La liaison entre le récepteur CXCR4 et son ligand SDF-1 inhibe l'entrée des souches T-tropique (Oberlin et al., 1996, Clapham, 1997). L'inhibition de l'entrée du VIH-1 par SDF-1 est indépendante de la signalisation par les protéines G et est attribuable à l'occupation du récepteur et de son internalisation engendrées par le ligand (Amara et al., 1997, Haribabu et al., 1997, Signoret et al., 1997).

### **21.2 Syndrome de WHIM**



Le syndrome Warts, Hypogammaglobulinemia, Immunodeficiency, and Myelokathexis (WHIM) est un désordre hématologique où l'on observe une rétention des neutrophiles matures dans la moelle osseuse et où l'abondance ou la fonction des cellules T et B est déficiente (Kawai and Malech, 2009). En analysant le gène codant pour CXCR4, une mutation a été décelée. Une partie du domaine C-terminal (19 a.a) de CXCR4 est tronquée (Hernandez et al., 2003). Des cellules lymphoblastoïdes présentant cette mutation démontrent une mobilisation de calcium plus importante que les cellules contrôles en réponse à SDF-1. Cette mutation engendre donc une signalisation dérégulée du récepteur CXCR4 (Hernandez et al., 2003). De plus, il a été démontré que le récepteur CXCR4 présentant cette mutation ne recrute pas efficacement GRK6 et la  $\beta$ -arrestine 2 ce qui ralentit la désensibilisation et l'internalisation du récepteur (McCormick et al., 2009).

### **21.3 Cancer du sein**

En 2001, une étude a démontré que les cellules tumorales ne font pas que se déplacer aléatoirement dans l'organisme mais sont influencées par des signaux qui déterminent leur comportement migratoire. Cette étude a mise en évidence l'implication des récepteurs à chimiokines dans la progression métastatique du cancer du sein. Plus spécifiquement, l'axe SDF-1/CXCR4 a été identifiée comme jouant un rôle important dans le processus métastatique du cancer du sein, particulièrement dans la formation de métastases au niveau des poumons (Muller et al., 2001). Le ligand de CXCR4, SDF-1, est exprimé à des niveaux élevés dans les sites secondaires métastatiques du cancer du sein, principalement les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et les os. Il a été rapporté que le récepteur CXCR4 est fortement exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires, les tumeurs mammaires malignes et les métastases (Muller et al., 2001). Le niveau d'expression de CXCR4 est très bas ou absent dans l'épithélium mammaire normal (Schmid et al., 2004). Toutefois, les niveaux de CXCR4 augmentent avec la progression du cancer passant de l'hyperplasie atypique au cancer invasif (Allinen et al., 2004). Dans les cellules cancéreuses mammaires, l'activation de CXCR4 par SDF-1 augmente la polymérisation d'actine et la formation de pseudopodes menant à la migration des cellules et ultérieurement à la formation de métastases dans les

environnements riches en SDF-1. Une étude a mis en évidence que l'inhibition de l'interaction entre CXCR4 et SDF-1 réduit considérablement la formation de métastases dans un modèle animal (Ji-Kun et al., 2008). La déplétion de CXCR4 par interférence à l'ARN altère sévèrement la formation de métastases dans un modèle animal de cancer du sein (Liang et al., 2005).

Plusieurs études ont confirmé que l'augmentation de l'expression de CXCR4 dans les cellules cancéreuses mammaires est associée avec une augmentation du potentiel métastatique. Toutefois, il a été rapporté que CXCR4 n'est pas seulement associé à la progression métastatique des cellules cancéreuses mammaires dans des sites secondaires, mais joue également un rôle dans les étapes initiales de l'intravasation de la cellule tumorale et la dissémination à partir du site primaire de la tumeur (Fig.14). L'activation de CXCR4 stimule la production de métalloprotéases matricielles qui favoriserait la chimio-invasion de la tumeur du site primaire à travers les cellules endothéliales vers la circulation sanguine (Fernandis et al., 2004, Samara et al., 2004). De plus, la signalisation par SDF-1 augmente l'activité des intégrines ce qui favoriserait l'adhésion des cellules tumorales à la vascularisation (Campbell et al., 1998). Plus récemment, une étude a démontré que CXCR4 est requis pour la migration des cellules cancéreuses mammaires du site primaire vers la membrane basale. Il est aussi impliqué dans la migration transendothéliale via l'activation de la petite GTPase Rho (Hiroshi et al., 2011). Les conditions hypoxiques augmentent l'expression de CXCR4 à la surface des tumeurs mais également l'expression de SDF-1 par les cellules endothéliales stimulant ainsi la migration transendothéliale vers un gradient de SDF-1 (Jin et al., 2012). Ces résultats démontrent que CXCR4 est impliqué dans les étapes initiales du processus métastatique.

Une source de SDF-1 est retrouvée dans le microenvironnement du site primaire de la tumeur qui favorise le recrutement d'autres types cellulaires augmentant la formation des tumeurs. Les cellules stromales présentes dans la tumeur primaire sont une source importante de SDF-1. Les macrophages associés aux tumeurs activent un type cellulaire particulier, les myofibroblastes, qui sécrètent SDF-1. Les cellules endothéliales progénitrices (CEP) quant à elles expriment CXCR4. Le recrutement des CEPs à la tumeur primaire dû à la présence de SDF-1 au niveau du site primaire promouvoit l'angiogénèse et la croissance tumorale. Par

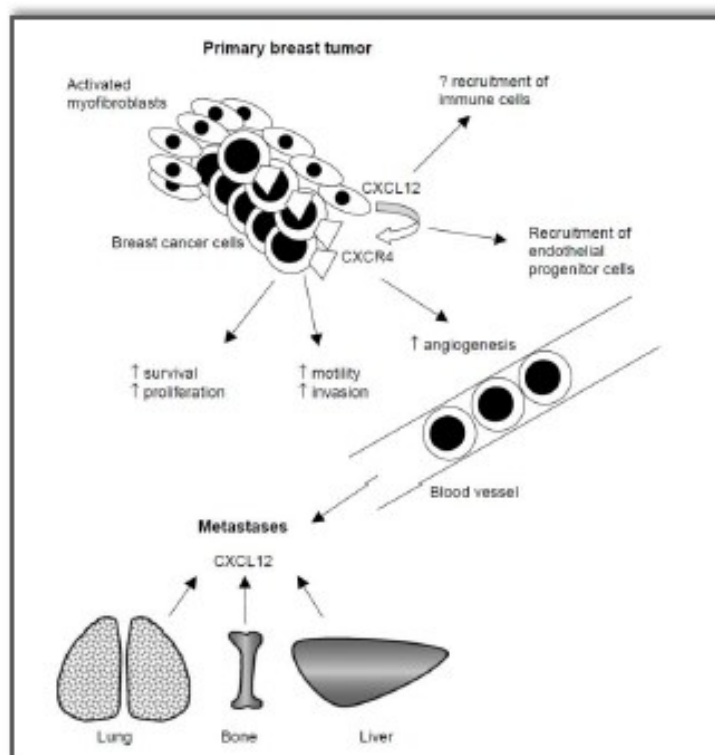
ailleurs, des études ont rapporté que l'estrogène augmente l'expression de SDF-1 dans des cellules cancéreuses mammaires et ovariennes ER positives (Hall and Korach, 2003) et dans une lignée endométriale ER positive (Kubarek and Jagodzinski, 2007), ce qui suggère qu'une cellule cancéreuse, en réponse à un stimulus, peut produire par elle-même du SDF-1. MIS (Mullerian-inhibiting substance), un membre de la famille TGF- $\beta$ , induit également l'expression de SDF-1 dans des cellules cancéreuses mammaires (Gupta et al., 2007). Ces résultats démontrent que les cellules cancéreuses peuvent représenter une source de SDF-1. Les cellules cancéreuses CXCR4 positives peuvent donc répondre au SDF-1 qu'elles autoproduisent en plus du SDF-1 présent dans le microenvironnement de la tumeur et dans les sites secondaires.

CXCR4 est également impliqué dans la prolifération et la survie de cellules cancéreuses mammaires. Dans un modèle animal où l'on a implanté des cellules cancéreuses mammaires murines dans le tissu adipeux mammaire, l'expression de CXCR4 s'est avérée essentielle pour la croissance des tumeurs. Les tumeurs issues de cellules dont l'expression de CXCR4 a été réduite par interférence à l'ARN avaient une croissance beaucoup plus lente que les tumeurs issues de cellules contrôles (Smith et al., 2004). L'expression stable de l'interférence à l'ARN dirigé contre CXCR4 a même mené à une régression complète des tumeurs. Des résultats similaires ont été observés avec la lignée cancéreuse mammaire humaine MDA-MB-231. La déplétion de CXCR4 a entraîné une division cellulaire plus lente comparativement à la lignée parentale en culture et n'a pas induit de tumeurs dans un modèle murin (Lapteva et al., 2004). L'impact de CXCR4 sur la croissance tumorale serait en partie dépendant de l'effet pro-angiogénique exercé par SDF-1/CXCR4. Bloquer l'interaction entre CXCR4 et SDF-1 à l'aide d'anticorps neutralisants diminue la croissance tumorale dans un modèle animal de xenogreffe en partie en réduisant le nombre de vaisseaux sanguins à l'intérieur de la tumeur (Darash-Yahana et al., 2004). La prolifération de cellules cancéreuses ovariennes et mammaires ER positive en réponse à l'estrogène est inhibée par la neutralisation du récepteur CXCR4, ce qui suggère que l'axe SDF-1/CXCR4 est impliqué dans la croissance hormonale des cellules cancéreuses mammaires (Hall and Korach, 2003). Ces résultats supportent l'implication de CXCR4 dans l'initiation du processus tumoral.

Il a aussi été rapporté que CXCR4 peut jouer un rôle dans les cellules cancéreuses mammaires indépendamment de son ligand SDF-1 en coopérant avec d'autres récepteurs. Il a été démontré que la surexpression du récepteur à activité tyrosine kinase ErbB2 dans des cellules cancéreuses mammaires augmente l'expression de CXCR4 en augmentant sa transcription et en réprimant sa dégradation en réponse au ligand (Li et al., 2004). L'augmentation de l'expression de CXCR4 s'est avérée importante dans la migration, l'invasion et l'adhésion de ces cellules surexprimant ErbB2 *in vitro*. De plus, l'augmentation de CXCR4 est requise pour la formation de métastases au niveau pulmonaire induite par des cellules tumorales mammaires exprimant des hauts niveaux de ErbB2 (Li et al., 2004). Une autre étude a démontré que l'activation de la GEF P-Rex1 et la migration de cellules cancéreuses mammaires en réponse au facteur de croissance héréguiline, le ligand du récepteur à activité tyrosine kinase ErbB3, sont partiellement inhibées par la déplétion de CXCR4 (Sosa et al., 2010). Il a également été rapporté que la migration de cellules cancéreuses mammaires en réponse à l'activation du récepteur IGF-1R par IGF-1 est partiellement inhibée par la déplétion de CXCR4 (Akekawatchai et al., 2005).

D'autres cancers non-hématologiques ont été décrits comme exprimant CXCR4. L'activation de CXCR4 par SDF-1 induit la migration et/ou la survie de cellules néoplasiques incluant entre autre les cellules tumorales de néoplasie du cerveau (Zhou et al., 2002, Rubin et al., 2003), les cellules de neuroblastomes (Geminder et al., 2001), le cancer colorectal (Zeelenberg et al., 2003), le cancer de la prostate (Wang et al., 2005), le mélanome (Scala et al., 2005), le carcinome à cellules rénales et le cancer de l'ovaire (Scotton et al., 2002).

Il s'avère important de trouver des alternatives pour inhiber la signalisation engendrée par l'axe CXCR4/SDF-1. Le composé le mieux étudié pour inhiber l'interaction CXCR4-SDF-1 est l'antagoniste de CXCR4 AMD3100. Ce composé a déjà fait ses preuves en diminuant le potentiel métastatique dans un modèle animal (Ji-Kun et al., 2008). L'efficacité de l'AMD3100 et de d'autres antagonistes et inhibiteurs de CXCR4 dans la prévention du cancer sont présentement testés en essai clinique (ClinicalTrials. Gov identifier : NCT01120457).



**Figure 14** Fonctions de CXCR4 et SDF-1 dans le cancer du sein (Tiré de Luker and Luker, 2006)

## 22 CXCR7, un deuxième récepteur pour la chimiokine SDF-1

### 22.1 Identification

CXCR7 a été cloné en 1989 à partir d'une librairie d'ADNc de chien, d'où son nom original Receptor Dog cDNA (RDC1) (Libert et al., 1989). Les séquences chez l'humain et le chien présentent plus de 90% d'homologie. L'analyse de la séquence a indiqué que RDC1 appartient à la famille des récepteurs à sept passages transmembranaires (Libert et al., 1990). D'abord considéré comme un récepteur orphelin, des études ont plus tard démontré que la chimiokine SDF-1 sert de ligand au récepteur CXCR7 (Balabanian et al., 2005, Burns et al., 2006). Le chimiokine Interferon inducible T-cell alpha chemoattractant (ITAC), un ligand naturel de CXCR3, est également un ligand pour CXCR7 (Burns et al., 2006). De plus, il a

également été rapporté que l'antagoniste de CXCR4, l'AMD3100, est aussi un ligand de CXCR7 (Kalatskaya et al., 2009).

## 22.2 Expression

CXCR7 est exprimé dans des tissus embryonnaires, juvéniles et adultes. Toutefois, l'expression de CXCR7 est plus abondante dans les cellules néoplasiques transformées et les cellules embryonnaires (Thelen and Thelen, 2008). On retrouve CXCR7 dans plusieurs types de cellules tumorales humaines et murines, cellules endothéliales activées et cellules du foie fœtal. À l'opposé, les cellules non-transformées expriment peu de la protéine CXCR7 à leurs surfaces (Burns et al., 2006). Contrairement à l'expression protéique, l'ARNm de CXCR7 est détectable dans des tissus sains comme le cœur, le cerveau, la rate, les reins, les poumons, la vessie, les muscles squelettiques, les îlots de Langerhans, le cartilage, la membrane synoviale, les testicules et les ovaires (Autelitano, 1998, Martínez et al., 2000, Jones et al., 2006, Gerrits et al., 2008). Dans le système hématopoïétique, CXCR7 est exprimé dans les neutrophiles, les monocytes et les cellules B (Balabanian et al., 2005, Infantino et al., 2006, Sierro et al., 2007). L'expression de CXCR7 dans les cellules B régule leurs différenciations en plasmocytes (Sierro et al., 2007). CXCR7 est également fortement exprimé dans le cerveau plus particulièrement dans les cellules neuronales, astrogliales et vasculaires (Schönemeier et al., 2008). Une étude effectuée à partir de lymphocyte T a révélé que la majorité de CXCR7 est présent dans un compartiment intracellulaire (endosome) (Hartmann et al., 2008).

## 22.3 Signalisation

CXCR7 présente la caractéristique spéciale de ne pas engendrer de signalisation G $\alpha$ i dépendante, même s'il interagit de manière constitutive avec cette dernière (Levoye et al., 2009). De plus, il ne possède pas la séquence DRYLAIV conservée chez la majorité des récepteurs aux chimiokines (Thelen and Thelen, 2008), qui est responsable du couplage à la protéine G $\alpha$ i et de l'induction du flux calcique.

Malgré le fait que CXCR7 ne semble pas signaler de manière classique comme les autres récepteurs à chimiokines, il a été rapporté que son interaction avec SDF-1 et ITAC induit son internalisation dans les lymphocytes T (Balabanian et al., 2005). Il a été démontré que l'activation de CXCR7 entraîne le recrutement de  $\beta$ -arrestine 2 (Kalatskaya et al., 2009, (Zabel et al., 2009). Le recrutement de  $\beta$ -arrestine 2 à CXCR7 engendre l'activation de la voie MAPK ERK1/2 (Gravel et al., 2010) (refs Zabel 2009, Gravel 2010, (Rajagopal et al., 2010). L'activation de ERK1/2 mais également Akt par CXCR7 dans diverses cellules cancéreuses a été démontré par plusieurs études (Sierro et al., 2007, Wang et al., 2008, Grymula et al., 2010, Miekus et al., 2010). Toutefois, une étude a démontré que dans les lymphocytes T, l'activation de CXCR7 par SDF-1 et ITAC n'engendre pas la phosphorylation des kinases ERK 1/2 et Akt (Hartmann et al., 2008).

Le récepteur CXCR7 régulerait également la signalisation de CXCR4. Puisque CXCR7 lie SDF-1 avec dix fois plus d'affinité que CXCR4, il a initialement été décrit comme un récepteur 'decoy' (Haraldsen and Rot, 2006, Boldajipour et al., 2008). Cette possibilité a été postulée basée sur une étude portant sur la migration des cellules germinales primordiales (PGCs) dans le poisson zèbre. Les PGCs expriment CXCR4 et migrent vers les crêtes génitales en réponse à un gradient de SDF-1. L'expression de CXCR7 n'est pas détectée sur les PGCs mais plutôt sur les cellules environnantes (Boldajipour et al., 2008). Dans ce contexte, les cellules somatiques exprimant CXCR7 lient et séquestrent une partie du SDF-1, procurant un gradient optimal pour faciliter le chimiotactisme et guider les PGCs (Boldajipour et al., 2008).

Une étude suggère que CXCR7 pourrait également agir comme protéine adaptatrice pour des molécules spécialisées dans l'activation rapide des intégrines par CXCR4 en réponse à SDF-1 (Hartmann et al., 2008). Cette hypothèse est basée sur l'observation que dans les lymphocytes T CD34+, qui expriment CXCR4 et CXCR7, la disponibilité de CXCR7 augmente l'activation d'intégrines par SDF-1/CXCR4 (Hartmann et al., 2008).

D'autres études ont affirmé que CXCR7 peut avoir un impact sur la signalisation de CXCR4 en potentialisant l'activation de certaines voies. Des analyses par Förster resonance

energy transfer (FRET) ont révélé l'hétérodimérisation de CXCR7 et CXCR4 dans des cellules HEK 293 en réponse à SDF-1 (Sierro et al., 2007, Levoye et al., 2009). La présence de CXCR7 inhibe l'activation de la protéine G $\alpha$ i et la mobilisation de calcium intracellulaire induite par CXCR4 (Levoye et al., 2009). Un autre groupe a observé que la co-expression de CXCR7 et CXCR4 dans des cellules HEK 293 entraîne un plus fort flux calcique et une phosphorylation plus soutenue de MAPK ERK1/2 en réponse à SDF-1 comparativement aux cellules exprimant seulement CXCR4 (Sierro et al., 2007). Il a été démontré auparavant qu'un hétérodimère de récepteurs à chimiokine peut activer un plus large éventail de voies intracellulaires qu'un récepteur seul (Mellado et al., 2001, Décaillot et al., 2011). Les résultats décrits pour CXCR7 et CXCR4 suggèrent que l'hétérodimérisation permet une réponse plus soutenue d'une voie intracellulaire donnée. Finalement, une autre étude sur la co-expression de CXCR7 et CXCR4 a révélé que l'hétérodimérisation de CXCR7 avec CXCR4 altère effectivement la signalisation médiée par l'activité de G $\alpha$ i mais engendre un recrutement constitutif de la  $\beta$ -arrestine. La co-expression de CXCR7 et CXCR4 potentialise l'activation de la signalisation  $\beta$ -arrestine dépendante comme ERK1/2 et p38 (Décaillot et al., 2011).

## 22.4 Rôles physiologiques

L'invalidation du gène CXCR7 chez la souris mène à une mort peu après la naissance due à une malformation cardiaque (Sierro et al., 2007, Gerrits et al., 2008). CXCR7 s'avère important dans le développement cardiaque embryonnaire mais ne semble pas être impliqué dans le développement du système hématopoïétique ou du système nerveux comme CXCR4 (Sierro et al., 2007). L'implication de CXCR7 dans le développement cardiovasculaire a été supportée par l'observation de défauts cardiaques et vasculaires chez le poisson zèbre invalidé pour le gène CXCR7 à l'aide de morpholinos (Boldajipour et al., 2008).

Il y a des résultats contradictoires concernant l'implication de CXCR7 dans le chimiotactisme. Des études ont rapporté que l'activation de CXCR7 SDF-1 induit la migration des lymphocytes T en réponse à SDF-1 (Balabanian et al., 2005) et des cellules du muscle vasculaire lisse de rat en réponse à ITAC (Rajagopal et al., 2010). Par contre, un autre groupe



effectuant une étude à partir de lymphocytes T n'a pas observé de réponse chimiotactique suite à l'activation de CXCR7 par SDF-1 ou ITAC (Hartmann et al., 2008). De plus, une autre étude fait mention que CXCR7, contrairement à CXCR4, n'est pas impliqué dans la mobilisation de calcium intracellulaire et la migration cellulaire (Burns et al., 2006).

CXCR7 augmente la prolifération de cellules tumorales sur des fibroblastes, promouvoit la croissance tumorale dans un modèle murin (Raggio et al., 2005) et exerce des effets pro-survie (Mazzeinghi et al., 2008) et anti-apoptotiques (Infantino et al., 2006). Il a été rapporté que l'expression de CXCR7 dans des cellules cancéreuses mammaires et de poumons corrèle positivement avec leurs proliférations, vascularisations et leurs potentiel métastatiques (Miao et al., 2007). L'expression de CXCR7 est également élevée dans les cellules cancéreuses de la prostate (Wang et al., 2008). CXCR7 régule la prolifération de ces cellules en augmentant la survie cellulaire, l'adhésion et le chimiotactisme tout en augmentant l'expression de facteurs pro-angiopoïétiques (Wang et al., 2008). Un rôle pour CXCR7 a aussi été décrit dans les cellules de rhabdomyosarcome (RMS) (Grymula et al., 2010). L'activation de CXCR7 par SDF-1 et ITAC augmente le chimiotactisme, le mobilité et l'adhésion de cellules (Grymula et al., 2010).

La signalisation de CXCR7 serait également impliquée dans l'invasion tumorale en régulant l'expression de diverses molécules comme CD44, cadherin-11, IL-8, VEGF et TGF- $\beta$  (Wang et al., 2008). Il est possible que l'expression de CXCR7 soit induite dans les cellules endothéliales en condition hypoxique (Bosco et al., 2006, Costello et al., 2008). De plus, CXCR7 est fortement exprimé dans la vascularisation associée à la tumeur (Madden et al., 2004). Ces observations supportent l'implication de CXCR7 dans l'angiogénèse et la formation de la vascularisation de la tumeur.

CXCR7 peut également agir comme co-récepteur pour plusieurs souches du VIH-1, VIH-2 et du virus de l'immunodéficience simienne (VIS), qui infectent les lymphocytes et les cellules du cerveau (Shimizu et al., 2000).

## 23 Les récepteurs à activité tyrosine kinase ErbBs

Les ErbBs font partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase qui ont comme ligands divers facteurs de croissance de la famille EGF.

### 23.1 Ligands

Tous les ligands des récepteurs ErbBs présentent un motif EGF-like de 45-55 acides aminés et possèdent six résidus cystéines qui interagissent de manière covalente pour former trois ponts disulfures. Ces ligands sont divisés en trois principaux groupes. Le groupe 1 inclut EGF, amphiréguline, épigènes et TGF- $\alpha$ , tous des ligands du récepteur à l'EGF (EGFR); le groupe 2 inclut betacelluline, épiréguline et heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF), des ligands de ErbB4 et EGFR et finalement le groupe 3 inclut neurégulines (NRG) (ou hérégulines-HRG) qui sont sous-divisés en deux sous-groupes selon leur capacité à lier ErbB3 et ErbB4 (NRG-1 et NRG-2) ou seulement ErbB4 (NRG-3 et NRG-4) (Casalini et al., 2004, Hubert, 2006). Les ligands sont des protéines solubles qui dérivent de la protéolyse de précurseurs membranaires. Le clivage des précurseurs est dû à l'activation de métalloprotéinases en réponse à divers stimuli (Hubert, 2006). Les facteurs EGF-like et NRGs sont principalement exprimés dans les organes parenchymateux. Les NRGs sont également exprimés dans le système nerveux central et périphérique embryonnaire. Les différents isoformes de NRGs sont des produits de l'épissage alternatif d'un seul gène (Marchionni et al., 1993).

### 23.2 Structure des récepteurs

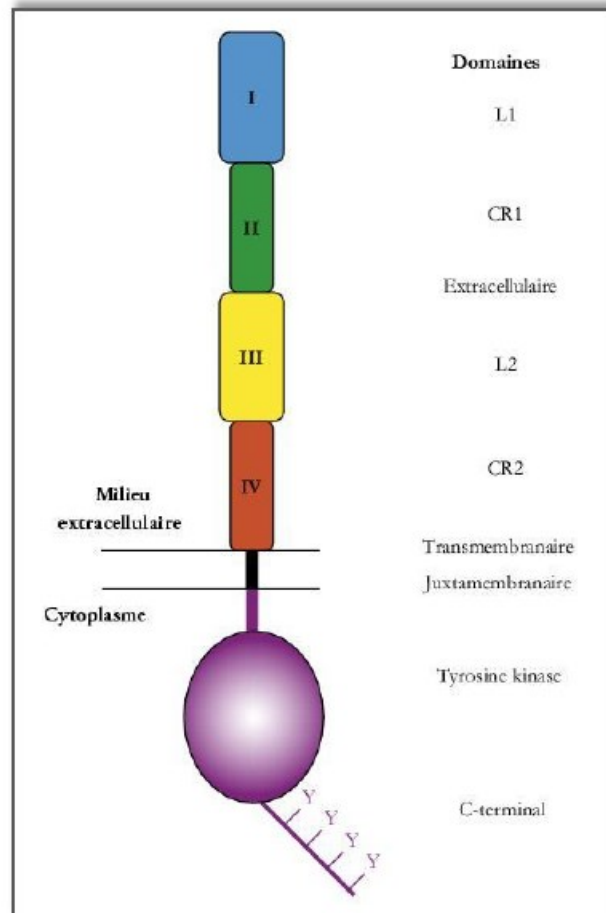
Les ErbBs partagent une forte homologie de structure primaire (Fig.15). La région extracellulaire est composée des domaines 1 à IV. Les domaines 1 et III sont très semblables et analogues à un domaine du récepteur à l'IGF-1. Les domaines II et IV présentent une abondance en résidus cystéines. La région extracellulaire est suivie du domaine transmembranaire, une courte séquence de 23-24 acides aminés hydrophobes. Cette séquence

d'ancrage est suivie du côté cytoplasmique par un domaine juxtamembranaire et d'un domaine à activité tyrosine kinase très conservé parmi les protéines tyrosine kinase. Enfin, s'en suit la queue C-terminale riche en sites de phosphorylation, très important pour la transduction du signal (Holbro et al., 2003, Holbro and Hynes, 2004).

Les structures cristallographiques de EGFR lié à EGF ou TNF- $\alpha$  ont démontré l'implication des domaines I et III dans la fixation du ligand. Elles ont également révélées l'existence d'interactions directes entre les domaines II de chaque monomère, au niveau de ce qui a été nommé le bras d'interaction. En absence de ligand, les structures cristallographiques de EGFR et ErbB3 ont démontré que ce bras de dimérisation est bloqué par des interactions entre les domaines II et IV. C'est la liaison du ligand aux domaines I et II qui libérerait le bras de dimérisation à la suite d'un réarrangement structural (Ferguson, 2004).

La structure de la région extracellulaire de ErbB2 présente des différences. La structure cristallographique révèle l'existence de monomère dont la configuration ressemble à celle de l'état activé de EGFR. Il n'y a pas d'interaction entre les domaines II et IV et le bras de dimérisation du domaine II est exposé (Hubert, 2006). Cette structure pourrait expliquer pourquoi ErbB2 est le partenaire privilégié des hétérodimères, puisque sa structure serait toujours apte à interagir avec un autre récepteur. De plus, la structure de ErbB2 est incompatible avec la liaison d'un ligand due à l'éloignement des domaines I et III (Hubert, 2006).

La structure du domaine tyrosine kinase de EGFR a été déterminée en absence ou présence d'un inhibiteur. Le domaine kinase a une structure comparable à celle des autres kinases cristallisées. Il est constitué de deux lobes, un du côté N-terminal qui comprend des feuillets bêta et une hélice alpha et un autre du côté C-terminal qui possède surtout des hélices alpha. Les lobes sont séparés par un sillon où se fixe l'ATP. Le lobe C-terminal comprend la boucle activatrice qui contrairement à la plupart des RTKs n'est pas phosphorylé et ne semble pas participer au mécanisme d'activation (Hubbard and Till, 2000). La structure cristallographiée indique que la boucle de EGFR adopte une conformation similaire à la boucle activatrice phosphorylée du récepteur à l'insuline (Jorissen et al., 2003).



**Figure 15** Schématisation de la structure des récepteurs de la famille ErbB (Tiré de Hubert, 2006)

## 24 Identification et caractérisation des ErbBs

### 24.1 EGFR

Cohen et Carpenter ont identifié le récepteur à l'EGF (Carpenter and Cohen, 1976). À partir d'extraits membranaires isolés de cellules de carcinome épidermoïde A431, ils ont mis en évidence deux caractéristiques du récepteur : celle de pouvoir lier un ligand et l'autre de présenter une activité kinase intrinsèque, qui s'autophosphoryle suite à la liaison de EGF

(Cohen et al., 1982). Par la suite, Tony Hunter et Jonathan Cooper ont démontré que le traitement des cellules A431 à l'EGF entraîne la phosphorylation de plusieurs protéines sur des résidus tyrosines (Hunter and Cooper, 1981). D'autres recherches ont mené à l'identification d'autres facteurs de croissance de la famille EGF, qui est passée de deux à onze membres. L'autosécrétion de ces facteurs est un mécanisme qui supporte la progression de tumeurs et la surexpression de EGFR est fréquemment observée dans les tumeurs de cerveau et épithéliales (Yarden and Pines, 2012).

## 24.2 ErbB2/Her2/Neu

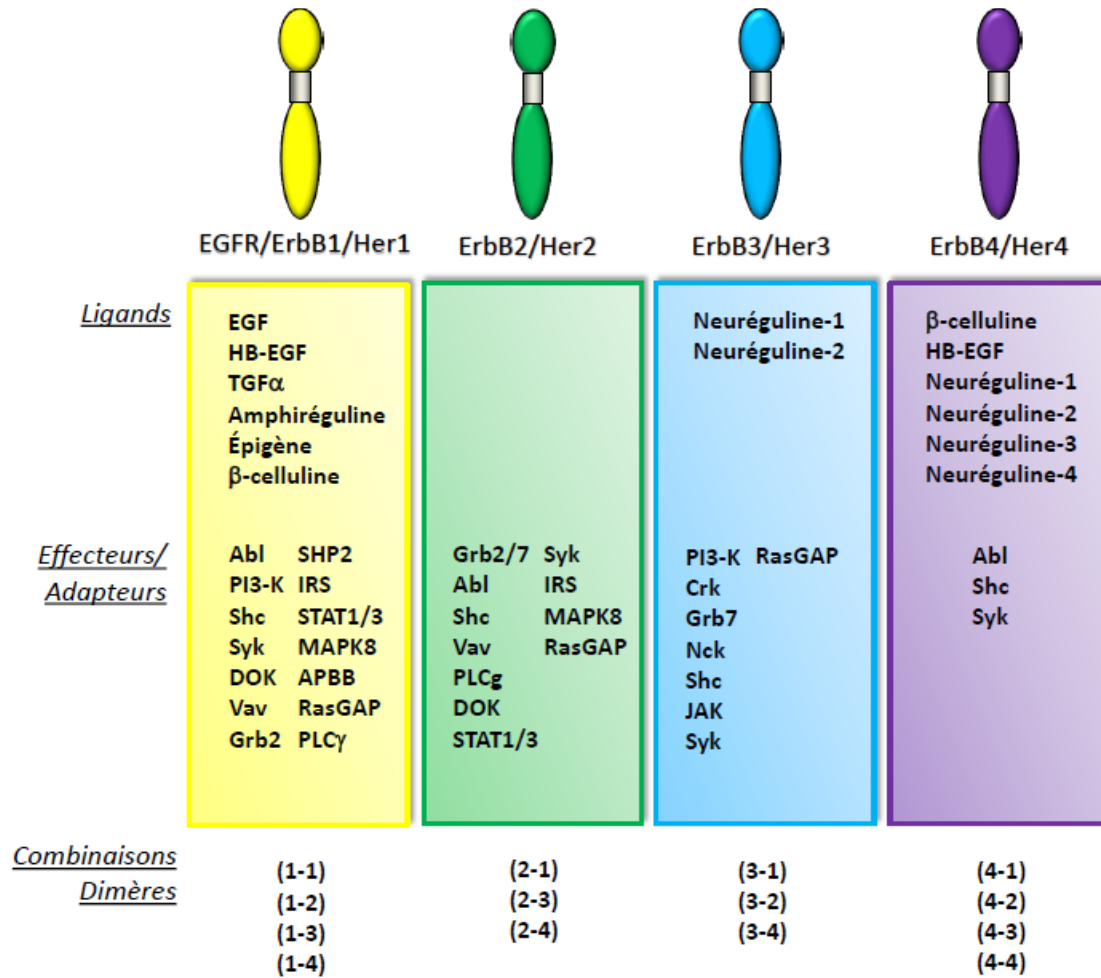
L'ADNc de *Neu* a été isolé à partir de tumeurs au cerveau de rats induites suite à l'exposition de rates en gestation au carcinogène N-nitroso-N-éthylurée. La séquence du clone d'ADNc isolé a prédite une protéine transmembranaire avec des similitudes structurales au récepteur EGFR (Schechter et al., 1984). L'élaboration de recombinants entre l'ADNc normal et transformé a mené à l'identification d'une mutation dans l'ADNc transformé : un résidu valine dans le domaine transmembranaire substitué en acide glutamique (Bargmann et al., 1986). L'orthologue humain de Neu, nommé ErbB2 ou Her2, a été cloné par la suite (Coussens et al., 1985, Schechter et al., 1985, Bargmann et al., 1986, Yamamoto et al., 1986, Kraus et al., 1987). La surexpression de ErbB2 dans des fibroblastes engendre la transformation de ces cellules (Di Fiore et al., 1987, Di Fiore et al., 1987, Hudziak et al., 1987). L'amplification de ErbB2 est observée dans le cancer du sein, du poumon, du pancréas, du colon et de l'œsophage (Ross and Fletcher, 1998). En plus de favoriser la prolifération des cellules cancéreuses, la surexpression de ErbB2 affecte la différenciation cellulaire et augmente le potentiel de migration et d'invasion cellulaire (Beerli et al., 1995, Spencer et al., 2000).

Le laboratoire de Weinberg a identifié un facteur à partir de cellules transformées capable de stimuler la phosphorylation de ErbB2 (Yarden and Weinberg, 1989). Toutefois, le facteur en question, nommé neuréguline 1 (NRG1), induit la phosphorylation de ErbB2 sans le lier directement (Peles et al., 1993). Depuis, la famille NRG ou héréguline (HRG) a pris de

l'expansion et inclut quatre membres (Yarden and Pines, 2012). ErbB2 demeure à ce jour un récepteur orphelin (Yarden and Pines, 2012). Malgré le fait que ErbB2 ne possède pas de ligand, il peut spontanément d'homodimériser lorsqu'il est surexprimé. L'activité constitutive de ErbB2 dans plusieurs cancers s'explique par son amplification et sa surexpression mais également par des altérations moléculaires au niveau du récepteur (Herter-Sprue et al., 2013).

### **24.3 ErbB3/ErbB4**

Les troisième et quatrième membres de la famille de ErbBs, ErbB3 et ErbB4, ont été identifiés par Greg Plowman et Matthias Kraus par homologies avec EGFR (Yarden and Ullrich, 1988, Plowman et al., 1990, Plowman et al., 1993). Ils représentaient alors des cibles potentiels pour la liaison de NRGs, ce qui a été confirmé par plusieurs laboratoires. ErbB3 présente des altérations au niveau de trois motifs du domaine catalytique ce qui fait en sorte qu'il présente peu ou pas d'activité kinase (Knighton et al., 1993). Il doit donc s'hétérodimériser avec un autre membre de la famille des ErbBs. ErbB3 est exprimé dans plusieurs carcinomes tels que le cancer du sein, du colon, gastrique et de la prostate. Toutefois, on ne retrouve pas d'expression aberrante de ce récepteur dans ces cancers comme c'est le cas pour ErbB2. Sa coexpression avec ErbB2 ou ErbB1 améliore le pouvoir prédictif (Lyne et al., 1997, Xia et al., 1999). ErbB3 est toutefois surexprimé dans le carcinome à cellules squameuses oral (OSCC) et corrèle avec l'étendue du cancer dans les ganglions lymphatiques (Shintani et al., 1995). L'expression de ErbB4 est réduite dans le cancer du sein et de la prostate et corrèle avec un phénotype différencié (Kew et al., 2000). ErbB4 est exprimé dans le méningo-blastome chez l'enfant et sa coexpression avec ErbB2 apporte une valeur pronostique (Gilbertson et al., 1997).



**Figure 16** Membres de la famille des ErbB, leurs ligands et leurs effecteurs

## 25 Rôles physiologiques dans le développement

Les récepteurs de la famille ErbB jouent un rôle crucial dans le développement du système cardiovasculaire, du système nerveux et des glandes mammaires.

### 25.1 Système cardiovasculaire

Une souris invalidée pour les gènes ErbB2, ErbB4 et NRG meurt à l'état embryonnaire due à une absence du développement du myocarde ventriculaire (Gassmann et al., 1995, Lee

et al., 1995). Des souris invalidées pour le gène ErbB3 sont non-viables et présentent une malformation des valves cardiaques (Casalini et al., 2004). La signalisation de ErbB2, qui est importante dans les tubules T de cardiomyocytes, est cruciale pour la fonction cardiaque chez l'adulte (Özcelik et al., 2002).

## 25.2 Système nerveux

ErbB3, NRG-1 et ErbB2 sont impliqués dans la maturité des jonctions neuromusculaires et des neurones moteurs périphériques (Meyer et al., 1997, Riethmacher et al., 1997, Garratt et al., 2000, Wolpowitz et al., 2000). ErbB4 est impliqué dans l'architecture nerveux crânien (Casalini et al., 2004). La signalisation de NRG-1 et ErbB2/ErbB3 est importante dans le développement des cellules de Schwann (Garratt et al., 2000, Woldeyesus et al., 1999, Wolpowitz et al., 2000). Des souris homozygotes pour ErbB2, ErbB3 ou NRG présentent une altération au niveau de la migration des progéniteurs neuraxiaux à partir de la crête neurale (Britsch et al., 1998). La crête neurale se définit comme un groupe de cellules embryonnaires qui se sépare de la plaque neurale et qui migre à des endroits précis pour donner naissance aux nerfs crâniens et rachidiens, aux ganglions associés à ces nerfs, aux ganglions de la chaîne sympathique latéro-vertébrale, à la médulla des glandes surrénales ainsi qu'à une partie de certains tissus conjonctifs. Des études ont démontré que NRG facilite la différenciation des progéniteurs de la crête neurale en cellules gliales. ErbB2 est important pour la différenciation des oligodendrocytes et la formation de myéline dans le système nerveux central et périphérique (Park et al., 2001).

## 25.3 Développement épithélial

Des souris invalidées pour le gène EGFR sont viables mais présentent un retard dans le développement des épithéliums (yeux, poumons,...). L'inactivation du gène TGF- $\alpha$  ne perturbe pas le développement normal de la souris, mais des anomalies au niveau de la peau et de la fourrure sont observables. L'inactivation du gène EGF entraîne un phénotype normal (Hubert, 2006).



## 25.4 Glande mammaire

Les quatre récepteurs sont exprimés dans la glande mammaire. EGFR et ErbB2 colocalisent dans tous les principaux types cellulaires durant la morphogénèse des canaux mais sont différemment exprimés dans la glande mature. EGFR et ErbB2 sont davantage exprimés dans les canaux de lactation et les alvéoles alors que l'expression de ErbB3 et ErbB4 est plus prononcée dans les alvéoles (Schroeder and Lee, 1998). Les récepteurs EGFR et ErbB2 activés sont principalement détectés dans les glandes mammaires à la puberté et moins à la fin de la grossesse et durant la lactation (Sebastian et al., 1998). ErbB3 et ErbB4 quant à eux sont principalement actifs durant la grossesse et la lactation (Yang et al., 1995). Des souris invalidées pour le gène EGFR présentent de sévères altérations au niveau du développement des canaux (Miettinen et al., 1995). Des souris invalidées pour le gène ErbB4 présentent une différenciation lobulo-alvéolaire anormale et un défaut au niveau de la lactation (Tidcombe et al., 2003). Des animaux transgéniques exprimant un mutant ErbB2 tronqué présentent des altérations au niveau du développement mammaire en fin de gestation et en début postpartum avec une absence d'expansion alvéolaire (Jones and Stern, 1999). Le développement des canaux est normal mais ces animaux présentent des problèmes de lactation (Tidcombe et al., 2003). ErbB4 est un médiateur essentiel de la signalisation du facteur de différenciation mammaire Stat5 (Liu et al., 1997, Teglund et al., 1998, Jones et al., 1999). L'inactivation de ErbB4 dans la glande mammaire empêche l'accumulation d'alvéoles lobulaires ou l'engagement de la lactation (Long et al., 2003).

## 26 Signalisation

L'activation de l'activité tyrosine kinase induite par la dimérisation en réponse au ligand se traduit par la phosphorylation de résidus tyrosine présents sur les récepteurs (autophosphorylation), puis par le recrutement de protéines possédant des motifs de reconnaissance pour ces phosphotyrosines : domaines Src homology domain (SH2) et phosphotyrosine binding (PTB) (Hubert, 2006). Ces événements vont entraîner l'activation de diverses cascades de signalisation. Les récepteurs ErbB possèdent des sites de phosphorylation

sur plusieurs résidus tyrosines, ce qui explique la diversité des voies de signalisation activées en fonction des ligands et des partenaires associés dans les dimères (Holbro et al., 2003, Holbro and Hynes, 2004).

## 26.1 Voies de signalisation

L'identité du ligand de même que les partenaires du dimère dictent quels sites sont autophosphorylés et par le fait même quelles protéines signalitiques sont recrutées. Les trois voies de signalisation induites par les ErbBs les mieux caractérisés sont Ras-MAPK, PI3-K-Akt et PLC-PKC (Schlessinger, 2000, Blume-Jensen and Hunter, 2001, Prenzel et al., 2001). Tous les ligands et récepteurs engendrent l'activation de la voie Ras-MAPK soit directement via le recrutement de Grb2 (SH2) ou indirectement via le recrutement de la protéine adaptatrice Shc (PTB). La protéine GEF Sos s'associe à Grb2 et active Ras. Ras s'associe et active Raf, initiant une cascade impliquant la phosphorylation de MEK1/2 et ultimement de ERK1/2. ERK phosphoryle plusieurs protéines cytoplasmiques et du cytosquelette. ERK transloque également rapidement dans le noyau où il phosphoryle et active une variété de facteurs de transcription tels que Sp1, E2F, Elk-1 et AP-1 (Marmor et al., 2004).

Les ErbBs permettent l'activation de PI3-K via la liaison de GTP-Ras à la sous-unité catalytique p110 de PI3-K. De plus, le recrutement de la sous-unité régulatrice p85 de PI3-K via son domaine SH2 aux récepteurs activés entraîne une activation allostérique de la kinase. Quoique tous les ErbBs activent PI3-K, la magnitude et la cinétique de l'activation de cette kinase varient entre les récepteurs, puisque PI3-K s'associe directement à ErbB3 et ErbB4 qui possèdent six et un site(s) pour p85 respectivement, mais indirectement à ErbB1 et ErbB2 (Soltoff and Cantley, 1996). La kinase Akt est un effecteur de PI3-K, qui est recrutée à la membrane via son domaine PH (*Pleckstrin Homology*) et est activée suite à la phosphorylation de PDK1 (Meier and Hemmings, 1999). Akt a plusieurs cibles cytoplasmiques mais peut transloquer dans le noyau et possède des cibles nucléaires. La phosphorylation de Bad par Akt promouvoit la survie cellulaire en bloquant l'interaction entre Bcl-2 et Bcl-X (Danielsen and Maihle, 2002). Akt régule négativement les kinases Raf et GSK-3 et le facteur de transcription

impliqué dans la régulation du cycle cellulaire FOXO1a. À l'opposé, il promouvoit l'initiation de la transcription via mTOR, eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) et p70S6K. De plus, Akt favorise la progression du cycle cellulaire en régulant négativement l'inhibiteur de Cdk p27<sup>KIP1</sup>. PI3-K régule plusieurs signaux de prolifération et de survie cellulaire. L'activité de PI3-K est négativement régulée par la phosphatase PTEN, qui est fréquemment mutée et inactivée dans des cancers (Cantley and Neel, 1999).

La phospholypase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) est recrutée à la membrane via son domaine SH2 aux récepteurs EGFR et ErbB2 activés et également via la liaison de son domaine PH aux produits de PI3-K. PLC $\gamma$  phosphorylée et activée hydrolyse phosphatidylinositol 4', 5' biphosphate (PIP2) pour générer les seconds messagers diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3). La liaison de IP3 au réticulum endoplasmique entraîne une relâche calcique et une augmentation de la concentration calcique intracellulaire qui mènent à l'activation de protéines kinases calcium/calmoduline dépendantes et de phosphatases, incluant Pyk2 et calcineurine. Par ailleurs, le calcium et DAG activent PKC qui elle phosphoryle un large éventail de substrats (Marmor et al., 2004).

D'autres voies de signalisation sont activées par les RTK ErbBs. c-Src est activée en réponse à EGF et phosphoryle des résidus tyrosines présent sur le récepteur EGFR en plus de phosphoryler et activer des protéines du cytosquelette et endocytiques (Biscardi et al., 1999, Abram and Courtneidge, 2000). Les facteurs de transcription STAT1, STAT3 et STAT5 sont directement phosphorylés par EGFR, menant à leurs dimérisations et leurs translocations dans le noyau où ils régulent des gènes prolifératifs. La protéine GEF Ras régule l'activation des petites GTPases Rho, Rac et Cdc42, qui contrôlent le réarrangement du cytosquelette. La translocation nucléaire de fragments protéolytiques de EGFR, ErbB3 et ErbB4 a été observée, suggérant que ces récepteurs pourraient agir comme facteurs de transcription (Wells and Marti, 2002).

## 26.2 Transactivation par des RCPGs

La transduction des signaux médiés par certains RCPGs en réponse à leurs ligands semble dépendre de la signalisation médiée par certains RTK, dont les ErbBs. Cet effet est médié par la phosphorylation et l'activation des ErbBs en absence de leur ligand. La stimulation ligand-dépendante des RCPGs Lysophosphatidic acid receptor (LPA) et  $\beta$ -adrénergique fait intervenir l'action de EGFR pour l'activation de MAPK (Daub et al., 1997). La transactivation (phosphorylation) de EGFR implique les membres de la famille Src, qui sont recrutés par Pyk2 ou GRK et une protéine adaptatrice telle que  $\beta$ -arrestine (Dikic et al., 1996, Luttrell et al., 1997, Luttrell et al., 1999). Jak2 représente une autre kinase pouvant phosphoryler EGFR. La stimulation d'adipocytes par l'hormone de croissance (GH) engendre la phosphorylation de EGFR par Jak2, permettant ainsi la phosphorylation de MAPK (Wong et al., 1992, Yamauchi et al., 1997). Par ailleurs, le ligand de CXCR4, la chimiokine SDF-1, induit la phosphorylation de EGFR également, favorisant l'activation de Akt et ERK 1/2 et stimulant la croissance cellulaire de cellules cancéreuses ovariennes (Porcile et al., 2005). De plus, SDF-1 transactive également ErbB2 via l'activation de Src dans des cellules cancéreuses mammaires (Cabioglu et al., 2005) et de la prostate (Chinni et al., 2008). Il a été démontré dans des cellules cancéreuses de la prostate que CXCR4 et ErbB2 co-existent dans des rafts membranaires et que la perturbation de ceux-ci inhibe la transactivation de ErbB2 et l'invasion cellulaire (Chinni et al., 2008). Par ailleurs, la transactivation de ErbB2 dans des cardiomyocytes par les ligands angiotensine II, isoprotérénol, phényléphrine, Urocortin 2 (Ucn2), glucagon et le peptide vasoactif intestinal est nécessaire à l'activation de ERK 1/2 (Negro et al., 2006).

Un mécanisme de rétroaction négative serait médié par l'action de ligands de RCPGs couplés à  $G\alpha_q$  dans le but de réguler l'intensité et/ou la durée de la transactivation de EGFR. La transactivation de EGFR suite à la stimulation de cellules épithéliales intestinales et de fibroblastes par les ligands angiotensine II, vassopressine, carbachol et bombésin est augmentée par l'inhibition de PKC (Santiskulvong and Rozengurt, 2007).

L'activation des RCPGs serait également impliquée dans l'activation directe des ErbBs par leur ligand en régulant l'expression de métalloprotéinases matricielles générant le clivage des ligands précurseurs des ErbBs (Gschwind et al., 2001).

### **26.3 Terminaison de la signalisation**

L'internalisation et la dégradation des ErbBs mettent fin à la signalisation intracellulaire de ces récepteurs. Pour EGFR, l'internalisation dans des vésicules de clathrine et la voie endosomale semblent être les principaux moyens d'interrompre le signal (Peschard and Park, 2003). L'étape initiale implique l'interaction de EGFR avec la clathrine via les adaptateurs AP2 et est médiée par epidermal growth factor receptor substrate 15 (EPS15) et epsin (Warren and Landgraf, 2006). Suite à l'endocytose du récepteur, EGFR est dirigé vers des endosomes précoces jusqu'au endosomes tardifs pour être dégradé ou vers des endosomes de recyclage (Warren and Landgraf, 2006). L'ubiquitination de EGFR, médiée par l'ubiquitine ligase Cbl, permet de diriger le récepteur vers la voie de dégradation lysosomale menant ainsi à sa dégradation (Haglund et al., 2003, Marmor and Yarden, 2004). L'interaction avec Cbl, mais pas l'ubiquitination, semble nécessaire pour l'internalisation de EGFR (Jiang and Sorkin, 2003). Les cavéoles représenteraient une route alternative pour l'internalisation de EGFR qui serait activée par de fortes concentrations de EGF (Sigismund et al., 2005). Une modification du récepteur régulerait également la terminaison de la signalisation. Il a été rapporté que la phosphorylation de la thréonine 654 par PKC entraînerait la désensibilisation du récepteur (Lin et al., 1986, Decker et al., 1990, Lund et al., 1990).

À l'exception de EGFR, les autres ErbBs ne subiraient pas d'atténuation significative de leurs signalisations en réponse à leur ligands. Particulièrement, la formation d'hétérodimères avec ErbB2 entraîne une ubiquitination réduite et ces hétérodimères sont internalisés et dégradés plus lentement, potentialisant ainsi les effets prolifératifs (Yarden and Sliwkowski, 2001, Hubert, 2006). Une étude a démontré que ErbB2 est associé à des protrusions membranaires ce qui fait en sorte qu'il est exclu des puits de clathrine, le rendant résistant à l'internalisation (Hommelgaard et al., 2004). De plus, l'association de la protéine

chaperone Hsp90 à ErbB2 (Lerdrup et al., 2007) et l'expression de la propyl isomérase Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (Pin1) dans des cancers mammaires ErbB2 positif (Lam et al., 2008) protègent ErbB2 contre la dégradation. Toutefois, un mécanisme pour l'atténuation de la signalisation a toutefois été décrit pour ErbB2. La phosphorylation de la thréonine 686 de ErbB2 par PKC favorise l'internalisation du récepteur (Ouyang and Gulliford, 2013).

Même en absence de liaison du ligand, les récepteurs des facteurs de croissance sont constamment internalisés et dirigés vers les endosomes. La majorité des récepteurs internalisés retournent à la surface, une petite fraction étant dégradée (Wiley, 2003). Dans une cellule épithéliale normale, un récepteur de facteur de croissance peut être recyclé plusieurs fois avant d'être dégradé et présente un temps de demie-vie de 12 heures. Toutefois, dans une cellule transformée, une plus petite proportion des récepteurs est dégradée, ce qui prolonge le temps de demie-vie du récepteur et augmente les niveaux du récepteur à la surface (Sweeney and Carraway, 2004). Deux études ont caractérisé une E3 ubiquitine ligase dans le contrôle des niveaux cellulaires de ErbB3 et ErbB4 (Diamonti et al., 2002, Qiu and Goldberg, 2002). Nrdp1 a originellement été identifiée comme une protéine possédant un domaine 'RING finger' interagissant avec ErbB3 de manière ligand-indépendante. Nrdp1 interagit spécifiquement avec ErbB3 et ErbB4 mais pas avec EGFR ou ErbB2. Contrairement à Cbl, Nrdp1 agit autant avec des récepteurs stimulés que non-stimulés et diminue la demie-vie de ceux-ci. ErbB3 ubiquitylé par Nrdp1 est relocalisé dans des compartiments intracellulaires suggérant que Nrdp1 dirigerait les récepteurs ErbB3 et ErbB4 vers un voie de dégradation. Pour ce qui est de ErbB2, deux groupes ont démontré que la E3 ubiquitine ligase CHIP s'associe à ErbB2 et entraîne sa dégradation et ce indépendamment de l'activité kinase du récepteur (Xu et al., 2002, Zhou et al., 2003)

## **27 Les fonctions cellulaires des ErbBs**

### **27.1 ErbBs, régulateurs du cycle cellulaire et des voies de survie cellulaire**

Les voies de signalisation induites par les ErbBs convergent vers la machinerie du cycle cellulaire pour promouvoir la prolifération (Harari and Yarden, 2000, Hynes et al., 2001). Un régulateur clé en aval des ErbBs est CCND1, qui active Cdk4 et Cdk6 pour promouvoir la progression du cycle cellulaire en G1/S. L'activation de MAPK augmente la transcription de *CCND1* via les facteurs de transcription Sp1 et E2F transcription factor 1 (E2F) (Lee et al., 2000). La stabilité protéique de CCND1 est également augmentée via la phosphorylation par Akt (Diehl et al., 1998). De plus, la signalisation par Akt et Ras-MAPK régule négativement les régulateurs négatifs du cycle cellulaire p27<sup>KIP1</sup> et p21<sup>Waf1</sup> (Lane et al., 2000, Neve et al., 2000, Zhou et al., 2001) en plus de promouvoir l'ubiquitination de p53 par la E3 ubiquitine ligase Mdm2 (Zhou et al., 2001). Une dérégulation au niveau des régulateurs du cycle cellulaire suite à une signalisation aberrante des ErbBs peut contribuer à la transformation oncogénique. De plus, la signalisation des ErbBs antagonise des régulateurs de l'apoptose (Danielsen and Maihle, 2002). PI3-K, MAPK et STAT3 sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire par les ErbBs et induisent également la transcription de protéines antiapoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-x en plus d'inhibiteurs de l'apoptose qui inactivent les caspases. Les ErbBs engendrent une diminution de l'expression de la protéine proapoptotique Bax et l'inactivation de Bad. Il a été démontré que les récepteurs ErbBs et leurs ligands préviennent l'apoptose des cellules cancéreuses et tumorales via l'activation de la voie PI3-K/Akt (Wen et al., 2000). De plus, l'hyperactivation de EGFR et ErbB2 engendre une résistance à l'apoptose en réponse à des agents chimiothérapeutiques. Cet effet qui semble être médié par l'augmentation de l'expression de p21<sup>Waf1</sup> (Nagane et al., 1998, Yu et al., 1998, Yu et al., 1998).

## 27.2 Autres fonctions cellulaires des ErbBs

### 27.2.1 Motilité cellulaire

Les récepteurs ErbBs régulent également la motilité de cellules cancéreuses. ErbB2 régule la migration de cellules cancéreuses mammaires *in vitro* (Spencer et al., 2000). La motilité cellulaire fait intervenir une séquence de processus nécessitant d'importantes

modifications de la morphologie et de l'adhésion cellulaire (Ridley et al., 2003). La signalisation des ErbBs peut influencer ces événements. PI3-K active Rac1 et Cdc42 alors que PLC $\gamma$  médie l'activation de protéines de nucléation calcium-dépendant (Feldner and Brandt, 2002). Il a été démontré que ces composantes du complexe actin-related protein 2/3 (Arp2/3) s'associent à EGFR (Blagoev et al., 2004). Le recrutement des molécules signalétiques Shc, PLC $\gamma$  et Crk à ErbB2 est lié au remodelage du cytosquelette et à la formation de lamellipodes. Il a été démontré qu'un effecteur de ErbB2, mediator of ErbB2-driven motility (Memo), est impliqué dans la migration ErbB2-dépendante de cellules tumorales mammaires (Marone et al., 2004). ErbB2 contrôle également la migration indirectement en régulant l'expression de protéines (Li et al., 2004, Tan et al., 2005) ou de gènes motogéniques (Jauliac et al., 2002, Vial et al., 2003).

### **27.2.2 Progression métastatique**

Il a été démontré que ErbB2 régule le processus métastatique dans plusieurs modèles animaux (Guy et al., 1992, Minn et al., 2005). ErbB2 coopère avec d'autres facteurs tels que hepatocyte growth factor (HGF) (Khoury et al., 2005) et TGF- $\beta$  (Muraoka et al., 2003, Siegel et al., 2003) pour promouvoir l'invasion. ErbB2 promouvoit l'expression de protéases pro-invasives (Xu et al., 1997, Mazumdar et al., 2001) et de facteurs pro-angiogéniques (Kumar and Yarmand-Bagheri, 2001). Il contrôle également l'expression de protéines pro-oncogéniques (Badache and Gonçalves, 2006). Les cellules cancéreuses mammaires ErbB2 positives présentent un fort potentiel métastatique et une augmentation de l'activité de la tyrosine kinase cytoplasmique Src. L'augmentation de l'activité de Src contribue à promouvoir le potentiel métastatique induit par ErbB2. ErbB2 promouvoit la synthèse et la stabilité de Src (Tan et al., 2005). Il contrôle également l'expression du récepteur à chimiokine CXCR4, qui joue un rôle critique dans la migration des cellules tumorales mammaires vers des organes métastatiques produisant du SDF-1 (Li et al., 2004). CXCR4 semble jouer un rôle critique dans la formation de métastases aux poumons induites par ErbB2. La régulation transcriptionnel de Src et CXCR4 implique la voie PI3-K/Akt/mTOR.

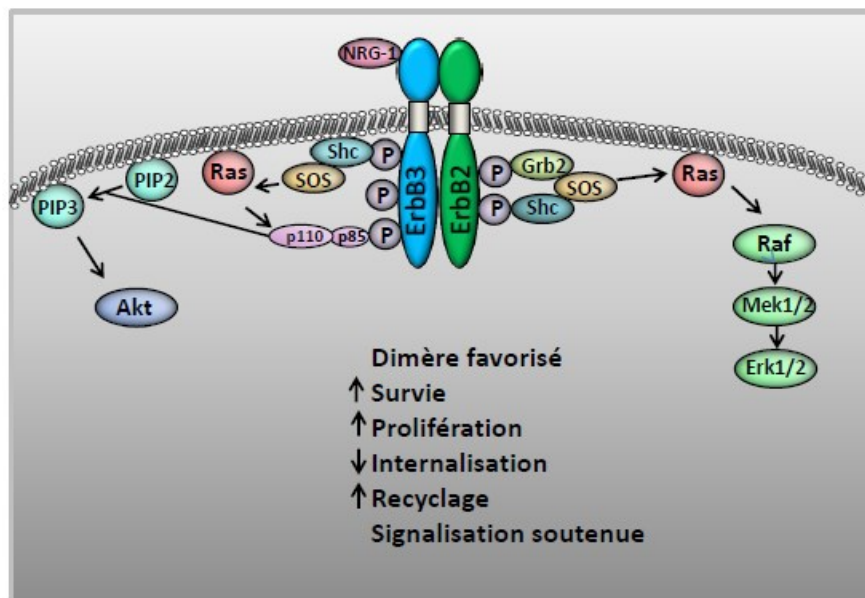


## **28 L'hétérodimérisation**

En absence de ligand, les récepteurs ErbBs existent majoritairement sous forme de monomères inactifs. La liaison du ligand va entraîner l'association de deux monomères pour former un dimère actif (Hubert, 2006). Il peut y avoir formation d'homodimères ou d'hétérodimères. Les homodimères EGFR et ErbB4 sont actifs alors que l'homodimère ErbB3 n'engendre pas de signalisation (Yarden and Sliwkowski, 2001). La surexpression de ErbB2 dans certains cancers peut entraîner la formation d'homodimères (Yarden and Sliwkowski, 2001). Toutefois, en présence de d'autres membres ErbB, ErbB2 va spontanément s'hétérodimériser. La formation d'hétérodimère diversifie la signalisation intracellulaire puisque que la queue C-terminale de chaque récepteur recrute différentes protéines effectrices via les résidus phospho-tyrosines (Yarden and Pines, 2012).

### **28.1 L'hétérodimère ErbB2/ErbB3**

Des études ont déterminé que ErbB2 est le partenaire favorisé d'hétérodimères induits en présence de ligands (Riese et al., 1995, Karunagaran et al., 1996, Tzahar et al., 1996, Graus-Porta et al., 1997, Pinkas-Kramarski et al., 1997, Holbro et al., 2003). La combinaison la plus favorisée est ErbB3 avec ErbB2, qui génère le complexe présentant le plus fort potentiel mitogénique (Pinkas-Kramarski et al., 1996) et de transformation cellulaire (Alimandi et al., 1995, Wallasch et al., 1995). Il a été démontré que la co-expression de ces deux récepteurs augmente l'affinité pour NRGs (Sliwkowski et al., 1994) (Fig.17).



**Figure 17** Signalisation de l'hétérodimère ErbB2/ErbB3

## 28.2 Coopération entre ErbB2 et ErbB3 dans le cancer du sein

Une collection de tissus de cancer du sein primaire a mis en évidence que ErbB2 est amplifié dans 30% des tumeurs mammaires (Slamon et al., 1987, Slamon et al., 1989). La surexpression de ErbB2 corrèle avec plusieurs facteurs liés au cancer du sein comme la taille de la tumeur, la migration de la tumeur vers les ganglions lymphatiques, un grade élevé de malignité, une augmentation des cellules en phase S, une aneuploidie ainsi qu'une absence de l'expression de récepteurs stéroïdiens (Ross and Fletcher, 1998). L'expression de ErbB3 accompagne souvent la surexpression de ErbB2 dans le cancer du sein (Lemoine et al., 1992, Bodey et al., 1997, Siegel et al., 1999). De plus, les tumeurs qui surexpriment ErbB2 montrent une augmentation de la phosphorylation des résidus tyrosines sur ErbB3 (Alimandi et al., 1995). La surexpression de ErbB2 promouvoit la prolifération et la transformation cellulaire mais ces effets sont favorisés par une étroite collaboration entre ErbB2 et ErbB3 (Holbro et al., 2003, Lee-Hoeflich et al., 2008).

L'amplification de ErbB2 dans les tumeurs engendre une activité constitutive de ErbB2. Des cellules cancéreuses mammaires surexprimant ErbB2 dépendent de l'activité de ce récepteur pour leurs proliférations, car l'inhibition de celui-ci bloque les cellules tumorales dans la phase G1 du cycle cellulaire (Lane et al., 2000, Holbro et al., 2003). L'inhibition de la signalisation de ErbB2 est accompagnée d'une diminution de la phosphorylation en tyrosine de ErbB3 (Holbro et al., 2003). Cette observation a suggéré que ErbB3 pourrait être un partenaire pour ErbB2 dans la transformation cellulaire. L'ablation de l'expression de ErbB3 dans des cellules cancéreuses mammaires surexprimant ErbB2 a mis en évidence l'implication de ErbB3 dans le processus de transformation. La perte de ErbB2 ou ErbB3 fonctionnel engendre les mêmes effets sur la prolifération cellulaire et les régulateurs du cycle cellulaire (Holbro et al., 2003). Ces résultats démontrent que la surexpression de ErbB2 seule est insuffisante pour promouvoir la division de cellules tumorales mammaires. L'inhibition de la prolifération cellulaire induite par la perte de signalisation de ErbB2 ou ErbB3 est renversée par l'expression d'un mutant de Akt constitutivement actif. ErbB3 coopère donc avec ErbB2 pour induire la prolifération cellulaire en se couplant à la voie PI3-K/Akt (Holbro et al., 2003). De son côté, ErbB2 amplifie la signalisation de la voie ERK/MAPK. La combinaison de la signalisation PI3-K et ERK accentue fortement la prolifération cellulaire et l'évasion de l'apoptose. ErbB2 et ErbB3 agissent ensemble pour stimuler la signalisation mitogénique, par exemple par un mécanisme visant la séquestration Akt et c-Myc dépendante de p27<sup>KIP1</sup>, ce qui mène à une dérégulation de la transition G1/S du cycle cellulaire dans des cellules cancéreuses mammaires surexprimant ErbB2 (Neve et al., 2000). D'autres résultats ont démontré la coopération de ErbB2 et ErbB3 dans la transformation néoplasique des cellules. À partir de la lignée cellulaire NIH3T3, il a été démontré que chaque gène séparément n'induit pas alors que la co-expression des deux induit la transformation de ces cellules (Alimandi et al., 1995). L'importance de la signalisation de l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 dans la transformation néoplasique a aussi été mise en évidence dans quatre lignées tumorales mammaires différentes (Alimandi et al., 1995). La coopération requiert l'hétérodimérisation de ErbB2 et ErbB3 et la phosphorylation de ErbB3.

ErbB2 peut également coopérer avec ErbB3 pour promouvoir la migration cellulaire. L'activation de ErbB2 en réponse à héréguline favorise la migration des cellules cancéreuses

mammaires via la stimulation des kinases PI3-K et p21-activated *protein* kinase (PAK) et par la formation du cytosquelette d'actine (Adam et al., 1998). De plus, la signalisation médiée par l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 induit la phosphorylation et l'activation de FAK, essentielle à la transformation oncogénique et à l'invasion cellulaire. (Benlimame et al., 2005).

## 29 Approches thérapeutiques ciblant les ErbBs

Étant donné l'implication de EGFR et ErbB2 dans la progression de plusieurs cancers, des approches thérapeutiques ont été élaborées pour antagoniser la signalisation de ces récepteurs. Un anticorps monoclonal dirigé contre EGFR et agissant comme antagoniste, cetuximab, restreint la prolifération et engendre un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Peng et al., 1996). Le cetuximab est utilisé en combinaison avec la chimiothérapie chez des patients atteints de carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou (HNSCC) ou du cancer du colorectal (Cunningham et al., 2004, Bonner et al., 2006). L'anticorps monoclonal dirigé contre ErbB2, trastuzumab, induit la régression de tumeurs mammaires qui présentent une amplification du gène *ErbB2* (Baselga et al., 1996). Le trastuzumab entraîne l'internalisation et la dégradation de ErbB2 (Austin et al., 2004). Il a été approuvé en 1998 par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de patientes atteintes de cancer du sein métastatique surexprimant ErbB2 (Yarden and Pines, 2012). Il est également efficace et utilisé pour le traitement du cancer gastrique (Bang et al.). Toutefois, des études ont montré une faible efficacité du trastuzumab pour le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) (Gatzemeier et al., 2004) et le cancer de la prostate (Ziada et al., 2004). Un autre anticorps monoclonal dirigé contre ErbB2, pertuzumab, est maintenant utilisé en combinaison avec trastuzumab et prolonge la survie de patientes atteintes du cancer du sein. Le pertuzumab lie le domaine II de ErbB2, nommé le 'bras de dimérisation' et bloque l'interaction entre ErbB2 et ErbB3 (Franklin et al., 2004), ce que ne fait pas le trastuzumab, qui s'associe au domaine IV (Cho et al., 2003).

Il existe également de petites molécules inhibitrices de l'activité kinase (TKI) qui compétitionnent pour la liaison de l'ATP. Deux groupes de ces molécules existent : des inhibiteurs réversibles comme erlotinib, gefitinib et lapatinib, qui peuvent se dissocier des

récepteurs et des inhibiteurs irréversibles tels que afatinib, neratinib, pelitinib et dacomitinib qui se lient de manière covalente aux récepteurs (Herter-Sprie et al., 2013). La majorité cible à la fois EGFR et ErbB2.

Une troisième classe de composés, les inhibiteurs de Hsp90, ciblent également ErbB2. La protéine Hsp90 est une chaperone impliquée dans la maturation et le bon repliement de ErbB2. Le composé geldanamycin ou ses dérivés entraînent l'internalisation et la dégradation de ErbB2 (Austin et al., 2004, Lerdrup et al., 2006, Pedersen et al., 2008). Toutefois, ces inhibiteurs n'ont pas été approuvés à ce jour par la FDA. Une étude a rapporté qu'un inhibiteur approuvé du protéasome 20S, le bortezomib (PS341), entraîne la dégradation de ErbB2 lysosomale de ErbB2 dans des cellules cancéreuses mammaires en perturbant l'interaction entre ErbB2 et Hsp90 (Marx et al., 2007).

### **30 Relation entre ErbB2/ErbB3/héréguline et les récepteurs des estrogènes**

Plusieurs études montrent que la surexpression de ErbB2 est associée à une résistance aux thérapies anti-estrogènes dans les cancers du sein ER positifs. Les patientes atteintes d'un cancer du sein qui surexprime ErbB2 répondent moins bien au traitement tamoxifène (Carlomagno et al., 1996). Les tumeurs développées dans des souris à partir de MCF-7 surexprimant ErbB2 développent rapidement une résistance au tamoxifène (Benz et al., 1992). Dans les cellules cancéreuses mammaires BT474 qui surexpriment ErbB2, la signalisation par ErbB2 induit une résistance au tamoxifène en inhibant les effets apoptotiques de ce composé (Chung et al., 2002). Dans un environnement faible en estrogène, le tamoxifène agit comme agoniste et induit la croissance tumorale à partir de cellules MCF-7 où ErbB2 a été surexprimé (Shou et al., 2004). Ce phénomène s'explique par le fait que le complexe tamoxifène-ER recrute des co-activateurs aux promoteurs de gènes cibles.

Lorsqu'il y a une résistance hormonale, la surexpression de ErbB2 engendre une prolifération cellulaire indépendante des estrogènes (Pietras et al., 1995). Ce phénomène a

aussi été observé dans le cas de la surexpression d'héréguline (Tang et al., 1996). Une corrélation inverse existe entre la surexpression de ErbB2 et l'expression de ER $\alpha$ . Une surexpression de ErbB2 dans la lignée cancéreuse mammaire ER positive MCF-7 provoque une diminution de l'expression de ER $\alpha$  et diminue l'activité ERE-dépendante (Pietras et al., 1995). La surexpression de ErbB2 induit l'expression du co-répresseur MTA1, qui entraîne la séquestration cytoplasmique de ER $\alpha$  et empêche ainsi la translocation nucléaire ligand-dépendante du récepteur (Kumar et al., 2002). Inversement, l'activation de ER par l'estrogène s'oppose à la surexpression de ErbB2 en supprimant la transcription du gène *ErbB2* (Russell and Hung, 1992, Antoniotti et al., 1994), inhibant ainsi la croissance des cellules cancéreuses surexprimant ErbB2 (Giani et al., 1998).

L'activité des ERs n'est pas seulement régulée par la surexpression de ErbB2 mais également par le ligand héréguline, un ligand de ErbB3 et ErbB4. Une étude a montré que héréguline diminue la transcription ligand-dépendante de ER (Tang et al., 1996). Héréguline induit l'expression du co-répresseur MTA1 ce qui a pour conséquence de diminuer la transcription ERE-dépendante de ER $\alpha$  via le recrutement de HDACs (Kumar et al., 2002). Il a été démontré que héréguline inhibe la prolifération estrogène-dépendante des cellules co-exprimant ErbB2 et ER $\alpha$  (Grunt et al., 1995). Notre laboratoire a démontré que l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 par l'héréguline- $\beta$  ou l'expression d'un mutant constitutivement actif de ErbB2 diminue l'activité estrogène-dépendante de ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans les cellules HEK-293T et dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 (St-Laurent et al., 2005). Cependant la répression de ER $\beta$ , contrairement à celle de ER $\alpha$ , est dépendante de la MAP kinase p38 et du domaine AF-1 et est relevée par la surexpression du co-activateur SRC-1. De plus, comme précédemment rapporté, nous avons observé que l'héréguline- $\beta$  inhibe la prolifération estrogène-dépendante de la lignée MCF-7 (St-Laurent et al., 2005). D'autres études effectuées dans notre laboratoire ont démontré que l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 inhibe l'activité transcriptionnelle estrogène-dépendante de ER $\beta$  malgré la présence du co-activateur CBP. L'inhibition de ER $\beta$  est attribuable à un résidu situé dans la région charnière du récepteur murin, la sérine 255 (Sanchez et al., 2007). L'activation de la voie PI3-K/Akt par le dimère ErbB2/ErbB3 phosphoryle la sérine 255 ce qui induit l'ubiquitination et la dégradation de ER $\beta$  en

présence de CBP, mais pas celle de ER $\alpha$ . La E3 ubiquitine ligase Mdm2, activée par Akt et relocalisée dans le noyau, participe à la dégradation de ER $\beta$  (Sanchez et al., 2013). La dégradation de ER $\beta$  humain est également observable par l'activation de ErbB2/ErbB3 et la présence de CBP et Mdm2. Dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 qui exprime les deux isoformes de ER, la stimulation par héréguline- $\beta$  engendre une diminution de l'expression de ER $\beta$  qui est relevée par la déplétion de CBP (Sanchez et al., 2013). La prolifération des cellules MCF-7 en réponse à héréguline- $\beta$  est diminuée suite à la déplétion de Mdm2, une condition où l'expression de ER $\beta$  est récupérée (Sanchez et al., 2013). Ce résultat suggère que le ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  influence la prolifération de cellules cancéreuses mammaires en réponse à héréguline- $\beta$ .

## 31 Hypothèses et objectifs

Les récepteurs des estrogènes sont importants dans le développement, la croissance et le maintien des fonctions des tissus gynécologiques et périphériques. Toutefois, par l'action mitogénique de l'estrogène, une dérégulation de l'activité des ERs engendre l'initiation et la progression de cancers, dont le cancer du sein. En plus de répondre à l'estrogène, les ERs répondent également à des stimuli qui engendrent une cascade de signalisation intracellulaire. Les facteurs de croissance représentent les stimuli les mieux étudiés sur l'impact de l'activité transcriptionnelle des ERs. L'activation aberrante de voies de signalisation via les facteurs de croissance représente un des mécanismes responsable d'une résistance à l'anti-estrogène tamoxifène, une approche thérapeutique pour le cancer du sein. Par ailleurs, une dérégulation de la signalisation des récepteurs CXCR4 et ErbB2 est associée à une progression vers un phénotype plus agressif de cancer du sein.

**L'hypothèse générale** de mes études doctorales était la suivante : La signalisation médiée par les récepteurs membranaires CXCR4 et ErbB2/ErbB3 régule l'action de ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans les cellules cancéreuses mammaires.

Une partie de mes travaux a porté sur l'impact de la signalisation intracellulaire médiée par le récepteur couplé aux protéines G CXCR4 et de son ligand, la chimiokine SDF-1, sur l'activité transcriptionnelle des ERs et sur la prolifération de cellules cancéreuses mammaires. Je me suis ensuite penchée sur l'impact d'un couplage entre la signalisation de CXCR4/SDF-1 et de ErbB2 sur la régulation de l'activité des ERs.

**Les objectifs** de mes études doctorales étaient :

I) Déterminer l'impact de l'axe CXCR4/SDF-1 sur l'activité transcriptionnelle des ERs (1<sup>er</sup> article) en :



- a) Évaluant l'effet de l'activation du récepteur à chimiokine CXCR4 par son ligand SDF-1 sur l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et ER $\beta$
- b) Évaluant l'implication de l'activation du récepteur à chimiokine CXCR4 sur la régulation de gènes cibles des ERs dans des cellules cancéreuses mammaires.
- c) Identifiant par quel mécanisme l'axe CXCR4/SDF-1 affecte ERs.
- d) Examinant l'impact de l'axe CXCR4/SDF-1 sur la prolifération de cellules cancéreuses ER positives.

II) Déterminer l'impact de CXCR4 sur la signalisation du dimère ErbB2/ErbB3 et la régulation de l'activité transcriptionnelle des ERs par ce dimère (2<sup>ième</sup> article) en :

- a) Évaluant l'effet de CXCR4 et de son ligand sur l'expression et l'activité kinase (phosphorylation) de ErbB2 et ErbB3.
- b) Évaluant l'effet de la signalisation de ErbB2/ErbB3 sur la phosphorylation de CXCR4 dans des cellules HEK293T et dans des cellules cancéreuses mammaires.
- c) Étudiant l'effet de CXCR4 et de son ligand sur l'activation des voies de signalisation ciblées par ErbB2/ErbB3.
- d) Évaluant l'effet de CXCR4 et son ligand sur l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante de ER $\alpha$  et ER $\beta$  en réponse à ErbB2/ErbB3.
- e) Examinant l'impact de la modulation de l'expression de CXCR4 sur l'expression et l'activité de ErbB2 et ErbB3 ainsi que la signalisation et la régulation estrogène-dépendante de gènes cibles de ER en réponse à l'héréguline- $\beta$ 1.

## Chapitre 2 : Résultats

### 1 – 1<sup>ère</sup> publication

#### Positive Feedback Activation of Estrogen Receptors by the CXCL12-CXCR4 Pathway

Karine Sauv<sup>1,2</sup>, Julie Lepage<sup>1,2</sup>, Mélanie Sanchez<sup>1,2</sup>, Nikolaus Heveker<sup>1,2</sup>, and André Tremblay<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Research Center, CHU Ste-Justine, and Departments of Biochemistry<sup>2</sup>, and Obstetrics & Gynecology<sup>3</sup>, University of Montreal, Montréal, QC, H3T 1C5, Canada

keywords: estrogen receptor; ER $\alpha$ ; ER $\beta$ ; AF-1; AF-2; stromal cell-derived factor 1; SDF-1; chemokine receptor; MAPK/Erk; MCF-7; breast cancer

Short title: SDF-1 transactivates ER $\alpha$  and ER $\beta$  in breast cancer cells

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have no competing interests.

Correspondence should be addressed to:

André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada.

## Mise en contexte

L'estrogène et les facteurs de croissance induisent la croissance des cellules cancéreuses mammaires ER positives en régulant l'expression de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire. SDF-1/CXCL12 a été identifié comme un nouveau gène cible de ER $\alpha$  dans des cellules cancéreuses mammaires et ovariennes (Hall and Korach, 2003). L'expression du récepteur pour la chimiokine SDF-1, CXCR4, est induite dans le processus de tumorigénèse mammaire. De plus, l'axe CXCR4/SDF-1 est associé à la progression vers un stade plus agressif du cancer du sein (Zlotnik, 2004). Il a aussi été démontré que SDF-1 participe à la prolifération E2-dépendante de cellules cancéreuses mammaires et ovariennes et que SDF-1 seul promouvoit également la prolifération cellulaire (Hall and Korach, 2003). Ces résultats suggèrent que ER $\alpha$  coopère avec CXCR4/SDF-1 pour initier la croissance cellulaire. Par ailleurs, l'activité des ERs peut être modulée de manière ligand-indépendante via leur domaine AF-1 (Sanchez et al., 2010). La stimulation de CXCR4 par SDF-1 entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation qui pourraient moduler l'activité ligand-indépendante des ERs, ce qui engendrait ainsi une boucle de régulation entre le récepteur CXCR4 et les ERs. Nous avons mis en évidence une boucle de régulation positive entre CXCR4 et ERs, ce qui favorise la prolifération de cellules cancéreuses mammaires ER positive. Nous avons démontré que CXCR4/SDF-1 augmente l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et ER $\beta$  en absence et en présence d'estrogène. Dans la littérature, l'association entre E2 et SDF-1/CXCR4 était attribuable à ER $\alpha$ . De plus, il existe beaucoup moins de données sur la régulation de ER $\beta$  et l'impact de ER $\beta$  sur le comportement des cellules cancéreuses mammaires. C'est en autre pour ces raisons que nous avons décidé d'étudier l'impact de CXCR4/SDF-1 sur l'activité de ER $\beta$ . L'axe CXCR4/SDF-1, via la voie ERK/MAPK, induit la phosphorylation de la serine 87 de ER $\beta$ , augmente l'occupation de ER $\beta$  sur des sites ERE et AP-1 situés dans des promoteurs de gènes cibles et augmente l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$ .

## **Contributions des auteurs:**

Karine Sauvé: À titre de premier auteur, en me basant sur les résultats préalables de Julie Lepage, j'ai mis au point les conditions expérimentales et j'ai réalisé et analysé la majorité des expériences présentés dans le papier.

Julie Lepage: Cette étudiante à la maîtrise a entamé le projet avant mon arrivé au laboratoire. Elle a généré les résultats des figures 1A,B; 2A,B; 3B,C; 4C,D et S2. Elle a travaillé à la mise en place de certaines conditions expérimentales.

Mélanie Sanchez: Cette étudiante au doctorat a généré une partie des résultats des figures 5D, E.

Nikolaus Heveker: Directeur d'un laboratoire au CHU Ste-Justine. A collaboré avec Dr. Tremblay et Julie Lepage lorsque Julie Lepage était au laboratoire. A été mon co-directeur lors de mes études à la maîtrise au laboratoire de Dr.Tremblay lorsque j'ai continué mon projet et à continuer de collaborer avec Dr.Tremblay et moi-même lors de mes études doctorales. A fourni les plasmides de CXCR4 wt et les mutants ainsi que le SDF-1 recombinant et les inhibiteurs TC140 et AMD3100. A participé à des discussions actives et a apporté son expertise dans le domaine de CXCR4/RCPG.

André Tremblay: En tant que mon directeur de laboratoire, Dr. Tremblay a supervisé et participé à la conception du projet. Il a écrit et corrigé l'article.

## Abstract

Induction of estrogen-regulated gene transcription by estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  plays an important role in breast cancer development and growth. High expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12/SDF-1 has also been correlated with aggressive breast tumor phenotypes. Here, we describe a positive regulatory loop between CXCR4/SDF-1 signaling pathway and ER transcriptional competence in human breast cancer cells. Treatment of breast carcinoma MCF-7 cells with SDF-1 increased ER transcriptional activity and expression of ER target genes, including SDF-1 itself. These effects were blocked by the antiestrogen ICI-182780 and by CXCR4 silencing, and conversely, estrogen-induced gene expression and growth of MCF-7 cells were impaired upon CXCR4 inhibition. Both ER $\alpha$  and ER $\beta$  were activated by SDF-1 in the presence of CXCR4, and by overexpression of a constitutively active CXCR4, indicating that CXCR4 signals to both receptors. In particular, ER $\beta$  was able to translate the effects of SDF-1 on its own expression, as well as enhancing AP-1 containing genes cyclin D1 and c-Myc in the presence of tamoxifen. This correlated with an increased ER $\beta$  occupancy of responsive promoters at both ERE and AP-1 elements. Ser-87, a conserved MAP kinase site in ER $\beta$ , was highly phosphorylated by SDF-1, revealing an essential role of the AF-1 domain in response to CXCR4 activation. These results identify a complete autocrine loop between CXCR4/SDF-1 and ER $\alpha$ /ER $\beta$  signaling pathways that dictates ER-dependent gene expression and growth of breast cancer cells.

## Introduction

Estrogens play a pivotal role in reproductive physiology but are also oncogenic in breast cancers. Regulation of target gene expression by estrogens is mediated through direct interaction with the estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which belong to the nuclear hormone receptor family of ligand-activated transcription factors (1). Transcription by ERs involves interaction with their cognate estrogen response element (ERE) within target promoters, but also through tethered interactions with AP-1 transcription factors (2). The activation function AF-2 located in the C-terminal region of ERs responds to hormone to initiate a combinatorial recruitment of coactivators that facilitate chromatin remodeling and transcription (3, 4). However, the cellular mechanisms involved in ER AF-1 activation are poorly understood. It is known that in response to many growth factors, such as EGF, IGF-1, and heregulins, the activation of ERs is associated with phosphorylation of the AF-1 domain (5-7).

CXCR4 is a G-protein coupled seven-transmembrane domain receptor (GPCR), which is activated by the chemokine stromal cell-derived factor SDF-1 (also referred to as CXCL12). The receptor is widely expressed in different tissues, and is a prominent chemokine receptor on cancer cells. The chemotactic properties of SDF-1 have been widely associated with metastasis of several epithelial and hematopoietic cancers, including breast, prostate, ovary and lung cancer (8, 9). Initial findings that breast cancer cells, as opposed to surrounding healthy tissue, express CXCR4, have revealed that CXCR4-mediated chemotaxis of cancer cells was mainly involved in the dissemination of metastases to SDF-1 producing target tissues, such as lung, liver, and bone marrow (10). However, although these studies clearly demonstrated the deleterious consequences of CXCR4 expression by cancer cells, it does not explain by which process the expression of CXCR4 is selected before metastasis. It was

generally believed that CXCR4 signaling does not promote cell growth. Nonetheless, several findings suggest that CXCR4 confers tumor growth advantages prior to metastasis dissemination, namely as a survival factor, by inducing the expression of integrins and matrix metalloproteases associated with invasive phenotypes (11, 12), and neovascularization (13).

Studies of hormone action in human breast cancer cells have widely been informative on the mitogenic actions of estrogens in ER-positive tumors. The identification of several estrogen-induced genes from ER $\alpha$ -positive tumor cells have provided valuable prognostic tools for predicting ER responsiveness to endocrine treatment (14). SDF-1 has been identified as an estrogen-regulated gene in ER $\alpha$  positive ovarian and breast cancer cells, suggesting a direct pathway by which estrogen may induce SDF-1 production through ER $\alpha$  (15).

Here we demonstrate an autologous regulation of SDF-1 through increased ER $\alpha$  and ER $\beta$  transcriptional activity in response to SDF-1, which confers growth potential of breast cancer cells. We further demonstrate that the CXCR4/SDF-1 pathway promotes ER $\beta$  AF-1 phosphorylation at Ser-87, and enables ER $\beta$  responsiveness at AP-1 sites despite the presence of tamoxifen. Our findings provide a mechanism by which the CXCR4/SDF-1 and the ER signaling pathways mutually contribute to a positive autocrine/paracrine feedback loop in breast cancer.

## Materials and Methods

**Plasmids.** Expression pCMX plasmids coding for human and mouse ER $\alpha$  and ER $\beta$ , and ER $\beta$  serine to alanine mutants have been described (16-18). The estrogen-responsive EREtkLuc reporter (18), and the AP-1coll luciferase reporter (19), which contains a fragment (pos. -73 to +63) of the collagenase promoter with an AP-1 element, were described. Plasmids coding for CXCL12/SDF-1 $\alpha$  (Invivogen), and for human CXCR4 and its constitutive D132N (NRY) and defective D84N and N119K mutant forms were described (20, 21).

**Cell culture.** Human breast cancer MCF-7 and human embryonic kidney 293 cells were routinely maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma) supplemented with 10% and 5% fetal bovine serum respectively. MCF-7 cells which stably express a ERE-luciferase reporter (17) were grown in the same conditions as parental MCF-7 cells. ER $\beta$ -expressing stable Hs578t breast cancer cells (Hs-ER $\beta$ ) have been described (22).

**Transfection and Luciferase assay.** Cells were seeded in phenol red-free DMEM supplemented with charcoal dextran-treated serum, prior to transfections and luciferase assays performed as described (17, 18). Cells were treated for 16hrs with 10nM 17 $\beta$ -estradiol (E2), 2.5-25nM recombinant SDF-1, 10nM ICI-182780, 5 $\mu$ M 4-hydroxytamoxifen (OHT), 50 $\mu$ M PD98059 inhibitor (BioMOL Research Labs), and CXCR4 antagonists AMD3100 and T140 (also known as 4F-benzoyl-TN14003). Luciferase values were determined from at least three independent experiments performed in duplicates.

**RNA isolation and qPCR.** Complementary DNA was prepared from MCF-7 cells and Hs578t stable clones as described (23), and PCR amplification was performed in a volume of 20  $\mu$ l with 0.5-1  $\mu$ l of reverse transcription reaction for 25-35 cycles. PCR products were analyzed on a MX3000P (Stratagene, La Jolla, CA) and on gel (Alpha Innotech, San Leandro, CA). Sequences of PCR primers are available upon request. Values are derived from three to five separate experiments, and normalized to GAPDH expression.



**Cell proliferation assay.** Cell proliferation was measured by using the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl] tetrazolium bromide (MTT) assay essentially as described (17). MCF-7 cells were seeded at low density in phenol red free DMEM supplemented with dextran charcoal-treated serum. Treatments with 10nM E2 in presence or absence of 1 $\mu$ M AMD3100 inhibitor were started the following day and maintained in fresh medium every subsequent day. All samples were assayed in triplicate from 3-4 independent experiments.

**Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay.** ChIP assays were performed as previously described (17, 24). MCF-7 cells were treated with estradiol, tamoxifen, and SDF-1 for 40min. Primer pairs were designed to encompass proximal/distal ERE and AP-1 sites of estrogen-responsive promoters (17, 25, 26).

**Cell lysates, immunoprecipitation and immunoblotting.** Site-specific phosphorylation of ER $\beta$  was determined by immunoprecipitation and Western analysis. MCF-7 cells were serum-depleted for 24h and treated with 25nM SDF-1 before lysis in TBS containing 0.1% Triton X-100, 1mM sodium orthovanadate, 1mM sodium fluoride, 0.1mM PMSF, and protease inhibitor cocktail (Roche). Immunoprecipitation was done using an anti-ER $\beta$  antibody (Santa Cruz) and Western analysis was performed using a phospho-specific Ser-87 ER $\beta$  antibody (Santa-Cruz). Phosphorylated Erk was determined by Western analysis using an anti-phospho Erk1/2 antibody (Cell Signaling).

**RNA interference.** To silence CXCR4 expression, small hairpin RNA duplexes targeting the sequence TGGAGGGGATCAGTATATACA of human CXCR4 (shCXCR4) were inserted into the pLVTH lentiviral vector for small interfering RNA production. Viral particles were produced in 293T cells as described (27), and used to infect MCF-7 cells. CXCR4 efficient knockdown was monitored by Western analysis (data not shown).

## Results

### **CXCR4 is required for estrogen-dependent gene expression and growth of human breast cancer cells.**

To assess the role of the CXCR4/SDF-1 axis on ER-mediated transcription, ER $\alpha$  and ER $\beta$ -positive human breast cancer MCF-7 cells, stably transfected with a ERE-luciferase reporter (17), were used. We observed that the increase in ER activity following estradiol treatment was further augmented by exogenous addition of SDF-1 to cells, suggesting that SDF-1 can potentiate the ER response to estrogen (Fig.1A). The role of CXCR4 in these effects was supported by addition of T140 and AMD3100, two antagonists of CXCR4, which both reduced in a dose-dependent manner ER activation by estradiol (Fig.1B). Similarly, MCF-7 cells transfected with an inactive D84N CXCR4 mutant also exhibited a decrease in ER activity. These findings indicate that estrogen-dependent ER response can be positively modulated through CXCR4 activation by SDF-1.

In line with a previous report that the SDF-1 gene is regulated by estrogen (15), we found a 5.5-fold increase in SDF-1 expression in response to estradiol compared to untreated cells, as determined by real-time PCR (Fig.1C). Interestingly, the increase in SDF-1 expression was reduced by 55% in the presence of the T140 antagonist (Fig.1C), which suggests that CXCR4 is involved in the regulation of SDF-1 gene. Other known ER-regulated genes, such as progesterone receptor (PR), pS2/TFF1, and EB-1, as well as cyclin D1 and c-Myc, which contain AP-1 sites that can mediate estrogen responsiveness, were all regulated similarly (Fig.1C). The contribution of CXCR4 was further assessed using the MTT proliferation assay, in which the growth dependency of MCF-7 cells to prolonged treatment with estradiol was significantly reduced with the use of AMD3100 (Fig. 1D). Taken together, these results point

towards an important role of CXCR4/SDF-1 to participate in the estrogenic response of MCF-7 cells, and on the ability of SDF-1 to potentiate these effects.

### **SDF-1 upregulates ER activity and target gene expression in absence of estrogen.**

In order to further substantiate that SDF-1 can promote ER function, we observed that ER activity was increased by SDF-1 independently of estrogen in MCF-7 cells (Fig.2A). Overexpression of wild type CXCR4 or the constitutively active D132N mutant also increased basal ER activity in MCF-7 cells (Fig.2B), suggesting a CXCR4-ER regulatory pathway. In line with our results on the requirement of CXCR4 in maintaining estrogen-induced SDF-1 expression (Fig. 1C), a 2-fold increase in SDF-1 expression was observed in MCF-7 cells treated with SDF-1, supporting the autologous regulation of SDF-1 gene (Fig.2C). Such effect was abrogated by the antiestrogen ICI-182780, further establishing an essential role of ER in mediating the response to SDF-1. Other ER target genes were similarly upregulated by SDF-1 (Fig.2C), which also enhanced MCF-7 cell growth in absence of estrogen (Supplementary Fig.S1). Silencing CXCR4 expression in MCF-7 cells strongly impaired the response of EB-1 and PR gene expression to SDF-1 (Fig.2D), in line with an essential role of CXCR4 in mediating responsiveness to SDF-1 in MCF-7 cells.

### **Activation of ER $\alpha$ and ER $\beta$ by the SDF-1/CXCR4 axis.**

As MCF-7 cells express both ER isoforms, therefore precluding the exact role of each receptor in the cellular response to SDF-1, we performed ERE-driven luciferase assays using human 293 cells transfected with either receptor. In such condition, both ER $\alpha$  and ER $\beta$  were activated by SDF-1 with or without estrogen, and these responses were dependent upon the

presence and the integrity of CXCR4, as demonstrated with the use of CXCR4 antagonist and mutant forms (Fig. 3). We also determined that SDF-1 produced by cells can signal ER $\alpha$  and ER $\beta$  in a paracrine fashion, using a co-culture system in which CXCR4- and ER $\alpha$  or ER $\beta$ -expressing ERE-Luc reporter 293 cells were incubated with cells transfected with a SDF-1 encoding plasmid (Supplementary Fig.S2). These results indicate that CXCR4 can promote the activity of ER $\alpha$  and ER $\beta$  isoforms.

### **SDF-1 induces ER $\beta$ -dependent gene expression in breast cancer cells.**

To further address the ability of ER $\beta$  to transduce the effects of SDF-1 in a breast cancer cell context, we used Hs-578t cells stably expressing ER $\beta$  (22) and which are CXCR4 positive (data not shown). As shown in Fig.4A, stable expression of ER $\beta$  conferred estrogen responsiveness in terms of target gene expression, as opposed to stable mock control cells (Hs-empty). Addition of SDF-1 to Hs-ER $\beta$  cells also increased expression of PR, EB-1 and SDF-1, providing additional evidence that SDF-1 can positively modulate its own expression through ER $\beta$  in breast cancer cells.

### **SDF-1 promotes ER $\beta$ assembly to proximal and distal estrogen responsive promoters**

To address the specific role of endogenously expressed ER $\beta$  in the response to SDF-1, we performed chromatin immunoprecipitation on the estrogen response regions of ER-regulated promoters. In parallel with estradiol, treatment of MCF-7 cells with increasing doses of SDF-1 induced a strong association of ER $\beta$  with the proximal ERE region of the SDF-1, PR, and pS2 genes (Fig.4B). Interestingly, such increased occupancy of the SDF-1 promoter is consistent

with the autologous regulation of the SDF-1 gene and further demonstrates that the SDF-1 gene is a target of ER $\beta$ . Recent genome-wide location analyses of ER $\alpha$  binding sites based on ChIP-on-chip approaches, have identified along with proximal EREs more distal *cis*-regulatory enhancer elements that for certain genes were reported to confer estrogen responsiveness (26, 28). Given the strong incidence of ER $\beta$  to upregulate PR in response to SDF-1 (Fig.4A), we then tested whether ER $\beta$  could associate with the distal enhancer region located ~100kb downstream of the transcriptional start site of the PR gene (28, 29). Indeed, we found that ER $\beta$  was even more recruited to the distal PR enhancer region in response to estradiol and to SDF-1, compared to the proximal promoter (Fig.4B). These findings provide evidence that ER $\beta$  can share the use of proximal and distal promoter elements originally identified with ER $\alpha$ , and that ER $\beta$  activating signals, such as with SDF-1, facilitates such recruitment in order to upregulate estrogen-responsive genes in breast cancer cells.

#### **SDF-1 enhances tamoxifen-induced transcription of AP-1 site by ER $\beta$ .**

Whereas antiestrogens, including tamoxifen, are known to efficiently inhibit the expression of ERE-regulated genes, transcription via an AP-1 element by ER $\alpha$  and ER $\beta$  can be enhanced by tamoxifen, possibly explaining how certain antiestrogens exhibit estrogen-like effects on cell growth (2, 30). We then tested whether SDF-1 could modulate ER $\beta$  activity on a AP-1 luciferase reporter. As expected, and also observed by others (2), estradiol alone had minimal effect on AP-1 response to ER $\beta$ , whereas tamoxifen lead to a 4.5 fold increase in AP-1 transcription (Fig.4C). However, a near 2-fold increase in AP-1 activity was observed in both cases following SDF-1 treatment, suggesting that SDF-1 is by itself able to regulate ER $\beta$

activity on an AP-1 site. These results were correlated in Hs-ER $\beta$  cells regardless of the presence of tamoxifen, with a 2.1- and 2.0-fold increase in the expression of Cyclin D1 and c-Myc, respectively (Fig.4D), two estrogen-regulated genes that contain AP-1 sites (30, 31). To ensure a potential role of AP-1 site, we performed ChIP on the AP-1 site located in the proximal promoter of CcnD1 reported to tether ER $\alpha$  in response to estradiol (25). This region was found potent in recruiting ER $\beta$  in response to tamoxifen, which was further increased by addition of SDF-1 (Fig.4E). These data suggest that SDF-1 can transduce a promiscuous ER $\beta$ /AP-1 relationship at the CcnD1 promoter in MCF-7 cells.

#### **The CXCR4-mediated activation of ER $\beta$ at ERE and AP-1 sites is AF-1 dependent.**

Given the ability of the CXCR4/SDF-1 pathway to exert activation of ER $\beta$  at both ERE and AP-1 sites regardless of the presence of ER ligands, we evaluated the role of ER $\beta$  AF-1, and in particular serines 106 and 124, identified to mediate mouse ER $\beta$  activation in response to ras and growth factors (5, 7, 16). We observed that disruption of Ser-106, either alone or in combination with Ser-94 and/or Ser-124, abolished the activation of ER $\beta$  by SDF-1 on an ERE reporter, identifying Ser-106 as critical for ER $\beta$  modulation by CXCR4/SDF-1 (Fig.5A). Similarly, when tested on an AP-1 reporter, the S106A mutant was unable to respond to CXCR4/SDF-1 modulation in the presence of tamoxifen (Fig.5B). These results highlight the role of Ser-106 in mediating ER $\beta$  responsiveness to CXCR4 signaling at both ERE and AP-1 sites.

**SDF-1 induces phosphorylation of ER $\beta$  at Ser-87 in MCF-7 cells.**

Mouse ER $\beta$  Ser-106 is part of a consensus site for MAPK-mediated phosphorylation highly conserved among vertebrates and which perfectly matches with Ser-87 of the human ER $\beta$ , the difference in numbering being attributable to a 19aa shorter form of the human vs mouse isoform. As previously reported (32), we found that CXCR4 activation by SDF-1 efficiently promoted Erk activation in transfected 293 cells, and this effect was severely impaired by addition of the CXCR4 antagonists T140 and AMD3100 (Supplementary Fig. S3B). Such activation of Erk through CXCR4 was found essential in providing transcriptional response of ER $\beta$  to SDF-1 (Fig.5C), and correlated with an increased phosphorylation of mouse ER $\beta$  at Ser-106 (Supplementary Fig. S3C), and an accelerated ER $\beta$  degradation through this site (Supplementary Fig. S4). This identifies Ser-106 as a crucial determinant that couples ER $\beta$  transcriptional competence and turnover in response to the CXCR4/SDF-1 pathway.

In order to confirm these observations in human breast cancer cells, we observed increased Erk activation levels in MCF-7 cells treated with SDF-1 (Fig.5D), paralleled with an increased human ER $\beta$  phosphorylation at Ser-87 (Fig.5E). Silencing CXCR4 contributed to severely impaired Erk activation and ER $\beta$  Ser-87 phosphorylation by SDF-1 (Fig.5D and E). These findings identify ER $\beta$  Ser-87 as a regulatory site targeted by the SDF-1/CXCR4 pathway in human breast cancer cells.

## Discussion

Both ERs and CXCR4/SDF-1 play pivotal roles in breast cancer. Previous data showing that estrogen promoted expression of the CXCR4 ligand SDF-1 have linked the two pathways. In the current study, we show that not only do ERs activate the CXCR4/SDF-1 pathway but, conversely, CXCR4 signaling promotes ER transcriptional activation, thereby establishing a complete autocrine loop for breast cancer cell growth. Our conclusions are supported by results showing that CXCR4 activation, by either the agonist SDF-1 or activating mutations in the CXCR4 receptor, increase ER-dependent transcription of either ERE or AP-1 driven reporters and target genes in cancer cells. CXCR4-mediated ER transcriptional activation occurred both in the presence and absence of ER ligands (estradiol or tamoxifen) and affected both ER $\alpha$  and ER $\beta$ . The ability of SDF-1 to signal the recruitment of ER $\beta$  to the estrogen responsive promoter region of the SDF-1 gene with subsequent SDF-1 expression emphasizes an autologous positive feedback regulation of SDF-1 in ER-positive breast cancer cells. The phosphorylation of ER $\beta$  at Ser-87 by SDF-1, correlated with receptor transcriptional activation and increased turnover, provides a mechanism by which the AF-1 mediates ER responsiveness to CXCR4/SDF-1 and the Erk1/2 pathway in cancer cells.

While the role of the SDF-1/CXCR4 axis in metastasis is well documented (8-10, 33), its potential implication in tumorigenic steps prior to metastasis remains less clear. Recent reports showing that SDF-1 expression was increased by estradiol resulting in mitogenic effects in ER $\alpha$ -positive ovarian and breast cancer cells (15), and on the requirement of steroid receptor coactivator SRC-1 (34), suggested that such early steps of tumorigenesis may involve estrogen receptors. In the current study, we show a correlation between estrogen-dependent proliferating gene activation by CXCR4, and SDF-1-promoted growth of ER-positive MCF-7



breast cancer cells. Our observations that transcription of ER-regulated genes was induced by SDF-1 but abrogated by antiestrogen ICI-182780, suggest that the mitogenic effect of SDF-1 in these cells requires functional estrogen receptors. We show that by targeting both ER $\alpha$  and ER $\beta$ , transduction of CXCR4 signaling by SDF-1 allows a direct regulation of ER-responsive genes, including the SDF-1 gene, independently of estrogen stimulation. This interplay between the CXCR4/SDF-1 pathway and ER-mediated transcription defines an autocrine/paracrine feed-forward loop (Fig.6), providing a possible explanation of how CXCR4 activation participates in the maintenance of continuous cancer cell proliferation. Whether this phenomenon occurs prior to CXCR4-mediated metastatic dissemination is uncertain, but it raises the intriguing possibility that autologous and continuous CXCR4 activity maintained through ER activation by hormone and/or enhanced Erk signaling, may participate in priming metastasis.

Our observation that regulation of ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity by SDF-1 occurs in the presence, but also in absence of hormone, points towards an important contribution of the AF-1 function in conferring ER responsiveness to SDF-1 signaling. Such active role of AF-1 was further substantiated by the demonstration that SDF-1 leads to AF-1 phosphorylation at Ser-106 of mouse ER $\beta$ , and the corresponding Ser-87 of human ER $\beta$ . Indeed, the AF-1 domain of ER $\beta$  contains many putative phosphorylation sites of which Ser-106 and -124 were described to be directly phosphorylated by Erk1/2, resulting in receptor AF-1 activation in response to EGF or ras, and subsequent recruitment of transcriptional coactivators SRC-1 and CREB binding protein (7, 16, 35). The critical role of Ser-106 was also important to mediate ER $\beta$  response to CXCR4/SDF-1 axis at both ERE and AP-1 sites. Altogether, our results emphasize a prominent role for the CXCR4/SDF-1 axis to impact ER $\beta$  activity through AF-1

phosphorylation, in order to achieve distinct transcriptional events as well as concerted actions with the AF-2.

It has previously been reported that ER $\beta$  is able to regulate the activity of the AP-1 transcription factor (2). We here show that the CXCR4/SDF-1 axis increases ER $\beta$  recruitment and subsequent transcriptional potential on ERE and AP-1 regulated genes in the context of breast cancer cells. Importantly, we found an increased expression of two AP-1 regulated genes, cyclin D1 and c-Myc, which are commonly overexpressed in primary breast tumors and recognized markers of early steps in breast tumorigenesis (36). Our findings that the CXCR4/SDF-1 axis stimulates ER $\beta$  assembly and activity at AP-1 sites brought potential implications for resistance of cancer cells to antiestrogen treatment. Resistance to prolonged tamoxifen exposure is a major clinical problem which develops in two-thirds of women treated for breast cancer, such that aggressive metastatic dissemination of tumor cells eventually ensues with a poor prognosis (14). The cellular mechanisms by which ER-positive tumor cells overcome antiestrogen effects and exhibit excessive proliferation remain uncertain at present. Our results are consistent with the possibility that the autocrine regulation and coupling between ER-regulated pathways and the CXCR4/SDF-1 axis may function despite the presence of tamoxifen. Indeed, the capacity of ER $\beta$  to enhance AP-1 activity and gene expression by SDF-1, and its promiscuity with the AP-1 region of cyclin D1 promoter, were both maintained in the presence of tamoxifen, in line with previous reports that AP-1 regulates transcription of cyclin D1 in the presence of antiestrogens (30). Our observations that this process may require Erk activation to phosphorylate ER $\beta$  Ser-87 are consistent with altered MAPK transduction pathways and enhanced AP-1 signaling associated with tamoxifen resistance (37). Elevated MAPK activity produced a mitogenic phenotype in MCF-7 cells (38)

and enhanced Erk1/2 activity was measured in tumors from ER-positive breast cancer patients maintained on tamoxifen (39). Although tamoxifen efficiently uncouples coactivator SRC-1 potentiation from ER AF-2 function, no such effect was observed on AF-1 activity upon Erk1/2 activation (16, 35). It is therefore tempting to speculate that the ability of CXCR4 signaling to target and upregulate AF-1 activity during tamoxifen exposure might supplant AF-2 as the primary route of ER activation in tamoxifen-resistant breast cancer cells.

Our data demonstrate that not only does ER $\beta$  upregulate the expression of SDF-1, as also observed for ER $\alpha$  (15), but that SDF-1 increases ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity, thereby extending the role of CXCR4 to ER signaling in breast cancer cells (Fig.6). Although not referred as a perfect ERE (15, 40), the estrogen response region of the SDF-1 gene was highly potent in recruiting ER $\beta$  in response to SDF-1, which identifies the SDF-1 gene as a target of ER $\beta$ , and further provides a mechanism by which the autologous regulation of the SDF-1 gene can occur in breast cancer cells. Similarly, recruitment of ER $\beta$  to other estrogen-responsive promoters, such as PR and pS2, supports the ability of ER $\beta$  to increase gene expression in a context of enhanced SDF-1 production. In the case of PR, the apparent propensity of ER $\beta$  to bind distal as well as proximal EREs points towards a complex interplay that likely involves cooperating factors to facilitate gene transcription (41). CXCR4 was also reported to be enhanced by estradiol in endometrial adenocarcinoma (42) and breast tumor xenografts (43). Altogether, these data suggest that both components of the CXCR4/SDF-1 axis, the receptor and the ligand, are likely to be regulated in an ER-dependent fashion.

Recent reports have identified the chemokine receptor CXCR7 as an additional receptor for SDF-1, with potential implication in tumor development (44, 45). Our findings do not rule out the implication of CXCR7 in the effect of SDF-1 in MCF-7 cells. However, our

observation that CXCR4 silencing impairs the modulation of ER dependent gene expression and Erk-mediated ER $\beta$  phosphorylation, suggests that functional CXCR4 is required for transducing these effects by SDF-1 in MCF7 cells. Notwithstanding its implication in sustaining growth of breast cancer cells and its potential to affect CXCR4 function (46), the role of CXCR7 in regulating estrogen-dependent functions remains as yet uncharacterized and deserves further investigation.

## Acknowledgments

We acknowledge the technical assistance of Julie Martin and thank members of the laboratory for critical reading and useful comments. K.S. is supported by graduate student awards from the GRUM (Groupe de Recherche sur le Médicament de l'Université de Montréal) and from the FHSJ (Fondation de l'Hôpital Ste-Justine), J.L. holds an award from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, M.S. from the FHSJ, and N.H. and A.T. are New Investigators of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This work was supported by grants from the CIHR and the Cancer Research Society Inc., and by the Canadian Foundation for Innovation.

## References

- 1 Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835-9.
- 2 Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science* 1997;277:1508-10.
- 3 Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000;14:121-41.
- 4 McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 2002;108:465-74.
- 5 Sanchez M, Tremblay A. Growth factor signaling to estrogen receptors in hormone dependent cancers. In: Sinnett, D. Editor. *Molecular Genetics of Cancer*. Kerala: Research Signpost; 2005. p.149-85.
- 6 Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995;270:1491-4.
- 7 Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, et al. Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Molecular Endocrinology* 1997;11:353-65.
- 8 Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* 2002;62:1832-7.
- 9 Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin.Cancer Biol* 2004;14:181-5.
- 10 Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-6.
- 11 Burger M, Glodek A, Hartmann T, et al. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene* 2003;22:8093-101.
- 12 Bartolome RA, Galvez BG, Longo N, et al. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer Res.* 2004;64:2534-43.
- 13 Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J* 2004;18:1240-2.

- 14 Jordan VC, O'Malley BW. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin.Oncol.* 2007;25:5815-24.
- 15 Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol.Endocrinol.* 2003;17:792-803.
- 16 Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor  $\beta$  through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular Cell* 1999;3:513-9.
- 17 St Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A. Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94:23-37.
- 18 Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, et al. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-AP ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol.* 2008;22:317-30.
- 19 Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol.* 1995;9:443-56.
- 20 Berchiche YA, Chow KY, Lagane B, et al. Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation. *J Biol Chem* 2007;282:5111-5.
- 21 BreLOT A, Heveker N, Montes M, Alizon M. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J Biol Chem.* 2000;275:23736-44.
- 22 Sanchez M, Sauvé K, Picard N, Tremblay A. The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the PI3K/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem* 2007;282:4830-40.
- 23 Rodrigue-Way A, Demers A, Ong H, Tremblay A. A Growth Hormone-Releasing Peptide Promotes Mitochondrial Biogenesis And A Fat Burning-like Phenotype Through Scavenger Receptor CD36 in White Adipocytes. *Endocrinology* 2007;148:1009-18.
- 24 Avallone R, Demers A, Rodrigue-Way A, et al. A Growth Hormone-Releasing Peptide that Binds Scavenger Receptor CD36 and Ghrelin Receptor Upregulates ABC Sterol Transporters and Cholesterol Efflux in Macrophages Through a PPAR $\gamma$ -dependent Pathway. *Molecular Endocrinology* 2006;20:3165-78.
- 25 Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, et al. Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory

- element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol* 2004;24:7260-74.
- 26 Carroll JS, Meyer CA, Song J, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat.Genet.* 2006;38:1289-97.
  - 27 Nadra K, Anghel SI, Joye E, et al. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Mol Cell Biol* 2006;26:3266-81.
  - 28 Hua S, Kallen CB, Dhar R, et al. Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Mol Syst.Biol* 2008;4:188.
  - 29 Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, et al. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* 2005;122:33-43.
  - 30 Liu MM, Albanese C, Anderson CM, et al. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol.Chem.* 2002;277:24353-60.
  - 31 Dubik D, Shiu RP. Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene* 1992;7:1587-94.
  - 32 Montes M, Tagieva NE, Heveker N, Nahmias C, Baleux F, Trautmann A. SDF-1-induced activation of ERK enhances HIV-1 expression. *Eur.Cytokine Netw.* 2000;11:470-7.
  - 33 Lee BC, Lee TH, Avraham S, Avraham HK. Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Mol Cancer Res.* 2004;2:327-38.
  - 34 Kishimoto H, Wang Z, Bhat-Nakshatri P, Chang D, Clarke R, Nakshatri H. The p160 family coactivators regulate breast cancer cell proliferation and invasion through autocrine/paracrine activity of SDF-1alpha/CXCL12. *Carcinogenesis* 2005;26:1706-15.
  - 35 Tremblay A, Giguere V. Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 2001;77:19-27.
  - 36 Butt AJ, Caldon CE, McNeil CM, Swarbrick A, Musgrove EA, Sutherland RL. Cell cycle machinery: links with genesis and treatment of breast cancer. *Adv.Exp Med Biol* 2008;630:189-205.
  - 37 Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2004;50:3-22.



- 38 Martin LA, Farmer I, Johnston SR, Ali S, Marshall C, Dowsett M. Enhanced estrogen receptor (ER) alpha, ERBB2, and MAPK signal transduction pathways operate during the adaptation of MCF-7 cells to long term estrogen deprivation. *J.Biol.Chem.* 2003;278:30458-68.
- 39 Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI. Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer. *Int.J Cancer* 2001;95:247-54.
- 40 Zhu Y, Sullivan LL, Nair SS, et al. Coregulation of estrogen receptor by ERBB4/HER4 establishes a growth-promoting autocrine signal in breast tumor cells. *Cancer Res.* 2006;66:7991-8.
- 41 Carroll JS, Brown M. Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol.* 2006;20:1707-14.
- 42 Kubarek L, Jagodzinski PP. Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 beta-estradiol and tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* 2007;581:1441-8.
- 43 Harvell DM, Richer JK, Allred DC, Sartorius CA, Horwitz KB. Estradiol regulates different genes in human breast tumor xenografts compared with the identical cells in culture. *Endocrinology* 2006;147:700-13.
- 44 Burns JM, Summers BC, Wang Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 2006;203:2201-13.
- 45 Miao Z, Luker KE, Summers BC, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007;104:15735-40.
- 46 Thelen M, Thelen S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol.* 2008;198:9-13.

## Figure legends

**Figure 1. The SDF-1-CXCR4 pathway stimulates ER-dependent response in breast cancer cells.** **A-** Luciferase activity of stable ERE-reporter expressing MCF-7 cells treated with 10nM 17 $\beta$ -estradiol (E2) and SDF-1 for 16h. Results are normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as fold response compared to vehicle-treated cells. **B-** MCF-7 cells were treated with 10nM E2 with or without 0.2 and 1 $\mu$ g/ml CXCR4 antagonists T140 or AMD3100 for 16h. Cells were also transfected with increasing amounts of an inactive D84N CXCR4 plasmid. Luciferase activity is expressed as in (A). **C-** Real-time RT-PCR analysis on MCF-7 cells treated with 10nM E2 with or without 1 $\mu$ g/ml T140 for 16h. **D-** MTT proliferation assay on MCF-7 cells treated with 10nM E2 in absence or presence of 1 $\mu$ g/ml AMD3100. Results are expressed as % change from untreated cells set at 100%.

**Figure 2. SDF-1 promotes ligand-independent ER activation and target gene expression.** **A-** Luciferase activity of stably ERE-reporter expressing MCF-7 cells treated with 25nM SDF-1 or 1 $\mu$ g/ml T140 for 16h. **B-** MCF-7 cells were transfected with a plasmid encoding CXCR4 or its constitutively active D132N mutant, and harvested for luciferase activity as in (A). **C-** MCF-7 cells were treated for 16h with 25nM SDF-1 in absence or presence of 10nM ICI-182780, prior to real-time RT-PCR analysis. **D-** RT-PCR analysis in MCF-7 cells treated with 10nM E2 or 25nM SDF-1 for 16h. CXCR4 expression was silenced by infecting cells with a lentiviral-carrying shCXCR4 compared to a negative control shRNA.

**Figure 3. The SDF-1-CXCR4 axis activates ER $\alpha$  and ER $\beta$ .** **A-** Luciferase activity of 293 cells transfected with ER $\alpha$  or ER $\beta$  construct in the presence or wt CXCR4 or its inactive

N119K mutant. Cells were then treated with 10nM E2 with or without 25nM SDF-1 or 1 $\mu$ g/ml T140. **B-** 293 cells were transfected with ER $\alpha$  or ER $\beta$  in the presence of CXCR4 plasmid, and then treated as in (A) but in absence of E2. **C-** Similar to (B) except that CXCR4 D132N active mutant or D84N inactive mutant were tested.

**Figure 4. SDF-1 induces ER $\beta$  occupancy and transcription of ERE and AP-1 genes in breast cancer cells.** **A-** Hs578t cells stably expressing ER $\beta$  (Hs-ER $\beta$ ) and their corresponding negative clones (Hs-empty) were treated with 10nM E2 or 25nM SDF-1 for 16h, and subjected to gene expression analysis. **B-** ChIP analysis on MCF-7 cells treated with 10nM E2, 5nM or 25nM SDF-1 for 40 minutes. Fold changes of ChIP signals are expressed relative to untreated cells. **C-** 293 cells were transfected with the AP-1coll-Luc reporter and ER $\beta$  plasmid, followed by treatments with 10nM E2, 5 $\mu$ M tamoxifen (OHT), and/or 25nM SDF-1 for 16h. **D-** Hs-ER $\beta$  cells were treated with 5 $\mu$ M OHT in absence or presence of 25nM SDF-1 for 16h prior to gene expression analysis. **E-** ChIP analysis on MCF-7 cells treated with 5 $\mu$ M OHT in absence or presence of 5nM or 25nM SDF-1 for 40 minutes. Fold changes are expressed as in (B).

**Figure 5. Role of the conserved AF-1 Ser-87 of ER $\beta$  in mediating responsiveness to the CXCR4/SDF-1 pathway.** **A-** Luciferase activity of 293 cells transfected with EREtkLuc in the presence of CXCR4 and serine to alanine mutants of mouse ER $\beta$  (schematically represented), and treated with 10nM E2 with or without 25nM SDF-1 for 16h. **B-** 293 cells were transfected with the AP-1coll-Luc reporter and wt or S106A ER $\beta$ , followed by treatment

with 5 $\mu$ M tamoxifen (OHT) and 25nM SDF-1 for 16h. **C-** 293 cells were transfected as in (A) and luciferase activity was determined in response to 25nM SDF-1 with or without 50 $\mu$ M PD98059. **D-** Western analysis of MCF-7 cells treated with 25nM SDF-1 for the indicated time periods. CXCR4 expression was silenced using shRNA-carrying lentiviral infection. **E-** MCF-7 cells were treated as in (D) prior to immunoprecipitation of ER $\beta$ . Western analysis was performed using the anti phospho-Ser-87 ER $\beta$  antibody. The effect of CXCR4 silencing on ER $\beta$  phosphorylation is also shown.

**Figure 6. A proposed model for the positive autocrine loop between ERs and the CXCR4/SDF-1 pathway.** Activation of ER $\alpha$  or ER $\beta$  by estrogen induces SDF-1 gene expression which in turn triggers Erk1/2 activation through interaction with its cognate CXCR4 receptor. For ER $\beta$ , the enhanced Erk activity results in the phosphorylation of Ser-87 in the AF-1 domain and subsequent receptor transcriptional activation. Such feed forward mechanism between ERs and CXCR4 is proposed to promote growth potential to breast cancer cells.

Fig. 1

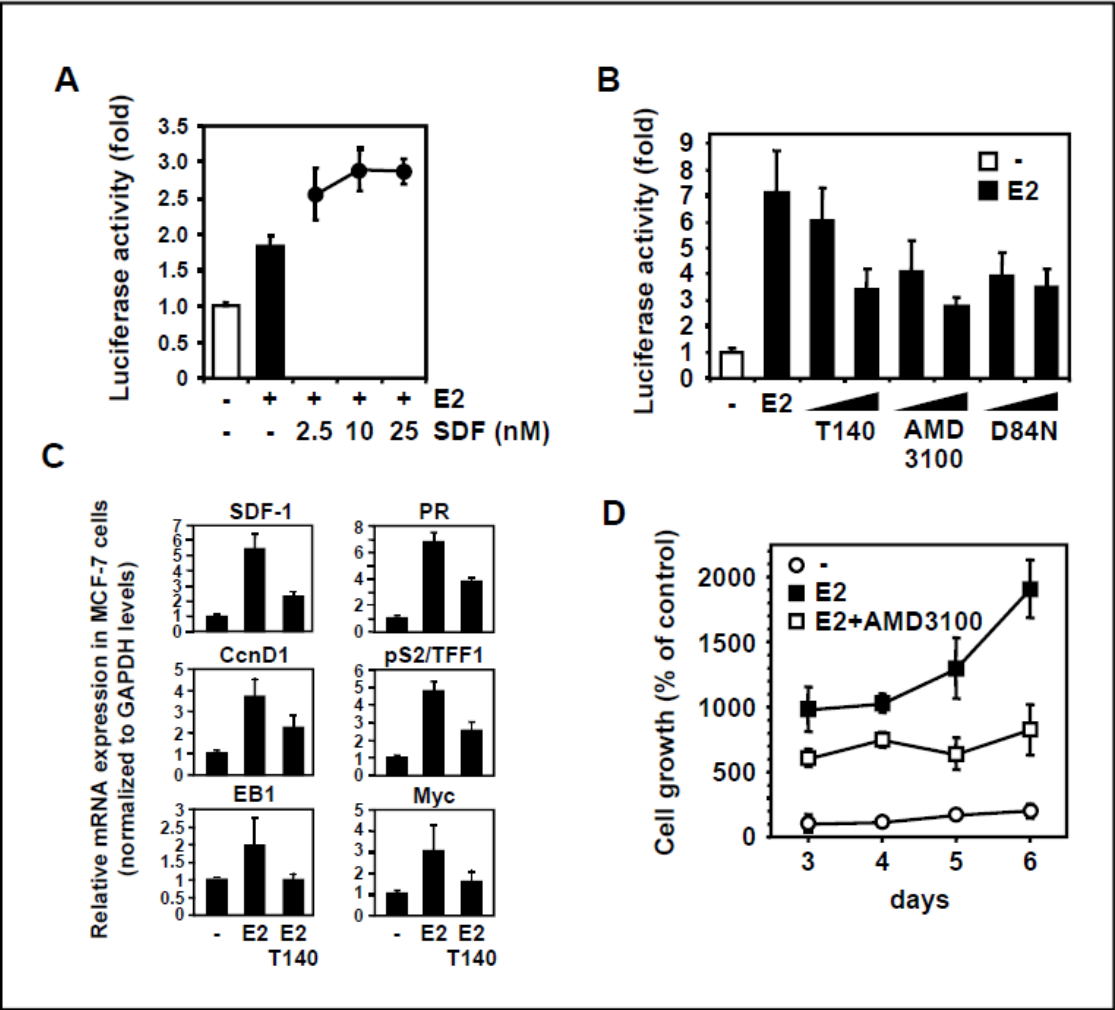


Fig. 2

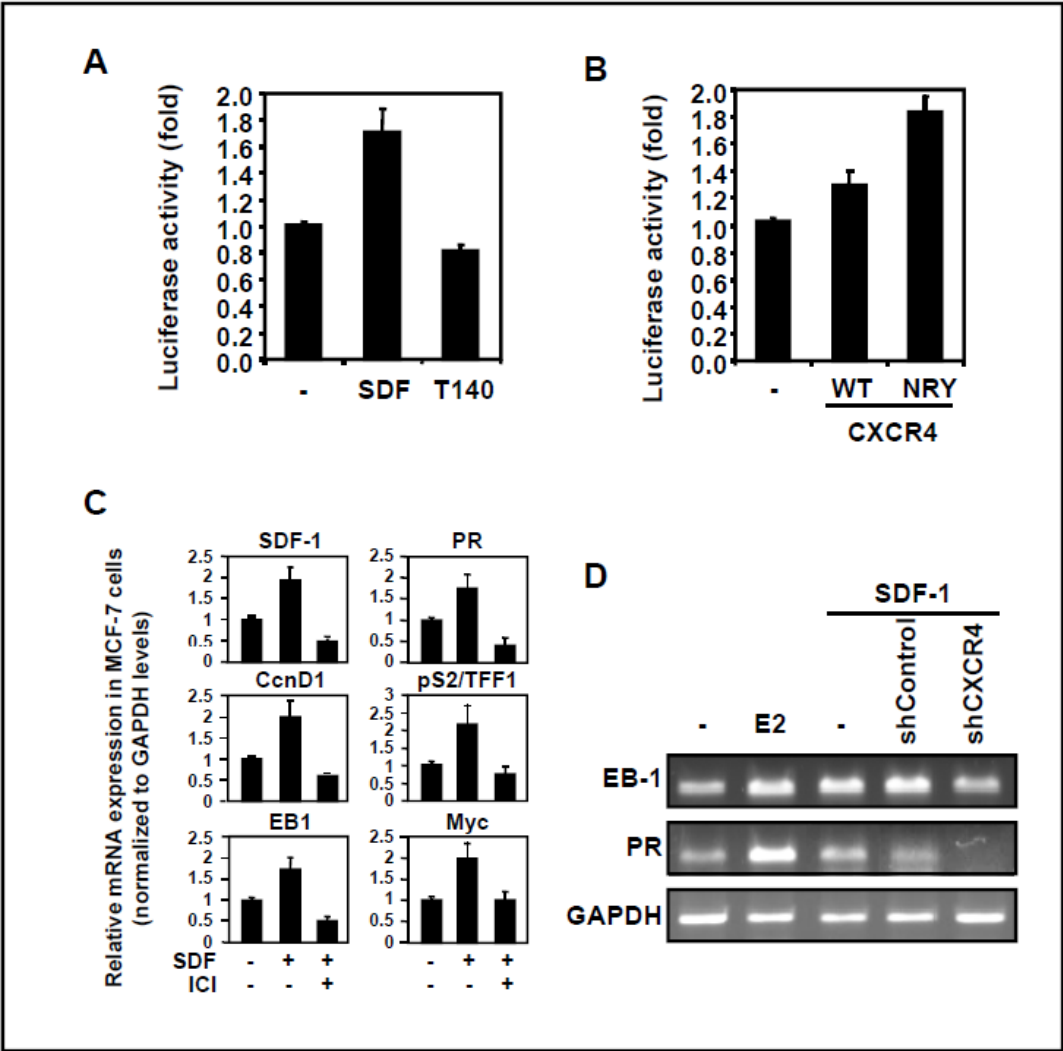


Fig. 3

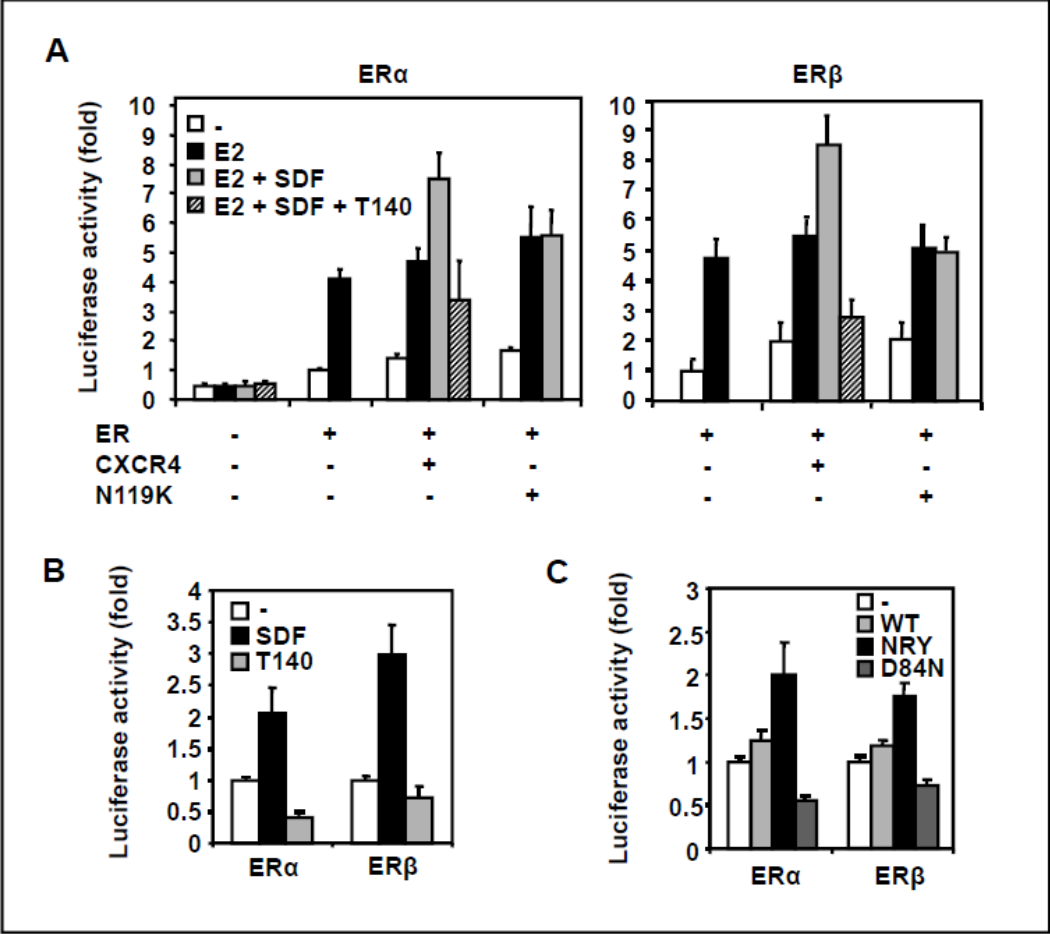


Fig. 4

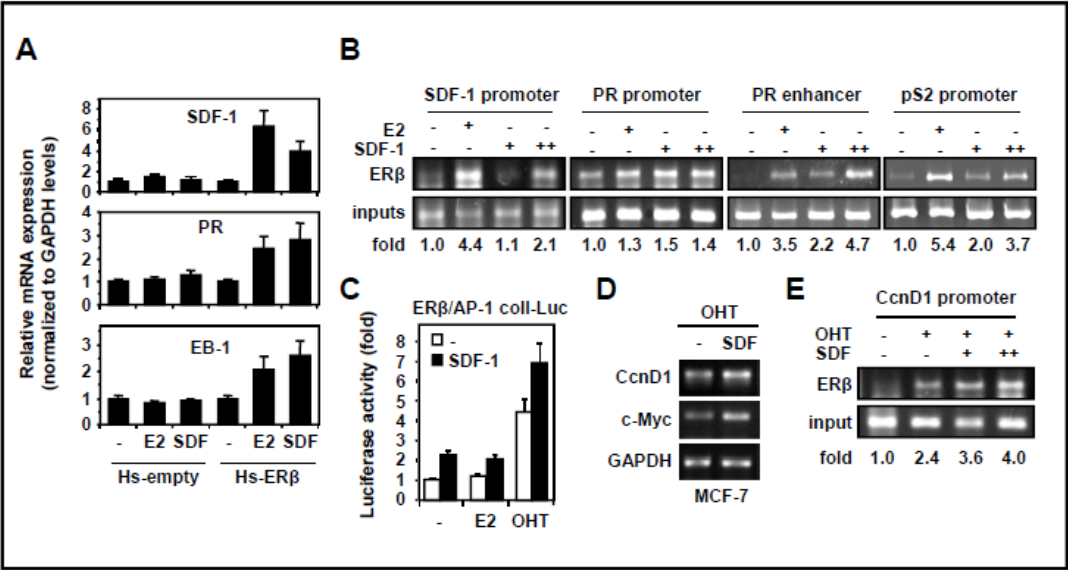




Fig. 5

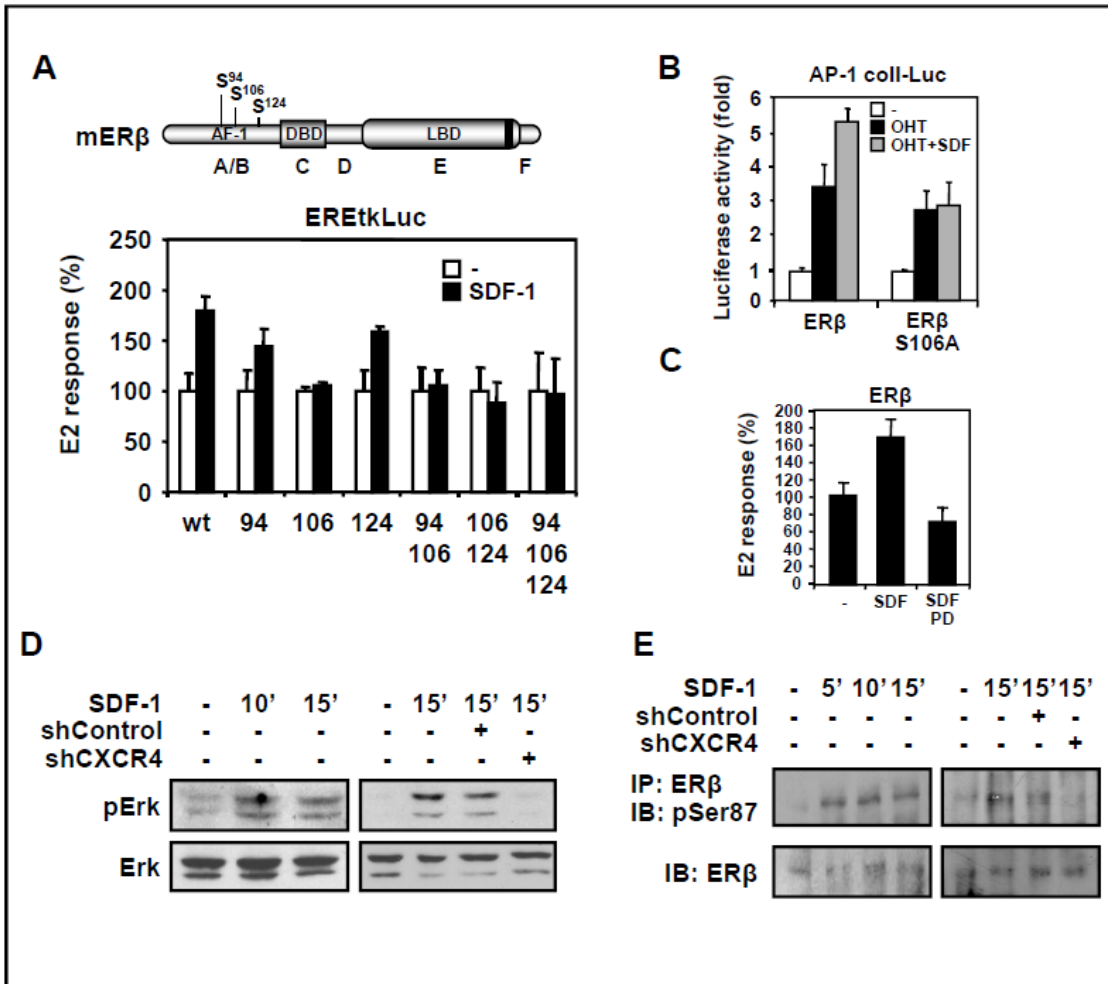


Fig. 6

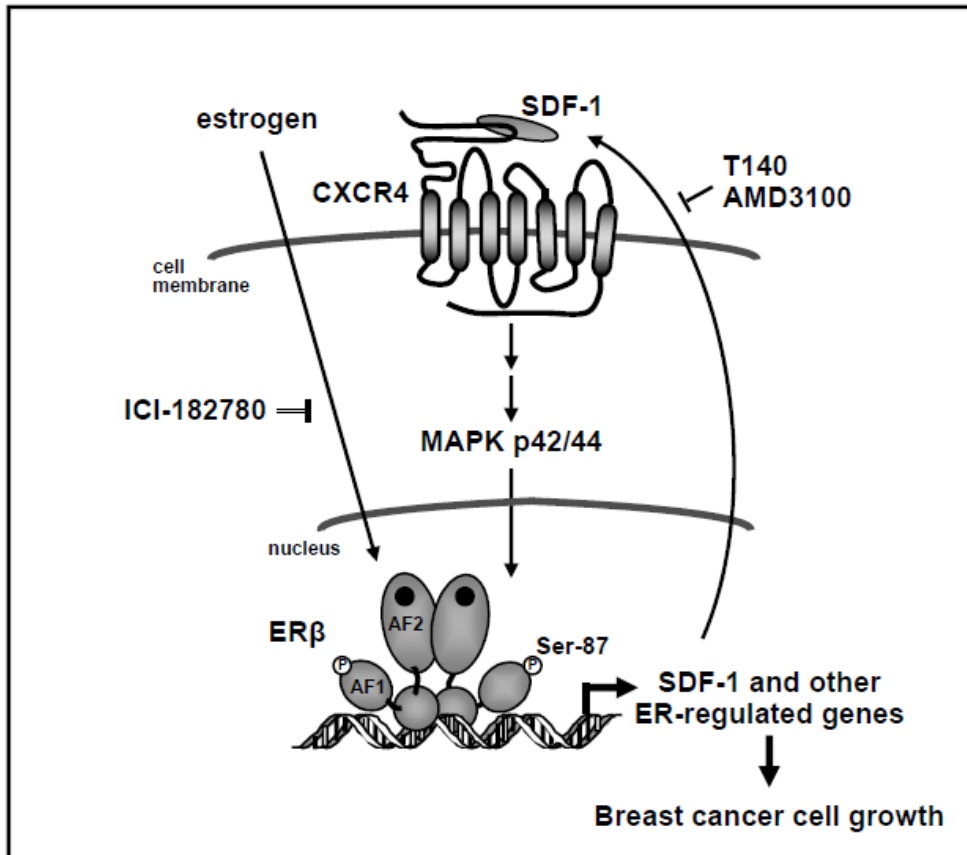
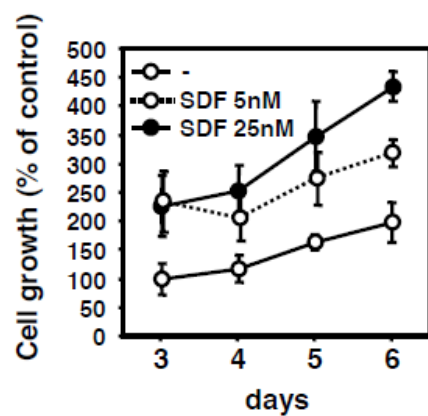
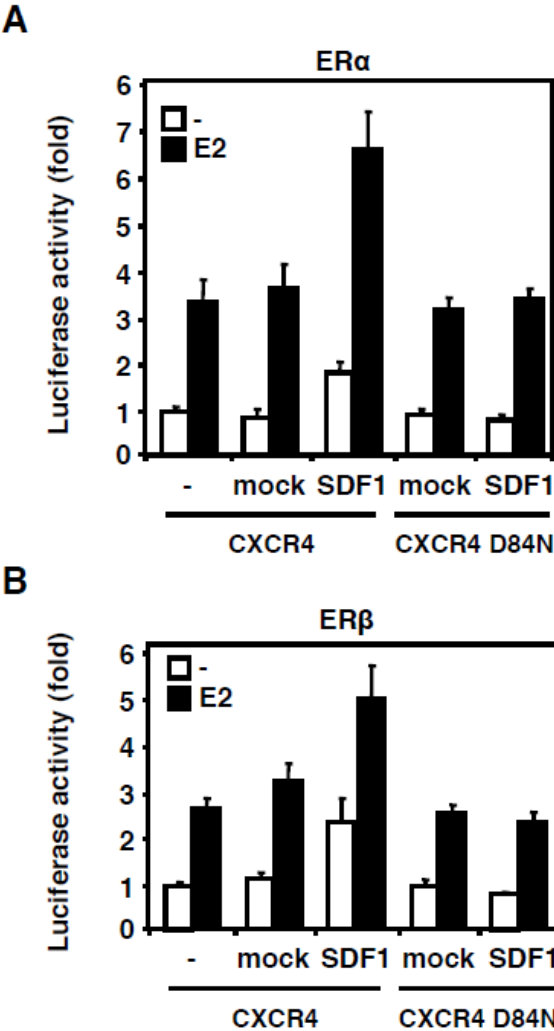


Fig. S1



**Supplementary Figure 1.** SDF-1 promotes the growth of MCF-7 cells. MTT proliferation assay on MCF-7 cells treated with 5 or 25nM SDF-1 over the indicated time period. Results are expressed as % change from untreated cells which is set at 100%.

Fig. S2

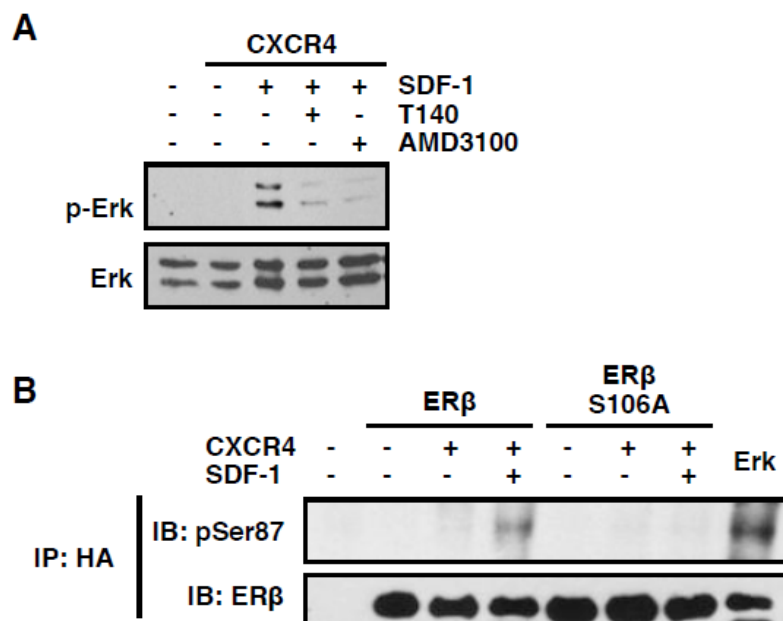


**Supplementary Figure 2.** Paracrine control of ER $\alpha$  and ER $\beta$  activation by SDF-1.

**A-** 293 cells were transfected with an EREtkLuc reporter and plasmids encoding ER $\alpha$  and CXCR4 or the inactive CXCR4 D84N variant. Separate 293 cells transfected with an empty (mock) or a plasmid coding for human SDF-1 were then added for 16h, in presence or absence of 10nM estradiol (E2). Co-cultured cells were then harvested for luciferase activity, and results expressed as fold response compared to untreated cells set at 1.0 for either wild type or mutated CXCR4 constructs used in transfection.

**B-** Similar experiment as in (A) except that ER $\beta$  was expressed in cells.

Fig. S3

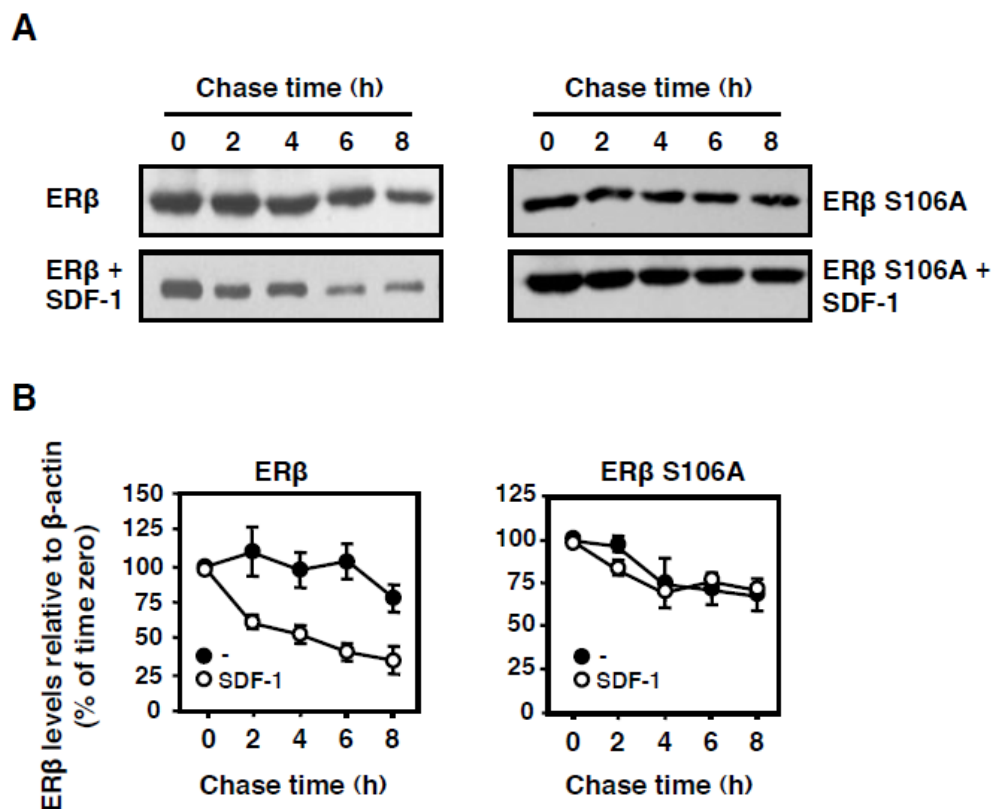


**Supplementary Figure 3.** The CXCR4-SDF-1 pathway signals the phosphorylation of Ser-106 of mouse ER $\beta$ .

**A-** CXCR4 signals to Erk. 293 cells were transfected with CXCR4 plasmid followed by treatment with 25nM SDF-1 for 15min prior to Western analysis. Cells were also treated with CXCR4 antagonists TC140 and AMD3100.

**B-** Ser-106 of mouse ER $\beta$  is phosphorylated upon activation of CXCR4 by SDF-1. HA-tagged ER $\beta$  was expressed in 293 cells in absence or presence of CXCR4. After transfection, cells were treated or not with 25nM SDF-1 for 15min and harvested for immunoprecipitation of ER $\beta$  using an anti-HA antibody. Western analysis was then performed on immunoprecipitates using an anti human phospho-Ser-87 (which corresponds to mouse Ser-106) ER $\beta$  antibody. The mouse S106A mutant was also tested to ensure selectivity of the pSer-87 antibody towards mouse Ser-106. As a positive control, Erk was activated by coexpressing constitutive Mek1 and Erk2 plasmids. Samples were normalized to ER $\beta$  content using an anti-ER $\beta$  antibody.

Fig. S4



**Supplementary Figure 4. Ser-106 regulates mouse ER $\beta$  degradation by SDF-1.**  
**A-** 293 cells were transiently transfected with plasmids expressing HA-tagged wild-type or S106A ER $\beta$  in presence of CXCR4 plasmid. At 12 hours after transfection, cells were treated or not with 25nM SDF-1, and cycloheximide was added at a concentration of 50 $\mu$ M. Cells were then lysed for Western blot analysis at the indicated time points.  
**B-** Each signal intensity was obtained from 2-3 separate experiments such as in (A) and expressed relative to  $\beta$ -actin levels.

## **2 – 2ième publication**

# **Interplay between CXCR4 and ErbB2/ErbB3 signaling regulates the hormonal response of estrogen receptors $\alpha$ and $\beta$**

**Karine Sauvé<sup>1</sup>, Mélanie Sanchez<sup>1</sup> and, André Tremblay<sup>1,2\*</sup>**

**Ste-Justine Hospital Research Center and Departments of <sup>1</sup>Biochemistry & Molecular Medicine and <sup>2</sup>Obstetrics & Gynecology  
University of Montreal, Montréal, Québec, Canada**

**(in preparation)**

Keywords: ErbB2/Her-2/Neu; ErbB3; Heregulin; CXCR4; PI3-K/Akt pathway; ER $\alpha$ ; ER $\beta$ ; MCF-7; BT-474; breast cancer

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have no competing interests

\* Correspondence should be addressed to:

André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada

Phone: (514) 345-4931 x2830

Fax: (514) 345-4988

## Mise en contexte

L'action de certains RTK peut dépendre de la signalisation médiée par certains RCPGs. La migration, l'invasion et l'adhésion cellulaire des cellules cancéreuses mammaires surexprimant ErbB2 dépendent de l'expression de CXCR4 (Li et al., 2004). Il a été démontré que la surexpression de ErbB2 induit l'expression de CXCR4 et réduit la dégradation de CXCR4 en réponse à son ligand SDF-1, prolongeant ainsi sa signalisation. De plus, plusieurs études ont rapporté la transactivation de ErbB2 par le ligand de CXCR4, SDF-1 (Cabioglu et al., 2005, Chinni et al., 2008, Pattarozzi et al., 2008). Par ailleurs, il a également été rapporté que CXCR4 participe à l'activation de la Rac-GEF P-Rex1 par le récepteur ErbB3 (Sosa et al., 2010) Ces résultats suggèrent un couplage entre des membres de la famille ErbB et CXCR4. Nous avons démontré au laboratoire que l'activation de CXCR4 augmente l'activité transcriptionnelle des ERs (Sauvé et al., 2009). Nous avons également démontré que l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 par le facteur de croissance héréguiline- $\beta$  régule négativement l'activité transcriptionnelle E2-dépendante des ERs (St-Laurent et al., 2005, Sanchez et al., 2007, Sanchez et al., 2013). Nous nous sommes intéressés à l'impact de CXCR4 et de SDF-1 sur la signalisation de ErbB2/ErbB3/Hrg- $\beta$ . Nous avons démontré que CXCR4 régule négativement la stabilité protéique de ErbB2 et ErbB3 ainsi que la phosphorylation de ErbB2 et altère l'activation de la voie PI3-K/Akt en réponse à ErbB2/ErbB3. Par ailleurs, héréguiline- $\beta$  induit la phosphorylation d'un résidu dans la queue C-terminale de CXCR4 régulant l'internalisation et le recyclage du récepteur et favorise l'assemblage d'un complexe ErbB2/ErbB3-CXCR4. Le couplage entre ErbB2/ErbB3 et CXCR4 ainsi décrit affecte l'activité des ERs en relevant la répression hormonale des ERs médiée par ErbB2/ErbB3. Par ailleurs, le ligand de CXCR4, SDF-1, permet de récupérer l'activation de la voie PI3-K/Akt et la répression hormonale des ERs en réponse à ErbB2/ErbB3.



## **Contributions des auteurs**

Karine Sauvé : A titre de premier auteur, j'ai initié le projet, fait l'entière conception et réalisé toutes les expériences. J'ai également écrit la première version de l'article.

Mélanie Sanchez : Par son expertise scientifique sur les ERs et les ErbBs, a participé aux discussions et m'a apporté son aide à nombreuses reprises (théorique et technique) ce qui m'a aidé à bien diriger et structurer mon projet.

André Tremblay : En tant que superviseur, Dr. Tremblay a supervisé et participé à la conception du projet. Il a également corrigé une partie de la première version de l'article.

## Abstract

Overexpression and deregulated signaling of receptor tyrosine kinase ErbB2 correlate with aggressive breast tumor phenotype and poor outcomes. Enhanced expression of chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12/SDF-1 is also associated with aggressive disease and dissemination. Both of these oncogenic pathways are described to impact estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  but how ErbB2 and CXCR4 signaling is functionally related to regulate ER response in breast cancer cells is not known. Here we show that steady-state levels of ErbB2 and its dimeric partner ErbB3, as well as ErbB2 tyrosine phosphorylation are negatively regulated with the expression of CXCR4. CXCR4 downregulates ErbB2/ErbB3 dimer activation of the PI3-K/Akt pathway in response to ErbB3 ligand heregulin- $\beta$ , whereas addition of SDF-1 restored activation levels. These effects were not observed using a dominant negative CXCR4 N119K mutant, suggesting a role for CXCR4 signaling. We found that heregulin- $\beta$  promoted CXCR4 phosphorylation at serine 339, a site important for CXCR4 internalization and signaling. In addition, ErbB2 recruitment to CXCR4 was enhanced by ErbB3 and heregulin- $\beta$ , and also increased with a constitutive active form of ErbB2. Gene expression analysis and knockdown experiment showed that the hormonal repression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  target genes in ErbB2 activated breast cancer cells was relieved with the expression of CXCR4 and partially recuperated with the addition of SDF-1. These effects appeared selective for genes regulated by estrogen-response elements in contrast to AP-1 binding sites. Together, these results show that CXCR4 recruitment to ErbB2 alters ErbB2/ErbB3 signaling pathway and downstream regulation of ER hormonal activity in breast cancer cells.

## Introduction

ErbB2 (also known as HER-2 and Neu) is a receptor tyrosine kinase that has oncogenic activity in many cancers. In particular, ErbB2 overexpression and/or gene amplification is found in 25 to 30 % of breast cancers and is associated with aggressive tumor phenotype and poor outcomes (Slamon et al., 1987, Slamon et al., 1989). ErbB2 is one of the four members of the epidermal growth factor receptor family which also includes ErbB1 (EGFR), ErbB3 (HER-3) and ErbB4. With the exception of ErbB2, other ErbB receptors mediate downstream signaling following activation with growth factor ligands such as EGF and TGF $\alpha$  (ErbB1 ligands) and heregulins/neuregulins (ErbB3/ErbB4 ligands) (Todaro et al., 1980, Chang et al., 1997). However, despite the presence of an extracellular ligand binding-like structure, ErbB2 remains an orphan receptor (Cho et al., 2003, Garrett et al., 2003). ErbB2 overexpression is sufficient to promote cell growth and transformation but dimerization with other liganded ErbB receptors confer also oncogenic potential. Cell surface ErbB2 expression is very stable as the receptor does not internalize properly and is rapidly recycled back to the membrane, contributing to prolonged and enhanced signaling of ErbB2-containing heterodimers (Lenferink et al., 1998, Muthuswamy et al., 1999, Yarden and Sliwkowski, 2001). In particular, ErbB2 dimerization with ErbB3 represents a strong signaling complex that promotes high transforming and mitogenic activities (Holbro et al., 2003) (Alimandi et al., 1995, Wallaschl et al., 1995, Pinkas-Kramarski et al., 1996). However, ErbB3 does not possess a functional catalytic tyrosine kinase domain and hence requires to heterodimerize upon activation with its ligand heregulin (Carraway et al., 1994, Guy et al., 1994, Berger et al., 2004). The combinatorial dimerization of ErbB receptors and their distinct coupling to signaling adaptors and effectors create a complex network of signaling events that, when

deregulated, leads to uncontrolled growth and transformation. Dissecting the cellular mechanisms leading to deregulation of ErbB2-controlled pathways in breast cancers is therefore essential.

CXCR4 is a G $\alpha$ i-protein coupled receptor that is activated by the chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1; also referred to as CXCL12). CXCR4-SDF-1 interaction plays a role in primary and metastatic breast cancers by enhancing tumor cell proliferation, angiogenesis, and invasion to SDF-1 producing tissues such as bone, lung and (Smith et al., 2004, Mukherjee and Zhao, 2013). In addition to its direct role in the progression of breast cancer, CXCR4 has been linked with ErbB2 expression in breast cancer. In ErbB2-overexpressed breast cancer cells, CXCR4 ligand-induced degradation was inhibited, contributing to enhance CXCR4 protein levels and cell invasion (Li et al., 2004). ErbB2 phosphorylation and activation was also enhanced in overexpressing breast cancer cells treated with SDF-1 (Cabioglu et al., 2005). Other ErbB receptors were also shown to be modulated by CXCR4. ErbB3 activation of the exchange factor Rac-GEF P-Rex1 required CXCR4 transactivation by ErbB1/EGFR, resulting in enhanced migration of breast cancer cells, although these effects were independent of the presence of SDF-1 (Sosa et al., 2010). These observations suggest a regulatory interplay between CXCR4 and ErbB-induced signaling pathways in breast cancer.

Estrogens exert potent mitogenic actions in hormone-sensitive breast cancers through their interaction with estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which belong to the nuclear hormone receptor family of ligand-activated transcription factors (Mangelsdorf et al., 1995). Regulation of estrogen-responsive gene expression by estrogen receptors involves binding to estrogen response elements (ERE) within target promoters and recruitment of coactivators to facilitate

chromatin remodeling and transcription (Paech et al., 1997, Glass et al., 2000, McKenna and O'Malley, 2002). In addition to hormone, ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity is also regulated by growth factor signaling pathways, primarily involving phosphorylation of the N-terminal activation function AF-1. For instance, phosphorylation of ER $\alpha$  AF-1 by MAPK/Erk and Akt induced ER $\alpha$  activity (Kato et al., 1995, Bunone et al., 1996, Campbell et al., 2001, Thomas et al., 2008), whereas ER $\beta$  AF-1 phosphorylation resulted in the recruitment of transcriptional coactivators and transactivation in response to EGF and oncogene Ras (Tremblay et al., 1999, Tremblay and Giguère, 2001). Conversely, heregulin treatment of breast cancer cells resulted in impaired activation of ER $\alpha$  by estrogen (Pietras et al., 1995, Kumar et al., 1996, Tang et al., 1996) and also of ER $\beta$  involving ErbB2/ErbB3 activation of the p38 and Akt pathways (St-Laurent et al., 2005, Sanchez et al., 2007, Sanchez et al., 2013). Increasing evidence associates these effects on the deregulation of ERs by ErbB receptors to hormone resistance, which develops in most treated patient with selective estrogen receptor modulators (SERMs), such as tamoxifen (Clarke et al., 2003). ErbB2 overexpression has been correlated with hormone resistance in breast cancers (Yu and Hung, 2000) and increased heregulin- $\beta$  expression has led to loss of E2 dependence and acquisition of tamoxifen resistance (Tang et al., 1996).

The CXCR4/SDF-1 chemokine axis also contributes in the regulation of estrogen receptors. We have recently reported that SDF-1 activation of CXCR4 induced ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity in absence or presence of estrogen, resulting in enhanced target gene expression and growth of breast cancer cells (Sauvé et al., 2009). Interestingly, the *CXCL12* gene which codes for chemokine SDF-1 was identified as a direct target of ER $\alpha$  (Hall and Korach, 2003), a finding also reported for ER $\beta$  (Sauvé et al., 2009), and as such, both ERs were shown to be

part of an autocrine positive feedback loop with the CXCR4/SDF-1 axis, contributing to proliferation of breast cancer cells (Sanchez et al., 2010).

Here, we describe an intricate interplay between CXCR4 and ErbB2 receptors in breast cancer cells, affecting protein levels, phosphorylation and signaling of each component. We found that ErbB2 and ErbB3 are present in a complex with CXCR4, resulting in cross-regulation by their respective ligands and downstream and selective modulation of the PI3-K/Akt pathway. This convergence of ErbB2/ErbB3 and CXCR4 signaling pathways directly impacts ER $\alpha$  and ER $\beta$ -mediated gene expression, thus underscoring the potential of pro-oncogenic signals to alter each other with consequences on ER functions in breast cancer cells.

## **Materials and Methods**

### **Plasmids**

Expression plasmids coding for mouse and human ER $\alpha$  and ER $\beta$ , human ErbB2 wild-type, V659E constitutive variant, and K753A kinase deficient mutant, and human ErbB3 have been described previously (St-Laurent et al., 2005, Sanchez et al., 2007). Plasmids coding for human YFP-tagged CXCR4 and the N119K defective mutant were described (Percherancier et al., 2005, Berchiche et al., 2007, Sauvé et al., 2009).

### **Cell Culture, Transfection, and Treatments**

Human embryonic kidney 293-T and human breast cancer MCF-7 and BT-474 cells were cultured in DMEM (Sigma, St-Louis, MO) supplemented with 5% and 10% fetal bovine serum, respectively. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Prior to transfection, cells were seeded in phenol red-free DMEM supplemented with charcoal dextran-treated serum. 293 cells were transfected using calcium phosphate as described (Picard et al., 2012). MCF-7 and BT-474 cells were transfected using polyethylenimine in serum-free medium and 10% FBS was added to cells for 4-6 hrs. Cells were serum-starved in phenol red-free medium supplemented with 0.5% BSA prior to treatments. Cells were treated with 10 nM estradiol (Sigma, St-Louis, MO), 25 nM SDF-1 (Cell Sciences, Canton, MA), and/or 50 ng/ml heregulin- $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, MN) for 16-20 hrs or left untreated (control). When indicated, cells were also treated with 1  $\mu$ M proteasome inhibitor MG-132 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY), 200  $\mu$ M lysosome inhibitor chloroquine (Sigma, St-Louis, MO), 1  $\mu$ M PKC inhibitor G   6850 (Calbiochem, Billerica, MA), or 5  $\mu$ M ErbB2 inhibitor AG825 (Enzo Life Sciences Farmingdale, NY).

### **Luciferase Assay**

Luciferase assays were performed essentially as described (Sauvé et al., 2009, Picard et al., 2012, Sanchez et al., 2013). Cells were transfected with respective expression plasmids in the presence of a luciferase reporter gene under the control of the estrogen response element of the vitellogenin gene (vitA<sub>2</sub>-ERE-tkLuc). After transfection, the medium was changed, and cells were treated and lysed in potassium phosphate buffer containing 1% Triton X-100, and luciferase activity was measured by luminescence (Wallac, Turku, Finland). Luciferase assays were performed in triplicates from at least three independent experiments, and values were expressed as relative light units normalized to the  $\beta$ -galactosidase activity of each sample.

### **Western blotting and Immunoprecipitation Assay**

Western blot analysis of ErbB2 and ErbB3, and of ErbB2 phosphorylation was performed essentially as described (St-Laurent et al., 2005), using anti-ErbB2 and anti-ErbB3 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) and an anti-phospho-ErbB2 Tyr-1248 antibody (NeoMarkers, Fremont, CA). Total protein loading was normalized using an anti- $\beta$ -actin antibody (Abcam, Cambridge, MA). Transfected YFP-CXCR4 levels were determined using an anti-GFP antibody (Roche, Laval, QC). Phosphorylation of CXCR4 was analyzed either directly from cell extracts or following immunoprecipitation of CXCR4 using an anti-phospho-CXCR4 Ser-339 antibody (kind gift from J.B. Rubin). For immunoprecipitation of endogenous p85, ErbB3 and ErbB2, cells were lysed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate acid, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitor cocktail (Roche), and immunoprecipitation was carried out using anti-p85, anti-ErbB3 and anti-ErbB2 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX ) Western analysis



was performed as described above. Phosphorylated PI3-K p85 subunit was analyzed using an anti-phospho-p85 Tyr-467 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Western analysis of phosphorylated and non-phosphorylated forms of Akt, Erk1/2 and p38 was performed as described (St-Laurent et al., 2005, Sanchez et al., 2007, Sauvé et al., 2009). Co-immunoprecipitation assays were performed in lysis buffer with 0.7 M NaCl and no SDS.

### **Cycloheximide Chase**

293 cells were transfected with ErbB2 and ErbB3 in the absence or presence of CXCR4 plasmid as described above. At 12 h post transfection, cycloheximide (Sigma, St-Louis, MO) was added at a concentration of 50  $\mu$ M and cells were harvested at each indicated time points and lysed for Western analysis of ErbB2. Each signal intensity, derived from three separate experiments, was quantified using an image analyzer (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) and expressed relative to  $\beta$ -actin levels.

### **RNA Interference**

Lentiviral knockdown of CXCR4 was performed essentially as described (Sauvé et al., 2009). Small hairpin RNA (shRNA) duplexes targeting the sequence TGGAGGGGATCAGTATATACA of human CXCR4 (shCXCR4) were inserted in pLenti vector. Viral particles were produced in HEK 293-T cells and used to infect MCF-7 cells. CXCR4 knockdown was monitored by Western analysis and real-time PCR.

### **RNA isolation and Real-time PCR**

RNA was prepared using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) and reverse transcription was performed as described (Rodrigue-Way et al., 2007). PCR products were analyzed on a StepOnePlus cycler (Applied Biosystems). Values are derived from at least two separate experiments performed in triplicate and normalized to ribosomal protein RPLP0/36B4 expression.

## Results

### **ErbB2 tyrosine phosphorylation is regulated by chemokine receptor CXCR4**

We addressed the role of CXCR4 on the regulation of ErbB2 by transfecting human embryonic kidney 293 cells with ErbB2 expressing construct in the presence of ErbB3, which allowed to activate ErbB2/ErbB3 dimer using heregulin- $\beta$ 1, a ligand of ErbB3. As seen in Fig. 1A, protein levels of ErbB2 greatly decreased in response to CXCR4 expression as determined by Western blot analysis. The decrease was independent of the addition of heregulin- $\beta$ 1, which cannot restore receptor levels despite ErbB2 activation as monitored using an anti-ErbB2 phospho-tyrosine (Tyr-1248) antibody. Phosphorylated ErbB2 was also diminished by CXCR4, consistent with the decrease in ErbB2 protein levels (Fig.1A). Similar to ErbB2, ErbB3 levels were also reduced by CXCR4 and were not modulated by heregulin- $\beta$ 1 or with addition of CXCR4 ligand SDF-1 (Fig. 1B). The decrease in ErbB2 was dependent on CXCR4 activity, as a CXCR4 inactive N119K mutant had no effect on ErbB2 steady-state levels (Fig. 1C). In order to directly address the effect on ErbB2 without the context of ErbB3 dimerization, we used a V659E ErbB2 variant which exhibits homodimer constitutive active (Sanchez et al., 2007). Expression of wild-type CXCR4, but not the inactive mutant N119K, was shown to decrease total and phosphorylated ErbB2 V659E variant levels (Fig. 1D). These results suggest that CXCR4 can affect ErbB2/ErbB3 dimer activity through modulation of ErbB2 levels and phosphorylation.

We next addressed the impact of CXCR4 on endogenously expressed ErbB2 in the context of human breast cancer cells. Transient expression of CXCR4 in MCF-7 cells dramatically decreased ErbB2 steady-state levels (Fig. 2A), a finding also observed in human breast cancer BT-474 cells, which express higher levels of ErbB2 compared to MCF-7 cells

(Fig. 2B). The active form of ErbB2 measured by Tyr-1248 phosphorylation was also downregulated by CXCR4 despite the presence of heregulin- $\beta$ 1 (Fig. 2B). In addition, knockdown of CXCR4 using lentiviral shRNA abolished the decrease in ErbB2 in MCF-7 cells and even led to an increase similar to the one observed with ErbB3 (Fig. 2C). These findings suggest that CXCR4 can regulate ErbB2/ErbB3 receptor levels in breast cancer cells.

### **CXCR4 induces ErbB2 and ErbB3 degradation**

To determine whether CXCR4 affects ErbB2 turnover, we performed cycloheximide chase experiments in cells expressing ErbB2 and ErbB3 in the presence or absence of CXCR4. We found that over a period of 24 h, ErbB2 protein levels remained very stable (Fig. 2D), similar to what was reported in other cell systems (Austin et al., 2004, Hong et al., 2012). However, ErbB2 levels markedly decreased in the presence of CXCR4 ( $t_{1/2}=17.92 \pm 2.56$ ), indicating that CXCR4 increases ErbB2 degradation rate (Fig. 2D). Such enhanced degradation of ErbB2 was not dependent on the 26S proteasome-ubiquitin pathway, since addition of MG-132 inhibitor did not restore ErbB2 decreased levels in the presence of CXCR4 (Fig. 2E). However, under the same conditions, the decrease in ErbB3 in the presence of CXCR4 was relieved by MG-132 with the augmentation of ErbB3 signal but also of a faster-migrating band likely corresponding to a non-glycosylated form of the receptor (Fig. 2E). Consistent with this, both glycosylated and non-glycosylated forms of ErbB3 were reported to accumulate in cells treated with MG-132 inhibitor (Qiu and Goldberg, 2002).. Given that the 26S proteasome system was not involved in ErbB2 downregulation by CXCR4, we next addressed the role of the lysosomal degradation pathway which has also been implicated in ErbB2 degradation (Marx et al., 2007, Pedersen et al., 2008). Interestingly,

ErbB2 decreased levels in the presence of CXCR4 were restored, although partially, in cells treated with the lysosomal inhibitor chloroquine (Fig. 2F). Altogether, these findings suggest a role of both the 26S proteasome and the lysosomal degradation pathways in the regulation of ErbB2 and ErbB3 receptor turnover by CXCR4.

### **Activation of ErbB2 induces CXCR4 Ser-339 phosphorylation by protein kinase C**

Increased phosphorylation at the C-terminal tail of CXCR4 has been reported upon binding to its ligand SDF-1, resulting in receptor signaling and trafficking (Busillo et al., 2010). In order to determine the impact of ErbB2 signaling on CXCR4 phosphorylation, we analyzed the phosphorylation status of CXCR4 serine 339 based on previous findings that this site was reported as a target in response to the growth factor EGF (Woerner et al., 2005). Using a phospho-specific antibody for CXCR4 Ser-339, we found that ErbB2/ErbB3 dimer activation by heregulin- $\beta$ 1 resulted in an increase in CXCR4 phosphorylation (Fig. 3A). As a control, co-expression of ErbB3 with a kinase-dead K753A mutant of ErbB2 abolished the effect of heregulin- $\beta$ 1 on CXCR4 Ser-339 phosphorylation, indicating that ErbB2 signaling is required (Fig. 3A). In an attempt to identify the required protein kinase involved in the response to heregulin- $\beta$ 1, we tested the role of protein kinase C (PKC) based on reports implicating PKC in SDF-1 induced CXCR4 phosphorylation (Haribabu et al., 1997, Signoret et al., 1997, Orsini et al., 2000). We found that PKC inhibitor Gö-6850 greatly impaired the effect of heregulin- $\beta$ 1 on CXCR4 Ser-339 phosphorylation (Fig. 3B). Interestingly, addition of CXCR4 ligand SDF-1 did not further increase Ser-339 phosphorylation levels by heregulin- $\beta$ 1, indicating that no additive effects were achieved, despite an increased phosphorylation of this site by either treatment alone (Figs. 3B and S1A). Similarly, constitutively active V659E

variant of ErbB2 promoted CXCR4 Ser-339 phosphorylation, which was not further enhanced by SDF-1 (Fig. S2B), but was abolished by the PKC inhibitor (Fig. S2C). Treatment of breast cancer MCF-7 cells with Gö-6850 also strongly impaired CXCR4 Ser-339 phosphorylation induced by heregulin- $\beta$ 1 (Fig. 3C). These results indicate that activation of ErbB2 signaling targets CXCR4 specific phosphorylation involving PKC activity.

### **Formation of a CXCR4-ErbB2/ErbB3 complex**

In view that both CXCR4 and ErbB2 activation can regulate the phosphorylation of each other and therefore their respective signaling, we determined whether ErbB2 and CXCR4 could interact together in a same complex. Using co-immunoprecipitation assay performed in transfected 293 cells, CXCR4 was detected following ErbB2 immunoprecipitation in untreated cells but stronger signals were obtained in response to heregulin- $\beta$ 1, suggesting an increased CXCR4-ErbB2 interaction (Fig. 4A). Addition of the ErbB2 inhibitor AG825 impaired this interaction following heregulin- $\beta$  treatment, indicating that ErbB2 activation is important in recruiting CXCR4. In addition, ErbB3 recruitment to CXCR4 was also increased in response to heregulin- $\beta$  (Fig. 4B). Consistent with the requirement of ErbB2 activation, recruitment of ErbB2 K753A kinase dead mutant to CXCR4 was observed but not modulated by heregulin- $\beta$  or SDF-1 treatment (Fig. 4C). In addition, a strong recruitment of CXCR4 was observed with the constitutive ErbB2 V659E variant ErbB2 in absence of heregulin- $\beta$  and SDF-1 (Fig. 4D). However, treatment of cells with SDF-1 further increased the CXCR4 recruitment (Fig. 4D), as opposed to the ligand non-responsive N119K CXCR4 mutant, which interacted with the ErbB2 V659E variant, but the complex formation was not modulated by SDF-1 (Fig. 4E). The stimulating effect of SDF-1 on ErbB2-CXCR4 interaction seems to occur only in the context

of the constitutive ErbB2 variant, as treatment with SDF-1 did not further promote CXCR4 recruitment in the context of ErbB2 and ErbB3 dimer (Fig. 4A and B). These differences might relate to the distinct conformation adopted in ErbB2/ErbB3 dimer formation as opposed to ErbB2 V659E homodimers. Co-immunoprecipitation assay performed in MCF-7 cells transfected or not with CXCR4 also demonstrates the recruitment of endogenous ErbB2 by CXCR4. These results suggest that ErbB2 and ErbB3 receptors are assembled in a complex with CXCR4 and that ErbB2/ErbB3 signaling promotes complex stability.

### **CXCR4 impairs the activation of PI3-K/Akt kinase pathway by ErbB2 signaling**

Activation of ErbB2 signals to a variety of protein kinase pathways, including PI3-K/Akt and MAPK/ERK (Yarden and Sliwkowski, 2001). To determine the impact of CXCR4 on ErbB2 signaling, we performed Western analysis on Akt, MAPK p38 and Erk1/2 protein kinases in response to ErbB2 activation using respective phospho-specific antibodies. Transient expression of constitutively active V659E ErbB2 variant resulted in marked activation of Akt, p38 and Erk1/2 kinases (Fig. 5A). However, addition of CXCR4 strongly impaired the activation of Akt, whereas p38 and Erk1/2 phosphorylation remained unchanged. Interestingly, SDF-1 partially restored the CXCR4 reduction in phosphorylated levels of Akt (Fig. 5A). A similar effect of CXCR4 and SDF-1 was also obtained in the context of ErbB2/ErbB3 dimer activation by heregulin- $\beta$ , whereas expression of the CXCR4 inactive mutant N119K had no effect on Akt phosphorylation in absence or presence of SDF-1 (Fig. 5B). These results indicate that CXCR4 activity disrupts in a selective manner activation of the Akt pathway triggered by ErbB2 signaling.

Since PI3-K is an upstream mediator of Akt activity, we next monitored PI3-K p85 subunit recruitment and activation in the context of CXCR4/ErbB2 complex. PI3-K is known to be recruited to ErbB2/ErbB3 dimers through adapter proteins Shc and Grb2 (Radhakrishnan et al., 2008, Ursini-Siegel et al., 2012) and also through direct contact with ErbB3 (Hellyer et al., 1998) in order to achieve Akt activation. A strong recruitment of p85 to ErbB3 was observed upon ErbB2 V659E expression, which is clearly reduced in the presence of CXCR4 (Fig. 5C). However, addition of SDF-1 partially restored the reduction of p85 recruitment by CXCR4, correlating with Akt activation (Fig. 5A). In a similar fashion, recruitment of the Tyr-467 phosphorylated and activated form of p85 was enhanced to ErbB3 in the context of ErbB2/ErbB3 activation by heregulin- $\beta$  (Fig. 5D). Again, expression of CXCR4 altered such recruitment which was then partially restored in presence of SDF-1. These results suggest that impaired Akt signaling provoked by CXCR4 is dependent on an altered recruitment of PI3-K active regulatory p85 subunit to ErbB2/ErbB3 dimer.

To correlate with endogenous ErbB2/ErbB3 activation of Akt, treatment of MCF-7 cells with heregulin- $\beta$  induced Akt activation, which was impaired upon CXCR4 expression (Fig. 5E). Similar results were also obtained in BT-474 cells (Fig. 5F). In addition, knockdown of CXCR4 expression in MCF-7 cells increased Akt phosphorylation in response to heregulin- $\beta$  compared to control shRNA infected cells (Fig. 5G), suggesting that CXCR4 affects heregulin- $\beta$  signaling in breast cancer cells.

### **CXCR4 alters the hormonal response of estrogen receptors $\alpha$ and $\beta$ to ErbB2 signaling**

Given the effect of CXCR4 to efficiently recruit and regulate ErbB2, we next addressed whether this interaction could modulate downstream regulation of estrogen receptor



ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity and target gene expression. Activated ErbB2/ErbB3 signaling has been reported to impair the transcriptional activation of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in breast cancer cells (St-Laurent et al., 2005, Sanchez et al., 2007, Sanchez et al., 2013). Using luciferase reporter assay in 293 cells transfected with a luciferase reporter under the control of an estrogen response element (EREtkLuc), we have observed that the decreased estrogenic activity of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in response to constitutively active ErbB2 or to ErbB2/ErbB3 activation by heregulin- $\beta$  was restored by CXCR4 (Fig. 6A and B). However, addition of CXCR4 ligand SDF-1 partially relieved such effect, whereas the dominant negative CXCR4 N119K mutant remained ineffective in regulating ER $\alpha$  and ER $\beta$  in response to ErbB2 activation. These results indicate that both estrogen receptors are regulated in a similar manner to the context of CXCR4-ErbB2 signaling. Treatment of MCF-7 cells with heregulin- $\beta$  also decreased the hormonal response of ERE-controlled genes, such as *GREB1*, *PgR* and *CXCL12/SDF-1*, which was partially relieved upon CXCR4 expression (Fig. 6C). Consistent with such effect of CXCR4, shRNA-mediated knockdown of CXCR4 enhanced the estrogen-mediated reduction in expression of ER-target genes by heregulin- $\beta$  in MCF-7 cells (Fig. 6D). Interestingly, expression of *CcnD1* gene, which is also regulated by estrogen but through tethered interaction of ERs to an AP-1 responsive element (Albanese et al., 1995, Shen et al., 2007), was not regulated in a similar manner as ERE-containing genes. Expression levels of *Ccnd1* were upregulated by heregulin and estrogen, and further increased by CXCR4 knockdown in MCF-7 cells (Fig. 6D). These results suggest a selective regulation of ERE-controlled genes in response to the context of ErbB2-CXCR4 signaling pathway in breast cancer cells.

## Discussion

In human breast carcinoma cells, ErbB2 is found to undergo basal endocytosis combined with rapid recycling. A previous study has looked at ErbB2 degradation by performing a cycloheximide chase experiment with a human esophageal adenocarcinoma cell line and found that ErbB2 expression is very stable, with a half-life time exceeding 24 hours (Hong et al., 2012). The lysosomal degradation pathway has been shown to contribute to ErbB2 downregulation (Marx et al., 2007, Pedersen et al., 2008). As for ErbB3, a previous study has showed that its expression in transfected HEK 293-T cells is greatly increased by the proteasome inhibitor MG132 (Qiu and Goldberg, 2002). In our study we have found that in 293 cells, CXCR4 expression alone downregulated ErbB2 expression and phosphorylation and ErbB3 was found to be downregulated by CXCR4 as well. ErbB2 downregulation by CXCR4 was a result of ErbB2 degradation implicating the lysosomal degradation pathway, but was insensitive to the proteasome inhibitor MG-132. On the other hand, ErbB3 downregulation was sensitive to MG-132.

It is known that many GPCRs display constitutive activity (Milligan, 2003). It has been shown that overexpression of CXCR4 enables functional autonomous signaling without SDF-1 (Kahn et al., 2004). It is not surprising that in our study, CXCR4 displayed an effect by its own. As for an activation of CXCR4 through an autocrine regulation of its ligand SDF-1, it is not expected to be the case for 293 cells. Expression of the CXCR4 dominant mutant N119K that present a loss of G $\alpha$ i activation did not alter ErbB2 expression or phosphorylation. This suggests that activated G proteins may participate in ErbB2 downregulation. It has been demonstrated in the literature that overexpression of G $\alpha$ s subunit promotes degradation of EGFR in 293 cells by interacting with the hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase

substrate (Hrs), a component implicated in the endosomal machinery (Zheng et al., 2004). Although CXCR4 primarily couples to  $G_{\alpha i}$ , it has been shown to couple to other subtypes of  $G_{\alpha}$  (Rubin, 2009). It is possible that CXCR4 mediated degradation of ErbB2 and ErbB3 may be regulated by  $G_{\alpha}$  subunit. We also observed in breast cancer cell lines MCF-7 and BT-474 that overexpression of CXCR4 led to a downregulation of endogenous ErbB2 expression and phosphorylation. On the other hand, knocking down CXCR4 increased ErbB2 and ErbB3 expression in MCF-7 cells. Another group has made the observation that suppression of CXCR4 expression in an EGFRvII stable MDA-MB-361 cell line increased ErbB2 expression and phosphorylation (Rahimi et al., 2010). Therefore CXCR4 levels influence ErbB2 expression and phosphorylation in breast cancer cell lines.

It has been reported that ErbB2 and CXCR4 coexist in lipid rafts in prostate cancer cells, but no demonstration of a physical interaction between these two receptors has ever been reported (Chinni et al.). We have shown by co-immunoprecipitation assay from transfected 293 cells that the heterodimer ErbB2/ErbB3 and ErbB2KD/ErbB3 are constitutively co-present in a complex with CXCR4. A constitutive interaction between V659E ErbB2 and wild-type CXCR4 and N119K CXCR4 was also observed. We have also observed in CXCR4 transfected breast cancer cells MCF-7 that ErbB2 was found in a complex with CXCR4. Heregulin accentuated the interaction between CXCR4 and ErbB2/ErbB3 but not with ErbB2KD/ErbB3. SDF-1 increased interaction between constitutive ErbB2 and wild-type CXCR4 but not N119K CXCR4. These results suggest that the kinase activity of ErbB2 and SDF-1-induced functional signaling seems to be required to improve ErbB2-CXCR4 interaction. Also, it demonstrates that although ErbB3 is not required for the formation of a complex between CXCR4 and ErbB2, it contributes to the stabilization of the complex in the

presence of its ligand. Finally, the interaction interfaces between CXCR4 and ErbB2 must be different in the case of an ErbB2 homodimer and ErbB2/ErbB3 heterodimer since SDF-1 only affects V659E ErbB2-CXCR4 interaction.

After binding of its ligand SDF-1, CXCR4 becomes phosphorylated on residues within the C-terminal tail, which regulate CXCR4 signaling and trafficking (Busillo et al., 2010). Evidences have shown that GPCR can also be phosphorylated in a ligand-independent manner by kinases tyrosine kinases (Wang et al., 2000, Waters et al., 2004, Sun et al., 2007). There are several examples of cross-talk between RTK and GPCR which can lead to GPCR phosphorylation (Vazquezprado, 2003, Waters et al., 2004, Delcourt et al., 2007). We looked at the phosphorylation of serine 339 of CXCR4 that represent one of the residues targeted upon receptor activation by its ligand SDF-1 and is important in CXCR4 trafficking and signaling (Busillo et al., 2010). We have found an increased CXCR4 phosphorylation of serine residue 339 in 293 cells in response to ErbB2/ErbB3 dimer and the ErbB2 constitutively active mutant signaling as well as in heregulin-treated breast cancer cells MCF-7. Another group has previously shown that other residues (324/325 and 330) within the C-terminal tail of CXCR4 are phosphorylated in response to heregulin in breast cancer cell lines through EGFR and ErbB3 signaling (Sosa et al., 2010). Our data provides evidence that CXCR4 is modified by ErbB2 signaling and identifies serine 339 of CXCR4 as being a target of such signaling.

It has been reported that the PKC kinase participates in the phosphorylation of CXCR4 (Haribabu et al., 1997, Signoret et al., 1997, Orsini et al., 2000). We found that CXCR4 phosphorylation of serine 339 by ErbB2 signaling was completely abolished by a PKC inhibitor. It has been shown that CXCR4 is recycled back to the plasma following PKC-mediated internalization (Signoret et al., 1997). It has been reported that high expression of

PIM1, a kinase found to specifically target residue 339 of CXCR4, correlates with elevated CXCR4 surface expression. Recently, the surface expression of CXCR4 S339E, a mutant that mimics Ser339 phosphorylation, has been shown to be increased compared to wild-type CXCR4 (Brault et al., 2013). Our results suggest that heregulin-mediated increase of Ser339 phosphorylation might increase CXCR4 recycling and surface expression and therefore lead to prolonged CXCR4 signaling.

ErbB2/ErbB3 signaling leads to the activation of a variety of kinase pathways, such as Akt and MAPKs (Yarden and Sliwkowski, 2001). The downregulation of ErbB2 expression and phosphorylation following CXCR4 overexpression correlated with an alteration in ErbB2 mediating Akt signaling in 293 cells and heregulin stimulated breast cancer cell lines MCF-7 and BT-474. We observed no significant changes in ErbB2-mediated activation of the Erk and p38 pathways by CXCR4. We also found that p85 association to ErbB2/ErbB3 dimer was altered by CXCR4. It has been shown that inactivation of ErbB2 leads to a decreased ErbB3 tyrosine phosphorylation (Motoyama et al., 2002). Since ErbB3 contains six docking sites for p85 it efficiently couples to the PI3-K/Akt pathway (Hellyer et al., 1998). Therefore it has been reported that the major consequence of targeting ErbB2 is decreased PI3-K/Akt activity (Lane et al., 2000, Basso et al., 2002). We have seen that CXCR4 overexpression leads to a downregulation of ErbB3 expression in 293 cells which might explain why activation of the PI3-K/Akt pathway by ErbB2/ErbB3 dimer in response to heregulin is majorly affected by CXCR4. When we knockdowned CXCR4 in breast cancer cells MCF-7, we observed an improvement in Akt activation in response to heregulin that correlated with an increase in ErbB2 and ErbB3 expression.

We have observed that CXCR4 alteration of ErbB2 PI3-K/Akt signaling was recuperated with CXCR4 ligand SDF-1. In the present study, our observation in 293 cells was that addition of CXCR4 ligand SDF-1 restored Akt signaling while ErbB2 expression levels and phosphorylation remained downregulated. These results suggest that the recuperation of Akt signaling with SDF-1 is attributed to CXCR4 signaling that does not involve ErbB2 transactivation. However, we cannot rule out the possibility that SDF-1 induces transactivation of ErbB2 in breast cancer cells, like it has been shown for ErbB2-overexpressing breast cancer cell (Cabioglu et al., 2005). We have observed following co-immunoprecipitation assay that in response to SDF-1, p85 was found in a complex with ErbB2/ErbB3 dimer. CXCR4 activation by SDF-1 has been shown to activate both class IA and IB PI3-Ks (Curnock and Ward, 2003). Although CXCR4 does not possess p85 binding sites, it has been reported that p85 associates with CXCR4 in human peripheral blood T lymphocytes after SDF-1 stimulation (Vicente-Manzanares et al., 1999). Thus the recuperation of Akt signaling in the presence of CXCR4 ligand could implicate PI3-K class 1A activation through recruitment of p85 to CXCR4 and activation of PI3-K $\gamma$  through G $\beta\gamma$  proteins.

We have previously reported that ErbB2/ErbB3 activation by the growth factor heregulin leads to a decreased transcriptional activity of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in presence of estrogen (St-Laurent et al., 2005, Sanchez et al., 2007, Sanchez et al., 2013). We have also demonstrated that the chemokine receptor CXCR4 signaling leads to ER $\alpha$  and ER $\beta$  transcriptional activation (Sauvé et al., 2009). We were interested in looking at the effect of ErbB2-CXCR4 cross-talk on the activity of estrogen receptors. We have observed that wild-type CXCR4 overexpression overcame ErbB2-mediated repression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity in response to estrogen in 293 cells, while CXCR4 dominant negative mutant N119K did not

disrupt ERs responses. Hormonal repression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  was recuperated with CXCR4 ligand SDF-1. We sought to determine the impact of ErbB2-CXCR4 cross-talk on estrogen responsive genes in MCF-7 breast cancer cells that co-expressed both isoforms of ERs. We found that overexpression of CXCR4 in MCF-7 partially prevented the heregulin-mediated repression of *GREB1*, *PgR* and *SDF-1/CXCL12* gene expression in response to estrogen. Conversely, CXCR4 knockdown enhanced the hormonal repression by heregulin of these genes *GREB1*, *PgR* and *SDF-1/CXCL12* gene expression. Interestingly, we found that *CcnD1* gene expression was upregulated by heregulin in response to estrogen. This suggests that heregulin may not repress the hormonal transcription of AP-1-regulated ER genes. Nevertheless, CXCR4 overexpression overcame while CXCR4 knockdown accentuated the upregulation of *CcnD1* gene expression by heregulin. CXCR4 impact on ERs activity in 293 cells and on ERE-regulated genes in MCF-7 correlates with an alteration of ErbB2/ErbB3 expression and heregulin-mediated Akt signaling. This suggests that CXCR4 alteration of signaling upstream of ERs would be responsible for the effects observed on ER transcriptional activity.

We showed in this study that: 1- CXCR4 regulates ErbB2 protein stability and phosphorylation and ErbB2 signaling affects CXCR4 phosphorylation and perhaps its stability; 2- CXCR4 and ErbB2 form a complex which is regulated by ErbB3 and CXCR4 ligand; 3 -CXCR4 specifically regulates PI3-K/Akt signaling in response to ErbB2/ErbB3/heregulin; and 4- CXCR4 expression modulates ER hormonal response of genes in response to heregulin in breast cancer cells and therefore may impact tamoxifen response in ER and ErbB2 positive breast cancers. In conclusion we found an interplay between CXCR4 and ErbB2/ErbB3 signaling that impact ER hormonal activity in response to heregulin.

## References

- Albanese, C., J. Johnson, G. Watanabe, N. Eklund, D. Vu, A. Arnold and R. G. Pestell (1995). Transforming p21 Mutants and c-Ets-2 Activate the Cyclin D1 Promoter through Distinguishable Regions. *J Biol Chem* 270, 23589-23597.
- Alimandi, M., A. Romano, M. Curia, R. Muraro, P. Fedi, S. Aaronson, P. Di Fiore and M. Kraus (1995). Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 10, 1813-1821.
- Austin, C. D., A. M. De Mazière, P. I. Pisacane, S. M. van Dijk, C. Eigenbrot, M. X. Sliwkowski, J. Klumperman and R. H. Scheller (2004). Endocytosis and Sorting of ErbB2 and the Site of Action of Cancer Therapeutics Trastuzumab and Geldanamycin. *Mol Biol Cell* 15, 5268-5282.
- Basso, A. D., D. B. Solit, P. N. Munster and N. Rosen (2002). Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* 21, 1159-1166.
- Berchiche, Y. A., K. Y. Chow, B. Lagane, M. Leduc, Y. Percherancier, N. Fujii, H. Tamamura, F. Bachelierie and N. Heveker (2007). Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation. *J Biol Chem* 282, 5111-5115.
- Berger, M. B., J. M. Mendrola and M. A. Lemmon (2004). ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett* 569, 332-336.
- Brault, L., A. Rovo, S. Decker, C. Dierks, A. Tzankov and J. Schwaller (2013). CXCR4-Serine339 regulates cellular adhesion, retention and mobilization, and is a marker for poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*.
- Bunone, G., P. A. Briand, R. J. Miksicek and D. Picard (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15, 2174-2183.
- Busillo, J. M., S. Armando, R. Sengupta, O. Meucci, M. Bouvier and J. L. Benovic (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem* 285, 7805-7817.
- Cabioglu, N., J. Summy, C. Miller, N. U. Parikh, A. a. Sahin, S. Tuzlali, K. Pumiglia, G. E. Gallick and J. E. Price (2005). CXCL-12/stromal cell-derived factor-1alpha transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation. *Cancer Res* 65, 6493-6497.
- Campbell, R. A., P. Bhat-Nakshatri, N. M. Patel, D. Constantinidou, S. Ali and H. Nakshatri (2001). Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated Activation of Estrogen Receptor  $\alpha$ : A NEW MODEL FOR ANTI-ESTROGEN RESISTANCE. *J Biol Chem* 276, 9817-9824.
- Carraway, K. L., M. X. Sliwkowski, R. Akita, J. V. Platko, P. M. Guy, A. Nuijens, A. J. Diamonti, R. L. Vandlen, L. C. Cantley and R. A. Cerione (1994). The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem* 269, 14303-14306.
- Chang, H., D. n. Riese, W. Gilbert, D. Stern and U. McMahan (1997). Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387, 509-512.



- Chinni, S. R., H. Yamamoto, Z. Dong, A. Sabbota, R. D. Bonfil and M. L. Cher CXCL12/CXCR4 transactivates HER2 in lipid rafts of prostate cancer cells and promotes growth of metastatic deposits in bone. *Mol.Cancer Res.* **6**: 446-457.
- Cho, H.-S., K. Mason, K. X. Ramyar, A. M. Stanley, S. B. Gabelli, D. W. Denney and D. J. Leahy (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* *421*, 756-760.
- Clarke, R., M. C. Liu, K. B. Bouker, Z. Gu, R. Y. Lee, Y. Zhu, T. C. Skaar, B. Gomez, K. O'Brien, Y. Wang and L. A. Hilakivi-Clarke (2003). Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* *22*, 7316-7339.
- Curnock, A. P. and S. G. Ward (2003). Development and characterisation of tetracycline-regulated phosphoinositide 3-kinase mutants: assessing the role of multiple phosphoinositide 3-kinases in chemokine signaling. *J Immunol Methods* *273*, 29-41.
- Delcourt, N., J. Bockaert and P. Marin (2007). GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci* *28*, 602-607.
- Garrett, T. P. J., N. M. McKern, M. Lou, T. C. Elleman, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, M. Kofler, R. N. Jorissen, E. C. Nice, A. W. Burgess and C. W. Ward (2003). The Crystal Structure of a Truncated ErbB2 Ectodomain Reveals an Active Conformation, Poised to Interact with Other ErbB Receptors. *Mol Cell* *11*, 495-505.
- Glass, C. K., M. G. Rosenfeld, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (2000). receptors The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. 121-141.
- Guy, P. M., J. V. Platko, L. C. Cantley, R. A. Cerione and K. L. C. Iiitt (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8132-8136.
- Hall, J. M. and K. S. Korach (2003). Stromal Cell-Derived Factor 1, a Novel Target of Estrogen Receptor Action, Mediates the Mitogenic Effects of Estradiol in Ovarian and Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*. **17**: 792-803.
- Haribabu, B., R. M. Richardson, I. Fisher, S. Sozzani, S. C. Peiper, R. Horuk, H. Ali and R. Snyderman (1997). Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *The Journal of biological chemistry* *272*, 28726-28731.
- Hellyer, N. J., K. Cheng and J. G. Koland (1998). ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *The Biochemical journal* *333* ( Pt 3, 757-763.
- Holbro, T., R. R. Beerli, F. Maurer, M. Koziczak, C. F. Barbas and N. E. Hynes (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 8933-8938.
- Hong, J., A. Katsha, P. Lu, Y. Shyr, A. Belkhiri and W. El-Rifai (2012). Regulation of ERBB2 receptor by t-DARPP mediates trastuzumab resistance in human esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* *72*, 4504-4514.
- Kahn, J., T. Byk, L. Jansson-Sjostrand, I. Petit, S. Shvitiel, A. Nagler, I. Hardan, V. Deutsch, Z. Gazit, D. Gazit, S. Karlsson and T. Lapidot (2004). Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation. *Blood* *103*, 2942-2949.
- Kato, S., H. Endoh, Y. Masuhiro, T. Kitamoto, S. Uchiyama, H. Sasaki, S. Masushige, Y. Gotoh, E. Nishida, H. Kawashima, D. Metzger and P. Chambon (1995). Activation of

- the Estrogen Receptor Through Phosphorylation by Mitogen-Activated Protein Kinase. *Science* 270, 1491-1494.
- Kumar, R., M. Mandal, A. Lipton, H. Harvey and C. B. Thompson (1996). Overexpression of HER2 modulates bcl-2, bcl-XL, and tamoxifen-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2, 1215-1219.
- Lane, H. A., I. Beuvink, A. B. Motoyama, J. M. Daly, R. M. Neve and N. E. Hynes (2000). ErbB2 Potentiates Breast Tumor Proliferation through Modulation of p27Kip1-Cdk2 Complex Formation: Receptor Overexpression Does Not Determine Growth Dependency. *Mol Cell Biol* 20, 3210-3223.
- Lenferink, A. E. G., R. Pinkas-kramarski, M. L. M. V. D. Poll, M. J. H. V. Vugt, L. N. Klapper, E. Tzahar, H. Waterman, M. Sela, E. J. J. V. Zoelen and Y. Yarden (1998). Differential endocytic routing of homo- and hetero- dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *17*, 3385-3397.
- Li, Y. M., Y. Pan, Y. Wei, X. Cheng, B. P. Zhou, M. Tan, X. Zhou, W. Xia, G. N. Hortobagyi, D. Yu and M.-C. Hung (2004). Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer cell* 6, 459-469.
- Mangelsdorf, D., I. C. Thumme, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon and R. Evans (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Marx, C., C. Yau, S. Banwait, Y. Zhou, G. K. Scott, B. Hann, J. W. Park and C. C. Benz (2007). Proteasome-Regulated ERBB2 and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer. *Mol Pharmacol* 71, 1525-1534.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators. *Cell* 108, 465-474.
- Milligan, G. (2003). Constitutive Activity and Inverse Agonists of G Protein-Coupled Receptors: a Current Perspective. *Mol Pharmacol* 64, 1271-1276.
- Motoyama, A. B., N. E. Hynes and H. A. Lane (2002). The Efficacy of ErbB Receptor-targeted Anticancer Therapeutics Is Influenced by the Availability of Epidermal Growth Factor-related Peptides. *Cancer Res* 62, 3151-3158.
- Mukherjee, D. and J. Zhao (2013). The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *American journal of cancer research* 3, 46-57.
- Muthuswamy, S. K., M. Gilman and J. S. Brugge (1999). Controlled Dimerization of ErbB Receptors Provides Evidence for Differential Signaling by Homo- and Heterodimers. *Mol Cell Biol* 19, 6845-6857.
- Orsini, M., J. Parent, S. Mundell, a. Marchese and J. Benovic (2000). Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4: role of arrestins and identification of residues in the C-terminal tail that mediate receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* 275, 25876.
- Paech, K., P. Webb, G. G. J. M. Kuiper, S. Nilsson, J.-Å. Gustafsson, P. J. Kushner and T. S. Scanlan (1997). Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 Sites. *Science* 277, 1508-1510.
- Pedersen, N. M., I. H. Madhus, C. Haslekås and E. Stang (2008). Geldanamycin-Induced Down-Regulation of ErbB2 from the Plasma Membrane Is Clathrin Dependent but Proteasomal Activity Independent. *Molecular Cancer Research* 6, 491-500.
- Percherancier, Y., Y. A. Berchiche, I. Slight, R. Volkmer-Engert, H. Tamamura, N. Fujii, M. Bouvier and N. Heveker (2005). Bioluminescence Resonance Energy Transfer Reveals

- Ligand-induced Conformational Changes in CXCR4 Homo- and Heterodimers. *J Biol Chem* *280*, 9895-9903.
- Picard, N., V. Caron, S. Bilodeau, M. Sanchez, X. Mascle, M. Aubry and A. Tremblay (2012). Identification of Estrogen Receptor  $\beta$  as a SUMO-1 Target Reveals a Novel Phosphorylated Sumoylation Motif and Regulation by Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ . *Mol Cell Biol* *32*, 2709-2721.
- Pietras, R. J., J. Arboleda, D. M. Reese, N. Wongvipat, M. D. Pegram, L. Ramos, C. M. Gorman, M. G. Parker, M. X. Sliwkowski and D. J. Slamon (1995). HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* *10*, 2435-2446.
- Pinkas-Kramarski, R., L. Soussan, H. Waterman, G. Levkowitz, I. Alroy, L. Klapper, S. Lavi, R. Seger, B. J. Ratzkin, M. Sela and Y. Yarden (1996). Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* *15*, 2452-2467.
- Qiu, X.-b. and A. L. Goldberg (2002). Nrdp1<sup>-</sup>FLRF is a ubiquitin ligase promoting ubiquitination and degradation of the epidermal growth factor receptor family member , ErbB3. *99*.
- Radhakrishnan, Y., L. A. Maile, Y. Ling, L. M. Graves and D. R. Clemmons (2008). Insulin-like Growth Factor-I Stimulates Shc-dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation via Grb2-associated p85 in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* *283*, 16320-16331.
- Rahimi, M., J. George and C. Tang (2010). EGFR variant-mediated invasion by enhanced CXCR4 expression through transcriptional and post-translational mechanisms. *Int J Cancer* *126*, 1850-1860.
- Rodrigue-Way, A., A. Demers, H. Ong and A. Tremblay (2007). A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology* *148*, 1009-1018.
- Rubin, J. B. (2009). Chemokine signaling in cancer: One hump or two? *Semin Cancer Biol* *19*, 116-122.
- Sanchez, M., N. Picard, K. Sauve and A. Tremblay (2010). Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends Endocrinol Metab* *21*, 104-110.
- Sanchez, M., N. Picard, K. Sauve and A. Tremblay (2013). Coordinate regulation of estrogen receptor [beta] degradation by Mdm2 and CREB-binding protein in response to growth signals. *Oncogene* *32*, 117-126.
- Sanchez, M., K. Sauve, N. Picard and A. Tremblay (2007). The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem* *282*, 4830-4840.
- Sauvé, K., J. Lepage, M. Sanchez, N. Heveker and A. Tremblay (2009). Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res* *69*, 5793-5800.
- Shen, Q., I. P. Uray, Y. Li, T. I. Krisko, T. E. Strecker, H. T. Kim and P. H. Brown (2007). The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. *Oncogene* *27*, 366-377.
- Signoret, N., J. Oldridge, A. Pelchen-Matthews, P. J. Klasse, T. Tran, L. F. Brass, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, W. Holmes, W. Dallas, M. A. Luther, T. N. C. Wells, J.

- A. Hoxie and M. Marsh (1997). Phorbol Esters and SDF-1 Induce Rapid Endocytosis and Down Modulation of the Chemokine Receptor CXCR4. *The Journal of Cell Biology* *139*, 651-664.
- Slamon, D., G. Clark, S. Wong, W. Levin, A. Ullrich and W. McGuire (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* *9*, 177-182.
- Slamon, D., W. Godolphin, L. Jones, J. Holt, S. Wong, D. Keith, W. Levin, S. Stuart, J. Udove, A. Ullrich and e. al (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* *12*, 707-712.
- Smith, M., K. Luker, J. Garbow, J. Prior, E. Jackson, D. Piwnica-Worms and G. Luker (2004). CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* *64*, 8604 - 8612.
- Sosa, M. S., C. Lopez-Haber, C. Yang, H. Wang, M. a. Lemmon, J. M. Busillo, J. Luo, J. L. Benovic, A. Klein-Szanto, H. Yagi, J. S. Gutkind, R. E. Parsons and M. G. Kazanietz (2010). Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol Cell* *40*, 877-892.
- St-Laurent, V., M. Sanchez, C. Charbonneau and A. Tremblay (2005). Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* *94*, 23-37.
- St-Laurent, V., M. Sanchez, C. Charbonneau and A. Tremblay (2005). Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *94*, 23-37.
- Sun, Y., D. McGarrigle and X.-Y. Huang (2007). When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Molecular BioSystems* *3*, 849-854.
- Tang, C. K., C. Perez, T. Grunt, C. Waibel, C. Cho and R. Lupu (1996). Involvement of Heregulin- $\beta$ 2 in the Acquisition of the Hormone-independent Phenotype of Breast Cancer Cells. *Cancer Res* *56*, 3350-3358.
- Thomas, R. S., N. Sarwar, F. Phoenix, R. C. Coombes and S. Ali (2008). Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor- $\alpha$  activity. *J Mol Endocrinol* *40*, 173-184.
- Todaro, G. J., C. Fryling and J. E. De Larco (1980). Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *77*, 5258-5262.
- Tremblay, A. and V. Giguère (2001). Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor  $\beta$ . *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* *77*, 19-27.
- Tremblay, A., G. B. Tremblay, F. Labrie and V. Giguère (1999). Ligand-Independent Recruitment of SRC-1 to Estrogen Receptor  $\beta$  through Phosphorylation of Activation Function AF-1. *Mol Cell* *3*, 513-519.
- Ursini-Siegel, J., W. R. Hardy, Y. Zheng, C. Ling, D. Zuo, C. Zhang, L. Podmore, T. Pawson and W. J. Muller (2012). The ShcA SH2 domain engages a 14-3-3/PI3[prime]K signaling complex and promotes breast cancer cell survival. *Oncogene* *31*, 5038-5044.
- Vazquezprado, J. (2003). G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal* *15*, 549-557.
- Vicente-Manzanares, M., M. Rey, D. R. Jones, D. Sancho, M. Mellado, J. M. Rodriguez-Frade, M. a. del Pozo, M. Yáñez-Mó, a. M. de Ana, C. Martínez-A, I. Mérida and F.

- Sánchez-Madrid (1999). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *163*, 4001-4012.
- Wallaschl, C., F. U. Weii, G. Niederfellnerl, B. Jallall, W. Issing and A. Ullrichl (1995). Heregulin-dependent regulation of HER2 / neu oncogenic signaling by heterodimerization with. *14*, 4267-4275.
- Wang, H.-y., S. Doronin and C. C. Malbon (2000). Insulin Activation of Mitogen-activated Protein Kinases Erk1,2 Is Amplified via  $\beta$ -adrenergic Receptor Expression and Requires the Integrity of the Tyr350 of the Receptor. *J Biol Chem* *275*, 36086-36093.
- Waters, C., S. Pyne and N. J. Pyne (2004). The role of G-protein coupled receptors and associated proteins in receptor tyrosine kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* *15*, 309-323.
- Woerner, B. M., N. M. Warrington, A. L. Kung, A. Perry and J. B. Rubin (2005). Widespread CXCR4 activation in astrocytomas revealed by phospho-CXCR4-specific antibodies. *Cancer Res* *65*, 11392-11399.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 127-137.
- Yu, D. and M.-c. Hung (2000). Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *2*, 6115-6121.
- Zheng, B., C. Lavoie, T.-d. Tang, P. Ma, T. Meerloo, A. Beas and M. G. Farquhar (2004). Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Degradation by Heterotrimeric  $G\alpha s$  Protein. *15*, 5538-5550.

## Figure legends

### **Figure 1. ErbB2/ErbB3 receptor levels and activation are decreased by CXCR4.**

(A) Human embryonic kidney 293 cells were transfected with expression plasmids encoding ErbB2 and ErbB3 in absence or presence of CXCR4 construct. Mock-transfected cells were used as control. Cells were treated with 50 ng/mL heregulin- $\beta$  (Hrg- $\beta$ ) with or without 25nM SDF-1 for 18h, and extracts were analyzed by Western blot using anti-ErbB2 and anti-phospho-Tyr-1248 ErbB2 antibodies.  $\beta$ -actin was monitored for control loading. (B) 293 cells were transfected as in (A), and ErbB3 was analyzed by Western blot. (C) Similar as in (A), except that cells were also transfected with a dominant negative N119K CXCR4 mutant. ErbB2 and CXCR4 were monitored by Western analysis, and  $\beta$ -actin was used for control loading. (D) 293 cells were transfected with a constitutively active V659E ErbB2 mutant in presence or absence of wild-type or N119K-mutated CXCR4, and analyzed as in (A).

### **Figure 2. CXCR4 downregulates ErbB2 and ErbB3 receptors in breast cancer cells.**

(A) Human breast cancer MCF-7 cells were transfected or not with a YFP-tagged CXCR4 encoding plasmid, and then treated with 50 ng/mL heregulin- $\beta$  for 16 hrs. Western blot analysis was performed using an anti-ErbB2 antibody. CXCR4 was also monitored and  $\beta$ -actin was used for control loading. (B) Human breast cancer BT-474 cells were transfected as in (A) and analyzed by Western blot using anti-ErbB2 and anti-phospho-ErbB2 antibodies. CXCR4 was also analyzed and  $\beta$ -actin was used for control loading (C) MCF-7 cells were infected with lentivirus encoding an shLuciferase RNA as a control or shCXCR4 RNA to knockdown CXCR4 expression. Cells were then treated with 50 ng/mL heregulin- $\beta$  and harvested for Western analysis of endogenous ErbB2, ErbB3 and CXCR4 content.  $\beta$ -actin was

also monitored for control loading. **(D)** CXCR4 increases ErbB2 turnover rate. Cycloheximide chase experiment in 293 cells expressing ErbB2 and ErbB3 in absence or presence of CXCR4. Cells were treated with 50mM cycloheximide and lysed at the indicated time points for Western analysis of ErbB2 expression. Results are normalized to  $\beta$ -actin content and expressed as a percentage of change of time zero, which was set at 100 %. **(E)** Proteasome-dependent degradation of ErbB2 is increased by CXCR4. 293 cells were transfected as in (A) and treated or not with 1  $\mu$ M proteasome inhibitor MG132 and 50 ng/mL Heregulin- $\beta$  for 18 hrs. Western analysis was performed using anti-ErbB2 and anti-ErbB3 antibodies.  $\beta$ -actin was monitored for control loading **(F)** Lysosomal degradation of ErbB2 is also promoted by CXCR4. 293 cells were transfected as in (E) and treated or not with 200  $\mu$ M lysosomal inhibitor chloroquine for 5 hrs. Extracts were analyzed using an anti-ErbB2 antibody and normalized to  $\beta$ -actin content.

**Figure 3. ErbB2/ErbB3 activation promotes CXCR4 phosphorylation in a PKC-dependent manner.** **(A)** 293 cells were transfected as indicated with ErbB2 wild-type or K753A kinase dead mutant in absence or presence of ErbB3 and CXCR4. Cells were then treated or not with 50 ng/mL heregulin- $\beta$  for 15 min, and lysed for immunoprecipitation (IP) of CXCR4. Western analysis (IB) was performed on immunoprecipitates using an anti-phospho-CXCR4 (Ser-339) antibody. Total CXCR4 content was monitored in each sample for control loading. **(B)** 293 cells were transfected as in (A), and then pre-treated with 1  $\mu$ M specific PKC inhibitor Gö 6850 for 1 h prior to addition of 50 ng/mL heregulin- $\beta$  with or without 25 nM SDF-1 for 15 min. Total cell extracts were subjected to Western blot analysis of total and Ser-339 phosphorylated CXCR4. **(C)** Phosphorylation of CXCR4 is increased by

heregulin- $\beta$  in MCF-7 cells. Cells were transfected or not with CXCR4 and analyzed as in (B).

**Figure 4. Recruitment of CXCR4 to ErbB2/ErbB3 receptor dimer.** (A) 293 cells were transfected with ErbB2, ErbB3 and CXCR4 as indicated, and then pre-treated or not with 5  $\mu$ M ErbB2 inhibitor AG825 for 1 h prior to treatment with 50 ng/mL heregulin- $\beta$  and 25 nM SDF-1 for 15 min. Cells were lysed and immunoprecipitation (IP) of ErbB2 and immunoblot analysis (IB) of CXCR4 were carried out. ErbB2 was monitored in each immunoprecipitate. Western analysis of CXCR4 in whole cell extracts is also shown. (B) Recruitment of CXCR4 to ErbB3. Cells were analyzed as in (A) except that ErbB3 was immunoprecipitated. (C) ErbB2 activity is required to induce CXCR4 recruitment. Cells were analyzed as in (A) except that the K753A kinase dead ErbB2 mutant was used. (D) Similar as in (C), except that the constitutively active V659E ErbB2 mutant was used in absence of ErbB3. (E) Cells were analyzed as in (D), except that the dominant negative N119K CXCR4 mutant was tested. (F) ErbB2 and CXCR4 coimmunoprecipitate in MCF-7 cells. Cells were transfected or not with YFP-tagged CXCR4 and immunoprecipitation of endogenous ErbB2 and detection of CXCR4 was carried out as described in (A).

**Figure 5. ErbB2 activation of the PI3-K/Akt pathway is selectively impaired by CXCR4.** (A) Cells were transfected with constitutively active V659E ErbB2 mutant in absence or presence of CXCR4 and treated or not with 25 nM SDF-1 for 15 min. Total cell lysates were subjected to Western blot analysis of phosphorylated forms of Akt, p38 and Erk1/2. Total levels were also analyzed. (B) 293 cells were transfected with ErbB2 and ErbB3 plasmids in



absence or presence of wild-type CXCR4 or dominant negative N119K CXCR4 mutant, and then treated with 50 ng/mL heregulin- $\beta$  and 25 nM SDF-1 for 15 min. Phosphorylation of Akt was monitored as in (A). **(C)** Recruitment of PI3-K p85 subunit to ErbB3 is impaired by CXCR4. Western analysis of ErbB3 following immunoprecipitation with anti-p85 antibody in response to expression of constitutively active V659E ErbB2 mutant and CXCR4. Cells were also treated with 25 nM SDF-1 for 15 min. Loading was normalized to p85 content. **(D)** SDF-1 is required to maintain phosphorylated p85 recruitment to ErbB3 in presence of CXCR4. Cells were transfected as in (B) and treated with 50 ng/mL heregulin- $\beta$  and 25 nM SDF-1. Western analysis was performed using an anti-phospho Tyr-467 p85 antibody following immunoprecipitation of ErbB3. **(E and F)** CXCR4 impairs Akt activation in breast cancer cells. Western analysis of phosphorylated Akt performed as in (A) in MCF-7 (E) and BT-474 (F) cells transfected with CXCR4 plasmid and treated or not with 50 ng/mL heregulin- $\beta$  for 15 min. Mock-transfected cells are used as controls and  $\beta$ -actin was monitored for control loading. **(G)** Knockdown of CXCR4 increased Akt activation by heregulin- $\beta$ . CXCR4 expression was knockdown in MCF-7 cells using shCXCR4 RNA and Western analysis of phosphorylated Akt was carried out on cells treated with 50 ng/mL heregulin- $\beta$  for 15 min compared to untreated cells. Endogenous CXCR4 content was also monitored.

**Figure 6. The hormonal response of estrogen receptors is disrupted by ErbB2/ErbB3 and CXCR4 activity.** **(A)** Luciferase assay in 293 cells transfected with plasmids encoding ER $\alpha$  (*left*) or ER $\beta$  (*right*) in the presence of an ERE<sub>3</sub>tkLuc reporter. Plasmids for constitutively active V659E ErbB2 mutant and CXCR4 wild-type and N119K dominant negative CXCR4 mutant were also used in transfection. Cells were treated with 10 nM of estradiol (E2) alone or

with 25 nM SDF-1 for 20 hrs and harvested for measurement of transcriptional activity. Luciferase values were normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as fold activation compared with untreated cells set at 1.0. **(B)** Similar as in (A), except that cells were also treated with 50 ng/mL heregulin- $\beta$ . **(C)** Real-time RT-PCR analysis performed on MCF-7 cells treated with 10 nM E2 alone or with 50 ng/mL heregulin- $\beta$  for 20 h. Cells were also transfected with CXCR4 when indicated. Results are expressed as fold changes of mRNA levels relative to untreated cells which was set at 1.0 for each target. **(D)** Real-time RT-PCR analysis performed as in (C), except that MCF-7 cells were infected with lentiviral shCXCR4 RNA compared to control cells. Results are expressed as fold changes of mRNA levels relative to E2 response set at 100% for each target. Student's t-test was performed to determine statistical significance (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

**Figure 7. A proposed model for CXCR4 and ErbB2/ErbB3 signaling complex and downstream regulation of estrogen receptors.** Activation of ErbB2/ErbB3 receptor dimer by heregulin- $\beta$  leads to recruitment of PI3-K and Akt phosphorylation (*left*), resulting in low estrogenic activity of ER $\alpha$  and ER $\beta$ . Recruitment of chemokine receptor CXCR4 to ErbB2/ErbB3 receptors (*middle*) promotes their degradation, resulting in PI3-K release, reduced Akt activation and enhanced ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity and gene expression. In that context, phosphorylation of CXCR4 at serine 339 is increased in a PKC dependent manner. Addition of CXCR4 ligand SDF-1 (*right*) restored PI3-K recruitment to the complex and Akt phosphorylation, leading to impaired ER $\alpha$  and ER $\beta$  hormone response similar to as with heregulin- $\beta$ , despite a sustained ErbB2 and ErbB3 downregulation.

**Supplementary Figure 1. ErbB2 activation increases phosphorylation of CXCR4 Ser-339**

**(A)** Phosphorylation of CXCR4 Ser-339 by SDF-1. Western blot analysis of 293 cells transfected with CXCR4 and treated with 25 nM SDF-1 for 15 min. Total cell extracts were analyzed using an anti-phospho-CXCR4 (Ser-339) antibody. **(B)** Similar as in (A), except that cells were also transfected with constitutively active V659E ErbB2 mutant, and CXCR4 was immunoprecipitated prior to analysis with anti-phospho-CXCR4 (Ser-339) antibody. **(C)** Cells were analyzed as in (B), except that cells were treated with 1  $\mu$ M of PKC inhibitor Gö 6850 for 1 h.

Figure 1

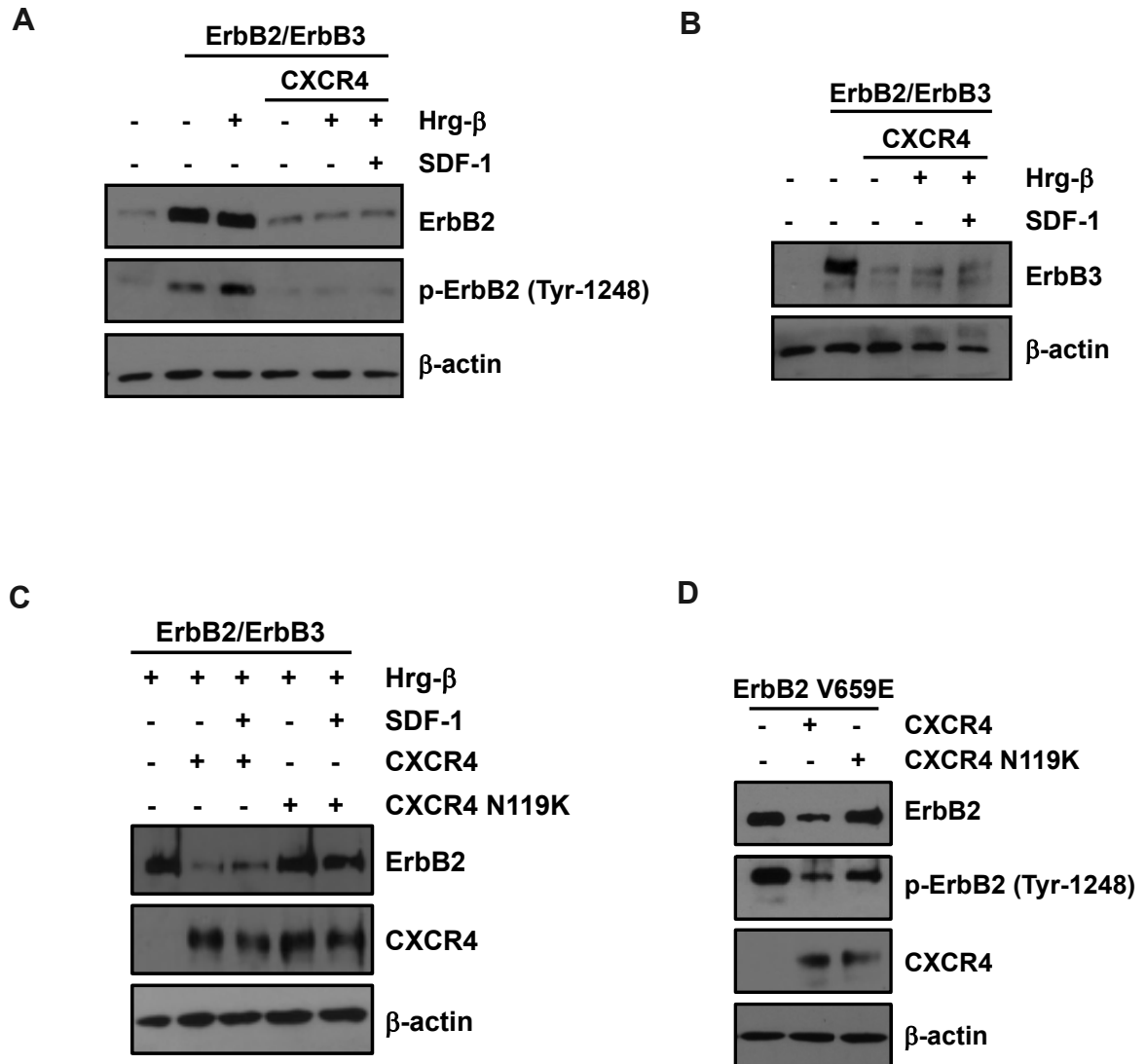


Figure 2

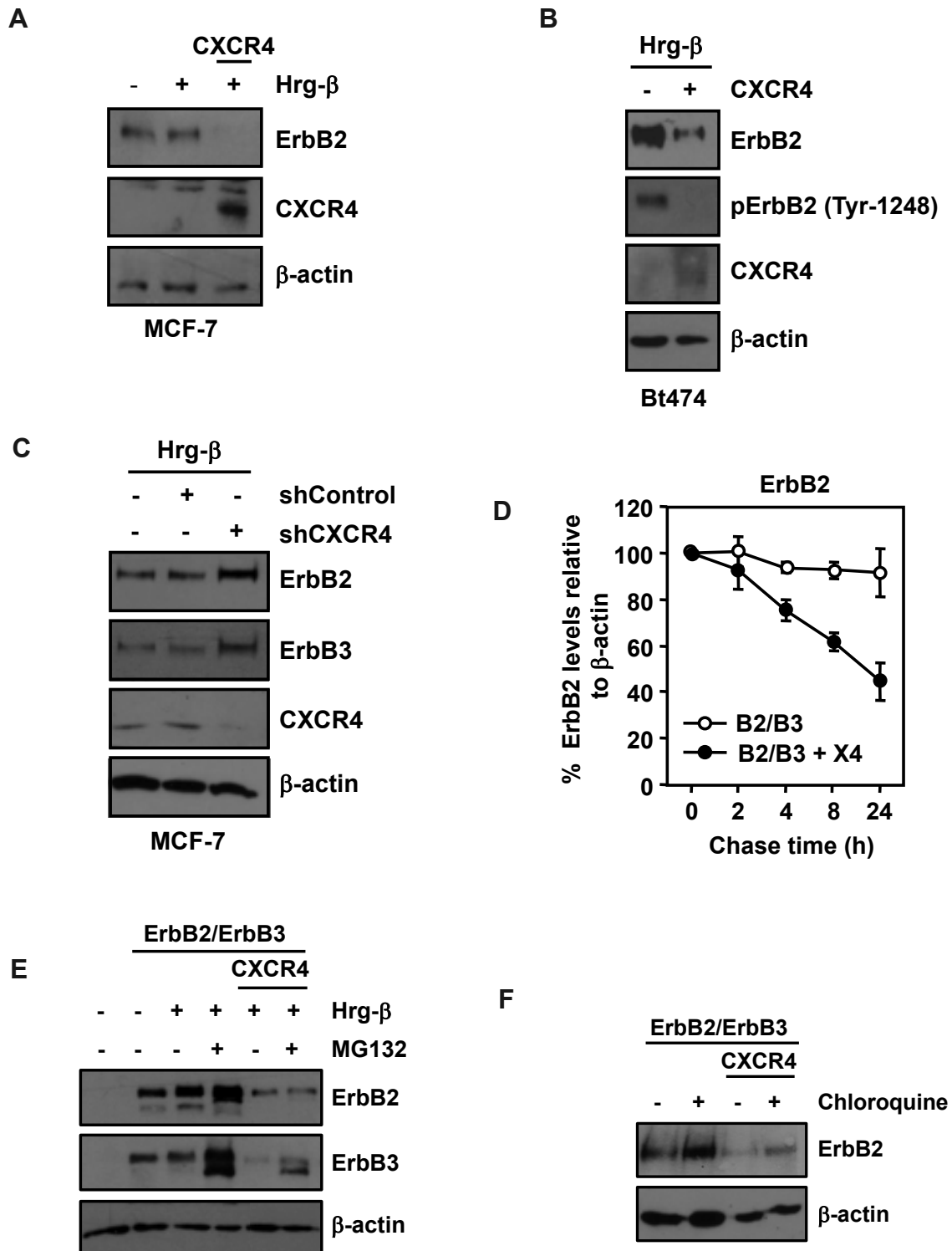


Figure 3

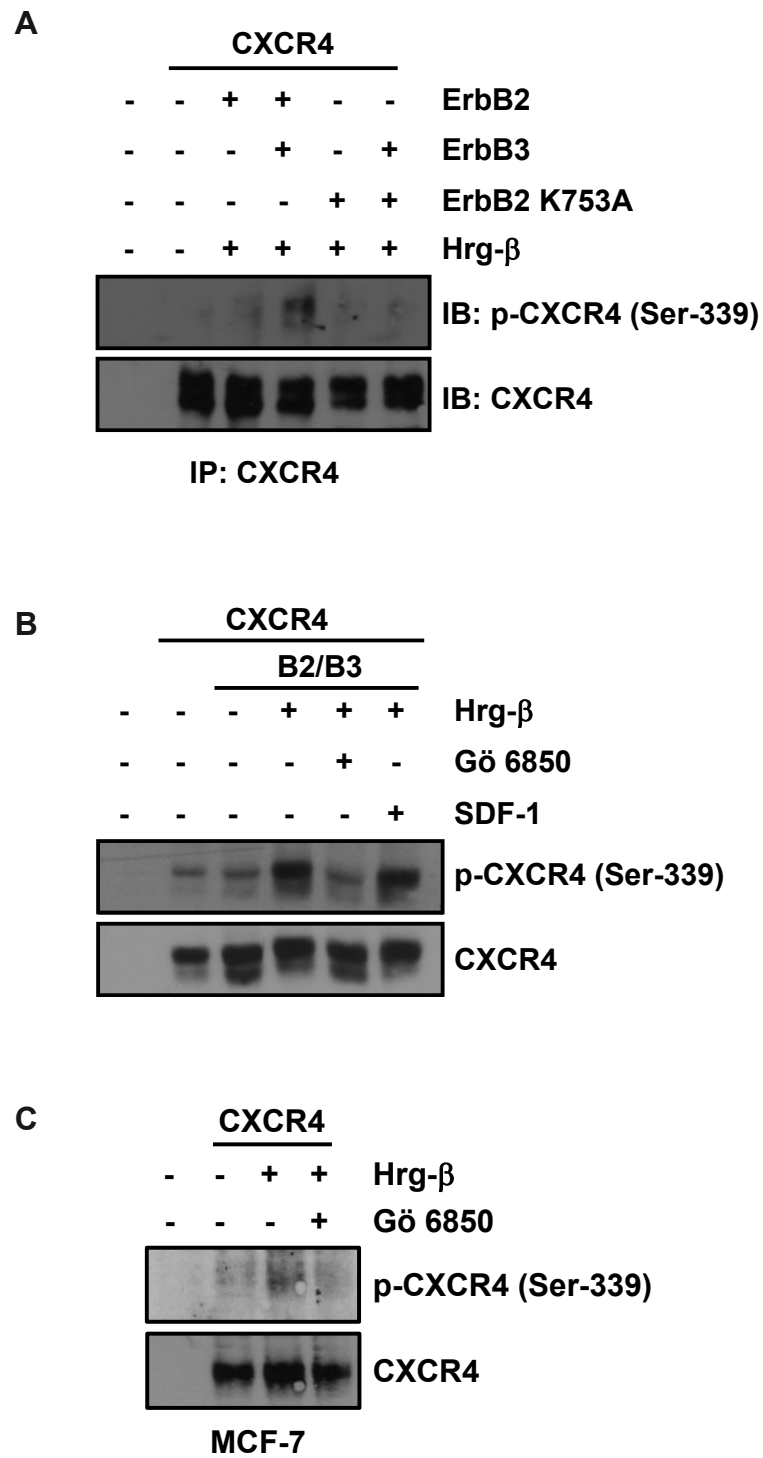


Figure 4

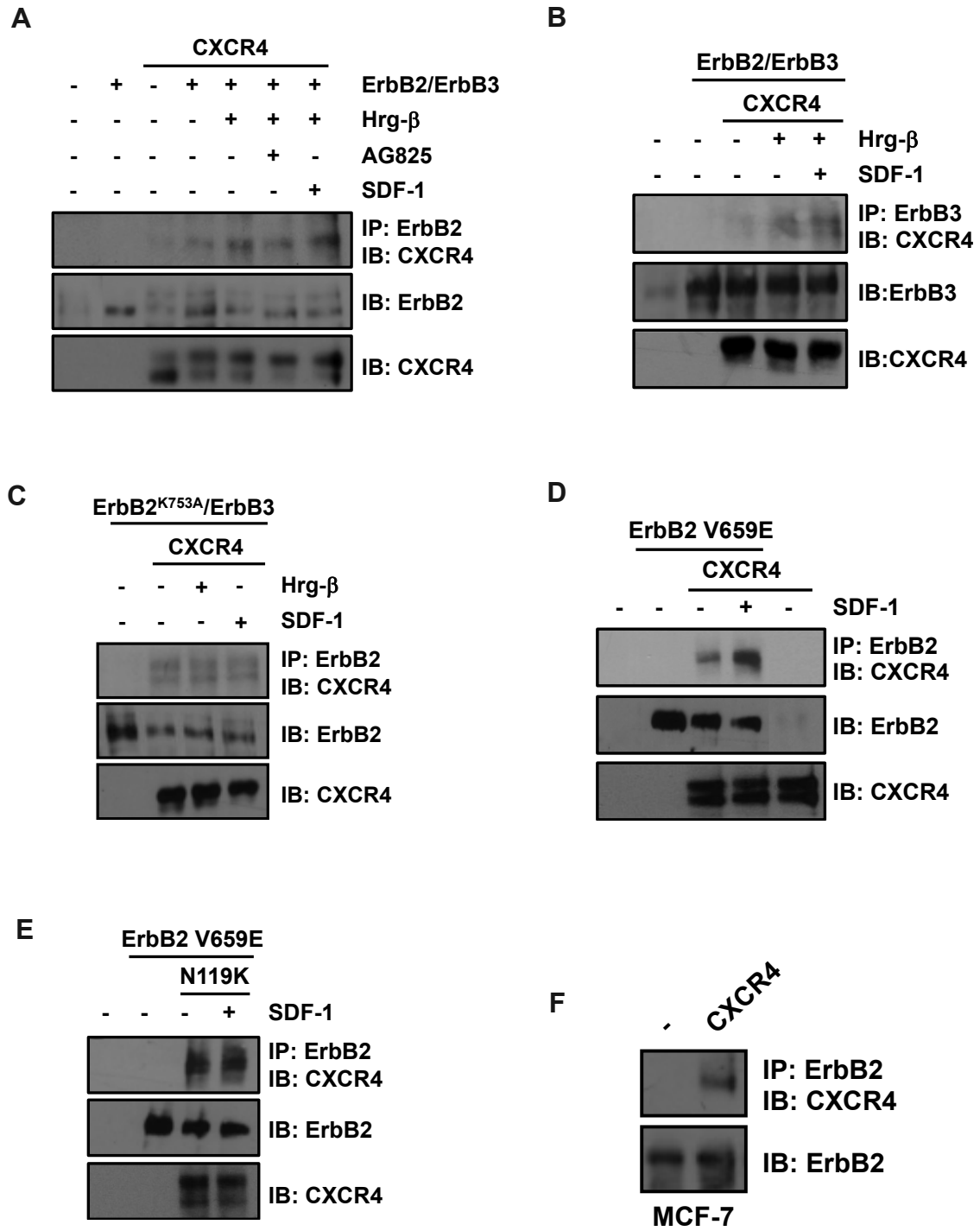


Figure 5

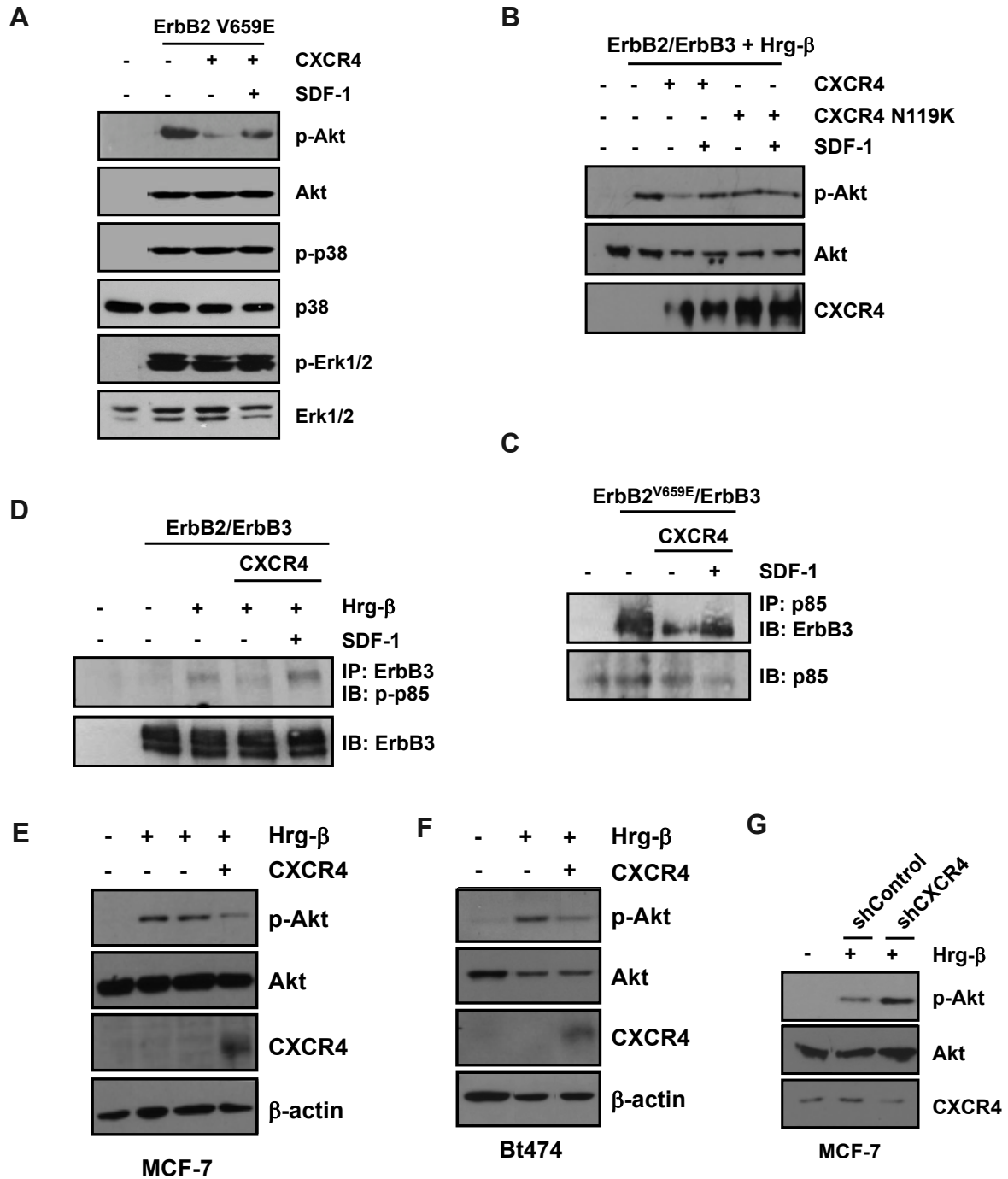
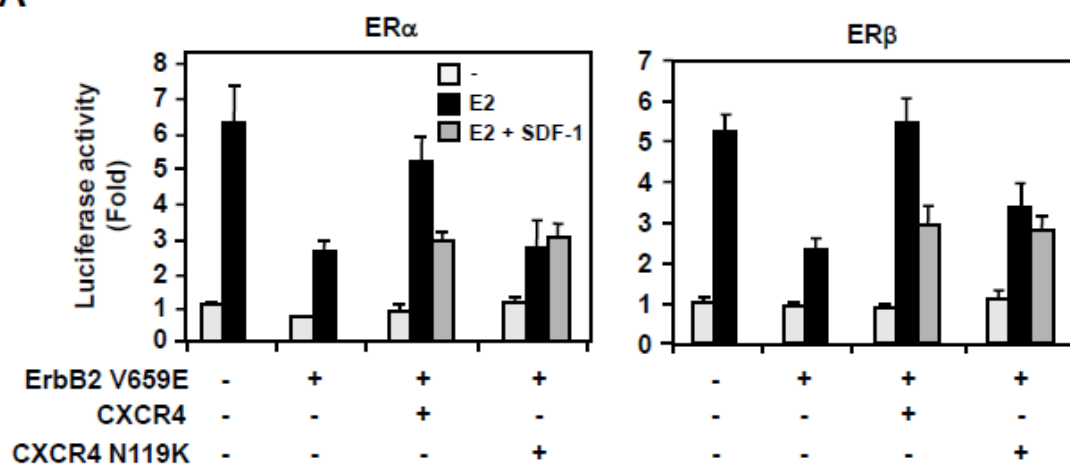


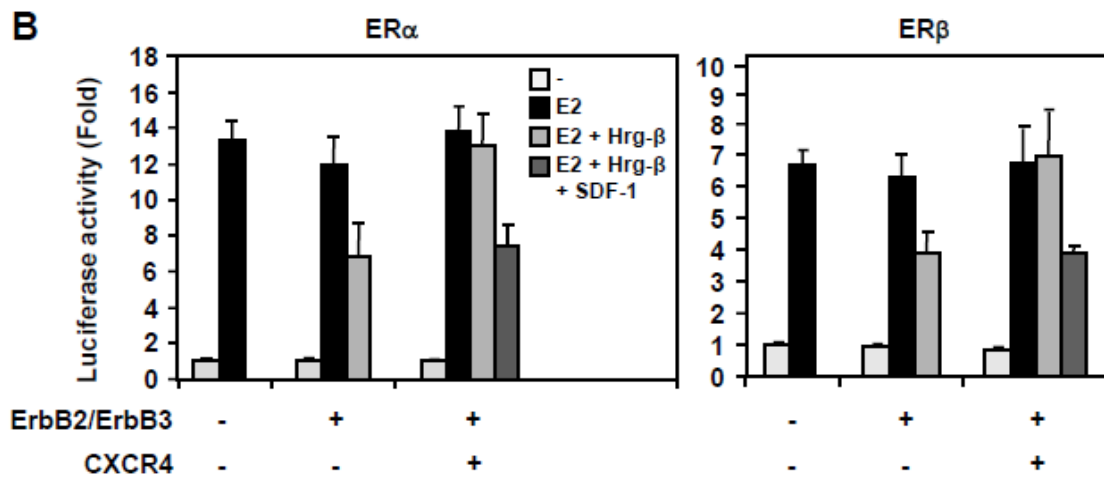


Figure 6

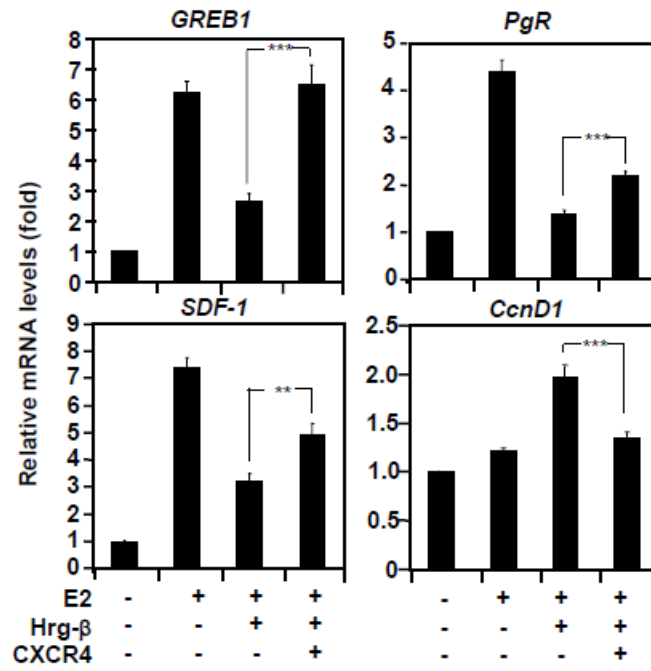
A



B



C



D

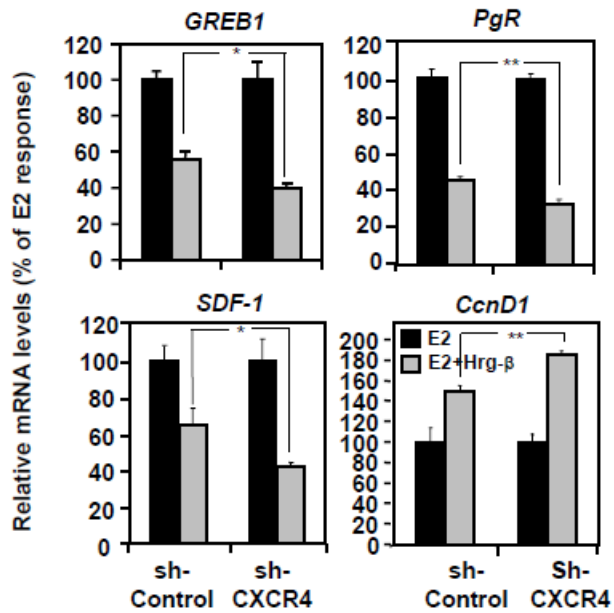
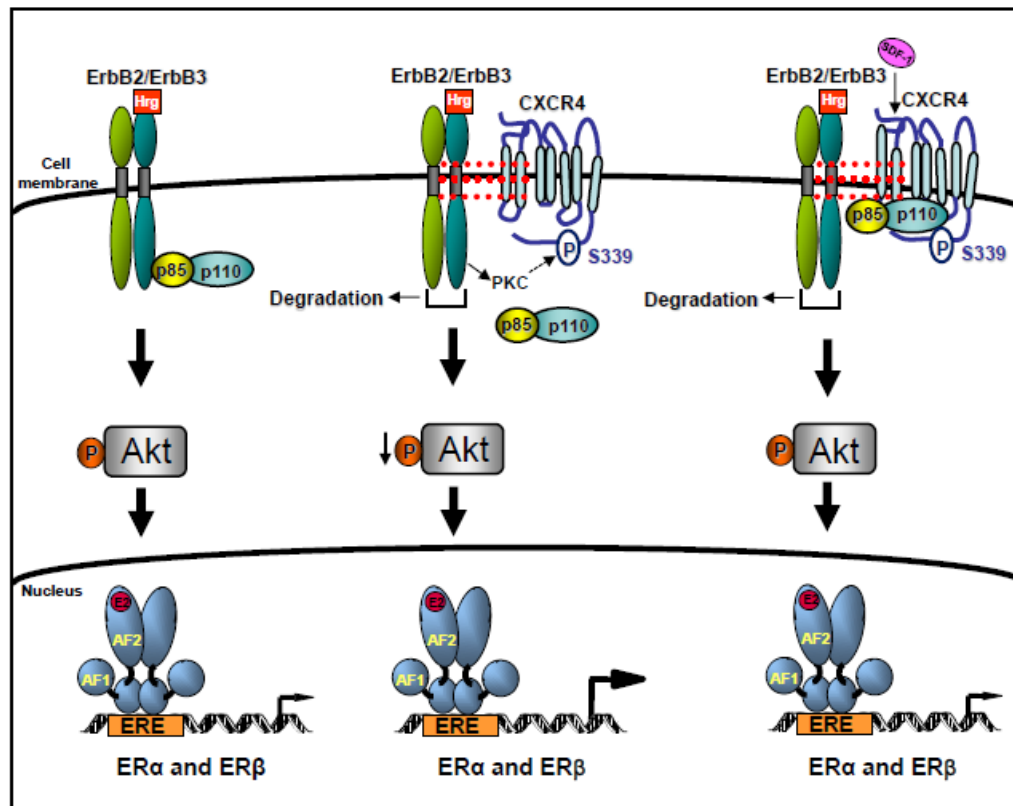
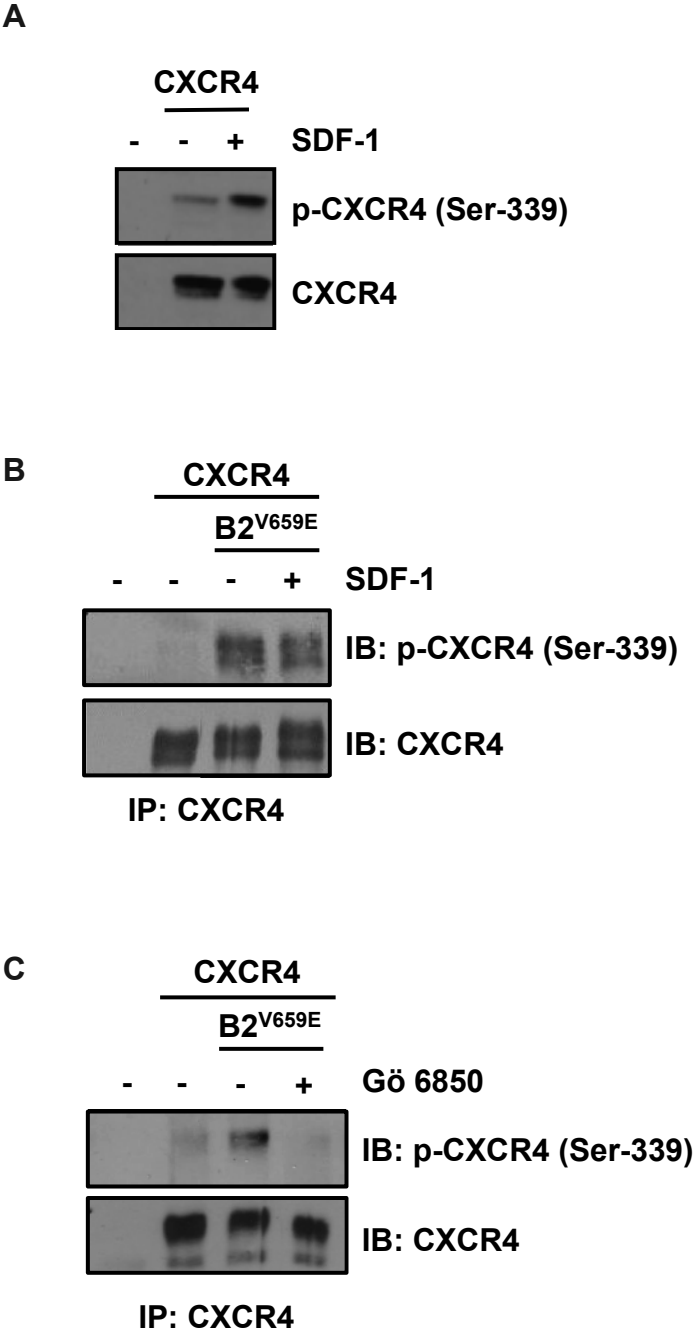


Figure 7



Supplementary Figure 1



## Chapitre 3 : Discussion générale, perspectives et conclusion

### Discussion

La coopération de divers facteurs et plusieurs voies de signalisation intracellulaires dérégulées participent à l'initiation et la progression du cancer du sein. Les ERs, via l'action mitogénique de E2, favorise l'initiation du cancer du sein hormono-dépendant. L'anti-estrogène tamoxifène est utilisé depuis plus de vingt ans comme approche thérapeutique dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant. Toutefois, un phénomène de résistance est malheureusement observé dans certains cas. Par ailleurs, l'activité des ERs n'est pas seulement régulée par E2 mais également de manière ligand indépendante via le domaine AF-1, une région n'étant pas ciblée par le tamoxifène. Il s'avère donc important d'identifier et de caractériser de nouveaux mécanismes de régulation de l'activité des ERs dans le but d'apporter des données pouvant servir à l'amélioration d'approches thérapeutiques existantes ou à la conception de nouveaux traitements.

CXCR4/SDF-1 et ErbB2/ErbB3/Hrg représentent des signaux pro-oncogéniques qui favorisent la progression du cancer du sein. Mes recherches ont permis d'identifier l'axe CXCR4/SDF-1 comme un nouvel élément de régulation de l'activité E2-indépendante des ERs. L'activation de CXCR4 par SDF-1 favorise l'expression de gènes cibles et la prolifération de cellules cancéreuses mammaires. Par ailleurs, il avait précédemment été démontré au laboratoire que la signalisation par le dimère ErbB2/ErbB3 en réponse au facteur de croissance héréguline inhibe la réponse estrogénique de ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Mes travaux ont permis dans un deuxième temps d'identifier un couplage entre ErbB2/ErbB3 et CXCR4 qui affecte la signalisation PI3-K/Akt médiée par ErbB2/ErbB3 et comme cibles en aval les ERs dans des cellules cancéreuses mammaires. Ce qui suit est une analyse des points importants de mes travaux de recherche.

# 1 Boucle de rétroaction positive entre la réponse transcriptionnelle des ERs et l'axe SDF/CXCR4

## 1.1 L'expression du gène SDF-1 est régulée par ER et CXCR4

L'action de SDF-1 est impliquée dans la progression du cancer du sein (voir section 21.3). Il avait été rapporté avant mes travaux que le traitement des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et ovariennes et BG-1 ER $\alpha$  positives avec E2 induit l'expression de l'ARNm de la chimiokine SDF-1 (Hall and Korach, 2003). L'étude de Kishimoto a déterminé que les co-activateurs de la famille SRC régulent l'expression du gène SDF-1. La délétion de SRC-1 altère l'expression du gène *SDF-1* en réponse à E2. L'introduction de SRC-1, SRC-2 et SRC-3 dans les cellules déplétées en SRC-1 augmente l'expression basale de *SDF-1* (Kishimoto et al., 2005). Nous avons nous aussi observé au laboratoire que le traitement des cellules cancéreuses mammaires MCF-7, qui expriment ER $\alpha$ , ER $\beta$  et CXCR4, à E2, augmente l'expression du gène *SDF-1*. L'inhibition de l'activité de CXCR4 altère l'induction de l'expression du gène *SDF-1* par E2 mais de plus, nous avons démontré que SDF-1 augmente l'expression du gène *SDF-1*, ce qui n'avait pas été rapporté auparavant. Cela indique que la signalisation du récepteur CXCR4 participe à la régulation de son propre ligand. Nous avons montré que l'induction de l'expression du gène *SDF-1* par SDF-1 est régulée par l'activité transcriptionnelle des ERs, puisque l'anti-estrogène fulvestrant abolit l'effet de SDF-1. Il a aussi été rapporté que E2 augmente l'expression de *SDF-1* dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Rhodes et al., 2011) ainsi que dans une lignée cellulaire dérivée de tissu utérin de rat (ELT-3) (Glance et al., 2009). Le raloxifène réprime l'expression de *SDF-1* dans la lignée ELT-3 et dans des kystes utérins en réponse à E2. Toutefois, il n'y a pas de répression complète même à plus forte doses de raloxifène, ce qui suggère une régulation qui n'est pas complètement AF-2 dépendante de ER (Glance et al., 2009).

Nous ne pouvons pas écarter la possibilité que la signalisation des ERs membranaires ou du récepteur GPR30 membranaire puisse contribuer à la régulation de l'expression de *SDF-1* en réponse à E2. La signalisation membranaire et intracellulaire peut directement ou

indirectement réguler l'activité génomique des ERs. D'ailleurs, il a été démontré que l'estrogène promouvoit l'association entre ER $\alpha$  membranaire et ErbB4. L'estrogène induit la translocation nucléaire du domaine intracellulaire de ErbB4 (4ICID) et son association à ER $\alpha$ . Le complexe ER $\alpha$ /4ICID est recruté au promoteur du gène *SDF-1* et 4ICID co-active la transcription de ER $\alpha$  (Zhu et al., 2006).

Dans la littérature, la régulation positive de gènes impliqués dans le développement et la progression du cancer en réponse à E2, dont *SDF-1*, est associée à ER $\alpha$ . Nous avons observé que le gène *SDF-1* est également positivement régulé par E2 et SDF-1 dans des cellules cancéreuses mammaires Hs578T exprimant stablement ER $\beta$ . Le promoteur de *SDF-1* ne possède pas un site ERE parfait (Hall and Korach, 2003, Zhu et al., 2006) mais nous avons démontré que l'exposition des cellules MCF-7 à E2 ou à SDF-1 augmente le recrutement de ER $\beta$  endogène au promoteur du gène *SDF-1*. ER $\beta$  est considéré comme un régulateur négatif dans le cancer du sein. Cependant, en régulant positivement l'expression de *SDF-1*, il pourrait contribuer à promouvoir la progression du cancer tout comme ER $\alpha$ .

Une étude a démontré que le phytoestrogène genistein ou des dérégulateurs endocriniens comme le bisphénol A ou le 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-Hydroxyphenyl)éthane (HPTE) augmentent l'expression du gène *SDF-1* dans les cellules cancéreuses ovariennes BG-1 ER $\alpha$  positives (Hall and Korach, 2012). Ces résultats appuient l'implication de ER dans la régulation de *SDF-1* dans des cellules cancéreuses ER positives. Le phytoestrogène genistein augmente également l'expression du gène *SDF-1* toutefois à des fortes doses dans les cellules MCF-7 qui co-expriment ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Boudot et al., 2011). Plusieurs études ont démontré que le genistein a un effet agoniste plus marqué pour ER $\beta$  que ER $\alpha$  (Miodini et al., 1999, Magee and Rowland, 2004), suggérant que l'activation de l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$  serait impliquée dans la régulation de *SDF-1*, appuyant ainsi nos résultats.

Plusieurs études suggèrent que ER $\beta$  régule négativement l'activité transcriptionnelle E2-dépendante de ER $\alpha$  (voir section 5.4). Une étude a rapporté que l'augmentation de l'expression du gène *SDF-1* dans une lignée cellulaire dérivée de tissu utérin de rat, en réponse

à E2, n'est pas inhibée par un agoniste sélectif de ER $\beta$ , le ERB-041 (Glance et al., 2009). Cela suggère que ER $\beta$  n'agirait donc pas comme régulateur négatif dans la régulation du gène *SDF-1* par ER $\alpha$ .

Le récepteur pour le ligand SDF-1, CXCR4, serait également régulé par les ERs. Une étude a rapporté que E2 augmente l'expression de *CXCR4* dans les cellules cancéreuses mammaires ER positives MCF-7 et ZR-75 (Boudot et al., 2011). De faibles doses de genistein stimule également efficacement l'expression du gène *CXCR4* dans les cellules MCF-7, ce qui suggère que ER $\beta$  régulerait CXCR4 (Boudot et al., 2011).

## **1.2 La signalisation de CXCR4 régule l'activité ligand-dépendante des ERs**

Nous avons démontré que l'inhibition de CXCR4 altère l'augmentation de l'activité transcriptionnelle E2-dépendante dans les cellules MCF-7 en réponse à E2 sur un gène rapporteur ERE. De plus, l'inhibition de l'activité de CXCR4 altère l'expression de gènes cibles régulés par les ERs en présence de E2 dans les cellules MCF-7. Par ailleurs, nous avons observé que SDF-1 améliore l'activité transcriptionnelle E2-dépendante dans les cellules MCF-7 sur un gène rapporteur ERE. Dans des cellules HEK 293T transfectées, nous avons observé que SDF-1 améliore la réponse hormonale de ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Cet effet n'est pas observé avec un mutant de CXCR4 dominant négatif N119K, qui n'engendre pas de signalisation protéines G-dépendante en réponse à SDF-1, ce qui suggère un mécanisme protéines G dépendant.

L'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et ER $\beta$  peut être induite par le tamoxifène sur un élément AP-1. Nous avons observé que SDF-1 améliore l'activité de ER $\beta$  en présence de tamoxifène dans un contexte de gène rapporteur AP-1-collagénase. De plus, SDF-1 améliore l'expression de gènes régulés par des sites AP-1 en réponse au tamoxifène. Finalement, SDF-1 améliore le recrutement de ER $\beta$  au promoteur du gène *CCND1* en réponse au tamoxifène dans les cellules MCF-7. Nous avons démontré que SDF-1 est impliqué dans l'optimisation de la



réponse ligand-dépendante des ERs, autant dans un contexte de liaison directe que indirecte à l'ADN.

### **1.3 La chimiokine SDF-1 régule l'activité ligand-indépendante des ERs**

Nous avons émis l'hypothèse que la signalisation de CXCR4 induit l'activité des ERs en ciblant potentiellement la portion N-terminale des ERs. Les ERs peuvent être activés en absence ou en présence de E2 mais les domaines AF-1 et AF-2 peuvent agir de manière synergique et ainsi optimiser la réponse transcriptionnelle des ERs. Nos résultats indiquent que la chimiokine SDF-1 améliore la réponse hormonale médiée par ER. L'amélioration de la réponse pourrait être attribuable à une augmentation de l'activité ligand-indépendante des ERs qui s'additionne à l'activation par E2 ou/et pourrait être explicable par le fait que SDF-1 favorise le recrutement de co-activateurs en réponse à E2. Pour répondre à cela, nous avons évalué la capacité de la chimiokine SDF-1 à réguler l'activité ligand-indépendante des ERs. Nous avons observé que SDF-1 augmente l'activité transcriptionnelle d'un gène rapporteur ERE mais également l'expression de gènes cible régulés par les ERs dans les cellules MCF-7. Comme c'est le cas pour la régulation du gène *SDF-1* par SDF-1, l'augmentation de l'expression des gènes en réponse à SDF-1 est régulée par l'activité des ERs. Nous avons également observé que SDF-1 active l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans des cellules HEK 293T transfectées. De plus, SDF-1 augmente le recrutement de ER $\beta$  aux régions promotrices/enhancers de gènes cibles dans les cellules MCF-7. Par ailleurs, la chimiokine SDF-1 augmente également l'activité de ER $\beta$  sur un gène rapporteur AP-1 collagénase, élargissant le contexte dans lequel SDF-1 peut réguler l'activité de ER $\beta$  de manière ligand-indépendante. Nous avons donc démontré que l'activité transcriptionnelle des ERs peut être régulée de manière ligand-indépendante par la chimiokine SDF-1. Jusqu'à maintenant, l'activité ligand-indépendante était beaucoup attribuée aux facteurs de croissance. Nous identifions l'axe CXCR4/SDF-1 comme étant un nouveau mécanisme dans la régulation de la transcription par les ERs.

Nous avons démontré au laboratoire que le turn-over de ER $\beta$  est important dans la régulation de l'activité transcriptionnelle ligand-indépendante du récepteur (Picard et al.,

2008). ER doit être dégradé puis re-synthétisé pour permettre une activité transcriptionnelle optimale du récepteur. Nous avons observé suite à l'utilisation de l'inhibiteur de la synthèse protéique cycloheximide, que la stimulation de CXCR4 par SDF-1 induit la dégradation de ER $\beta$ .

Nous avons déterminé que l'estrogène et SDF-1 régulent positivement la production de la chimiokine SDF-1. Le SDF-1 ainsi produit se lie à son récepteur CXCR4 et l'activation du récepteur CXCR4 augmente l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et ER $\beta$  en absence de E2 mais améliore également la réponse hormonale. L'activation des ERs par SDF-1 seul ou SDF-1+E2 induit l'expression de gènes cibles, dont SDF-1, permettant ainsi de poursuivre l'activation de CXCR4 et ER de manière cyclique. Nos résultats démontrent une interdépendance entre ER et CXCR4 et valide notre hypothèse portant sur le concept d'une boucle de régulation positive dans des cellules cancéreuses mammaires ER positives. Nous avons montré par des essais de co-culture que la production de SDF-1 par une cellule affecte l'activité transcriptionnelle de ER des cellules avoisinantes, démontrant ainsi que la régulation peut de faire de manière paracrine.

#### **1.4 SDF-1, via la voie ERK 1/2/MAPK, cible la portion N-terminale de ER $\beta$**

L'activité transcriptionnelle des ERs peut être régulée de manière ligand-indépendante, principalement via la phosphorylation de résidus situés dans le domaine N-terminal du récepteur en réponse à des facteurs de croissance. L'activité transcriptionnelle des ERs est aussi dépendante de la présence de co-régulateurs. La phosphorylation de résidus dans la région AF-1 de ER $\beta$  améliore le recrutement des co-régulateurs SRC-1 et CBP (Tremblay et al., 1999, Tremblay and Giguère, 2001) et la phosphorylation de certains co-activateurs améliorent l'interaction avec ER. La liaison de SDF-1 à CXCR4 active plusieurs voies de signalisation, dont la voie MAPK, connue pour cibler les ERs mais également certains co-activateurs.

Nous avons observé que l'activation de CXCR4 par SDF-1 induit efficacement la phosphorylation de ERK 1/2 dans les cellules MCF-7 ainsi que dans les cellules HEK 293T transfectées. L'inhibition de ERK 1/2 abolit également l'amélioration de la réponse hormonale de ER $\beta$  en réponse à SDF-1. Ces résultats ne nous indiquent pas si l'effet de SDF-1 sur la régulation de l'activité de ER $\beta$  est engendré par une signalisation 'rectiligne' engendrée par SDF-1 ou si un couplage entre CXCR4 et un autre récepteur est impliqué par exemple. Il a été rapporté que le ligand de CXCR4, SDF-1, transactive les récepteurs à activité tyrosine kinase EGFR et ErbB2 dans certaines lignées cancéreuses (Cabioglu et al., 2005, Pattarozzi et al., 2008). Toutefois, il a été rapporté que SDF-1 ne transactive pas ErbB2 dans les cellules MCF-7 (Cabioglu et al., 2005). Lors de mes travaux au laboratoire, je n'ai pas observé de transphosphorylation de ErbB2 en réponse à SDF-1. Toutefois il est possible que le traitement des cellules MCF-7 avec du SDF-1 ectopique engendre la transactivation de EGFR ou d'un autre récepteur dont la signalisation affecte l'activité transcriptionnelle ligand-indépendante de ER $\beta$ . De plus, EGFR et ErbB2 stabilisent l'expression de CXCR4, pouvant ainsi favoriser la signalisation de celui-ci (Li et al., 2004, Guo et al., 2007). Il serait possible également que l'activation de CXCR4 par SDF-1 active ER situé à la membrane plasmique dont la signalisation MAPK peut réguler l'activité des ERs nucléaires.

La délétion des domaines AB de ER $\beta$  abolit l'amélioration de l'activité transcriptionnelle hormono-dépendante du récepteur en présence de SDF-1. La portion N-terminale de ER $\beta$  possède plusieurs résidus ciblés par la voie MAPK. Nous avons voulu évaluer si la chimiokine affecte directement ER $\beta$ . Nous avons observé que la substitution de la serine 106 de ER $\beta$  en alanine inhibe complètement l'amélioration de la réponse hormonale de ER $\beta$  par SDF-1. Nous avons démontré que SDF-1 induit la phosphorylation de la serine 106 de ER $\beta$  murin dans des cellules HEK 293T transfectées mais également de la serine 87 de ER $\beta$  endogène dans les cellules humaines MCF-7. La serine 106 de ER $\beta$  est un site ciblé par ERK 1/2. L'activation de CXCR4 par SDF-1 active la voie ERK 1/2/MAPK qui induit la phosphorylation de la serine 106/87 de ER $\beta$ , augmentant ainsi l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$ . La serine 106 de ER $\beta$  régule également l'activité de ER $\beta$  en réponse à SDF-1 dans un contexte AP-1. Nous démontrons que l'axe CXCR4/SDF-1 affecte directement l'activité de

ER $\beta$ . Il se peut également que la phosphorylation de la serine 106 favorise le recrutement de co-activateurs et que la phosphorylation de co-activateurs par ERK 1/2 augmente la fonction co-activatrice de ceux-ci.

## **2 CXCR4/SDF-1 régule la prolifération des cellules MCF-7**

L'effet mitogénique de l'estrogène dans les cancers hormono-dépendant est bien connu. SDF-1 a été largement caractérisé dans le développement de tumeurs métastatiques. Les organes ciblés par les métastases dans le cancer du sein expriment de haut niveau de SDF-1 et les tumeurs primaires exprimant CXCR4 migrent vers ces sites (Luker and Luker, 2006). CXCR4/SDF-1 participent à tous les stades impliqués dans le développement des métastases en régulant la migration cellulaire, l'adhésion cellulaire, la dégradation de la matrice extracellulaire, l'invasion cellulaire et l'angiogenèse. Moins d'études ont porté sur l'impact de SDF-1 sur l'initiation du cancer. La prolifération des cellules cancéreuses représente une des premières étapes dans le développement du cancer. Il a été rapporté que SDF-1 induit la prolifération de cellules cancéreuses mammaires (voir section 21.3). Une étude a également démontré que la prolifération de cellules cancéreuses mammaires et ovariennes en réponse à E2 est inhibée par l'utilisation d'un anticorps neutralisant pour SDF-1 (Hall and Korach, 2003). De notre côté, nous avons observé que l'augmentation de la prolifération des MCF-7 en réponse à E2 est bloquée par l'antagoniste de CXCR4, l'AMD 3100, validant ainsi la participation du récepteur CXCR4 dans l'effet mitogénique de l'estrogène. Par ailleurs, un groupe a démontré que la déplétion du co-activateur SRC-1 dans les cellules MCF-7 altère l'induction de l'expression du gène SDF-1 par E2. La déplétion de SRC-1 altère également la prolifération des cellules MCF-7 en réponse à E2 (Kishimoto et al., 2005). Nos résultats et ceux de cette étude indiquent que l'activité de CXCR4 et l'expression de SDF-1 sont impliquées dans la prolifération de cellules cancéreuses ER positives en réponse à l'estrogène.

Comme mentionné auparavant, il est bien connu que l'estrogène induit la prolifération de cellules cancéreuses ER positives. Les mécanismes régulant l'effet prolifératif de E2 sont toutefois encore à l'étude. D'autres groupes et nous-même avons déterminé que l'augmentation de l'expression de *SDF-1* par E2 est un mécanisme contribuant à la

prolifération des cellules cancéreuses ER positives par E2. Par ailleurs, comme démontré par Hall, nous avons démontré que le traitement des cellules MCF-7 avec du SDF-1 ectopique induit la prolifération de ces cellules, indiquant que la chimiokine SDF-1 contribuerait au développement des tumeurs primaires mammaires en absence de E2. L'effet prolifératif du SDF-1 pourrait être explicable par l'activation ligand-indépendante des ERs ou/et par un mécanisme ER indépendant, ce qui suggèrerait que SDF-1 pourrait induire la prolifération de cellules cancéreuses mammaires ER négatives. D'ailleurs, une étude a démontré que SDF-1 induit la prolifération des cellules cancéreuses mammaires T47D par un mécanisme de transactivation du récepteur EGFR. SDF-1 transactive EGFR via l'activation de la kinase c-src et l'inhibiteur de EGFR, gefitinib, inhibe la prolifération de ces cellules en réponse à SDF-1 (Pattarozzi et al., 2008). De plus, l'inhibition de CXCR4 inhibe la prolifération des cellules cancéreuses mammaires ER négatives SKBr3 dont le récepteur EGFR est constitutivement actif en réduisant la phosphorylation de EGFR (Pattarozzi et al., 2008). Cela démontre que la fonction proliférative de SDF-1 peut être indépendante de l'activité des ERs.

Quant est-il du rôle de ER $\beta$  dans la régulation de la prolifération de cellules cancéreuses mammaires? Plusieurs études attribuent un rôle anti-prolifératif à ER $\beta$  (voir section 11.1). SDF-1 augmente la prolifération des cellules MCF-7, où ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont co-exprimés. D'un autre côté, des cellules Hs578T stablement transfectées avec ER $\beta$  induisent l'expression de SDF-1 en réponse à E2 et à SDF-1. Le tamoxifène agit comme agoniste pour l'expression de *CCND1*. *CCND1* est un gène important dans la régulation de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. SDF-1 améliore le recrutement de ER $\beta$  au promoteur du gène *CCND1* en réponse au tamoxifène. En réponse à SDF-1, ER $\beta$  pourrait contribuer à augmenter la prolifération cellulaire en réponse au tamoxifène. On peut penser que ER $\beta$  contribuerait au phénomène de résistance au tamoxifène en améliorant la réponse agoniste du tamoxifène. L'impact de ER $\beta$  sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires en réponse à SDF-1 dépend peut-être de sa co-expression ou non avec ER $\alpha$ . Des cellules tumorales qui expriment seulement ER $\beta$  semblent se comporter différemment des cellules co-exprimant ER $\beta$  et ER $\alpha$  (voir section 11.1).

### **3 Le récepteur CXCR4 régule l'activité des ERs en absence de SDF-1**

#### **3.1 CXCR4 augmente l'activité basale et hormonale des ERs**

Il a été rapporté que CXCR4 type sauvage présente une certaine activité constitutive en absence de ligand (Kahn et al., 2004). De plus, une mutation dans le motif DRY de CXCR4, soit la substitution de l'acide aspartique pour un résidu asparagine, rend le récepteur constitutivement actif en absence de ligand. La surexpression de CXCR4 type-sauvage ou du mutant constitutivement actif NRY dans les cellules MCF-7 ou HEK 293T augmente l'activité E2-dépendante d'un gène rapporteur ERE et l'activité basale de ER $\alpha$  et ER $\beta$ , respectivement. L'activité transcriptionnelle basale d'un gène rapporteur ERE dans les cellules MCF-7 et dans les cellules HEK 293T transfectées est partiellement inhibée par l'agoniste inverse T140, démontrant ainsi qu'une activité basale de CXCR4 en absence de SDF-1 régule l'activité des ERs. Toutefois, pour ce qui est des cellules MCF-7, il se peut que la production basale de SDF-1 endogène contribue à l'effet de CXCR4 en absence de SDF-1 ectopique. Cela serait vérifiable en testant l'antagoniste AMD 3100 sur l'activité basale ER dépendante. Nos résultats démontrent qu'une activité fonctionnelle basale de CXCR4, même en absence du ligand SDF-1, augmente l'activité transcriptionnelle ER-dépendante.

#### **3.2 CXCR4 relève la répression hormonale des ERs en réponse à ErbB2/ErbB3**

Nous avons précédemment publié que la signalisation du dimère ErbB2/ErbB3 réprime l'activité transcriptionnelle hormono-dépendante de ER $\alpha$  et ER $\beta$  (St-Laurent et al., 2005, Sanchez et al., 2007, Sanchez et al., 2013). Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre l'expression de ErbB2 et CXCR4 dans les tumeurs mammaires (Muller et al., 2001, Li et al., 2004). Lors de mes travaux de doctorat, nous avons démontré que la co-expression de CXCR4 avec ErbB2/ErbB3 relève la répression transcriptionnelle de ER $\alpha$  et ER $\beta$  en réponse à ErbB2/ErbB3. De plus, la surexpression de CXCR4 relève partiellement alors que la déplétion de CXCR4 accentue la répression E2-dépendante de gènes cibles de ER en réponse au facteur

de croissance héréguline, qui favorise la dimérisation ErbB2/ErbB3. Fait intéressant, SDF-1 fait partie des gènes dont l'induction en réponse à E2 est inhibée par héréguline, ce qui suggère que héréguline contribuerait à atténuer la signalisation de CXCR4 en réponse à SDF-1 en plus d'altérer la réponse hormonale des ERs.

CXCR4 relève que partiellement l'expression des gènes dont la transcription en réponse à E2 est inhibée par héréguline. Cela pourrait être attribuable à la production de SDF-1 par les cellules MCF-7 faisant en sorte que nous n'observons pas que l'effet de la surexpression de CXCR4 seul mais également l'effet de la signalisation de CXCR4/SDF-1. Même si l'expression de SDF-1 en réponse à E2 est altérée par héréguline, elle n'est pas complètement inhibée. Nous avons démontré dans les cellules HEK 293T que l'expression de CXCR4 en absence ou en présence de SDF-1 régule différemment la signalisation de ErbB2/ErbB3 et l'activité des ERs en réponse à ErbB2/ErbB3. Dans le cas de la déplétion de CXCR4, l'expression restante de CXCR4 peut répondre au SDF-1 et ainsi atténuer l'amélioration de la répression hormonale médiée par héréguline.

Par ailleurs, les cellules MCF-7 expriment également ErbB1/EGFR et ErbB4. Malgré que celui-ci soit favorisé, le traitement à l'héréguline n'engendre pas que la formation du dimère ErbB2/ErbB3. La signalisation par d'autres dimères en réponse à héréguline pourrait peut-être expliquer l'effet partiel de CXCR4 sur l'expression des gènes en réponse à E2+Hrg.

Les cellules MCF-7 expriment également le récepteur CXCR7. Il est possible que CXCR7 affecte le couplage entre CXCR4 et ErbB2/ErbB3 et ainsi la réponse transcriptionnelle des ERs. La co-expression de CXCR7 pourrait être un autre facteur contribuant à l'effet partiel de la surexpression ou de la déplétion de CXCR4 sur la transcription des gènes.

Le mutant dominant négatif de CXCR4, N119K, qui ne possède pas d'activité protéines G dépendante n'a pas d'effet sur l'activité des ERs en réponse à ErbB2/ErbB3. Ces résultats suggèrent que CXCR4 possède une activité basale que ne posséderait pas le mutant N119K et que cette activité basale est suffisante pour exercer un effet sur la transcription E2-

dépendante en réponse à ErbB2/ErbB3. Nos résultats indiquent que CXCR4, en absence de SDF-1, a pour effet d'améliorer la réponse hormonale des ERs. Toutefois, nous avons observé que la présence de SDF-1 permet de récupérer la répression hormonale de ER $\alpha$  et ER $\beta$  en réponse au mutant ErbB2 constitutif ou à héréguiline. Contrairement aux résultats obtenus dans le contexte de mon premier article, SDF-1 n'améliore pas l'effet basal de CXCR4 dans un contexte d'activation de la signalisation par ErbB2

### **3.2.1 La phosphorylation de CXCR4 est régulée par la signalisation de ErbB2**

Le récepteur CXCR4, en plus de posséder une activité basale, peut être régulé de manière ligand-indépendante. Une étude a démontré que le traitement de cellules cancéreuses mammaires avec le facteur de croissance IGF-1 entraîne le couplage de CXCR4 aux protéines G en absence de ligand (Akekawatchai et al., 2005). Par ailleurs, la sous-unité G $\alpha$ i peut être phosphorylée en réponse au facteur de croissance platelet-derived growth factor (PDGF) (Alderton et al., 2001). La phosphorylation de G $\alpha$ i inhiberait son association avec les sous-unités G $\beta$  $\gamma$  et prolongerait ainsi la signalisation protéines G dépendante. De plus, CXCR4 peut être transphosphorylé de manière ligand-indépendante en réponse à la signalisation par des facteurs de croissance (voir section 19.2.3.2.3).

Nous avons démontré que le facteur de croissance héréguiline augmente la phosphorylation de CXCR4 sur la serine 339 de manière ErbB2 et PKC dépendante. Il a été rapporté que la phosphorylation de CXCR4 par PKC régule l'internalisation et le recyclage de CXCR4. Un autre groupe a observé une augmentation de la phosphorylation des serines 324-325 et 330 de CXCR4 en réponse à héréguiline, dépendante de ErbB3 et EGFR. Nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la phosphorylation de la serine 339 en réponse à héréguiline fasse intervenir la transactivation de EGFR, puisque EGFR est exprimé dans les cellules HEK 293T et MCF-7. Les investigateurs de l'étude dont je fais mention ont suggéré que la phosphorylation de CXCR4 par héréguiline engendrerait le couplage de CXCR4 aux protéines G. Il a été rapporté que la phosphorylation de CXCR4 par héréguiline induit le recrutement de  $\beta$ -arrestine, ce qui se produit à la suite de l'activation des protéines G par



CXCR4 et de la phosphorylation de CXCR4 par des GRKs. Nous avons démontré que la phosphorylation de la serine 339 de CXCR4 est dépendante de la kinase PKC. Or, il a été démontré que la phosphorylation de CXCR4 médiée par PKC n'induit pas le recrutement de la  $\beta$ -arrestine (Orsini et al., 1999). Il se peut toutefois que PKC ne phosphoryle pas directement CXCR4. Il a été rapporté que PKC active rapidement GRK2. Le recrutement de  $\beta$ -arrestine à CXCR4 met fin à la signalisation protéines G dépendante mais engendre une signalisation  $\beta$ -arrestine dépendante qui pourrait réguler l'activité des ERs. De plus, il a été rapporté que la kinase PIM1 phosphorylerait spécifiquement la serine 339 de CXCR4 (Grundler et al., 2009). La kinase PIM1 est constitutivement active et son expression est induite par PKC (Wingett et al., 1996). Il se pourrait aussi que la phosphorylation de la serine 339 ne soit pas un signal de recrutement de la  $\beta$ -arrestine. CXCR4, en réponse à PKC, est recyclé après son internalisation (Signoret et al., 1997). Une expression élevée de la PIM1, qui phosphoryle spécifiquement la sérine 339 de CXCR4, corrèle avec une augmentation de l'expression de CXCR4 à la surface (Grundler et al., 2009). De plus, il a été démontré que l'expression d'un mutant de CXCR4 S339E, qui mimique la phosphorylation, est davantage recyclé et exprimé à la surface que CXCR4 type sauvage (Brault et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de la serine 339 de CXCR4 par héréguline augmenterait le recyclage du récepteur ayant pour conséquence l'augmentation de l'expression en surface de CXCR4. Par ailleurs, nous avons observé que le contenu en phospho-serine total de CXCR4 en réponse à héréguline n'est pas complètement inhibé par l'inhibiteur de PKC contrairement à la phosphorylation de la Ser339 (résultat non-inclus dans le manuscrit). Ce résultat suggère que d'autres serines sont ciblées et d'autres kinases sont impliquées la phosphorylation de CXCR4 par la signalisation de ErbB2.

Il a été démontré que la surexpression de ErbB2 dans des cellules cancéreuses mammaires augmente la stabilité de CXCR4, ce qui appuie l'implication de ErbB2 sur la stabilisation de CXCR4 (Li et al., 2004). De plus, la signalisation par des facteurs de croissance augmente le recyclage de CXCR4 en réponse à SDF-1 (Slagsvold et al., 2006). L'augmentation de l'expression de CXCR4 à la surface augmenterait ainsi la signalisation de CXCR4. En plus de phosphorylé CXCR4, héréguline- $\beta$ 1 induit peut-être la phosphorylation

de la sous-unité  $G\alpha_i$  comme il a été démontré avec PDGF, ce qui accentuerait la signalisation protéines G dépendante.

Nous avons observé que le mutant N119K, même s'il n'altère pas la stabilité et la signalisation de ErbB2/ErbB3, est tout de même phosphorylé à la serine 339 en réponse à ErbB2 alors qu'il ne l'est pas en réponse à SDF-1 (résultat pas inclus dans le manuscrit). Ce résultat suggère que l'augmentation de la phosphorylation de la serine 339 du mutant N119K doit favoriser son recyclage et son expression en surface. Toutefois, comme il ne présente pas d'activité fonctionnelle, l'augmentation de sa stabilité n'aurait pas d'impact sur la signalisation de ErbB2 et sur l'activité transcriptionnelle E2-dépendante de  $ER\alpha$  et  $ER\beta$  en réponse à la signalisation de ErbB2.

Nos résultats démontrent que CXCR4 possède une activité basale qui régule l'activité transcriptionnelle des ERs en absence et en présence de ErbB2/ErbB3. De plus, nous avons identifié la signalisation de ErbB2 comme représentant un nouveau mécanisme ciblant la phosphorylation de la serine 339 de CXCR4 de manière SDF-1-indépendante. Une étude antérieure et nos données démontrent que l'héréguline phosphoryle CXCR4 sur des résidus localisés dans la queue C-terminale qui régulent le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et possiblement le recyclage du récepteur.

### **3.2.2 CXCR4 régule la signalisation de ErbB2/ErbB3**

Le dimère ErbB2/ErbB3 en réponse à héréguline- $\beta 1$  et le mutant ErbB2 constitutivement actif activent plusieurs voies de signalisation intracellulaires. L'expression de CXCR4 atténue la phosphorylation de Akt en réponse au mutant ErbB2 ou au dimère ErbB2/ErbB3 activé par héréguline- $\beta 1$  dans les cellules HEK 293T, mais n'affecte pas la phosphorylation de ERK 1/2 ou p38. La phosphorylation de Akt est récupérée en présence de SDF-1 dans les cellules HEK 293T. Le mutant dominant négatif de CXCR4, N119K, n'altère pas l'activation de la kinase Akt en réponse à ErbB2/ErbB3/Hrg- $\beta 1$ . La surexpression de CXCR4 dans les cellules MCF-7 et BT474 atténue la phosphorylation de Akt alors que la déplétion de CXCR4 dans les cellules MCF-7 améliore la phosphorylation de Akt en réponse à

héréguline- $\beta$ 1. Ces résultats corrént avec la réponse transcriptionnelle de ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans les cellules HEK 293T et la régulation des gènes suite à la surexpression ou la déplétion de CXCR4 dans les cellules MCF-7 en réponse à E2 et héréguline. Ces résultats suggèrent que l'altération de la voie PI3-K/Akt serait responsable de la modulation de l'activité transcriptionnelle des ERs en réponse à héréguline- $\beta$ 1 par CXCR4.

Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués dans la régulation de la kinase Akt par CXCR4 en réponse à ErbB2/ErbB3. Nous avons décidé de regarder du côté du recrutement de PI3-K à ErbB3 en présence de ErbB2. Nous avons observé que la co-expression de CXCR4 altère le recrutement de la sous-unité régulatrice de PI3-K à ErbB2/ErbB3 en réponse à héréguline1, qui est retrouvé en présence de SDF-1. En plus d'affecter le recrutement de PI3-K à ErbB2/ErbB3, CXCR4 affecte peut-être l'activation de PI3-K. Nous avons observé une diminution de la présence de la forme phosphorylée de p85 avec le complexe ErbB2V659E/ErbB3 en présence de CXCR4. Par ailleurs, il a été rapporté que  $\beta$ -arrestine 2 inhibe la sous-unité catalytique de PI3-K (p110) (Wang et al., 2007). Comme il a été rapporté que héréguline induit le recrutement de  $\beta$ -arrestine 2 à CXCR4, cela pourrait représenter un mécanisme par lequel CXCR4 altère l'activation de Akt. Toutefois, il a été démontré que l'inhibition de p110 par  $\beta$ -arrestine 2 cela requiert un niveau d'expression élevé de  $\beta$ -arrestine 2 dans la cellule (Wang et al., 2007). De plus, pour que cette hypothèse soit valable, cela devrait impliquer que le mutant N119K CXCR4, contrairement à CXCR4 type-sauvage, ne recrute pas  $\beta$ -arrestine 2 en réponse à héréguline.

Il a été rapporté que l'inhibition de l'activité de G $\alpha$ i accentue la phosphorylation de ERK 5 en réponse à EGF. La surexpression des sous-unités G $\beta\gamma$  inhibe la phosphorylation de ERK 5 en réponse à EGF (Obara et al., 2008). L'activité protéines G dépendante régule peut-être négativement la signalisation de d'autres kinases médiée par d'autres facteurs de croissance. L'activité protéine G constitutive de CXCR4 ou améliorée par héréguline contribue peut-être à l'altération de l'activation de PI3-K et/ou Akt en réponse à la signalisation par ErbB2.

Nous avons observé une diminution de l'activation de Akt en présence du mutant ErbB2 constitutivement actif exprimé seul, malgré le fait que ErbB2 ne possède pas de site de liaison pour PI3-K. ErbB2 possède plusieurs sites de liaison pour ShcA, ce qui lui permet de recruter PI3-K indirectement via la cascade ShcA (Lahlou et al., 2012). De plus, ErbB2 possède plusieurs sites pour la protéine Grb2 et il a été démontré que Grb2 module l'activité de Akt. La déplétion de Grb2 inhibe Akt mais n'affecte pas ERK 1/2 dans des cellules cancéreuses mammaires en réponse à héréguline ou surexprimant ErbB2 (Lim et al., 2000). Par ailleurs, il a été démontré pour le récepteur à l'IGF que la sous-unité régulatrice de PI3-K, p85, s'associe avec Grb2 et que cette association est dépendante de l'interaction entre Shc et Grb2. Cela dit, CXCR4 altère peut-être le recrutement de ShcA et/ou Grb2 à ErbB2, ce qui mènerait à une altération de l'activité de Akt.

Nous avons publié que l'AF-1 de ER $\beta$  participe à la répression E2-dépendante de ER $\beta$  en réponse à héréguline. L'activation de l'AF-1 de ER $\beta$  relève cette répression transcriptionnelle (St-Laurent et al., 2005). De plus, nous avons démontré que la signalisation par SDF-1 augmente l'activité de l'AF-1 de ER $\beta$ . Basé sur ce résultat, nous pourrions supposer que la signalisation CXCR4/SDF-1 ciblerait l'AF-1 de ER $\beta$  et ainsi relèverait la répression en réponse à héréguline. Pourtant, la répression de l'activité hormonale de ER $\beta$  par héréguline est maintenue en présence SDF-1. Cela indique que CXCR4/SDF-1 ne doit pas influencer la réponse de ER $\beta$  à héréguline via l'AF-1 de ER $\beta$ .

Nous avons démontré précédemment au laboratoire que la région charnière de ER $\beta$  participe également à la répression hormonale de ER $\beta$  en réponse à héréguline. Cette région, en réponse à PI3-K/Akt, recrute le co-activateur CBP et la E3 ubiquitine ligase Mdm2 ce qui engendre la dégradation protéosomale et la répression transcriptionnelle de ER $\beta$  en réponse à héréguline (Sanchez et al., 2013). Nous avons démontré que CXCR4 et SDF-1 module la signalisation de PI3-K/Akt ErbB2 dépendante d'une manière qui corrèle avec la réponse transcriptionnelle de ER $\beta$ . CXCR4 pourrait donc affecter la réponse transcriptionnelle de ER $\beta$  par un mécanisme Akt/CBP/Mdm2- dépendant.

D'autres et nous-même avons observé une répression de l'activité transcriptionnelle E2-dépendante de ER $\alpha$  en réponse à héréguline (voir section 30). Toutefois, contrairement à ER $\beta$ , nous avons démontré que l'AF-1 de ER $\alpha$  et Akt/CBP/Mdm2 ne participent pas à la répression hormonale de ER $\alpha$  en réponse à héréguline (St-Laurent et al., 2005, Sanchez et al., 2007, Sanchez et al., 2013). La voie PI3-K/Akt cible directement ER $\alpha$  et augmente l'activité transcriptionnelle basale et hormone-dépendante (Campbell et al., 2001, Shin and Arteaga, 2006). L'expression génique du co-répresseur MTA1 est augmentée dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 en réponse à héréguline (Mazumdar et al., 2001). L'activité transcriptionnelle E2-dépendante de ER $\alpha$  est inhibée par MTA1 (Mazumdar et al., 2001). Il a été rapporté que la répression hormonale de ER $\alpha$  en réponse à héréguline est partiellement relevée par la déplétion de MTA1 (Khaleque et al., 2007). CXCR4 pourrait altérer le recrutement de MTA1 à ER $\alpha$  en réponse à héréguline et ainsi relever la répression hormonale de ER $\alpha$ .

### **3.2.3 CXCR4 régule la stabilité de ErbB2 et ErbB3 et la phosphorylation de ErbB2.**

Nous avons démontré que la co-expression de CXCR4 avec ErbB2 et ErbB3 dans les cellules HEK 293T ou la surexpression de CXCR4 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et BT474 diminue l'expression protéique de ErbB2, ErbB3 et la phosphorylation de ErbB2. Une augmentation de l'expression de ErbB2 et ErbB3 dans les cellules MCF-7 est observée suite à la déplétion de CXCR4. Un autre groupe a observé une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de ErbB2 dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-361 exprimant stablement un mutant constitutivement actif de EGFR suite à la déplétion de CXCR4 (Rahimi et al., 2010).

La dégradation de ErbB2 a été rapportée avec un inhibiteur de Hsp90, geldanamycine (Lerdrup et al., 2007, Pedersen et al., 2008) et avec l'inhibiteur du protéasome 20S bortezomib (P341) (Marx et al., 2007). Les deux composés engendrent la déstabilisation de l'interaction entre ErbB2 et la protéine chaperone Hsp90, ce qui induit la dégradation de ErbB2. Basé sur

ces études et ce que nous avons observé, il est possible que CXCR4 affecte l'association de Hsp90 à ErbB2 ce qui représenterait un mécanisme par lequel CXCR4 dérégule l'expression protéique de ErbB2.

Étant donné que la dégradation de ErbB2 est observée avec CXCR4 type-sauvage mais pas avec le mutant N119K, cela suggère fortement un mécanisme protéine G dépendant. CXCR4 a été rapporté comme étant couplé à la protéine  $G_{\alpha i}$  mais également à  $G_{\alpha q}$  et à  $G_{\alpha s}$  (Rubin, 2009). Une étude a démontré que la surexpression de la protéine  $G_{\alpha s}$  engendre la dégradation du récepteur EGFR en absence et en présence de EGF (Zheng et al., 2004). La sous-unité  $G_{\alpha s}$  et la protéine GAP RGS-PX1 interagissent avec Hrs, une composante de la machinerie endosomale. La déplétion de  $G_{\alpha s}$  et Hrs inhibe la dégradation de EGFR (Zheng et al., 2004). Il se pourrait qu'une sous-unité  $G_{\alpha}$  couplé à CXCR4 puisse engendrer la dégradation de ErbB2.

CXCR4 est constitutivement internalisé en absence de ligand. De plus, nous avons démontré une interaction constitutive entre CXCR4 et ErbB2/ErbB3. Il se peut que le complexe CXCR4-ErbB2/ErbB3 soit constitutivement internalisé. Il a été rapporté que le RCPG  $\beta$ -adrénergique et le RTK EGFR forment un complexe constitutif. Les deux récepteurs sont internalisés en absence de ligand. Nous avons démontré que CXCR4 induit la dégradation de ErbB2 via la voie lysosomale. Toutefois, nous avons observé que le niveau d'expression protéique de CXCR4 n'est pas affecté par la co-expression de ErbB2/ErbB3. L'internalisation de CXCR4 en réponse à SDF-1 induit la dégradation lysosomale du récepteur. Notre hypothèse est que le complexe ErbB2-CXCR4 est internalisé. Lors de l'internalisation, une vésicule endocytée fusionne avec l'endosome précoce. À ce stade, des protéines peuvent retourner à la membrane ou transiter vers les lysosomes pour être dégradées. ErbB2 cheminerait vers les lysosomes alors que CXCR4, parce qu'il n'est pas lié à son ligand, serait recyclé à la membrane.

La diminution de l'expression de ErbB2 et ErbB3 et de la phosphorylation de ErbB2 corrèle avec une diminution de l'activité de Akt. Nous avons été surpris de constater que

malgré l'altération de l'expression et de la phosphorylation de ErbB2, seul l'activité de la kinase Akt est significativement affectée. De plus, une certaine activité fonctionnelle est maintenue puisque ErbB2/ErbB3 est en mesure de stimuler la phosphorylation de CXCR4 sur la serine 339. Un autre groupe a observé que le composé bortezomib, quoique entraînant une diminution de la phosphorylation de ErbB2, n'altère que la phosphorylation de la kinase Akt, avec aucun effet sur l'activité de ERK 1/2 (Marx et al., 2007). Il a été rapporté que la déstabilisation de ErbB2 mène à la déstabilisation de ErbB3 (Motoyama et al., 2002). Étant donné que ErbB3 recrute très efficacement PI3-K, la déstabilisation de ErbB3 entraîne une altération de l'activation de la voie PI3-K/Akt (Lane et al., 2000, Basso et al., 2002). La régulation de l'expression de ErbB2 et ErbB3 et la phosphorylation de ErbB2 par CXCR4 représentent des mécanismes par lesquels CXCR4 module l'activation de la voie PI3-K/Akt en réponse à ErbB2/ErbB3. Comme mentionné auparavant, CXCR4 affecte peut-être l'activité de PI3-K/Akt par un ou des mécanisme(s) indépendant(s) de la régulation de la stabilité de ErbB2/ErbB3. Le recrutement de PI3-K et la phosphorylation de Akt en présence de ErbB2/ErbB3 et de CXCR4 est récupéré en réponse à SDF-1 malgré le fait que les niveaux d'expression de ErbB2 et ErbB3 et la phosphorylation de ErbB2 demeurent diminués. Les RCPG activent généralement PI3-K $\gamma$  alors que les RTK activent PI3-K $\alpha$ . Toutefois, il a été démontré que CXCR4 en réponse à SDF-1 active les deux classes de PI3-K (Curnock and Ward, 2003). De plus, un groupe a démontré que CXCR4 co-précipite avec la sous-unité régulatrice p85 en réponse à SDF-1 (Vicente-Manzanares et al., 1999). La récupération de l'activation de la kinase Akt par SDF-1 en présence de ErbB2/ErbB3 et CXCR4 serait attribuable au recrutement de PI3-K $\alpha$  et à l'activation PI3-K $\gamma$  via les protéines G $\beta\gamma$ .

### **3.2.4 CXCR4 et ErbB2/ErbB3 forment un complexe**

Les effets observés suggèrent que CXCR4 doit être à proximité de ErbB2 et ErbB3. Il a été démontré que CXCR4 et ErbB2 co-localisent dans des rafts lipidiques dans des cellules cancéreuses de la prostate (Chinni et al., 2008). Cependant, aucune évidence d'une interaction entre CXCR4 et ErbB2 n'avait été démontrée jusqu'à maintenant.

Même si l'expression de ErbB2 et ErbB3 est diminuée en présence de CXCR4, nous avons observé que CXCR4 et ErbB2 forment un complexe constitutif. ErbB2 constitutivement actif interagit avec CXCR4, ce qui démontre que la présence de ErbB3 n'est pas essentielle. Toutefois, CXCR4 interagit davantage avec ErbB2 et ErbB3 en présence d'héréguline, et cet effet est dépendant de l'activité kinase de ErbB2. L'amélioration du complexe en réponse à héréguline pourrait être attribuable à la phosphorylation de ErbB2, même si elle est diminuée avec CXCR4 ou/et due à une augmentation de la phosphorylation de CXCR4 sur la serine 339. Étant donné que ce site est impliqué dans le recyclage du récepteur, sa phosphorylation par héréguline augmenterait l'expression CXCR4 à la membrane et favoriserait donc l'interaction avec ErbB2. Héréguline pourrait également favoriser le recrutement d'une protéine qui stabilise le complexe. La combinaison de SDF-1 avec héréguline ne favorise pas davantage le complexe entre CXCR4 et ErbB2/ErbB3. Toutefois, SDF-1 améliore l'interaction entre le mutant ErbB2 constitutivement actif et CXCR4 type-sauvage mais pas avec le mutant N119K. Le mutant N119K n'engendre pas de signalisation protéines G dépendante en réponse à SDF-1 et n'adopte pas la même conformation que CXCR4 type-sauvage suite à la liaison de SDF-1 (Berchiche et al., 2007). Ces résultats suggèrent que l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 versus l'homodimère ErbB2 interagit différemment avec CXCR4 et que la signalisation ou/et la conformation de CXCR4 régule l'interaction avec l'homodimère ErbB2 en réponse à SDF-1.

## **4 La chimiokine SDF-1 : Ligand pour les récepteurs CXCR4 et CXCR7**

Lorsque j'ai entamé mes travaux de recherche au laboratoire, SDF-1 et CXCR4 étaient considérés comme étant exclusivement lié l'un à l'autre dans la littérature. Toutefois, au cours de nos travaux, des études ont montré que la chimiokine SDF-1 est également un ligand pour le récepteur CXCR7 (voir section 22.1). Nous avons donc dû valider l'implication de CXCR4 dans la réponse SDF-1 dans les cellules MCF-7. La déplétion de CXCR4 diminue l'expression des gènes *EBI* et *PR* en réponse à SDF-1, altère la phosphorylation de ERK 1/2 et la phosphorylation de la serine 87 de ER $\beta$  en réponse à SDF-1 dans les cellules MCF-7. Par ailleurs, une étude a démontré que l'antagoniste de CXCR4, l'AMD3100, est un agoniste pour le récepteur CXCR7 (Kalatskaya et al., 2009). Nous avons démontré que l'AMD 3100



antagonise l'activité transcriptionnelle en réponse à E2 dans les cellules MCF-7, ce qui, basé sur l'étude sur CXCR7 et AMD 3100, démontrerait la contribution de CXCR4 dans la régulation de l'activité des ERs. De plus, l'AMD 3100 empêche l'augmentation de la prolifération des cellules MCF-7 en réponse à E2. Finalement, nous avons également démontré que la surexpression d'un mutant de CXCR4 dominant négatif atténue l'activité transcriptionnelle E2-dépendante dans les cellules MCF-7. Par diverses approches, nous avons validé l'implication de CXCR4 dans les effets médiés par SDF-1 dans les cellules MCF-7.

Nous ne pouvons toutefois pas exclure l'implication de CXCR7 puisque ce récepteur est exprimé dans les cellules MCF-7 et dans plusieurs lignées cancéreuses mammaires. Malgré le fait que le récepteur CXCR7 ne soit pas couplé aux protéines G, des études ont rapporté que c'est un récepteur fonctionnel pouvant engendrer l'activation de voies de signalisation (voir section 22.3). CXCR7, via le recrutement de  $\beta$ -arrestine, peut engendrer l'activation de ERK 1/2. Toutefois, contrairement à l'activation de ERK 1/2 de manière protéines G dépendante, l'activation par  $\beta$ -arrestine restreint généralement ERK 1/2 activé dans le cytoplasme (Lefkowitz and Shenoy 2005). Comme ER est localisé majoritairement dans le noyau (Picard et al., 1990), cela implique que l'activation de ERK 1/2 par CXCR7 ne pourrait vraisemblablement pas cibler les ERs dans le noyau. De plus, nous avons observé que le mutant de CXCR4 N119K qui ne peut se coupler aux protéines G, n'exerce aucun effet sur l'activité des ERs en réponse à SDF-1, ce qui suggère fortement l'implication d'une signalisation protéines G dépendante. Par ailleurs, il a été rapporté que lorsque co-exprimés, CXCR4 et CXCR7 peuvent former des hétérodimères et que la présence de CXCR7 influence la signalisation de CXCR4 (voir section 22.3). L'hétérodimère CXCR4/CXCR7 recrute constitutivement  $\beta$ -arrestine. La présence de CXCR7 favorise donc une signalisation  $\beta$ -arrestine dépendante. L'hétérodimère CXCR4/CXCR7 régule peut-être l'activité transcriptionnelle des ERs en réponse à SDF-1 en affectant la signalisation protéines G dépendante de CXCR4.

Une étude a démontré que la déplétion de CXCR7, contrairement à CXCR4, n'altère pas la prolifération de cellules cancéreuses mammaires ER positives MCF-7 et ZR-75. La

surexpression de CXCR7 dans les cellules MCF-7 augmente la croissance basale des cellules mais inhibe la croissance induite par E2 (Boudot et al., 2011). De plus, la régulation différentielle de l'expression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 a été observée. E2 augmente l'expression de SDF-1 et CXCR4 mais diminue l'expression de CXCR7 dans les cellules cancéreuses mammaires ER positives MCF-7 et ZR-75 (Boudot et al., 2011). De plus, le phytoestrogène genistein qui présente une plus forte activité agoniste pour ER $\beta$ , diminue l'expression de l'ARNm de CXCR7 mais toutefois à de fortes doses. De faibles doses de genistein sont suffisantes pour stimuler efficacement l'expression du gène *CXCR4* dans les cellules MCF-7 (Boudot et al., 2011).

## **5 Comment l'axe CXCR4/SDF-1 est couplé à d'autres récepteurs stéroïdiens**

L'expression de CXCR4 serait régulée par le récepteur à l'androgène (AR). L'ARNm de CXCR4 dans les cellules cancéreuses de la prostate LnCaP est augmenté en réponse au ligand synthétique de AR, le R1881. Toutefois, l'induction de l'expression de CXCR4 n'est pas inhibée de manière significative par l'anti-androgène bicalutamide (Kasina and Macoska, 2012). Comme le bicalutamide est un modulateur de l'activité de AR (SARM) et qu'il inhibe seulement l'AF-2 de AR, il est possible que l'effet du ligand R1881 sur l'expression de CXCR4 fasse intervenir l'AF-1 de AR. D'un autre côté, une autre étude a rapporté que AR régule négativement l'expression de CXCR4. En comparant des cellules cancéreuses de la prostate DU-145 parentales AR négatives aux cellules DU-145 exprimant stablement AR, un groupe a observé une diminution de l'expression de CXCR4 dans les cellules exprimant AR (Akashi et al., 2006). Cela affecte le potentiel migratoire des cellules en réponse à SDF-1. Il est possible que les cellules cancéreuses de la prostate co-exprimant AR et CXCR4 expriment moins de CXCR4 comparativement aux cellules AR négatives mais que l'activation de AR par son ligand puisse réguler l'expression de CXCR4.

Il a été démontré que la chimiokine SDF-1 régule positivement l'expression de CXCR4 dans les cellules cancéreuses de la prostate LnCaP de manière AR-dépendante (Kasina and Macoska, 2012). Nous avons montré que CXCR4 régule positivement

l'expression de son ligand dans des cellules cancéreuses mammaires. D'après ce qui a été décrit pour des cellules de la prostate, il se pourrait également que SDF-1 régule positivement l'expression de CXCR4 dans des cellules cancéreuses mammaires.

La serine 106/87 de ER $\beta$  est conservée parmi les récepteurs stéroïdiens, suggérant que SDF-1 pourrait réguler l'activité de d'autres récepteurs par un mécanisme similaire à ER $\beta$ . Pour ER $\alpha$ , le site équivalent correspond à la serine 118. Dans la littérature, la phosphorylation de la serine 118 est surtout attribuée à la signalisation par l'estrogène. Une étude a toutefois révélé que la chimiokine SDF-1 augmente la phosphorylation de la serine 118 de ER $\alpha$  dans les cellules MDA-MB-361 et dans les cellules MCF-7 surexprimant CXCR4. De plus, la phosphorylation de la serine 167 de ER $\alpha$  est également augmenter en réponse à SDF-1 (Rhodes et al., 2011). Plusieurs kinases ont été attribuées à la phosphorylation de la serine 118 de ER $\alpha$ , dont MAPK/ERK. La serine 167 de ER $\alpha$  est ciblée par la voie MAPK et la kinase Akt. Il reste à déterminer si ces sites sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de ER $\alpha$  en réponse à SDF-1. Si c'est le cas, l'activité de ER $\alpha$  en réponse à SDF-1 pourrait être régulée par la voie MAPK comme ER $\beta$  mais peut-être aussi par la voie PI3-K/Akt.

Il a été rapporté que la signalisation engendrée par SDF-1 augmente l'activité transcriptionnelle d'un autre récepteur stéroïdien. SDF-1 augmente l'activité transcriptionnelle du récepteur de l'androgène (AR) de manière ligand-indépendante sur un gène rapporteur et promouvoit la transcription de gènes cibles de AR dans les cellules cancéreuses de la prostate LnCaP. SDF-1 induit la translocation nucléaire du co-activateur SRC-1 et promouvoit l'association entre AR et le co-activateur SRC-1 (Kasina and Macoska, 2012). SDF-1 induit la phosphorylation des serines 210/213 de AR dans les cellules LNCaP. La phosphorylation de AR est inhibée par inhibiteur de PI3-K (Kasina and Macoska, 2012). Cela indique que la portion N-terminale de AR est ciblée par l'axe CXCR4/SDF-1 via la voie PI3-K/Akt. La voie MAPK serait également indirectement impliquée dans le régulation de l'activité transcriptionnelle de AR en réponse à SDF-1 puisque la phosphorylation en thréonine de SRC-1 par SDF-1 est inhibée par un inhibiteur de MEK (Kasina and Macoska, 2012).

SDF-1 induit également la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate LnCaP. Cette prolifération est inhibée par AMD et par l'anti-androgène bicalutamide. Toutefois, SDF-1 n'induit pas la prolifération de cellules cancéreuses de la prostate 22Rv1 qui sont insensibles à l'androgène (Kasina and Macoska, 2012). Alors que SDF-1 peut induire la prolifération de cellules cancéreuses mammaires ER négatives, ces résultats indiquent que la prolifération de cellules de la prostate en réponse à SDF-1 est hormono-dépendante.

Dans une lignée cellulaire dérivée de tissu utérin de rat (ELT-3), l'induction de l'expression de SDF-1 par E2 est inhibée par la progestérone. Le modulateur de l'activité de PR (SPRM), asoprisnil, relève partiellement la répression de l'expression du gène SDF-1 par la progestérone. La progestérone inhibe la prolifération des cellules ELT-3 induite par E2 et diminue le volume de kystes utérins dans un modèle animal (Glance et al., 2009). *PR* est un gène cible de ER et est induit en réponse à l'estrogène. Les résultats décrits ci-dessus suggèrent un mécanisme de rétroaction négative par PR sur l'expression de SDF-1 en réponse à E2.

## Perspectives

### 1 Implication de la sérine 87 de ER $\beta$ dans la régulation des gènes

Nous avons démontré que la sérine 87 de ER $\beta$  est ciblée par la signalisation de CXCR4/SDF-1 et est essentielle dans la réponse à SDF-1. Nous avons également démontré que ER $\beta$  régule positivement la transcription du gène SDF-1 en réponse à E2 et à SDF-1. Beaucoup d'études ont porté sur le patron de liaison à la chromatine et la régulation des gènes par ER $\alpha$  et ER $\beta$  en réponse à E2. Aucune étude à grande échelle sur l'implication de la phosphorylation de l'AF-1 de ER $\beta$  sur la liaison à la chromatine et sur l'expression de certains gènes n'a été réalisée. Il serait intéressant de déterminer l'impact de la sérine 87 de ER $\beta$  sur la régulation de l'expression des gènes réponse à E2 et à SDF-1 dans des cellules cancéreuses mammaires. Une analyse par puce à l'ADN (microarray) permettrait d'établir un plus grand portrait de l'expression des gènes médiée par la sérine 87 de ER $\beta$ . Il permettrait également d'analyser le profil des gènes selon leur fonction. Étant donné que nous savons maintenant que des sites de liaison de ER à des régions distales peuvent réguler la transcription des gènes, l'analyse des régions de liaison de ER $\beta$  à la chromatine en réponse à SDF-1 par la technique de ChIP-Sequence s'avèrerait très utile. Toujours dans un contexte de la sérine 87, il permettrait l'identification et la caractérisation de nouveaux sites de liaisons.

L'analyse des régions permettrait d'évaluer s'il y a un patron d'enrichissement particulier des sites ER $\beta$  en réponse à SDF-1 : Liaison directe via ERE ou de liaison indirecte via l'association de AP-1 aux sites ER $\beta$  par exemple. De plus, la coopération de facteurs de transcription est importante pour la transcription de ER. L'analyse de la présence de motifs pour certains facteurs de transcription aux sites de liaisons nous permettrait également d'évaluer s'il y a un patron d'enrichissement de motifs pour un ou plusieurs facteurs de transcription.

Comme une étude a démontré que SDF-1 induit la phosphorylation des sérines 118 et 167 de ER $\alpha$ , il serait intéressant de valider si ces sites sont nécessaires à la réponse à SDF-1.

Si tel est le cas, l'évaluation de l'impact de ces sites sur la liaison à la chromatine et la régulation des gènes en réponse à SDF-1 serait pertinente également.

## **2 ER $\beta$ et plus particulièrement la serine 87 de ER $\beta$ modulent-ils la prolifération de cellules cancéreuses mammaires et la tumorigénèse?**

Nous avons démontré que la prolifération E2-dépendante de cellules cancéreuses co-exprimant ER $\alpha$  et ER $\beta$  est dépendante de CXCR4/SDF-1 et que SDF-1 seul induit également la prolifération des cellules. Toutefois, nous n'avons pas validé l'implication de ER $\beta$  dans la régulation de la prolifération de cellules cancéreuses mammaires médiée par l'axe CXCR4/SDF-1. Nous avons démontré que ER $\beta$  peut induire l'expression de SDF-1, et comme nous avons observé que SDF-1 induit la prolifération, cela laisse croire que ER $\beta$  pourrait être impliqué dans la prolifération des cellules en réponse à SDF-1. Est-ce que l'induction du gène SDF-1 par ER $\beta$  serait suffisante pour induire la prolifération de cellules cancéreuses? Les études jusqu'à maintenant attribue à ER $\beta$  un rôle antiprolifératif, quoique certains groupes tentent de démontrer que l'effet de ER $\beta$  est dépendante de sa co-expression ou non avec ER $\alpha$ .

Il y aurait l'approche d'évaluer la réponse proliférative de cellules exprimant stablement ER $\beta$  type sauvage ou ER $\beta$ S87A en réponse à E2 avec un antagoniste de CXCR4 et en réponse à SDF-1 seul. Cela nous donnerait une bonne indication si ER $\beta$  est en mesure d'induire la prolifération médiée par l'axe CXCR4/SDF-1. Toutefois, la majorité des cellules cancéreuses mammaires ER $\beta$  positives expriment également ER $\alpha$ . Pour respecter la co-expression de ER $\alpha$  et ER $\beta$ , il faudrait dépléter ER $\beta$  par interférence à l'ARN et mesurer la prolifération des cellules en réponse à E2 et à SDF-1. Il serait intéressant d'évaluer si ER $\beta$ , en condition de déplétion de ER $\alpha$ , peut compenser et promouvoir la prolifération des cellules. L'effet de SDF-1 seul sur la prolifération cellulaire ne doit pas être entièrement ER dépendant. Il faudrait utiliser un anti-estrogène complet comme le fulvestrant pour s'assurer de l'implication de ER.

Dans le but d'évaluer l'implication de la serine 87 de ER $\beta$  dans un contexte de co-expression ER $\alpha$ /ER $\beta$ , nous pourrions dépléter ER $\beta$  endogène et introduire un mutant S87A ou S87E dans les cellules. La prolifération de ces cellules serait comparée à des cellules parentales et déplétées en ER $\alpha$  ou ER $\beta$ . De plus, ces cellules pourraient être introduites dans le tissu adipeux mammaire (modèle orthotopique) d'une souris 'severe combined immunodeficient' (SCID) dans le but de regarder la formation et la progression de tumeurs mammaires en réponse à E2 et à SDF-1.

### **3 Implication de CXCR4/SDF-1 dans la résistance acquise au tamoxifène**

Nous avons démontré dans un contexte de gène rapporteur AP-1 coll-Luc que CXCR4/SDF-1 améliore l'activité agoniste du tamoxifène via ER $\beta$ . Lors d'une résistance acquise au tamoxifène, les cellules cancéreuses mammaires prolifèrent en réponse au tamoxifène. Il serait intéressant d'évaluer l'implication de l'axe CXCR4/SDF-1 dans le mécanisme de résistance acquise au tamoxifène à partir de cellules cancéreuses mammaires soumises à une exposition prolongée au tamoxifène ou d'une lignée cellulaire résistance au tamoxifène (TAM-R). La prolifération de ces cellules devrait être augmentée comparativement aux cellules parentales. De plus, les cellules TAM-R devraient proliférer en réponse au tamoxifène. La phosphorylation des kinases et de ER est augmentée dans les cellules résistantes au tamoxifène. Il serait intéressant de mesurer l'expression du gène *SDF-1* dans un contexte où le tamoxifène exerce un effet agoniste comparativement au niveau d'expression de SDF-1 dans des cellules parentales. Il faudrait évaluer si la déplétion de CXCR4 ou un anticorps dirigé contre CXCR4 ou SDF-1 atténue la prolifération des cellules résistantes au tamoxifène.

Par ailleurs, il serait intéressant de mesurer l'expression des gènes des cellules TAM-R versus les cellules parentales en réponse à SDF-1 et dans un contexte de déplétion de CXCR4. Également, l'implication de la Ser-87 de ER $\beta$  dans la résistance au tamoxifène pourrait être évaluée en dépliant l'expression endogène de ER $\beta$  et en introduisant le mutant ER $\beta$ S87A.

#### **4 CXCR7 peut-il influencer le couplage entre CXCR4 et ER?**

Nous avons démontré que l'activation de la voie ERK 1/2 par CXCR4/SDF-1 est responsable de l'activation de la transcription de ER $\beta$  en réponse à SDF-1. Étant donné que CXCR7 active la voie MAPK/ERK via  $\beta$ -arrestine et que ERK activé par  $\beta$ -arrestine demeure généralement dans le cytoplasme, il semblerait que la signalisation de CXCR7 serait moins efficace que CXCR4 pour cibler ER $\beta$ . Toutefois, il a été rapporté que la co-expression de CXCR7 avec CXCR4 module l'activité de CXCR4. CXCR7 est co-exprimé avec CXCR4 dans les cellules MCF-7, le modèle cellulaire que nous avons utilisé. Il serait intéressant de faire moduler le ratio CXCR4/CXCR7 dans les cellules MCF-7 en déplétant ou en surexprimant CXCR7. La mesure de l'activation de ERK 1/2, la phosphorylation de la serine 87 de ER $\beta$ , l'expression des gènes cibles dont SDF-1 et la prolifération des cellules en réponse à E2 et SDF-1 nous permettrait ainsi d'évaluer l'impact de CXCR7 sur la signalisation de CXCR4 et le couplage entre CXCR4 et ER.

#### **5 Analyse du profil des gènes cibles de ER modulé par CXCR4 en réponse à la signalisation de ErbB2/ErbB3.**

Nous avons observé que le facteur de croissance hétérogène régule différemment la transcription E2-dépendante du gène *CCND1* que celle des gènes ERE *GREB1*, *PR* et *SDF-1*. Toutefois, le nombre de gènes analysés ne nous permet pas de clairement valider un mécanisme différentiel. Dans un premier temps, il serait intéressant d'évaluer à plus grande échelle l'impact du traitement à l'hétérogène sur l'expression de gènes cibles de ER régulés de manière classique ou non-classique en réponse à E2. Il faudrait également évaluer l'impact de la modulation de l'expression de CXCR4 sur l'expression de gènes variés ayant diverses fonctions cellulaires dans le but de tenter d'identifier un profil de gènes en particulier régulé par CXCR4.



Comme le couplage ErbB2/ErbB3-CXCR4 pourrait s'appliquer dans un contexte ER indépendant et que l'héréguline régule l'expression de gènes, il serait intéressant d'évaluer l'impact de CXCR4 sur l'expression de gènes 'héréguline-dépendant'.

## **6 Tenter de comprendre comment CXCR4 régule la transcription de ER $\alpha$ et ER $\beta$ en réponse à la signalisation de ErbB2/ErbB3.**

Notre laboratoire a démontré que l'activité transcriptionnelle E2-dépendante de ER $\alpha$  et ER $\beta$  est réprimée par la signalisation de ErbB2/ErbB3. Mes travaux nous ont permis de démontrer que l'expression de CXCR4 et SDF-1 régule l'activation de la voie PI3-K/Akt en réponse à ErbB2/ErbB3 et cette régulation corrèle avec la modulation de l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et ER $\beta$ .

Le co-activateur CBP et l'ubiquitine ligase Mdm2 engendrent la dégradation et la répression de ER $\beta$  via l'activation de la voie PI3-K/Akt par ErbB2/ErbB3. Le traitement des cellules MCF-7 avec héréguline stimule fortement la dégradation de ER $\beta$ . L'inhibition de la dégradation de ER $\beta$  par la déplétion de Mdm2 dans les cellules MCF-7 permet de récupérer partiellement la liaison E2-dépendante de ER $\beta$  aux promoteurs de gènes cibles en réponse à héréguline. La dégradation de ER $\beta$  contribue à la répression de la réponse hormonale des MCF-7 en réponse à héréguline. Il serait pertinent d'évaluer si l'expression de CXCR4 affecte l'expression protéique de ER $\beta$  dans les cellules MCF-7 en réponse à héréguline. De plus, il serait intéressant d'évaluer si CXCR4 régule l'interaction entre ER $\beta$  et CBP et ER $\beta$  et Mdm2 soit en essai de co-immunoprécipitation ou par la méthode re-ChIP.

Toutefois, pour ce qui est de ER $\alpha$ , la kinase Akt ne réprime pas l'activité transcriptionnelle E2-dépendante de ER $\alpha$  et CBP et Mdm2 ne dégradent pas ER $\alpha$ . Le co-répresseur MTA1 réprime l'activité E2-dépendante de ER $\alpha$  et héréguline induit l'expression de MTA1. Il serait important d'évaluer si CXCR4 régule l'interaction entre ER $\alpha$  et MTA1 par essai de co-immunoprécipitation ou par re-ChIP. Il a été rapporté que héréguline augmente le

niveau d'expression de MTA1. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de la modulation de l'expression de CXCR4 sur les niveaux d'expression de MTA1.

L'expression de *CCND1* en réponse à E2, contrairement à celle des gènes 'ERE' que nous avons étudié, est augmentée par héréguine dans les cellules MCF-7 co-exprimant ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Nous avons précédemment démontré au laboratoire à partir de la lignée cancéreuse mammaire Hs578T exprimant stablement ER $\beta$ , une diminution de l'occupation E2-dépendante de ER $\beta$  au promoteur de *CCND1* en réponse à héréguine. Il serait pertinent d'évaluer le comportement de ER $\alpha$  et ER $\beta$  sur des éléments AP-1 en réponse à E2 et héréguine en comparaison avec l'occupation sur des éléments ERE de promoteurs de gènes cibles par la méthode de CHIP dans les cellules MCF-7.

Notre laboratoire a démontré que la stabilité protéique de ER $\beta$  est davantage compromise que celle de ER $\alpha$  dans des cellules cancéreuses mammaires en réponse à héréguine. Il serait pertinent d'évaluer l'effet de la modulation de CXCR4 sur l'expression protéique de ER $\alpha$  et ER $\beta$  en réponse à héréguine. De plus, la localisation cellulaire (cytoplasme/noyau/matrice) et la mobilité de ER nous donnent de bons indices sur l'état transcriptionnel. Ainsi, par fractionnement cellulaire et par la technique de FRAP, la localisation et la mobilité de ER $\alpha$  et ER $\beta$  en réponse à héréguine et à CXCR4 pourraient être déterminées.

Nous avons mesuré l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et ER $\beta$  séparément en essai luciférase dans les cellules HEK 293T. La régulation de la transcription des gènes a été analysée à partir d'une lignée co-exprimant ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Il est possible qu'un isoforme versus un autre soit plus sensible à la répression hormonale par héréguine et que héréguine influence différemment la réponse du dimère ER $\alpha$ /ER $\beta$ . Par ailleurs, il est possible que CXCR4 altère davantage la répression hormonale ER $\alpha$  ou ER $\beta$  ou le dimère ER $\alpha$ /ER $\beta$  en réponse à héréguine. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de la déplétion de ER $\alpha$  ou de ER $\beta$  sur la répression hormonale des gènes en réponse à héréguine et l'effet de la modulation de l'expression de CXCR4 dans ces conditions. L'occupation de ER $\alpha$ , ER $\beta$  et le dimère

ER $\alpha$ /ER $\beta$  sur la chromatine en réponse à E2 et E2+Hrg serait évaluer par les méthodes CHIP et re-CHIP. Il faudrait dans ce contexte évaluer l'impact de CXCR4 sur l'occupation de ER $\alpha$ , ER $\beta$  et du dimère ER $\alpha$ /ER $\beta$  sur la chromatine.

## **7 Étudier les mécanismes derrière la régulation de l'expression de ErbB2 et ErbB3 par CXCR4.**

Nos résultats avec le mutant N119K CXCR4 nous suggèrent que CXCR4 type-sauvage pourrait réguler la dégradation de ErbB2 de manière protéines G dépendante. Pour vérifier cela, il s'agirait d'évaluer l'impact de l'inhibition des différentes protéines G $\alpha$  et la surexpression des sous-unités G $\beta\gamma$  et de la portion C-terminale de GRK2 sur l'expression protéique de ErbB2.

Il a été démontré que certains membres de la famille des ErbBs sont ubiquitinés, ce qui mène à leur dégradation (voir section 26.3). Il serait utile de mesurer le niveau d'ubiquitination de ErbB2 en présence de CXCR4. La dégradation de ErbB2 par la voie lysosomale implique son internalisation. L'internalisation de ErbB2 pourrait être évalué en mesurant l'expression en surface de ErbB2 par FACS, ELISA ou par analyse de type Western blot à partir de fractions membranaires. Si CXCR4 est internalisé également, ces mêmes approches nous permettraient de le déterminer. La formation de vésicule endocytée pourrait être visualisée par microscopie électronique. De plus, si le complexe ErbB2-CXCR4 est internalisé, la co-localisation de ErbB2 et de CXCR4 aux niveaux des vésicules pourrait être évaluée par immunofluorescence.

L'inhibition de la chaperone Hsp90 ainsi que l'ubiquitine ligase CHIP induit la dégradation de ErbB2. Il serait intéressant d'évaluer si CXCR4 affecte l'interaction entre ErbB2 et Hsp90 et l'ubiquitine ligase CHIP par co-immunoprécipitation.

Finalement, nous avons démontré que CXCR4 régule l'expression protéique de ErbB2 et ErbB3 mais il serait intéressant d'évaluer si CXCR4 affecte la transcription des gènes *ErbB2* et *ErbB3* également.

## 8 Déterminer l'impact de la serine 339 de CXCR4

Les données dans la littérature sur la stabilité de CXCR4 par PKC et la serine 339 de CXCR4 suggèrent que l'héréguline favoriserait le recyclage et l'expression en surface du récepteur. Pour valider cette hypothèse, il faudrait mesurer l'expression en surface de CXCR4 en réponse à ErbB2/ErbB3/Hrg par FACS, ELISA ou par analyse de type Western blot de fractions membranaires.

Il faudrait également évaluer l'impact de la serine 339 sur le couplage ErbB2-CXCR4 en déterminant l'impact des mutations S339A et S339E de CXCR4 sur l'activation de la voie PI3-K /Akt et la répression hormonale des ERs en réponse à ErbB2/ErbB3/Hrg. De plus, nous avons observé une augmentation de l'interaction entre ErbB2/ErbB3 et CXCR4 en réponse à héréguline qui pourrait être attribuée à la phosphorylation de la serine 339. Il faudrait évaluer l'impact des mutations S339A et S339E sur le complexe ErbB2/ErbB3-CXCR4 en réponse à héréguline.

La kinase PIM1 ciblerait spécifiquement la Ser-339 de CXCR4 et son expression est régulée par la kinase PKC. La déplétion de PIM1 ou l'utilisation de l'inhibiteur de PIM1 permettrait d'évaluer si cette kinase est impliquée dans la phosphorylation de la Ser-339 de CXCR4 en réponse à héréguline.

Il a été démontré que la phosphorylation de CXCR4 par héréguline induit le recrutement de  $\beta$ -arrestine. L'implication de la serine 339 dans le recrutement de  $\beta$ -arrestine 2 en réponse à héréguline pourrait être vérifiée par l'utilisation des mutants S339A et S339E de CXCR4.

## **9 Régulation de la signalisation PI3-K/Akt -ErbB2/ErbB3 dépendante par CXCR4**

Nous avons démontré que l'altération de l'activation de la voie PI3-K/Akt par ErbB2/ErbB3 corrèle avec une altération de l'expression de ErbB2 et ErbB3 et de la phosphorylation de ErbB2. Il est possible que CXCR4 régule négativement la signalisation PI3-K/Akt médiée par ErbB2/ErbB3 par un ou d'autre(s) mécanisme(s).

Il a été rapporté que la phosphorylation de CXCR4 par héréguiline induit le recrutement de  $\beta$ -arrestine 2 (Sosa et al., 2010) et que  $\beta$ -arrestine 2 peut inhiber la sous-unité catalytique de PI3-K (Wang et al., 2007). La déplétion de  $\beta$ -arrestine2 permettrait d'évaluer si cette protéine est impliquée dans la diminution de l'activité de Akt. De plus, il serait intéressant d'évaluer si le mutant N119K est en mesure de recruter  $\beta$ -arrestine en réponse à héréguiline.

L'activité de la protéine G $\alpha$ i peut altérer l'activation de kinases. L'utilisation d'un inhibiteur de la protéine G $\alpha$ i (pertussis toxin) ou la surexpression de G $\beta\gamma$  et de la portion C-terminale de GRK2 dans le but d'altérer la signalisation G dépendante permettrait d'évaluer si l'activité G $\alpha$ i participe à l'altération de l'activation de Akt. Par ailleurs, s'il s'avère qu'il y a une implication protéine G dépendante, il serait intéressant d'évaluer si héréguiline induit la phosphorylation en tyrosine de G $\alpha$ i. De plus, la mesure de liaison de GTP marqué permettrait de déterminer si l'héréguiline engendre le couplage de CXCR4 aux protéines G.

Finalement, le mécanisme de récupération de l'activation de PI3-K/Akt avec SDF-1 pourrait être évalué en utilisant des inhibiteurs spécifiques de PI3-K $\alpha$  et PI3-K $\gamma$ . Par ailleurs, il faudrait évaluer la capacité de CXCR4 à recruter p85 en réponse à SDF-1.

Nous avons observé que SDF-1 affecte différemment le complexe formé de CXCR4 avec un homodimère ErbB2 ou un hétérodimère ErbB2/ErbB3. Il serait intéressant de faire appel à un groupe travaillant sur la cristallographie de complexe protéique dans le but d'apporter une compréhension au niveau des bases structurales du complexe.

## **10 Évaluer l'impact de CXCR4 sur la prolifération des cellules en réponse à la signalisation de ErbB2/ErbB3.**

Nous avons précédemment démontré au laboratoire que la prolifération E2-dépendante des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 est inhibée par héréguline, ce qui corrèle avec une diminution de l'activité transcriptionnelle des ERs et de l'expression des gènes. Comme la modulation de l'expression de CXCR4 régule la transcription de certains gènes en réponse à héréguline, CXCR4 pourrait affecter la prolifération E2-dépendante en réponse à héréguline. Par ailleurs, la voie de signalisation PI3-K/Akt régule la croissance cellulaire en favorisant la survie cellulaire et en inhibant l'apoptose. De plus, CXCR4 module la voie PI3-K/Akt en réponse à ErbB2/ErbB3. Finalement, CXCR4 régule l'expression de ErbB2. Une étude a démontré que l'inhibiteur du protéasome 20S bortezomib induit la dégradation de ErbB2, altère la phosphorylation de Akt et inhibe la croissance de cellules cancéreuses mammaires (Marx et al., 2007). Une autre étude rapporte que la surexpression de EBP1, une protéine associée à ErbB3, diminue l'expression de ErbB2, l'activation de Akt, l'expression de CCND1, cycline E, et c-myc et la croissance de cellules cancéreuses mammaires co-exprimant ErbB2 et ErbB3 (Lessor et al., 2000, Lu et al., 2011). Ces résultats suggèrent que CXCR4 pourrait réguler la prolifération des cellules cancéreuses mammaires en réponse à héréguline. Dans cet ordre d'idées, des essais de prolifération cellulaire effectués à partir des cellules cancéreuses mammaires surexprimant CXCR4 ou déplétées en CXCR4 permettraient facilement de répondre à cette question.

Il serait également intéressant d'évaluer l'impact de la modulation de l'expression de CXCR4 sur la tumorigénèse induite par héréguline. Des cellules cancéreuses mammaires surexprimant CXCR4 ou déplétées en CXCR4 versus des cellules parentales pourraient être introduites dans le tissu adipeux mammaire d'une souris SCID. L'administration d'estrogène seul ou en combinaison avec héréguline aux souris permettrait d'évaluer si la modulation de l'expression de CXCR4 influence la formation de tumeurs dans ces conditions. Par ailleurs, une souris transgénique Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)-Hrg pourrait servir de modèle de tumeurs mammaires induites par héréguline. La livraison d'un vecteur exprimant un plasmide codant pour CXCR4 ou d'un vecteur exprimant un shRNA dirigé contre CXCR4

au niveau des tumeurs permettrait d'évaluer l'impact de CXCR4 sur la progression des tumeurs.

## Conclusion

Les mécanismes responsables de l'initiation et de la progression du cancer du sein sont multiples et complexes. Nous avons identifié un nouveau mécanisme oncogénique exercé par l'axe CXCR4/SDF-1 et par les ERs, qui fait intervenir une boucle de régulation positive entre CXCR4 et ER et qui promouvoit la prolifération des cellules cancéreuses. La surexpression de ErbB2 et le facteur de croissance héréguline représentent également des facteurs pro-oncogéniques. Nous avons déterminé qu'en plus d'agir sur l'activité des ERs via leur signalisation respective, CXCR4 et ErbB2/ErbB3 s'influencent l'un et l'autre, augmentant ainsi le degré de complexité de la signalisation des récepteurs membranaires. L'étude de couplage entre récepteurs représente un domaine de recherche en pleine expansion qui nous permet d'élargir notre compréhension sur la complexité de la signalisation des cellules cancéreuses.



## Liste des références

- Abbaszade, I. G., J. Arensburg, C.-H. J. Park, J. Z. Kasa-Vubu, J. Orly and A. H. Payne (1997). Isolation of a New Mouse 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoform, 3 $\beta$ -HSD VI, Expressed During Early Pregnancy. *Endocrinology* *138*, 1392-1399.
- Abram, C. L. and S. A. Courtneidge (2000). Src Family Tyrosine Kinases and Growth Factor Signaling. *Exp Cell Res* *254*, 1-13.
- Acconcia, F., P. Ascenzi, A. Bocedi, E. Spisni, V. Tomasi, A. Trentalance, P. Visca and M. Marino (2005). Palmitoylation-dependent Estrogen Receptor  $\alpha$  Membrane Localization: Regulation by 17 $\beta$ -Estradiol. *Mol Biol Cell* *16*, 231-237.
- Acconcia, F., P. Ascenzi, G. Fabozzi, P. Visca and M. Marino (2004). S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- $\alpha$  functions. *Biochem Biophys Res Commun* *316*, 878-883.
- Acconcia, F., A. Bocedi, P. Ascenzi and M. Marino (2003). Does Palmitoylation Target Estrogen Receptors to Plasma Membrane Caveolae? *IUBMB Life* *55*, 33-35.
- Acconcia, F. and M. Marino (2003). Synergism between Genomic and Non Genomic Estrogen Action Mechanisms. *IUBMB Life* *55*, 145-150.
- Acconcia, F., P. Totta, S. Ogawa, I. Cardillo, S. Inoue, S. Leone, A. Trentalance, M. Muramatsu and M. Marino (2005). Survival versus apoptotic 17 $\beta$ -estradiol effect: Role of ER $\alpha$  and ER $\beta$  activated non-genomic signaling. *J Cell Physiol* *203*, 193-201.
- Acevedo, M. and W. Kraus (2004). Transcriptional activation by nuclear receptors. *Essays Biochem* *40*, 73-88.
- Adam, L., R. Vadlamudi, S. B. Kondapaka, J. Chernoff, J. Mendelsohn and R. Kumar (1998). Heregulin Regulates Cytoskeletal Reorganization and Cell Migration through the p21-activated Kinase-1 via Phosphatidylinositol-3 Kinase. *J Biol Chem* *273*, 28238-28246.
- Ai, L.-S. and F. Liao (2002). Mutating the Four Extracellular Cysteines in the Chemokine Receptor CCR6 Reveals Their Differing Roles in Receptor Trafficking, Ligand Binding, and Signaling†. *Biochemistry (Mosc)* *41*, 8332-8341.
- Aiuti, A., I. J. Webb, C. Bleul, T. Springer and J. C. Gutierrez-Ramos (1997). The Chemokine SDF-1 Is a Chemoattractant for Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells and Provides a New Mechanism to Explain the Mobilization of CD34+ Progenitors to Peripheral Blood. *The Journal of Experimental Medicine* *185*, 111-120.
- Akashi, T., K. Koizumi, O. Nagakawa, H. Fuse and I. Saiki (2006). Androgen receptor negatively influences the expression of chemokine receptors (CXCR4, CCR1) and ligand-mediated migration in prostate cancer DU-145. *Oncol Rep* *16*, 831-836.
- Akekawatchai, C., J. D. Holland, M. Kochetkova, J. C. Wallace and S. R. McColl (2005). Transactivation of CXCR4 by the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) in Human MDA-MB-231 Breast Cancer Epithelial Cells. *J Biol Chem* *280*, 39701-39708.
- Alarid, E. T., N. Bakopoulos and N. Solodin (1999). Proteasome-Mediated Proteolysis of Estrogen Receptor: A Novel Component in Autologous Down-Regulation. *Mol Endocrinol* *13*, 1522-1534.
- Albanese, C., J. Johnson, G. Watanabe, N. Eklund, D. Vu, A. Arnold and R. G. Pestell (1995). Transforming p21 Mutants and c-Ets-2 Activate the Cyclin D1 Promoter through Distinguishable Regions. *J Biol Chem* *270*, 23589-23597.
- Alderton, F., S. Rakhit, K. C. Kong, T. Palmer, B. Sambhi, S. Pyne and N. J. Pyne (2001). Tethering of the Platelet-derived Growth Factor  $\beta$  Receptor to G-protein-coupled Receptors: A NOVEL PLATFORM FOR INTEGRATIVE SIGNALING BY THESE RECEPTOR CLASSES IN MAMMALIAN CELLS. *J Biol Chem* *276*, 28578-28585.

- Ali, S. and R. C. Coombes (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2, 101-112.
- Ali, S., D. Metzger, J. Bornert and P. Chambon (1993). Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *EMBO J* 12, 1153-1160.
- Alimandi, M., A. Romano, M. Curia, R. Muraro, P. Fedi, S. Aaronson, P. Di Fiore and M. Kraus (1995). Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 10, 1813-1821.
- Allen, S. J., S. E. Crown and T. M. Handel (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.
- Allinen, M., R. Beroukhi, L. Cai, C. Brennan, J. Lahti-Domenici, H. Huang, D. Porter, M. Hu, L. Chin, A. Richardson, S. Schnitt, W. R. Sellers and K. Polyak (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6, 17-32.
- Altucci, L., R. Addeo, L. Cicatiello, S. Dauvois, M. Parker, M. Truss, M. Beato, V. Sica, i. F. Brescian and A. Weisz (1996). 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* 12, 2315-2324.
- Amara, A., S. L. Gall, O. Schwartz, J. Salamero, M. Montes, P. Loetscher, M. Baggiolini, J.-L. Virelizier and F. Arenzana-Seisdedos (1997). HIV Coreceptor Downregulation as Antiviral Principle: SDF-1 $\alpha$ -dependent Internalization of the Chemokine Receptor CXCR4 Contributes to Inhibition of HIV Replication. *The Journal of Experimental Medicine* 186, 139-146.
- Anastasi, S., L. Fiorentino, M. Fiorini, R. Fraioli, G. Sala, L. Castellani, S. Alema, M. Alimandi and O. Segatto (2003). Feedback inhibition by RALT controls signal output by the ErbB network. *Oncogene* 22, 4221-4234.
- Anderson, R. G. W. (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67, 199-225.
- Andersson, S. (1995). 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase: isozymes and mutations. *J Endocrinol* 146, 197-200.
- Andersson, S. (1995). Molecular genetics of androgenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55, 533-540.
- Andl, C. D. and A. K. Rustgi (2005). No one-way street: Cross-talk between E-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling—A mechanism to regulate RTK activity. *Cancer Biology & Therapy* 4, 35-38.
- Anglesio, M. S., J. M. Arnold, J. George, A. V. Tinker, R. Tothill, N. Waddell, L. Simms, B. Locandro, S. Fereday, N. Traficante, P. Russell, R. Sharma, M. J. Birrer, A. S. Group, A. deFazio, G. Chenevix-Trench and D. D. L. Bowtell (2008). Mutation of ERBB2 Provides a Novel Alternative Mechanism for the Ubiquitous Activation of RAS-MAPK in Ovarian Serous Low Malignant Potential Tumors. *Molecular Cancer Research* 6, 1678-1690.
- Antoniotti, S., D. Taverna, P. Maggiora, M. Sapei, N. Hynes and M. De Bortoli (1994). Oestrogen and epidermal growth factor down-regulate erbB-2 oncogene protein expression in breast cancer cells by different mechanisms. *Br J Cancer* 70, 1095-1101.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001). Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev* 81, 1269-1304.
- Arensburg, J., A. H. Payne and J. Orly (1999). Expression of Steroidogenic Genes in Maternal and Extraembryonic Cells During Early Pregnancy in Mice. *Endocrinology* 140, 5220-5232.
- Arnold, S. F., J. D. Obourn, H. Jaffe and A. C. Notides (1995). Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro. *Mol Endocrinol* 9, 24-33.
- Aronica, S. M. and B. S. Katzenellenbogen (1993). Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by

- estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol* 7, 743-752.
- Arpino, G., H. Weiss, A. V. Lee, R. Schiff, S. De Placido, C. K. Osborne and R. M. Elledge (2005). Estrogen Receptor–Positive, Progesterone Receptor–Negative Breast Cancer: Association With Growth Factor Receptor Expression and Tamoxifen Resistance. *J Natl Cancer Inst* 97, 1254-1261.
- Arribas, J., J. Baselga, K. Pedersen and J. L. Parra-Palau (2011). p95HER2 and Breast Cancer. *Cancer Res* 71, 1515-1519.
- Arvelo, F. and C. Cotte (2009). Hypoxia in cancer malignity. Review. *Invest Clin* 50, 529-546.
- Ascenzi, P., A. Bocedi and M. Marino (2006). Structure–function relationship of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ : Impact on human health. *Mol Aspects Med* 27, 299-402.
- Athar, M., J. H. Back, X. Tang, K. H. Kim, L. Kopelovich, D. R. Bickers and A. L. Kim (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 224, 274-283.
- Auboeuf, D., A. Hönig, S. M. Berget and B. W. O'Malley (2002). Coordinate Regulation of Transcription and Splicing by Steroid Receptor Coregulators. *Science* 298, 416-419.
- Auricchio, F., M. Di Domenico, A. Migliaccio, G. Castoria and A. Bilancio (1995). The role of estradiol receptor in the proliferative activity of vanadate on MCF-7 cells. *Cell Growth Differ* 6, 105-113.
- Auricchio, F., A. Migliaccio and G. Castoria (2008). Sex-steroid hormones and EGF signalling in breast and prostate cancer cells: Targeting the association of Src with steroid receptors. *Steroids* 73, 880-884.
- Austin, C. D., A. M. De Mazière, P. I. Pisacane, S. M. van Dijk, C. Eigenbrot, M. X. Sliwkowski, J. Klumperman and R. H. Scheller (2004). Endocytosis and Sorting of ErbB2 and the Site of Action of Cancer Therapeutics Trastuzumab and Geldanamycin. *Mol Biol Cell* 15, 5268-5282.
- Autelitano, D. J. (1998). Cardiac Expression of Genes Encoding Putative Adrenomedullin/Calcitonin Gene-Related Peptide Receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 250, 689-693.
- Azios, N. G., F. J. Romero, M. C. Denton, J. K. Doherty and G. M. Clinton (2001). Expression of herstatin, an autoinhibitor of HER-2/neu, inhibits transactivation of HER-3 by HER-2 and blocks EGF activation of the EGF receptor. *Oncogene* 20, 5199-5209.
- Bachelder, R. E., M. A. Wendt and A. M. Mercurio (2002). Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Breast Carcinoma Invasion in an Autocrine Manner by Regulating the Chemokine Receptor CXCR4. *Cancer Res* 62, 7203-7206.
- Badache, A. and A. Gonçalves (2006). The ErbB2 Signaling Network as a Target for Breast Cancer Therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11, 13-25.
- Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250, 91-104.
- Bajetto, A., S. Barbero, R. Bonavia, P. Piccioli, P. Pirani, T. Florio and G. Schettini (2001). Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J Neurochem* 77, 1226-1236.
- Balabanian, K., B. Lagane, S. Infantino, K. Chow, J. Harriague, B. Moepps, F. Arenzana-Seisdedos, M. Thelen and F. Bachelierie (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 35760 - 35766.
- Balabanian, K., B. Lagane, S. Infantino, K. Y. C. Chow, J. Harriague, B. Moepps, F. Arenzana-Seisdedos, M. Thelen and F. Bachelierie (2005). The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 280, 35760-35766.
- Balasenthil, S., C. J. Barnes, S. K. Rayala and R. Kumar (2004). Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Lett* 567, 243-247.
- Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4, 540-550.

- Bang, Y.-J., E. Van Cutsem, A. Feyereislova, H. C. Chung, L. Shen, A. Sawaki, F. Lordick, A. Ohtsu, Y. Omuro, T. Satoh, G. Aprile, E. Kulikov, J. Hill, M. Lehle, J. Rüschoff and Y.-K. Kang (2010). Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet* *376*, 687-697.
- Bannister, A. and E. Miska (2000). Regulation of gene expression by transcription factor acetylation. *Cell Mol Life Sci* *57*, 1184-1192.
- Bargmann, C. I., M.-C. Hung and R. A. Weinberg (1986). Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* *45*, 649-657.
- Bargmann, C. I., M.-C. Hung and R. A. Weinberg (1986). The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* *319*, 226-230.
- Barone, I., D. Iacopetta, K. R. Covington, Y. Cui, A. Tsimelzon, A. Beyer, S. Ando and S. A. W. Fuqua (2010). Phosphorylation of the mutant K303R estrogen receptor [alpha] at serine 305 affects aromatase inhibitor sensitivity. *Oncogene* *29*, 2404-2414.
- Barretina, J., G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A. A. Margolin, S. Kim, C. J. Wilson, J. Lehar, G. V. Kryukov, D. Sonkin, A. Reddy, M. Liu, L. Murray, M. F. Berger, J. E. Monahan, P. Morais, J. Meltzer, A. Korejwa, J. Jane-Valbuena, F. A. Mapa, J. Thibault, E. Bric-Furlong, P. Raman, A. Shipway, I. H. Engels, J. Cheng, G. K. Yu, J. Yu, P. Aspesi, M. de Silva, K. Jagtap, M. D. Jones, L. Wang, C. Hatton, E. Palesscandolo, S. Gupta, S. Mahan, C. Sougnez, R. C. Onofrio, T. Liefeld, L. MacConaill, W. Winckler, M. Reich, N. Li, J. P. Mesirov, S. B. Gabriel, G. Getz, K. Ardlie, V. Chan, V. E. Myer, B. L. Weber, J. Porter, M. Warmuth, P. Finan, J. L. Harris, M. Meyerson, T. R. Golub, M. P. Morrissey, W. R. Sellers, R. Schlegel and L. A. Garraway (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* *483*, 603-307.
- Bartolomé, R. A., B. G. Gálvez, N. Longo, F. Baleux, G. N. P. van Muijen, P. Sánchez-Mateos, A. G. Arroyo and J. Teixidó (2004). Stromal Cell-Derived Factor-1 $\alpha$  Promotes Melanoma Cell Invasion across Basement Membranes Involving Stimulation of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase and Rho GTPase Activities. *Cancer Res* *64*, 2534-2543.
- Baselga, J., D. Tripathy, J. Mendelsohn, S. Baughman, C. C. Benz, L. Dantis, N. T. Sklarin, A. D. Seidman, C. A. Hudis, J. Moore, P. P. Rosen, T. Twaddell, I. C. Henderson and L. Norton (1996). Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* *14*, 737-744.
- Basso, A. D., D. B. Solit, P. N. Munster and N. Rosen (2002). Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* *21*, 1159-1166.
- Bastian, P., K. Lang, B. Niggemann, K. S. Zaenker and F. Entschladen (2005). Myosin regulation in the migration of tumor cells and leukocytes within a three-dimensional collagen matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* *62*, 65-76.
- Batistuzzo de Medeiros, S. R., G. Krey, A. K. Hihi and W. Wahli (1997). Functional Interactions between the Estrogen Receptor and the Transcription Activator Sp1 Regulate the Estrogen-dependent Transcriptional Activity of the Vitellogenin A1  $\alpha$ Promoter. *J Biol Chem* *272*, 18250-18260.
- Baulieu, E. E. (1998). NEUROSTEROIDS: A NOVEL FUNCTION OF THE BRAIN. *Psychoneuroendocrinology* *23*, 963-987.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* *56*, 335-344.
- Beerli, R. R., D. Graus-Porta, K. Woods-Cook, X. Chen, Y. Yarden and N. E. Hynes (1995). Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol* *15*, 6496-6505.

- Beg, A. and D. Baltimore (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-784.
- Ben-Baruch, A. (2006). The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 25, 357-371.
- Benitah, S. A., P. F. Valerón, L. van Aelst, C. J. Marshall and J. C. Lacal (2004). Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1705, 121-132.
- Benlimame, N., Q. He, S. Jie, D. Xiao, Y. J. Xu, M. Loignon, D. D. Schlaepfer and M. A. Alaoui-Jamali (2005). FAK signaling is critical for ErbB-2/ErbB-3 receptor cooperation for oncogenic transformation and invasion. *The Journal of Cell Biology* 171, 505-516.
- Benovic, J. M. B. a. J. L. (2007). Regulation of CXCR4 Signaling. *Biochimica et biophysica acta (BBA)* 1768, 952-963.
- Benz, C., G. Scott, J. Sarup, R. Johnson, D. Tripathy, E. Coronado, H. Shepard and C. Osborne (1992). Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 24, 85-95.
- Berchiche, Y. A., K. Y. Chow, B. Lagane, M. Leduc, Y. Percherancier, N. Fujii, H. Tamamura, F. Bachelierie and N. Heveker (2007). Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation. *J Biol Chem* 282, 5111-5115.
- Berger, E. A., P. M. Murphy and J. M. Farber (1999). CHEMOKINE RECEPTORS AS HIV-1 CORECEPTORS: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annu Rev Immunol* 17, 657-700.
- Berger, M. B., J. M. Mendrola and M. A. Lemmon (2004). ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett* 569, 332-336.
- Berry, N. B., M. Fan and K. P. Nephew (2008). Estrogen Receptor- $\alpha$  Hinge-Region Lysines 302 and 303 Regulate Receptor Degradation by the Proteasome. *Mol Endocrinol* 22, 1535-1551.
- Berson, J. F., D. Long, B. J. Doranz, J. Rucker, F. R. Jirik and R. W. Doms (1996). A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 70, 6288-6295.
- Bertolini, F., C. Dell'Agnola, P. Mancuso, C. Rabascio, A. Burlini, S. Monestiroli, A. Gobbi, G. Pruneri and G. Martinelli (2002). CXCR4 Neutralization, a Novel Therapeutic Approach for Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Res* 62, 3106-3112.
- Bhandari, D., J. Trejo, J. L. Benovic and A. Marchese (2007). Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 282, 36971-36979.
- Bhat-Nakshatri, P., G. Wang, H. Appaiah, N. Luktuke, J. S. Carroll, T. R. Geistlinger, M. Brown, S. Badve, Y. Liu and H. Nakshatri (2008). AKT Alters Genome-Wide Estrogen Receptor  $\alpha$  Binding and Impacts Estrogen Signaling in Breast Cancer. *Mol Cell Biol* 28, 7487-7503.
- Biscardi, J., D. Tice and S. Parsons (1999). c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv Cancer Res* 76, 61-119.
- Bjornstrom, L. and M. Sjoberg (2004). Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nuclear Receptor* 2, 3.
- Björnström, L. and M. Sjöberg (2002). Signal Transducers and Activators of Transcription as Downstream Targets of Nongenomic Estrogen Receptor Actions. *Mol Endocrinol* 16, 2202-2214.
- Blagoev, B., S.-E. Ong, I. Kratchmarova and M. Mann (2004). Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nat Biotech* 22, 1139-1145.
- Blanco-Aparicio, C., M. A. Molina, E. Fernández-Salas, M. L. Frazier, J. M. Mas, E. Querol, F. X. Avilés and R. de Llorens (1998). Potato Carboxypeptidase Inhibitor, a T-knot Protein, Is an

- Epidermal Growth Factor Antagonist That Inhibits Tumor Cell Growth. *J Biol Chem* 273, 12370-12377.
- Blanpain, C., R. Buser, C. A. Power, M. Edgerton, C. Buchanan, M. Mack, G. Simmons, P. R. Clapham, M. Parmentier and A. E. I. Proudfoot (2001). A chimeric MIP-1 $\alpha$ /RANTES protein demonstrates the use of different regions of the RANTES protein to bind and activate its receptors. *J Leukoc Biol* 69, 977-985.
- Blanpain, C., B. J. Doranz, A. Bondue, C. Govaerts, A. De Leener, G. Vassart, R. W. Doms, A. Proudfoot and M. Parmentier (2003). The Core Domain of Chemokines Binds CCR5 Extracellular Domains while Their Amino Terminus Interacts with the Transmembrane Helix Bundle. *J Biol Chem* 278, 5179-5187.
- Blanpain, C., B. Lee, J. Vakili, B. J. Doranz, C. Govaerts, I. Migeotte, M. Sharron, V. Dupriez, G. Vassart, R. W. Doms and M. Parmentier (1999). Extracellular Cysteines of CCR5 Are Required for Chemokine Binding, but Dispensable for HIV-1 Coreceptor Activity. *J Biol Chem* 274, 18902-18908.
- Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski and T. A. Springer (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.
- Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer and C. R. Mackay (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 1925-1930.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365.
- Bocchinfuso, W. and K. Korach (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2, 323-334.
- Bodey, B., B. J. Bodey, A. Gröger, J. Luck, S. Siegel, C. Taylor and H. Kaiser (1997). Clinical and prognostic significance of the expression of the c-erbB-2 and c-erbB-3 oncoproteins in primary and metastatic malignant melanomas and breast carcinomas. *Anticancer Res* 17, 1319-1330.
- Boldajipour, B., H. Mahabaleshwar, E. Kardash, M. Reichman-Fried, H. Blaser, S. Minina, D. Wilson, Q. Xu and E. Raz (2008). Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration. *Cell* 132, 463-473.
- Bondue, A., S.-c. Jao, C. Blanpain, M. Parmentier and P. J. LiWang (2002). Characterization of the Role of the N-Loop of MIP-1 $\beta$  in CCR5 Binding†. *Biochemistry (Mosc)* 41, 13548-13555.
- Bonner, J., P. Harari, J. Giralt, N. Azarnia, D. Shin, R. Cohen, C. Jones, R. Sur, D. Raben, J. Jassem, R. Ove, M. Kies, J. Baselga, H. Youssoufian, N. Amellal, E. Rowinsky and K. Ang (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354, 567-578.
- Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu and M. E. Greenberg (1999). Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and -Independent Mechanisms. *Science* 286, 1358-1362.
- Bosco, M. C., M. Puppo, C. Santangelo, L. Anfosso, U. Pfeffer, P. Fardin, F. Battaglia and L. Varesio (2006). Hypoxia Modifies the Transcriptome of Primary Human Monocytes: Modulation of Novel Immune-Related Genes and Identification Of CC-Chemokine Ligand 20 as a New Hypoxia-Inducible Gene. *The Journal of Immunology* 177, 1941-1955.
- Bostner, J., L. Skoog, T. Fornander, B. Nordenskjöld and O. Stål (2010). Estrogen Receptor- $\alpha$  Phosphorylation at Serine 305, Nuclear p21-Activated Kinase 1 Expression, and Response to Tamoxifen in Postmenopausal Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 16, 1624-1633.
- Boudot, A., G. Kerdivel, D. Habauzit, J. Eeckhoutte, F. Le Dily, G. Flouriot, M. Samson and F. Pakdel (2011). Differential Estrogen-Regulation of CXCL12 Chemokine Receptors, CXCR4 and CXCR7, Contributes to the Growth Effect of Estrogens in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 6, e20898.

- Boulay, A., M. Breuleux, C. Stephan, C. Fux, C. Brisken, M. Fiche, M. Wartmann, M. Stumm, H. A. Lane and N. E. Hynes (2008). The Ret receptor tyrosine kinase pathway functionally interacts with the ER $\alpha$  pathway in breast cancer. *Cancer Res* 68, 3743-3751.
- Bourdeau, V., J. Deschênes, R. Métivier, Y. Nagai, D. Nguyen, N. Bretschneider, F. Gannon, J. H. White and S. Mader (2004). Genome-Wide Identification of High-Affinity Estrogen Response Elements in Human and Mouse. *Mol Endocrinol* 18, 1411-1427.
- Bourguignon, L. Y. W., H. Zhu, A. Chu, N. Iida, L. Zhang and M.-C. Hung (1997). Interaction between the Adhesion Receptor, CD44, and the Oncogene Product, p185 HER2, Promotes Human Ovarian Tumor Cell Activation. *J Biol Chem* 272, 27913-27918.
- Bramlett, K. S. and T. P. Burris (2002). Effects of selective estrogen receptor modulators (SERMs) on coactivator nuclear receptor (NR) box binding to estrogen receptors. *Mol Genet Metab* 76, 225-233.
- Bramlett, K. S., Y. Wu and T. P. Burris (2001). Ligands Specify Coactivator Nuclear Receptor (NR) Box Affinity for Estrogen Receptor Subtypes. *Mol Endocrinol* 15, 909-922.
- Braut, L., A. Rovo, S. Decker, C. Dierks, A. Tzankov and J. Schwaller (2013). CXCR4-Serine339 regulates cellular adhesion, retention and mobilization, and is a marker for poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*.
- Brelot, A., N. Heveker, M. Montes and M. Alizon (2000). Identification of Residues of CXCR4 Critical for Human Immunodeficiency Virus Coreceptor and Chemokine Receptor Activities. *J Biol Chem* 275, 23736-23744.
- Britsch, S., L. Li, S. Kirchhoff, F. Theuring, V. Brinkmann, C. Birchmeier and D. Riethmacher (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* 12, 1825-1836.
- Brock, B. J. and M. R. Waterman (1999). Biochemical Differences between Rat and Human Cytochrome P450c17 Support the Different Steroidogenic Needs of These Two Species†. *Biochemistry (Mosc)* 38, 1598-1606.
- Brodie, A. and S. Inkster (1993). Aromatase in the human testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44, 546-555.
- Brodie, A., G. Sabnis and L. Macedo (2007). Xenograft models for aromatase inhibitor studies. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 106, 119-124.
- Brzozowski, A. M., A. C. W. Pike, Z. Dauter, R. E. Hubbard, T. Bonn, O. Engstrom, L. Ohman, G. L. Greene, J.-A. Gustafsson and M. Carlquist (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.
- Buck, M., V. Poli, P. van der Geer, M. Chojkier and T. Hunter (1999). Phosphorylation of Rat Serine 105 or Mouse Threonine 217 in C/EBP $\beta$  Is Required for Hepatocyte Proliferation Induced by TGF $\alpha$ . *Mol Cell* 4, 1087-1092.
- Bug, G., T. Rossmanith, R. Henschler, L. A. Kunz-Schughart, B. Schröder, M. Kampfmann, M. Kreutz, D. Hoelzer and O. G. Ottmann (2002). Rho family small GTPases control migration of hematopoietic progenitor cells into multicellular spheroids of bone marrow stroma cells. *J Leukoc Biol* 72, 837-845.
- Bunone, G., P. A. Briand, R. J. Miksicek and D. Picard (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15, 2174-2183.
- Burakov, D., L. A. Crofts, C.-P. B. Chang and L. P. Freedman (2002). Reciprocal Recruitment of DRIP/Mediator and p160 Coactivator Complexes in Vivo by Estrogen Receptor. *J Biol Chem* 277, 14359-14362.
- Burger, J., A. Spoo, A. Dwenger, M. Burger and D. Behringer (2003). CXCR4 chemokine receptors (CD184) and  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrins mediate spontaneous migration of human CD34+ progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoemperipolesis). *Br J Haematol* 122, 579-589.

- Burger, J. A., N. Tsukada, M. Burger, N. J. Zvaifler, M. Dell'Aquila and T. J. Kipps (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 96, 2655-2663.
- Burns, J. M., B. C. Summers, Y. Wang, A. Melikian, R. Berahovich, Z. Miao, M. E. T. Penfold, M. J. Sunshine, D. R. Littman, C. J. Kuo, K. Wei, B. E. McMaster, K. Wright, M. C. Howard and T. J. Schall (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 2201-2213.
- Burny, A. and G. Marbaix (1965). Isolation of messenger RNA from rabbit reticulocytes. *Biochem Biophys Acta* 103, 409-417.
- Busillo, J. M., S. Armando, R. Sengupta, O. Meucci, M. Bouvier and J. L. Benovic (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem* 285, 7805-7817.
- Busillo, J. M. and J. L. Benovic (2007). Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768, 952-963.
- Butenandt, A. and P. Karlson (1954). Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form. *Z Naturforsch* 9, 389-391.
- Buttitta, F., F. Barassi, G. Fresu, L. Felicioni, A. Chella, D. Paolizzi, G. Lattanzio, S. Salvatore, P. P. Campese, S. Rosini, T. Iarussi, F. Mucilli, R. Sacco, A. Mezzetti and A. Marchetti (2006). Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: Mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Int J Cancer* 119, 2586-2591.
- Cabioglu, N., J. Summy, C. Miller, N. U. Parikh, A. a. Sahin, S. Tuzlali, K. Pumiglia, G. E. Gallick and J. E. Price (2005). CXCL-12/stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation. *Cancer Res* 65, 6493-6497.
- Cabioglu, N., J. Summy, C. Miller, N. U. Parikh, A. A. Sahin, S. Tuzlali, K. Pumiglia, G. E. Gallick and J. E. Price (2005). CXCL-12/Stromal Cell-Derived Factor-1 $\alpha$  Transactivates HER2-neu in Breast Cancer Cells by a Novel Pathway Involving Src Kinase Activation. *Cancer Res* 65, 6493-6497.
- Campbell, J. J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M. A. Siani, D. A. Thompson and E. C. Butcher (1998). Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions. *Science* 279, 381-384.
- Campbell, R. A., P. Bhat-Nakshatri, N. M. Patel, D. Constantinidou, S. Ali and H. Nakshatri (2001). Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated Activation of Estrogen Receptor  $\alpha$ : A NEW MODEL FOR ANTI-ESTROGEN RESISTANCE. *J Biol Chem* 276, 9817-9824.
- Cantley, L. C. and B. G. Neel (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 4240-4245.
- Cardones, A. R., T. Murakami and S. T. Hwang (2003). CXCR4 Enhances Adhesion of B16 Tumor Cells to Endothelial Cells in Vitro and in Vivo via  $\beta$ 1 Integrin. *Cancer Res* 63, 6751-6757.
- Carlomagno, C., F. Perrone, C. Gallo, M. De Laurentiis, R. Lauria, A. Morabito, G. Pettinato, L. Panico, A. D'Antonio, A. R. Bianco and S. De Placido (1996). c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 14, 2702-2708.
- Carmeci, C., D. A. Thompson, H. Z. Ring, U. Francke and R. J. Weigel (1997). Identification of a Gene (GPR30) with Homology to the G-Protein-Coupled Receptor Superfamily Associated with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. *Genomics* 45, 607-617.
- Carpenter, G. and S. Cohen (1976). 125I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 71, 159-171.



- Carraway, K. L., M. X. Sliwkowski, R. Akita, J. V. Platko, P. M. Guy, A. Nuijens, A. J. Diamonti, R. L. Vandlen, L. C. Cantley and R. A. Cerione (1994). The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem* *269*, 14303-14306.
- Carreau, S., S. Bourguiba, S. Lambard, I. Galeraud-Denis, C. Genissel and J. Levallet (2002). Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol* *193*, 137-143.
- Carroll, J. S. and M. Brown (2006). Estrogen Receptor Target Gene: An Evolving Concept. *Mol Endocrinol* *20*, 1707-1714.
- Carroll, J. S., X. S. Liu, A. S. Brodsky, W. Li, C. A. Meyer, A. J. Szary, J. Eeckhoutte, W. Shao, E. V. Hestermann, T. R. Geistlinger, E. A. Fox, P. A. Silver and M. Brown (2005). Chromosome-Wide Mapping of Estrogen Receptor Binding Reveals Long-Range Regulation Requiring the Forkhead Protein FoxA1. *Cell* *122*, 33-43.
- Carroll, J. S., C. A. Meyer, J. Song, W. Li, T. R. Geistlinger, J. Eeckhoutte, A. S. Brodsky, E. K. Keeton, K. C. Fertuck, G. F. Hall, Q. Wang, S. Bekiranov, V. Sementchenko, E. A. Fox, P. A. Silver, T. R. Gingeras, X. S. Liu and M. Brown (2006). Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* *38*, 1289-1297.
- Casalini, P., M. V. Iorio, E. Galmozzi and S. Ménard (2004). Role of HER receptors family in development and differentiation. *J Cell Physiol* *200*, 343-350.
- Castagnetta, L., O. M. Granata, L. Cocciadiferro, A. Saetta, L. Polito, G. Bronte, S. Rizzo, I. Campisi, B. Agostara and G. Carruba (2004). Sex Steroids, Carcinogenesis, and Cancer Progression. *Ann N Y Acad Sci* *1028*, 233-246.
- Castles, C. G., S. Oesterreich, R. Hansen and S. A. W. Fuqua (1997). Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* *62*, 155-163.
- Castoria, G., A. Migliaccio, A. Bilancio, M. Di Domenico, A. de Falco, M. Lombardi, R. Fiorentino, L. Varricchio, M. V. Barone and F. Auricchio (2001). PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* *20*, 6050-6059.
- Castro-Rivera, E., I. Samudio and S. Safe (2001). Estrogen Regulation of Cyclin D1 Gene Expression in ZR-75 Breast Cancer Cells Involves Multiple Enhancer Elements. *J Biol Chem* *276*, 30853-30861.
- Catoe, H. W. and Z. Nawaz (2011). E6-AP facilitates efficient transcription at estrogen responsive promoters through recruitment of chromatin modifiers. *Steroids* *76*, 897-902.
- Cavaillès, V., S. Dauvois, F. L'Horset, G. Lopez, S. Hoare, P. Kushner and M. Parker (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J* *14*, 3741-3751.
- Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan, O. M. Tepper, N. Bastidas, M. E. Kleinman, J. M. Capla, R. D. Galiano, J. P. Levine and G. C. Gurtner (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* *10*, 858-864.
- Cestac, P., G. Sarrabayrouse, C. Medale-Giamarchi, P. Rochaix, P. Balaguer, G. Favre, J.-C. Faye and S. Doisneau-Sixou (2005). Prenylation inhibitors stimulate both estrogen receptor alpha transcriptional activity through AF-1 and AF-2 and estrogen receptor beta transcriptional activity. *Breast Cancer Res* *7*, R60 - R70.
- Chabot, D. J., H. Chen, D. S. Dimitrov and C. C. Broder (2000). N-Linked Glycosylation of CXCR4 Masks Coreceptor Function for CCR5-Dependent Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates. *J Virol* *74*, 4404-4413.
- Chambliss, K. L. and P. W. Shaul (2002). Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. *Steroids* *67*, 413-419.
- Chambliss, K. L., L. Simon, I. S. Yuhanna, C. Mineo and P. W. Shaul (2005). Dissecting the Basis of Nongenomic Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Estradiol: Role of ER $\alpha$  Domains with Known Nuclear Functions. *Mol Endocrinol* *19*, 277-289.

- Chandler, V. L., B. A. Maler and K. R. Yamamoto (1983). DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo. *Cell* 33, 489-499.
- Chang, E. C., T. H. Charn, S.-H. Park, W. G. Helferich, B. Komm, J. A. Katzenellenbogen and B. S. Katzenellenbogen (2008). Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  as Determinants of Gene Expression: Influence of Ligand, Dose, and Chromatin Binding. *Mol Endocrinol* 22, 1032-1043.
- Chang, H., D. n. Riese, W. Gilbert, D. Stern and U. McMahan (1997). Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387, 509-512.
- Charn, T. H., E. T.-B. Liu, E. C. Chang, Y. K. Lee, J. A. Katzenellenbogen and B. S. Katzenellenbogen (2010). Genome-Wide Dynamics of Chromatin Binding of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ : Mutual Restriction and Competitive Site Selection. *Mol Endocrinol* 24, 47-59.
- Charo, I. and M. Taubman (2004). Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 95, 858-866.
- Chen, D., S.-M. Huang and M. R. Stallcup (2000). Synergistic, p160 Coactivator-dependent Enhancement of Estrogen Receptor Function by CARM1 and p300. *J Biol Chem* 275, 40810-40816.
- Chen, D., H. Ma, H. Hong, S. S. Koh, S.-M. Huang, B. T. Schurter, D. W. Aswad and M. R. Stallcup (1999). Regulation of Transcription by a Protein Methyltransferase. *Science* 284, 2174-2177.
- Chen, D., P. E. Pace, R. C. Coombes and S. Ali (1999). Phosphorylation of Human Estrogen Receptor  $\alpha$  by Protein Kinase A Regulates Dimerization. *Mol Cell Biol* 19, 1002-1015.
- Chen, D., E. Washbrook, SarwarNaveed, G. J. Bates, P. E. Pace, V. Thirunuvakkarasu, J. Taylor, R. J. Epstein, F. V. Fuller-Pace, Egly. Jean-Marc, R. C. Coombes and S. Ali (2002). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene* 21, 4921-4931.
- Chen, J., X. Bai, A. Yang, Y. Cong and S. Chen (1997). Inactivation of HIV-1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy. *Nat Med* 3, 1110-1116.
- Chen, J. D. and R. M. Evans (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.
- Cheng, J., C. Zhang and D. J. Shapiro (2007). A functional serine 118 phosphorylation site in estrogen receptor-alpha is required for down-regulation of gene expression by 17beta-estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *Endocrinology* 148, 4634-4641.
- Cheng, J., C. Zhang and D. J. Shapiro (2007). A Functional Serine 118 Phosphorylation Site in Estrogen Receptor- $\alpha$  Is Required for Down-Regulation of Gene Expression by 17 $\beta$ -Estradiol and 4-Hydroxytamoxifen. *Endocrinology* 148, 4634-4641.
- Cheng, X. and G. W. Hart (2001). Alternative O-Glycosylation/O-Phosphorylation of Serine-16 in Murine Estrogen Receptor  $\beta$ : Post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem* 276, 10570-10575.
- Cheng, Z.-J., J. Zhao, Y. Sun, W. Hu, Y.-L. Wu, B. Cen, G.-X. Wu and G. Pei (2000).  $\beta$ -Arrestin Differentially Regulates the Chemokine Receptor CXCR4-mediated Signaling and Receptor Internalization, and This Implicates Multiple Interaction Sites between  $\beta$ -Arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* 275, 2479-2485.
- Chinni, S. R., H. Yamamoto, Z. Dong, A. Sabbota, R. D. Bonfil and M. L. Cher CXCL12/CXCR4 transactivates HER2 in lipid rafts of prostate cancer cells and promotes growth of metastatic deposits in bone. *Mol. Cancer Res.* 6: 446-457.
- Chinni, S. R., H. Yamamoto, Z. Dong, A. Sabbota, R. D. Bonfil and M. L. Cher (2008). CXCL12/CXCR4 Transactivates HER2 in Lipid Rafts of Prostate Cancer Cells and Promotes Growth of Metastatic Deposits in Bone. *Molecular Cancer Research* 6, 446-457.
- Cho, H.-S., K. Mason, K. X. Ramyar, A. M. Stanley, S. B. Gabelli, D. W. Denney and D. J. Leahy (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421, 756-760.

- Christopherson, K. W., G. Hangoc and H. E. Broxmeyer (2002). Cell Surface Peptidase CD26/Dipeptidylpeptidase IV Regulates CXCL12/Stromal Cell-Derived Factor-1 $\alpha$ -Mediated Chemotaxis of Human Cord Blood CD34+ Progenitor Cells. *The Journal of Immunology* *169*, 7000-7008.
- Chung, Y.-L., M.-L. Sheu, S.-C. Yang, C.-H. Lin and S.-H. Yen (2002). Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between Her2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer. *Int J Cancer* *97*, 306-312.
- Cirillo, L. A., F. R. Lin, I. Cuesta, D. Friedman, M. Jarnik and K. S. Zaret (2002). Opening of Compacted Chromatin by Early Developmental Transcription Factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* *9*, 279-289.
- Cirillo, L. A., C. E. McPherson, P. Bossard, K. Stevens, S. Cherian, E. Y. Shim, K. L. Clark, S. K. Burley and K. S. Zaret (1998). Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J* *17*, 244-254.
- Citri, A., J. Gan, Y. Mosesson, G. Vereb, J. Szollosi and Y. Yarden (2004). Hsp90 restrains ErbB-2/HER2 signalling by limiting heterodimer formation. *EMBO Rep* *5*, 1165-1170.
- Clapham, P. R. (1997). HIV and chemokines: ligands sharing cell-surface receptors. *Trends Cell Biol* *7*, 264-268.
- Clark-Lewis, I., I. Mattioli, J.-H. Gong and P. Loetscher (2003). Structure-Function Relationship between the Human Chemokine Receptor CXCR3 and Its Ligands. *J Biol Chem* *278*, 289-295.
- Clarke, R., M. C. Liu, K. B. Bouker, Z. Gu, R. Y. Lee, Y. Zhu, T. C. Skaar, B. Gomez, K. O'Brien, Y. Wang and L. A. Hilakivi-Clarke (2003). Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* *22*, 7316-7339.
- Clever, U. and P. Karlson (1960). Induction of puff changes in the salivary gland chromosomes of *Chironomus tentans* by ecdysone. *Exp Cell Res* *20*, 623-626.
- Cohen, L., S. Amin, P. Marks, R. Rifkind, D. Desai and V. Richon (1999). Chemoprevention of carcinogen-induced mammary tumorigenesis by the hybrid polar cytodifferentiation agent, suberanilohydroxamic acid (SAHA). *Anticancer Res* *19*, 4999-5005.
- Cohen, S., R. A. Fava and S. T. Sawyer (1982). Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *79*, 6237-6241.
- Cohen, S. and R. Levi-Montalcini (1957). Purification and properties of a nerve growth-promoting factor isolated from mouse sarcoma 180. *Cancer Res* *17*, 15-20.
- Coleman, K. and C. Smith (2001). Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci* *6*, D1379-D1391.
- Coleman, K. M., M. Dutertre, A. El-Gharbawy, B. G. Rowan, N. L. Weigel and C. L. Smith (2003). Mechanistic Differences in the Activation of Estrogen Receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ )- and ER $\beta$ -dependent Gene Expression by cAMP Signaling Pathway(s). *J Biol Chem* *278*, 12834-12845.
- Colley, S. M., K. R. Iyer and P. J. Leedman (2008). The RNA coregulator SRA, its binding proteins and nuclear receptor signaling activity. *IUBMB Life* *60*, 159-164.
- Compagnone, N. A., A. Bulfone, J. L. Rubenstein and S. H. Mellon (1995). Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* *136*, 2689-2696.
- Conley, A. J., M. A. Kaminski, S. A. Dubowsky, A. Jablonka-Shariff, D. A. Redmer and L. P. Reynolds (1995). Immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and P450 17 alpha-hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep, and cows. *Biol Reprod* *52*, 1081-1094.
- Cormier, E. M., M. F. Wolf and V. C. Jordan (1989). Decrease in Estradiol-stimulated Progesterone Receptor Production in MCF-7 Cells by Epidermal Growth Factor and Possible Clinical Implication for Paracrine-regulated Breast Cancer Growth. *Cancer Res* *49*, 576-580.

- Costello, C. M., K. Howell, E. Cahill, J. McBryan, M. Konigshoff, O. Eickelberg, S. Gaine, F. Martin and P. McLoughlin (2008). Lung-selective gene responses to alveolar hypoxia: potential role for the bone morphogenetic antagonist gremlin in pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 295, L272-L284.
- Couet, J., M. Sargiacomo and M. P. Lisanti (1997). Interaction of a Receptor Tyrosine Kinase, EGF-R, with Caveolins: CAVEOLIN BINDING NEGATIVELY REGULATES TYROSINE AND SERINE/THREONINE KINASE ACTIVITIES. *J Biol Chem* 272, 30429-30438.
- Coulter, C. L. and R. B. Jaffe (1998). Functional Maturation of the Primate Fetal Adrenal in Vivo: 3. Specific Zonal Localization and Developmental Regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/Aldosterone Synthase) Lead to Integrated Concept of Zonal and Temporal Steroid Biosynthesis. *Endocrinology* 139, 5144-5150.
- Couse, J. F. and K. S. Korach (1999). Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? *Endocr Rev* 20, 358-417.
- Coussens, L., T. Yang-Feng, Y. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P. Seeburg, T. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke and e. al. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230, 1132-1139.
- Crabbé, J. (1961). Stimulation of active sodium transport by the isolated toad bladder with aldosterone in vitro. *The Journal of Clinical Investigation* 40, 2103-2110.
- Creighton, C. J., X. Li, M. Landis, J. M. Dixon, V. M. Neumeister, A. Sjolund, D. L. Rimm, H. Wong, A. Rodriguez, J. I. Herschkowitz, C. Fan, X. Zhang, X. He, A. Pavlick, M. C. Gutierrez, L. Renshaw, A. A. Larionov, D. Faratian, S. G. Hilsenbeck, C. M. Perou, M. T. Lewis, J. M. Rosen and J. C. Chang (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 13820-13825.
- Cristillo, A. D., H. C. Highbarger, R. I. Dewar, D. S. Dimitrov, H. Golding and B. E. Bierer (2002). Up-regulation of HIV coreceptor CXCR4 expression in human T lymphocytes is mediated in part by a cAMP-responsive element. *The FASEB Journal* 16, 354-364.
- Cronin, P., J. Wang and H. P. Redmond (2010). Hypoxia increases the metastatic ability of breast cancer cells via upregulation of CXCR4. *BMC Cancer* 10, 225.
- Croston, G. E., L. B. Milan, K. B. Marschke, M. Reichman and M. R. Briggs (1997). Androgen Receptor-Mediated Antagonism of Estrogen-Dependent Low Density Lipoprotein Receptor Transcription in Cultured Hepatocytes. *Endocrinology* 138, 3779-3786.
- Crump, M. P., J.-H. Gong, P. Loetscher, K. Rajarathnam, A. Amara, F. Arenzana-Seisdedos, J.-L. Virelizier, M. Baggiolini, B. D. Sykes and I. Clark-Lewis (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 16, 6996-7007.
- Cui, X., P. Zhang, W. Deng, S. Oesterreich, Y. Lu, G. B. Mills and A. V. Lee (2003). Insulin-Like Growth Factor-I Inhibits Progesterone Receptor Expression in Breast Cancer Cells via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin Pathway: Progesterone Receptor as a Potential Indicator of Growth Factor Activity in Breast Cancer. *Mol Endocrinol* 17, 575-588.
- Cui, Y., M. Zhang, R. Pestell, E. M. Curran, W. V. Welshons and S. A. W. Fuqua (2004). Phosphorylation of Estrogen Receptor  $\alpha$  Blocks Its Acetylation and Regulates Estrogen Sensitivity. *Cancer Res* 64, 9199-9208.
- Cunningham, D., Y. Humblet, S. Siena, D. Khayat, H. Bleiberg, A. Santoro, D. Bets, M. Mueser, A. Harstrick, C. Verslype, I. Chau and E. Van Cutsem (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351, 337-345.

- Curnock, A. P. and S. G. Ward (2003). Development and characterisation of tetracycline-regulated phosphoinositide 3-kinase mutants: assessing the role of multiple phosphoinositide 3-kinases in chemokine signaling. *J Immunol Methods* 273, 29-41.
- Curnow, K. M., M.-T. Tusie-Luna, L. Pascoe, R. Natarajan, J.-L. Gu, J. L. Nadler and P. C. White (1991). The Product of the CYP11B2 Gene Is Required for Aldosterone Biosynthesis in the Human Adrenal Cortex. *Mol Endocrinol* 5, 1513-1522.
- Curtis, H. S., J. Couse and K. Korach (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2, 345-352.
- Cvoro, A., D. Tatomer, M.-K. Tee, T. Zogovic, H. A. Harris and D. C. Leitman (2008). Selective Estrogen Receptor- $\beta$  Agonists Repress Transcription of Proinflammatory Genes. *The Journal of Immunology* 180, 630-636.
- Dale, D. C., A. A. Bolyard, M. L. Kelley, E. C. Westrup, V. Makaryan, A. Aprikyan, B. Wood and F. J. Hsu (2011). The CXCR4 antagonist plerixafor is a potential therapy for myelokathexis, WHIM syndrome. *Blood* 118, 4963-4966.
- Danielian, P. S., R. White, J. A. Lees and M. G. Parker (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 11, 1025-1033.
- Danielsen, A. and N. Maihle (2002). The EGF/ErbB receptor family and apoptosis. *Growth Factors* 20, 1-15.
- Darash-Yahana, M., E. Pikarsky, R. Abramovitch, E. Zeira, B. Pal, R. Karplus, K. Beider, S. Avniel, S. Kasem, E. Galun and A. Peled (2004). Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J* 18, 1240-1242.
- Darnell, J. E. (1997). STATs and Gene Regulation. *Science* 277, 1630-1635.
- Datema, R., L. Rabin, M. Hincenbergs, M. Moreno, S. Warren, V. Linquist, B. Rosenwirth, J. Seifert and J. McCune (1996). Antiviral efficacy in vivo of the anti-human immunodeficiency virus bicyclam SDZ SID 791 (JM 3100), an inhibitor of infectious cell entry. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 750-754.
- Daub, H., C. Wallasch, A. Lanckenau, A. Herrlich and A. Ullrich (1997). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16, 7032-7044.
- de Bono, J. S., H. I. Scher, R. B. Montgomery, C. Parker, M. C. Miller, H. Tissing, G. V. Doyle, L. W. W. M. Terstappen, K. J. Pienta and D. Raghavan (2008). Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 14, 6302-6309.
- De Clercq, E. (2003). The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2, 581-587.
- de Jager, T., T. Pelzer, S. Müller-Botz, A. Imam, J. Muck and L. Neyses (2001). Mechanisms of Estrogen Receptor Action in the Myocardium: RAPID GENE ACTIVATION VIA THE ERK1/2 PATHWAY AND SERUM RESPONSE ELEMENTS. *J Biol Chem* 276, 27873-27880.
- Décaillot, F. M., M. A. Kazmi, Y. Lin, S. Ray-Saha, T. P. Sakmar and P. Sachdev (2011). CXCR7/CXCR4 Heterodimer Constitutively Recruits  $\beta$ -Arrestin to Enhance Cell Migration. *J Biol Chem* 286, 32188-32197.
- Decker, S. J., C. Ellis, T. Pawson and T. Velu (1990). Effects of substitution of threonine 654 of the epidermal growth factor receptor on epidermal growth factor-mediated activation of phospholipase C. *J Biol Chem* 265, 7009-7015.
- Deegan, B. J., V. Bhat, K. L. Seldeen, C. B. McDonald and A. Farooq (2011). Genetic variations within the ERE motif modulate plasticity and energetics of binding of DNA to the ER $\alpha$  nuclear receptor. *Arch Biochem Biophys* 507, 262-270.
- Deeley, R. G., J. I. Gordon, A. T. Burns, K. P. Mullinix, M. Binastein and R. F. Goldberg (1977). Primary activation of the vitellogenin gene in the rooster. *J Biol Chem* 252, 8310-8319.

- del Río, B., J. M. G. Pedrero, C. Martínez-Campa, P. Zuazua, P. S. Lazo and S. Ramos (2004). Melatonin, an Endogenous-specific Inhibitor of Estrogen Receptor  $\alpha$  via Calmodulin. *J Biol Chem* 279, 38294-38302.
- Delcourt, N., J. Bockaert and P. Marin (2007). GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci* 28, 602-607.
- Delgado, M. B., I. Clark-Lewis, P. Loetscher, H. Langen, M. Thelen, M. Baggiolini and M. Wolf (2001). Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. *Eur J Immunol* 31, 699-707.
- Denger, S., G. Reid, H. Brand, M. Kos and F. Gannon (2001). Tissue-specific expression of human ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the male. *Mol Cell Endocrinol* 178, 155-160.
- Denger, S., G. Reid, M. Koš, G. Flouriot, D. Parsch, H. Brand, K. S. Korach, V. Sonntag-Buck and F. Gannon (2001). ER $\alpha$  Gene Expression in Human Primary Osteoblasts: Evidence for the Expression of Two Receptor Proteins. *Mol Endocrinol* 15, 2064-2077.
- Denner, L., N. Weigel, B. Maxwell, W. Schrader and B. O'Malley (1990). Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science* 250, 1740-1743.
- DerMardirossian, C. and G. M. Bokoch (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15, 356-363.
- Deroo, B. J. and K. S. Korach (2006). Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 561-570.
- Devalaraja, M. N. and A. Richmond (1999). Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy? *Trends Pharmacol Sci* 20, 151-156.
- Di Fiore, P., J. Pierce, M. Kraus, O. Segatto, C. King and S. Aaronson (1987). erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237, 178-182.
- Di Fiore, P. P., J. H. Pierce, T. P. Fleming, R. Hazan, A. Ullrich, C. R. King, J. Schlessinger and S. A. Aaronson (1987). Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 51, 1063-1070.
- Di Salvo, J., G. E. Koch, K. E. Johnson, A. D. Blake, B. L. Daugherty, J. A. DeMartino, A. Sirotna-Meisher, Y. Liu, M. S. Springer, M. A. Cascieri and K. A. Sullivan (2000). The CXCR4 agonist ligand stromal derived factor-1 maintains high affinity for receptors in both G $\alpha$ i-coupled and uncoupled states. *Eur J Pharmacol* 409, 143-154.
- Diamonti, A. J., P. M. Guy, C. Ivanof, K. Wong, C. Sweeney and K. L. Carraway (2002). An RBCC protein implicated in maintenance of steady-state neuregulin receptor levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 2866-2871.
- Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel and C. J. Sherr (1998). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-3511.
- Dikic, I., G. Tokiwa, S. Lev, S. A. Courtneidge and J. Schlessinger (1996). A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383, 547-550.
- Distefano, E., M. Marino, J. A. Gillette, B. Hanstein, V. Pallottini, J. Brüning, W. Krone and A. Trentalance (2002). Role of tyrosine kinase signaling in estrogen-induced LDL receptor gene expression in HepG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1580, 145-149.
- Dominguez, F. (2003). Hormonal and embryonic regulation of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2B in the human endometrium and the human blastocyst. *Mol Hum Reprod* 9, 189-198.
- Dominguez, F., A. Pellicer and C. Simon (2003). The Chemokine Connection: Hormonal and Embryonic Regulation at the Human Maternal-Embryonic Interface—A Review. *Placenta* 24, Supplement 2, S48-S55.
- Dong, Z. (2003). Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 523–524, 145-150.

- Doranz, B. J., K. Grovit-Ferbas, M. P. Sharron, S.-H. Mao, M. B. Goetz, E. S. Daar, R. W. Doms and W. A. O'Brien (1997). A Small-molecule Inhibitor Directed against the Chemokine Receptor CXCR4 Prevents its Use as an HIV-1 Coreceptor. *The Journal of Experimental Medicine* 186, 1395-1400.
- Downward, J., Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, I. P. Stockwel, A. Ullrich, J. Schlessinger and M. Waterfield (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521-527.
- Dowsett, M., J. Cuzick, C. Wale, T. Howell, J. Houghton and M. Baum (2005). Retrospective Analysis of Time to Recurrence in the ATAC Trial According to Hormone Receptor Status: An Hypothesis-Generating Study. *J Clin Oncol* 23, 7512-7517.
- Dowsett, M., R. Nicholson and R. Pietras (2005). Biological characteristics of the pure antiestrogen fulvestrant: overcoming endocrine resistance. *Breast Cancer Res Treat* 93, 11-18.
- Duan, R., W. Porter and S. Safe (1998). Estrogen-Induced c-fos Protooncogene Expression in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: Role of Estrogen Receptor Sp1 Complex Formation. *Endocrinology* 139, 1981-1990.
- Duan, R., W. Xie, R. C. Burghardt and S. Safe (2001). Estrogen Receptor-mediated Activation of the Serum Response Element in MCF-7 Cells through MAPK-dependent Phosphorylation of Elk-1. *J Biol Chem* 276, 11590-11598.
- Dubrovskaya, A., A. Hartung, L. C. Bouchez, J. R. Walker, V. A. Reddy, C. Y. Cho and P. G. Schultz (2012). CXCR4 activation maintains a stem cell population in tamoxifen-resistant breast cancer cells through AhR signalling. *Br J Cancer* 107, 43-52.
- Dumont, M., V. Luu-The, E. Dupont, G. Pelletier and F. Labrie (1992). Characterization, expression, and immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase in human skin. *J Invest Dermatol* 99, 415-421
- Dunn, L. K., K. S. Mohammad, P. G. J. Fournier, C. R. McKenna, H. W. Davis, M. Niewolna, X. H. Peng, J. M. Chirgwin and T. A. Guise (2009). Hypoxia and TGF- $\beta$  Drive Breast Cancer Bone Metastases through Parallel Signaling Pathways in Tumor Cells and the Bone Microenvironment. *PLoS ONE* 4, e6896.
- Duong, V., N. Boulle, S. Daujat, J. Chauvet, S. Bonnet, H. Neel and V. Cavailles (2007). Differential Regulation of Estrogen Receptor  $\alpha$  Turnover and Transactivation by Mdm2 and Stress-Inducing Agents. *Cancer Res* 67, 5513-5521.
- Duong, V., A. Licznar, R. Margueron, N. Boulle, M. Busson, M. Lacroix, B. S. Katzenellenbogen, V. Cavailles and G. Lazennec (2005). ER[ $\alpha$ ] and ER[ $\beta$ ] expression and transcriptional activity are differentially regulated by HDAC inhibitors. *Oncogene* 25, 1799-1806.
- Durkee, T. J., M. P. McLean, D. B. Hales, A. H. Payne, M. R. Waterman, I. Khan and G. Gibori (1992). P450(17  $\alpha$ ) and P450SCC gene expression and regulation in the rat placenta. *Endocrinology* 130, 1309-1317.
- Dutertre, M. and C. L. Smith (2003). Ligand-Independent Interactions of p160/Steroid Receptor Coactivators and CREB-Binding Protein (CBP) with Estrogen Receptor- $\alpha$ : Regulation by Phosphorylation Sites in the A/B Region Depends on Other Receptor Domains. *Mol Endocrinol* 17, 1296-1314.
- Eakin, C. M., M. J. MacCoss, G. L. Finney and R. E. Klevit (2007). Estrogen receptor  $\alpha$  is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 5794-5799.
- Edelman, I. S., R. Bogoroch and G. A. Porter (1963). ON THE MECHANISM OF ACTION OF ALDOSTERONE ON SODIUM TRANSPORT: THE ROLE OF PROTEIN SYNTHESIS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50, 1169-1177.

- Egawa, T., K. Kawabata, H. Kawamoto, K. Amada, R. Okamoto, N. Fujii, T. Kishimoto, Y. Katsura and T. Nagasawa (2001). The Earliest Stages of B Cell Development Require a Chemokine Stromal Cell-Derived Factor/Pre-B Cell Growth-Stimulating Factor. *Immunity* 15, 323-334.
- El Khissiin, A. and G. Leclercq (1999). Implication of proteasome in estrogen receptor degradation. *FEBS Lett* 448, 160-166.
- El Marzouk, S., J. R. Schultz-Norton, V. S. Likhite, I. X. McLeod, J. R. Yates and A. M. Nardulli (2007). Rho GDP dissociation inhibitor  $\alpha$  interacts with estrogen receptor  $\alpha$  and influences estrogen responsiveness. *J Mol Endocrinol* 39, 249-259.
- Endoh, A., S. B. Kristiansen, P. R. Casson, J. E. Buster and P. J. Hornsby (1996). The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3558-3565.
- Endoh, H., K. Maruyama, Y. Masuhiro, Y. Kobayashi, M. Goto, H. Tai, J. Yanagisawa, D. Metzger, S. Hashimoto and S. Kato (1999). Purification and Identification of p68 RNA Helicase Acting as a Transcriptional Coactivator Specific for the Activation Function 1 of Human Estrogen Receptor  $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 19, 5363-5372.
- Engelman, J. A., R. J. Lee, A. Karnezis, D. J. Bearss, M. Webster, P. Siegel, W. J. Muller, J. J. Windle, R. G. Pestell and M. P. Lisanti (1998). Reciprocal Regulation of Neu Tyrosine Kinase Activity and Caveolin-1 Protein Expression in Vitro and in Vivo : IMPLICATIONS FOR HUMAN BREAST CANCER. *J Biol Chem* 273, 20448-20455.
- Enmark, E., M. Peltö-Huikko, K. Grandien, S. Lagercrantz, J. Lagercrantz, G. Fried, M. Nordenskjöld and J.-Å. Gustafsson (1997). Human Estrogen Receptor  $\beta$ -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258-4265.
- Espinosa, L. s., J. Inglés-Esteve, A. Robert-Moreno and A. Bigas (2003). I $\kappa$ B $\alpha$  and p65 Regulate the Cytoplasmic Shuttling of Nuclear Corepressors: Cross-talk between Notch and NF $\kappa$ B Pathways. *Mol Biol Cell* 14, 491-502.
- Evans, R. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Fan, S., Y. X. Ma, C. Wang, R.-Q. Yuan, Q. Meng, J.-A. Wang, M. Erdos, I. D. Goldberg, P. Webb, P. J. Kushner, R. G. Pestell and E. M. Rosen (2002). p300 Modulates the BRCA1 Inhibition of Estrogen Receptor Activity. *Cancer Res* 62, 141-151.
- Fan, S., J.-A. Wang, R. Yuan, Y. Ma, Q. Meng, M. R. Erdos, R. G. Pestell, F. Yuan, K. J. Auborn, I. D. Goldberg and E. M. Rosen (1999). BRCA1 Inhibition of Estrogen Receptor Signaling in Transfected Cells. *Science* 284, 1354-1356.
- Farach-Carson, M. C. and P. J. Davis (2003). Steroid Hormone Interactions with Target Cells: Cross Talk between Membrane and Nuclear Pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 307, 839-845.
- Farzan, M., G. J. Babcock, N. Vasilieva, P. L. Wright, E. Kiprilov, T. Mirzabekov and H. Choe (2002). The Role of Post-translational Modifications of the CXCR4 Amino Terminus in Stromal-derived Factor 1 $\alpha$  Association and HIV-1 Entry. *J Biol Chem* 277, 29484-29489.
- Faus, H. and B. Haendler (2006). Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60, 520-528.
- Feil, C. and H. G. Augustin (1998). Endothelial Cells Differentially Express Functional CXC-Chemokine Receptor-4 (CXCR-4/Fusin) under the Control of Autocrine Activity and Exogenous Cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 38-45.
- Feldner, J. C. and B. H. Brandt (2002). Cancer Cell Motility—On the Road from c-erbB-2 Receptor Steered Signaling to Actin Reorganization. *Exp Cell Res* 272, 93-108.
- Feng, Y., C. Broder, P. Kennedy and E. Berger (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.
- Ferguson, K. M. (2004). Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor. *Biochem Soc Trans* 32, 742-745.



- Fernandes, I., Y. Bastien, T. Wai, K. Nygard, R. Lin, O. Cormier, H. S. Lee, F. Eng, N. R. Bertos, N. Pelletier, S. Mader, V. K. M. Han, X.-J. Yang and J. H. White (2003). Ligand-Dependent Nuclear Receptor Corepressor LCoR Functions by Histone Deacetylase-Dependent and -Independent Mechanisms. *Mol Cell* *11*, 139-150.
- Fernandez, E. J. and E. Lolis (2002). STRUCTURE, FUNCTION, AND INHIBITION OF CHEMOKINES. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *42*, 469-499.
- Fernandis, A. and R. Ganju (2001). Slit: a roadblock for chemotaxis. *Sci STKE*, PE1.
- Fernandis, A. Z., A. Prasad, H. Band, R. Klosel and R. K. Ganju (2004). Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene* *23*, 157-167.
- Filardo, E. J., J. A. Quinn, K. I. Bland and A. R. Frackelton (2000). Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* *14*, 1649-1660.
- Filardo, E. J., J. A. Quinn, A. R. Frackelton and K. I. Bland (2002). Estrogen Action Via the G Protein-Coupled Receptor, GPR30: Stimulation of Adenylyl Cyclase and cAMP-Mediated Attenuation of the Epidermal Growth Factor Receptor-to-MAPK Signaling Axis. *Mol Endocrinol* *16*, 70-84.
- Filomeni, G., I. Graziani, G. Rotilio and M. Ciriolo (2007). trans-Resveratrol induces apoptosis in human breast cancer cells MCF-7 by the activation of MAP kinases pathways. *Genes Nutr* *3*, 295-305.
- Finley, M. J., A. Steele, W. D. Cornwell and T. J. Rogers (2011). Transcriptional regulation of the major HIV-1 coreceptor, CXCR4, by the kappa opioid receptor. *J Leukoc Biol* *90*, 111-121.
- Fiorentino, L., C. Pertica, M. Fiorini, C. Talora, M. Crescenzi, L. Castellani, S. Alemà, P. Benedetti and O. Segatto (2000). Inhibition of ErbB-2 Mitogenic and Transforming Activity by RALT, a Mitogen-Induced Signal Transducer Which Binds to the ErbB-2 Kinase Domain. *Mol Cell Biol* *20*, 7735-7750.
- Fiorini, M., C. Ballarò, G. Sala, G. Falcone, S. Alemà and O. Segatto (2002). Expression of RALT, a feedback inhibitor of ErbB receptors, is subjected to an integrated transcriptional and post-translational control. *Oncogene* *21*, 6350-6539.
- Fiorini, M., C. Ballarò, G. Sala, G. Falcone, S. Alemà and O. Segatto (2002). Expression of RALT, a feedback inhibitor of ErbB receptors, is subjected to an integrated transcriptional and post-translational control. *Oncogene* *21*, 6530-3539.
- Flouriot, G., H. Brand, S. Denger, R. Metivier, M. Kos, G. Reid, V. Sonntag-Buck and F. Gannon (2000). 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. *EMBO J* *19*, 4688-4700.
- Fong, A. M., R. T. Premont, R. M. Richardson, Y.-R. A. Yu, R. J. Lefkowitz and D. D. Patel (2002). Defective lymphocyte chemotaxis in  $\beta$ -arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 7478-7483.
- Font de Mora, J. and M. Brown (2000). AIB1 Is a Conduit for Kinase-Mediated Growth Factor Signaling to the Estrogen Receptor. *Mol Cell Biol* *20*, 5041-5047.
- Förster, C., S. Mäkela, A. Wärrä, S. Kietz, D. Becker, K. Hultenby, M. Warner and J.-Å. Gustafsson (2002). Involvement of estrogen receptor  $\beta$  in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 15578-15583.
- Foulds, C. E., A. Tsimelzon, W. Long, A. Le, S. Y. Tsai, M.-J. Tsai and B. W. O'Malley (2010). Research Resource: Expression Profiling Reveals Unexpected Targets and Functions of the Human Steroid Receptor RNA Activator (SRA) Gene. *Mol Endocrinol* *24*, 1090-1105.
- Franklin, M. C., K. D. Carey, F. F. Vajdos, D. J. Leahy, A. M. de Vos and M. X. Sliwkowski (2004). Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* *5*, 317-328.

- Frasor, J., J. M. Danes, B. Komm, K. C. N. Chang, C. R. Lyttle and B. S. Katzenellenbogen (2003). Profiling of Estrogen Up- and Down-Regulated Gene Expression in Human Breast Cancer Cells: Insights into Gene Networks and Pathways Underlying Estrogenic Control of Proliferation and Cell Phenotype. *Endocrinology* 144, 4562-4574.
- Fujimoto, N., H. Honda and S. Kitamura (2004). Effects of environmental estrogenic chemicals on AP1 mediated transcription with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 88, 53-59.
- Funakoshi, T., A. Yanai, K. Shinoda, M. M. Kawano and Y. Mizukami (2006). G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 904-910.
- Fuqua, S. A. W., S. D. Fitzgerald, D. C. Allred, R. M. Elledge, Z. Nawaz, D. P. McDonnell, B. W. O'Malley, G. L. Greene and W. L. McGuire (1992). Inhibition of Estrogen Receptor Action by a Naturally Occurring Variant in Human Breast Tumors. *Cancer Res* 52, 483-486.
- Fuqua, S. A. W., R. Schiff, I. Parra, J. T. Moore, S. K. Mohsin, C. K. Osborne, G. M. Clark and D. C. Allred (2003). Estrogen Receptor  $\beta$  Protein in Human Breast Cancer: Correlation with Clinical Tumor Parameters. *Cancer Res* 63, 2434-2439.
- Furuchi, T. and R. G. W. Anderson (1998). Cholesterol Depletion of Caveolae Causes Hyperactivation of Extracellular Signal-related Kinase (ERK). *J Biol Chem* 273, 21099-21104.
- Futahashi, Y., J. Komano, E. Urano, T. Aoki, M. Hamatake, K. Miyauchi, T. Yoshida, Y. Koyanagi, Z. Matsuda and N. Yamamoto (2007). Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Sci* 98, 373-379.
- Gaidarov, I., J. G. Krupnick, J. R. Falck, J. L. Benovic and J. H. Keen (1999). Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J* 18, 871-881.
- Galbiati, F., D. Volonte, J. Engelman, G. Watanabe, R. Burk, R. Pestell and M. Lisanti (1998). Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J* 17, 6633-6648.
- Galien, R. and T. Garcia (1997). Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF- $\kappa$ B site. *Nucleic Acids Res* 25, 2424-2429.
- Galluzzo, P., F. Caiazza, S. Moreno and M. Marino (2007). Role of ER $\beta$  palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocrine-Related Cancer* 14, 153-167.
- Gao, C. and Y. Li (2007). SDF-1 Plays a Key Role in the Repairing and Remodeling Process on Rat Allo-Orthotopic Abdominal Aorta Grafts. *Transplant Proc* 39, 268-272.
- García-Moruja, C., J. M. Alonso-Lobo, P. Rueda, C. Torres, N. González, M. Bermejo, F. Luque, F. Arenzana-Seisdedos, J. Alcamí and A. Caruz (2005). Functional Characterization of SDF-1 Proximal Promoter. *J Mol Biol* 348, 43-62.
- Garcia Dos Santos, E., M. N. Dieudonne, R. Pecquery, V. Le Moal, Y. Giudicelli and D. Lacasa (2002). Rapid Nongenomic E2 Effects on p42/p44 MAPK, Activator Protein-1, and cAMP Response Element Binding Protein in Rat White Adipocytes. *Endocrinology* 143, 930-940.
- Garcia, T., S. Lehrer, W. D. Bloomer and B. Schachter (1988). A Variant Estrogen Receptor Messenger Ribonucleic Acid is Associated with Reduced Levels of Estrogen Binding in Human Mammary Tumors. *Mol Endocrinol* 2, 785-791.
- Garratt, A. N., O. Voiculescu, P. Topilko, P. Charnay and C. Birchmeier (2000). A Dual Role of erbB2 in Myelination and in Expansion of the Schwann Cell Precursor Pool. *The Journal of Cell Biology* 148, 1035-1046.
- Garrett, T. P. J., N. M. McKern, M. Lou, T. C. Elleman, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, M. Kofler, R. N. Jorissen, E. C. Nice, A. W. Burgess and C. W. Ward (2003). The Crystal Structure of a Truncated ErbB2 Ectodomain Reveals an Active Conformation, Poised to Interact with Other ErbB Receptors. *Mol Cell* 11, 495-505.
- Garvin, S., K. Öllinger and C. Dabrosin (2006). Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Lett* 231, 113-122.

- Gassmann, M., F. Casagrande, D. Orioli, H. Simon, C. Lai, R. Klein and G. Lemke (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390-394.
- Gately, S. and W. W. Li (2004). Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 31, *Supplement 7*, 2-11.
- Gatzemeier, U., G. Groth, C. Butts, N. Van Zandwijk, F. Shepherd, A. Ardizzoni, C. Barton, P. Ghahramani and V. Hirsh (2004). Randomized phase II trial of gemcitabine–cisplatin with or without trastuzumab in HER2-positive non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 15, 19-27.
- Gazdar, A. F., H. Shigematsu, J. Herz and J. D. Minna (2004). Mutations and addiction to EGFR: the Achilles ‘heal’ of lung cancers? *Trends in Molecular Medicine* 10, 481-486.
- Gearhart, M. D., S. M. A. Holmbeck, R. M. Evans, H. J. Dyson and P. E. Wright (2003). Monomeric Complex of Human Orphan Estrogen Related Receptor-2 with DNA: A Pseudo-dimer Interface Mediates Extended Half-site Recognition. *J Mol Biol* 327, 819-832.
- Geissler, W. M., D. L. Davis, L. Wu, K. D. Bradshaw, S. Patel, B. B. Mendonca, K. O. Elliston, J. D. Wilson, D. W. Russell and S. Andersson (1994). Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet* 7, 34-39.
- Geminder, H., O. Sagi-Assif, L. Goldberg, T. Meshel, G. Rechavi, I. P. Witz and A. Ben-Baruch (2001). A Possible Role for CXCR4 and Its Ligand, the CXC Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-1, in the Development of Bone Marrow Metastases in Neuroblastoma. *The Journal of Immunology* 167, 4747-4757.
- Gensler, M., M. Buschbeck and A. Ullrich (2004). Negative Regulation of HER2 Signaling by the PEST-type Protein-tyrosine Phosphatase BDP1. *J Biol Chem* 279, 12110-12116.
- Geraldes, P., M. G. Sirois and J.-F. Tanguay (2003). Specific Contribution of Estrogen Receptors on Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Vascular Cell Activation. *Circ Res* 93, 399-405.
- Gerard, C. and B. Rollins (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2, 108-115.
- Gerrits, H., D. S. van Ingen Schenau, N. E. C. Bakker, A. J. M. van Disseldorp, A. Strik, L. S. Hermens, T. B. Koenen, M. A. M. Krajnc-Franken and J. A. Gossen (2008). Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *genesis* 46, 235-245.
- Gévry, N., S. Hardy, P.-É. Jacques, L. Laflamme, A. Svtelis, F. Robert and L. Gaudreau (2009). Histone H2A.Z is essential for estrogen receptor signaling. *Genes Dev* 23, 1522-1533.
- Ghayee, H. and R. Auchus (2007). Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 8, 289-300.
- Ghiglione, C., K. L. Carraway Iii, L. T. Amundadottir, R. E. Boswell, N. Perrimon and J. B. Duffy (1999). The Transmembrane Molecule Kekk1 Acts in a Feedback Loop to Negatively Regulate the Activity of the Drosophila EGF Receptor during Oogenesis. *Cell* 96, 847-856.
- Giani, C., P. Casalini, S. M. Pupa, R. De Vecchi, E. Ardini, M. I. Colnaghi, A. Giordano and S. Ménard (1998). Increased expression of c-erbB-2 in hormone-dependent breast cancer cells inhibits cell growth and induces differentiation. *Oncogene* 17, 425-432.
- Gilbertson, R. J., R. H. Perry, P. J. Kelly, A. D. J. Pearson and J. Lunec (1997). Prognostic Significance of HER2 and HER4 Coexpression in Childhood Medulloblastoma. *Cancer Res* 57, 3272-3280.
- Giordano, C., Y. Cui, I. Barone, S. Ando, M. Mancini, V. Berno and S. W. Fuqua (2010). Growth factor-induced resistance to tamoxifen is associated with a mutation of estrogen receptor  $\alpha$  and its phosphorylation at serine 305. *Breast Cancer Res Treat* 119, 71-85.
- Glance, L., E. T. Grygielko, R. Boyle, Q. Wang, N. J. Laping, A. C. Sulpizio and J. D. Bray (2009). Estrogen-induced stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/Cxcl12) expression is repressed by progesterone and by Selective Estrogen Receptor Modulators via estrogen receptor  $\alpha$  in rat uterine cells and tissues. *Steroids* 74, 1015-1024.

- Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* *14*, 121-141.
- Glass, C. K., M. G. Rosenfeld, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (2000). receptors The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. 121-141.
- Gleichmann, M., C. Gillen, M. Czardybon, F. Bosse, R. Greiner-Petter, J. Auer and H. W. Müller (2000). Cloning and characterization of SDF-1 $\gamma$ , a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci* *12*, 1857-1866.
- Godessart, N. and S. Kunkel (2001). Chemokines in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* *13*, 670-675.
- Goldman, R., R. Levy, E. Peles and Y. Yarden (1990). Heterodimerization of the erbB-1 and erbB-2 receptors in human breast carcinoma cells: a mechanism for receptor transregulation. *Biochemistry (Mosc)* *29*, 11024-11028.
- Goldmann, T., D. Drömann, J. Radtke, S. Marwitz, D. Lang, H. Schultz and E. Vollmer (2008). CXCR7 transcription in human non-small cell lung cancer and tumor-free lung tissues; possible regulation upon chemotherapy. *Virchows Arch* *452*, 347-348.
- Gong, J.-H., M. Uguccioni, B. Dewald, M. Baggiolini and I. Clark-Lewis (1996). RANTES and MCP-3 Antagonists Bind Multiple Chemokine Receptors. *J Biol Chem* *271*, 10521-10527.
- Gong, J. H. and I. Clark-Lewis (1995). Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH<sub>2</sub>-terminal residues. *The Journal of Experimental Medicine* *181*, 631-640.
- Goodman, O. B., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen and J. L. Benovic (1996). [beta]-Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the [beta]<sub>2</sub>-adrenergic receptor. *Nature* *383*, 447-450.
- Gosling, J., S. Slaymaker, L. Gu, S. Tseng, C. Zlot, S. Young, B. Rollins and I. Charo (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* *103*, 773-778.
- Goss, P. E., J. N. Ingle, S. Martino, N. J. Robert, H. B. Muss, M. J. Piccart, M. Castiglione, D. Tu, L. E. Shepherd, K. I. Pritchard, R. B. Livingston, N. E. Davidson, L. Norton, E. A. Perez, J. S. Abrams, D. A. Cameron, M. J. Palmer and J. L. Pater (2005). Randomized Trial of Letrozole Following Tamoxifen as Extended Adjuvant Therapy in Receptor-Positive Breast Cancer: Updated Findings from NCIC CTG MA.17. *J Natl Cancer Inst* *97*, 1262-1271.
- Gottardis, M. M. and V. C. Jordan (1988). Development of Tamoxifen-stimulated Growth of MCF-7 Tumors in Athymic Mice after Long-Term Antiestrogen Administration. *Cancer Res* *48*, 5183-5187.
- Gougelet, A., S. O. Mueller, K. S. Korach and J.-M. Renoir (2007). Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: The transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER) $\beta$ -mediated transcriptional repression of ER $\alpha$ . *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* *104*, 110-122.
- Govaerts, C., C. Blanpain, X. Deupi, S. Ballet, J. A. Ballesteros, S. J. Wodak, G. Vassart, L. Pardo and M. Parmentier (2001). The TXP Motif in the Second Transmembrane Helix of CCR5: A STRUCTURAL DETERMINANT OF CHEMOKINE-INDUCED ACTIVATION. *J Biol Chem* *276*, 13217-13225.
- Graus-Porta, D., R. R. Beerli, J. M. Daly and N. E. Hynes (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* *16*, 1647-1655.
- Gravel, S., C. Malouf, P. E. Boulais, Y. A. Berchiche, S. Oishi, N. Fujii, R. Leduc, D. Sinnett and N. Heveker (2010). The Peptidomimetic CXCR4 Antagonist TC14012 Recruits  $\beta$ -Arrestin to CXCR7: ROLES OF RECEPTOR DOMAINS. *J Biol Chem* *285*, 37939-37943.

- Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J.-M. Bornert, P. Argos and P. Chambon (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* *320*, 134-139.
- Greger, J. G., Y. Guo, R. Henderson, J. F. Ross and B. J. Cheskis (2006). Characterization of MNAR expression. *Steroids* *71*, 317-322.
- Greulich, H., B. Kaplan, P. Mertins, T.-H. Chen, K. E. Tanaka, C.-H. Yun, X. Zhang, S.-H. Lee, J. Cho, L. Ambrogio, R. Liao, M. Imielinski, S. Banerji, A. H. Berger, M. S. Lawrence, J. Zhang, N. H. Pho, S. R. Walker, W. Winckler, G. Getz, D. Frank, W. C. Hahn, M. J. Eck, D. R. Mani, J. D. Jaffe, S. A. Carr, K.-K. Wong and M. Meyerson (2012). Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 14476-14481.
- Grober, O., M. Mutarelli, G. Giurato, M. Ravo, L. Cicatiello, M. De Filippo, L. Ferraro, G. Nassa, M. Papa, O. Paris, R. Tarallo, S. Luo, G. Schroth, V. Benes and A. Weisz (2011). Global analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation. *BMC Genomics* *12*, 36.
- Grundler, R., L. Brault, C. Gasser, A. N. Bullock, T. Dechow, S. Woetzel, V. Pogacic, A. Villa, S. Ehret, G. Berridge, A. Spoo, C. Dierks, A. Biondi, S. Knapp, J. Duyster and J. Schwaller (2009). Dissection of PIM serine/threonine kinases in FLT3-ITD-induced leukemogenesis reveals PIM1 as regulator of CXCL12-CXCR4-mediated homing and migration. *J Exp Med* *206*, 1957-1970.
- Grunt, T., M. Saceda, M. Martin, R. Lupu, E. Dittrich, G. Krupitza, H. Harant, H. Huber and C. Dittrich (1995). Bidirectional interactions between the estrogen receptor and the cerbB-2 signaling pathways: heregulin inhibits estrogenic effects in breast cancer cells. *Int J Cancer* *63*, 560-567.
- Gruvberger-Saal, S. K., P.-O. Bendahl, L. H. Saal, M. Laakso, C. Hegardt, P. Edén, C. Peterson, P. Malmström, J. Isola, Å. Borg and M. Fernö (2007). Estrogen Receptor  $\beta$  Expression Is Associated with Tamoxifen Response in ER $\alpha$ -Negative Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res* *13*, 1987-1994.
- Grymula, K., M. Tarnowski, M. Wysoczynski, J. Drukala, F. Barr, J. Ratajczak, M. Kucia and M. Ratajczak (2010). Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *Int J Cancer* *127*, 2554 - 2568.
- Gschwind, A., E. Zwick, N. Prenzel, M. Leserer and A. Ullrich (2001). Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* *20*, 1594-1600.
- Guinamard, R., N. Signoret, M. Ishiai, M. Marsh, T. Kurosaki and J. V. Ravetch (1999). B Cell Antigen Receptor Engagement Inhibits Stromal Cell-derived Factor (SDF)-1 $\alpha$  Chemotaxis and Promotes Protein Kinase C (PKC)-induced Internalization of CXCR4. *The Journal of Experimental Medicine* *189*, 1461-1466.
- Guo, Z., S. Cai, R. Fang, H. Chen, J. Du, Y. Tan, W. Ma, H. Hu, S. Cai and Y. Liu (2007). The synergistic effects of CXCR4 and EGFR on promoting EGF-mediated metastasis in ovarian cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* *60*, 1-6.
- Gupta, S. K., P. G. Lysko, K. Pillarisetti, E. Ohlstein and J. M. Stadel (1998). Chemokine Receptors in Human Endothelial Cells: FUNCTIONAL EXPRESSION OF CXCR4 AND ITS TRANSCRIPTIONAL REGULATION BY INFLAMMATORY CYTOKINES. *J Biol Chem* *273*, 4282-4287.
- Gupta, V., G. Yeo, H. Kawakubo, V. Rangnekar, P. Ramaswamy, T. Hayashida, D. T. MacLaughlin, P. K. Donahoe and S. Maheswaran (2007). Mullerian-Inhibiting Substance Induces Gro- $\beta$  Expression in Breast Cancer Cells through a Nuclear Factor- $\kappa$ B-Dependent and Smad1-Dependent Mechanism. *Cancer Res* *67*, 2747-2756.

- Gur, G., C. Rubin, M. Katz, I. Amit, A. Citri, J. Nilsson, N. Amariglio, R. Henriksson, G. Rechavi, H. Hedman, R. Wides and Y. Yarden (2004). LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *EMBO J* 23, 3270-3281.
- Gutierrez, M. C., S. Detre, S. Johnston, S. K. Mohsin, J. Shou, D. C. Allred, R. Schiff, C. K. Osborne and M. Dowsett (2005). Molecular Changes in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer: Relationship Between Estrogen Receptor, HER-2, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Clin Oncol* 23, 2469-2476.
- Guy, C. T., M. A. Webster, M. Schaller, T. J. Parsons, R. D. Cardiff and W. J. Muller (1992). Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 10578-10582.
- Guy, P. M., J. V. Platko, L. C. Cantley, R. A. Cerione and K. L. C. Iiitt (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8132-8136.
- Hackel, P. O., M. Gishizky and A. Ullrich (2005). Mig-6 Is a Negative Regulator of the Epidermal Growth Factor Receptor Signal. *Biol Chem* 382, 1649-1662.
- Haglund, K., S. Sigismund, S. Polo, I. Szymkiewicz, P. P. Di Fiore and I. Dikic (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5, 461-466.
- Hall, J. M. and K. S. Korach (2003). Stromal Cell-Derived Factor 1, a Novel Target of Estrogen Receptor Action, Mediates the Mitogenic Effects of Estradiol in Ovarian and Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology* 17: 792-803.
- Hall, J. M. and K. S. Korach (2012). Endocrine disrupting chemicals promote the growth of ovarian cancer cells via the ER-CXCL12-CXCR4 signaling axis. *Mol Carcinog*, n/a-n/a.
- Hall, J. M. and D. P. McDonnell (1999). The Estrogen Receptor  $\beta$ -Isoform (ER $\beta$ ) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER $\alpha$  Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinology* 140, 5566-5578.
- Hall, J. M., D. P. McDonnell and K. S. Korach (2002). Allosteric Regulation of Estrogen Receptor Structure, Function, and Coactivator Recruitment by Different Estrogen Response Elements. *Mol Endocrinol* 16, 469-486.
- Han, Y., J. Wang, T. He and R. M. Ransohoff (2001). TNF- $\alpha$  down-regulates CXCR4 expression in primary murine astrocytes. *Brain Res* 888, 1-10.
- Hao, L., C. Zhang, Y. Qiu, L. Wang, Y. Luo, M. Jin, Y. Zhang, T. B. Guo, K. Matsushima and Y. Zhang (2007). Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Lett* 253, 34-42.
- Haraldsen, G. and A. Rot (2006). Coy decoy with a new ploy: Interceptor controls the levels of homeostatic chemokines. *Eur J Immunol* 36, 1659-1661.
- Harari, D. and Y. Yarden (2000). Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19, 6102-6114.
- Haribabu, B., R. M. Richardson, I. Fisher, S. Sozzani, S. C. Peiper, R. Horuk, H. Ali and R. Snyderman (1997). Regulation of Human Chemokine Receptors CXCR4. *J Biol Chem* 272, 28726-28731.
- Haribabu, B., R. M. Richardson, I. Fisher, S. Sozzani, S. C. Peiper, R. Horuk, H. Ali and R. Snyderman (1997). Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *The Journal of biological chemistry* 272, 28726-28731.
- Harris, H. A. (2002). Characterization of the Biological Roles of the Estrogen Receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , in Estrogen Target Tissues in Vivo through the Use of an ER $\alpha$ -Selective Ligand. *Endocrinology* 143, 4172-4177.
- Harris, H. A. (2007). Estrogen Receptor- $\beta$ : Recent Lessons from in Vivo Studies. *Mol Endocrinol* 21, 1-13.

- Harris, H. A., L. M. Albert, Y. Leathurby, M. S. Malamas, R. E. Mewshaw, C. P. Miller, Y. P. Kharode, J. Marzolf, B. S. Komm, R. C. Winneker, D. E. Frail, R. A. Henderson, Y. Zhu and J. C. Keith, Jr. (2003). Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology* *144*, 4241-4249.
- Harris, S. E., R. J. Schwartz, M. J. Tsai, B. W. O'Malley and A. K. Roy (1976). Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct. In vitro transcription of the ovalbumin gene in chromatin. *J Biol Chem* *251*, 524-529.
- Hartman, J., A. Ström and J.-Å. Gustafsson (2009). Estrogen receptor beta in breast cancer—Diagnostic and therapeutic implications. *Steroids* *74*, 635-641.
- Hartmann, T. N., J. A. Burger, A. Glodek, N. Fujii and M. Burger (2005). CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* *24*, 4462-4471.
- Hartmann, T. N., V. Grabovsky, R. Pasvolsky, Z. Shulman, E. C. Buss, A. Spiegel, A. Nagler, T. Lapidot, M. Thelen and R. Alon (2008). A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol* *84*, 1130-1140.
- Hasegawa, A., M. Yasukawa, I. Sakai and S. Fujita (2001). Transcriptional Down-Regulation of CXC Chemokine Receptor 4 Induced by Impaired Association of Transcription Regulator YY1 with c-Myc in Human Herpesvirus 6-Infected Cells. *The Journal of Immunology* *166*, 1125-1131.
- Hassan, S., M. Buchanan, K. Jahan, A. Aguilar-Mahecha, L. Gaboury, W. J. Muller, Y. Alsawafi, A. A. Mourskaia, P. M. Siegel, O. Salvucci and M. Basik (2011). CXCR4 peptide antagonist inhibits primary breast tumor growth, metastasis and enhances the efficacy of anti-VEGF treatment or docetaxel in a transgenic mouse model. *Int J Cancer* *129*, 225-232.
- Hawse, J. R., M. Subramaniam, D. G. Monroe, A. H. Hemmingsen, J. N. Ingle, S. Khosla, M. J. Oursler and T. C. Spelsberg (2008). Estrogen Receptor  $\beta$  Isoform-Specific Induction of Transforming Growth Factor  $\beta$ -Inducible Early Gene-1 in Human Osteoblast Cells: An Essential Role for the Activation Function 1 Domain. *Mol Endocrinol* *22*, 1579-1595.
- Hay, R. T. (2005). SUMO: A History of Modification. *Mol Cell* *18*, 1-12.
- He, J., Y. Chen, M. Farzan, H. Choe, A. Ohagen, S. Gartner, J. Busciglio, X. Yang, W. Hofmann, W. Newman, C. R. Mackay, J. Sodroski and D. Gabuzda (1997). CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* *385*, 645-649.
- Hearn-Stokes, R., C. Mayers, C. Zahn, D. Cruess, J.-Å. Gustafsson, J. Segars and L. Nieman (2006). Expression of the proto-oncoprotein breast cancer nuclear receptor auxiliary factor (Brx) is altered in eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* *85*, 63-70.
- Hecht, I., L. Cahalon, R. Hershkoviz, A. Lahat, S. Franitza and O. Lider (2003). Heterologous desensitization of T cell functions by CCR5 and CXCR4 ligands: inhibition of cellular signaling, adhesion and chemotaxis. *Int Immunol* *15*, 29-38.
- Heinzel, T., R. M. Lavinsky, T.-M. Mullen, M. Soderstrom, C. D. Laherty, J. Torchia, W.-M. Yang, G. Brard, D. NgoSally, R. DavieJames, E. Seto, R. N. Eisenman, D. W. Rose, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (1997). A complex containing N-CoR, mSln3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* *387*, 43-48.
- Helbig, G., K. W. Christopherson, P. Bhat-Nakshatri, S. Kumar, H. Kishimoto, K. D. Miller, H. E. Broxmeyer and H. Nakshatri (2003). NF- $\kappa$  B Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis by Inducing the Expression of the Chemokine Receptor CXCR4. *J Biol Chem* *278*, 21631-21638.
- Helguero, L. A., M. H. Faulds, J.-A. Gustafsson and L.-A. Haldosen (2005). Estrogen receptors alpha (ER[alpha]) and beta (ER[beta]) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* *24*, 6605-6616.
- Hellyer, N. J., K. Cheng and J. G. Koland (1998). ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *The Biochemical journal* *333* ( Pt 3, 757-763.

- Henderson, B. E. and H. S. Feigelson (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 427-433.
- Hendler, F. J. and B. W. Ozanne (1984). Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *The Journal of Clinical Investigation* 74, 647-651.
- Hendrix, C. W., A. C. Collier, M. M. Lederman, D. Schols, R. B. Pollard, S. Brown, J. B. Jackson, R. W. Coombs, M. J. Glesby, C. W. Flexner, G. J. Bridger, K. Badel, R. T. MacFarland, G. W. Henson, G. Calandra and f. t. A. H. S. Group (2004). Safety, Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of AMD3100, a Selective CXCR4 Receptor Inhibitor, in HIV-1 Infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 37, 1253-1262.
- Henttu, P. M., E. Kalkhoven and M. G. Parker (1997). AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 17, 1832-1839.
- Herber, B., M. Truss, M. Beato and R. Müller (1994). Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* 9, 1295-1304.
- Hernandez, P. A., R. J. Gorlin, J. N. Lukens, S. Taniuchi, J. Bohinjec, F. Francois, M. E. Klotman and G. A. Diaz (2003). Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 34, 70-74.
- Herter-Sprie, G. S., H. Greulich and K.-K. Wong (2013). Activating mutations in ERBB2 and their impact on diagnostics and treatment. *Frontiers in Oncology* 3.
- Herynk, M. H. and S. A. W. Fuqua (2004). Estrogen Receptor Mutations in Human Disease. *Endocr Rev* 25, 869-898.
- Hesselgesser, J., M. Halks-Miller, V. DeVecchio, S. C. Peiper, J. Hoxie, D. L. Kolson, D. Taub and R. Horuk (1997). CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol* 7, 112-121.
- Hesselgesser, J., D. Taub, P. Baskar, M. Greenberg, J. Hoxie, D. L. Kolson and R. Horuk (1998). Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 $\alpha$  is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr Biol* 8, 595-598.
- Hill, S., L. Spriggs, M. Simon, H. Muraoka and D. Blask (1992). The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett* 64, 249-256.
- Hirata, S., T. Shoda, J. Kato and K. Hoshi (2001). The multiple untranslated first exons system of the human estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) gene. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 78, 33-40.
- Hiroshi, Y., T. Wenfu, D.-P. Patricia, A. Sylvain, A. Panomwat, S. May, W. Roberto, A. M. Alfredo, B. Michel and G. J. Silvio (2011). A Synthetic Biology Approach Reveals a CXCR4-G13-Rho Signaling Axis Driving Transendothelial Migration of Metastatic Breast Cancer Cells. *Sci Signal* 4, ra60.
- Hiscox, S., W. G. Jiang, K. Obermeier, K. Taylor, L. Morgan, R. Burmi, D. Barrow and R. I. Nicholson (2006). Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of  $\beta$ -catenin phosphorylation. *Int J Cancer* 118, 290-301.
- Holbro, T., R. R. Beerli, F. Maurer, M. Koziczak, C. F. Barbas and N. E. Hynes (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 8933-8938.
- Holbro, T., G. Civenni and N. E. Hynes (2003). The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284, 99-110.
- Holbro, T. and N. E. Hynes (2004). ErbB Receptors: Directing Key Signaling Networks Throughout Life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 195-217.
- Hollenberg, S., C. Weinberger, E. Ong, G. Cerelli, A. Oro, R. Lebo, E. Thompson, M. Rosenfeld and R. Evans (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.



- Holm, C., M. Kok, R. Michalides, R. Fles, R. H. T. Koornstra, J. Wesseling, M. Hauptmann, J. Neefjes, J. L. Peterse, O. Stål, G. Landberg and S. C. Linn (2009). Phosphorylation of the oestrogen receptor  $\alpha$  at serine 305 and prediction of tamoxifen resistance in breast cancer. *The Journal of Pathology* 217, 372-379.
- Holme, A. and S. Pervaiz (2007). Resveratrol in cell fate decisions. *J Bioenerg Biomembr* 39, 59-63.
- Hommelgaard, A. M., M. Lerdrup and B. van Deurs (2004). Association with Membrane Protrusions Makes ErbB2 an Internalization-resistant Receptor. *Mol Biol Cell* 15, 1557-1567.
- Hong, J., A. Katsha, P. Lu, Y. Shyr, A. Belkhiri and W. El-Rifai (2012). Regulation of ERBB2 receptor by t-DARPP mediates trastuzumab resistance in human esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 72, 4504-4514.
- Hong, X., F. Jiang, S. N. Kalkanis, Z. G. Zhang, X. P. Zhang, A. C. DeCarvalho, M. Katakowski, K. Bobbitt, T. Mikkelsen and M. Chopp (2006). SDF-1 and CXCR4 are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion. *Cancer Lett* 236, 39-45.
- Honma, N., R. Horii, T. Iwase, S. Saji, M. Younes, K. Takubo, M. Matsuura, Y. Ito, F. Akiyama and G. Sakamoto (2008). Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *J Clin Oncol* 26, 3727-3734.
- Hopper, N. A., J. Lee and P. W. Sternberg (2000). ARK-1 Inhibits EGFR Signaling in *C. elegans*. *Mol Cell* 6, 65-75.
- Horuk, R. (2001). Chemokines receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 313-335.
- Hsu, E. L., N. Chen, A. Westbrook, F. Wang, R. Zhang, R. T. Taylor and O. Hankinson (2008). CXCR4 and CXCL12 down-regulation: a novel mechanism for the chemoprotection of 3,3'-diindolylmethane for breast and ovarian cancers. *Cancer Lett* 265, 113-123.
- Hsu, E. L., N. Chen, A. Westbrook, F. Wang, R. Zhang, R. T. Taylor and O. Hankinson (2009). Modulation of CXCR4, CXCL12, and Tumor Cell Invasion Potential In Vitro by Phytochemicals. *J Oncol* 2009, 491985.
- Hu, P., T. Zhou, L. Qian, J. Wang, M. Shi, M. Yu, Y. Yang, X. Zhang, B. Shen and N. Guo (2006). Sequestering ErbB2 in endoplasmic reticulum by its autoinhibitor from translocation to cell surface: An autoinhibition mechanism of ErbB2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 19-27.
- Hua, S., C. B. Kallen, R. Dhar, M. T. Baquero, C. E. Mason, B. A. Russell, P. K. Shah, J. Liu, A. Khramtsov, M. S. Tretiakova, T. N. Krausz, O. I. Olopade, D. L. Rimm and K. P. White (2008). Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Mol Syst Biol* 4.
- Huang, H.-J., J. D. Norris and D. P. McDonnell (2002). Identification of a Negative Regulatory Surface within Estrogen Receptor  $\alpha$  Provides Evidence in Support of a Role for Corepressors in Regulating Cellular Responses to Agonists and Antagonists. *Mol Endocrinol* 16, 1778-1792.
- Huang, S., N. Ouyang, L. Lin, L. Chen, W. Wu, F. Su, Y. Yao and H. Yao (2012). HGF-Induced PKC $\zeta$  Activation Increases Functional CXCR4 Expression in Human Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 7, e29124.
- Huang, X., J. Shen, M. Cui, L. Shen, X. Luo, K. Ling, G. Pei, H. Jiang and K. Chen (2003). Molecular Dynamics Simulations on SDF-1 $\alpha$ : Binding with CXCR4 Receptor. *Biophys J* 84, 171-184.
- Hubbard, S. R. and J. H. Till (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 69, 373-398.
- Hubert, P. (2006). Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs. *Bull Cancer hors série*, 17-24.
- Huderson, B. P., T. T. Duplessis, C. C. Williams, H. C. Seger, C. G. Marsden, K. J. Pouey, S. M. Hill and B. G. Rowan (2012). Stable Inhibition of Specific Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) Phosphorylation Confers Increased Growth, Migration/Invasion, and Disruption of Estradiol Signaling in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 153, 4144-4159.

- Hudziak, R. M., J. Schlessinger and A. Ullrich (1987). Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *84*, 7159-7163.
- Hunter, T. and J. A. Cooper (1981). Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. *Cell* *24*, 741-752.
- Hyams, D., A. Chan, C. Oliveira, R. Snyder, J. Vinholes, M. W. Audeh, V. Alencar, J. Lombard, B. Mookerjee, J. Xu, K. Brown and P. Klein (2013). Cediranib in combination with fulvestrant in hormone-sensitive metastatic breast cancer: a randomized Phase II study. *Invest New Drugs*, 1-10.
- Hyatt, P., K. Bhatt and J. Tait (1983). Steroid biosynthesis by zona fasciculata and zona reticularis cells purified from the mammalian adrenal cortex. *J Steroid Biochem* *19*, 953-959.
- Hyatt, P. J., J. B. G. Bell, K. Bhatt and J. F. Tait (1983). Preparation and steroidogenic properties of purified zona fasciculata and zona reticularis cells from the guinea-pig adrenal gland. *J Endocrinol* *96*, 1-NP.
- Hynes, N. E., K. Horsch, M. A. Olayioye and A. Badache (2001). The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocrine-Related Cancer* *8*, 151-159.
- Ikeda, K., S. Ogawa, T. Tsukui, K. Horie-Inoue, Y. Ouchi, S. Kato, M. Muramatsu and S. Inoue (2004). Protein Phosphatase 5 Is a Negative Regulator of Estrogen Receptor-Mediated Transcription. *Mol Endocrinol* *18*, 1131-1143.
- Ikeda, M., E. C. Wilcox and W. W. Chin (1996). Different DNA Elements Can Modulate the Conformation of Thyroid Hormone Receptor Heterodimer and Its Transcriptional Activity. *J Biol Chem* *271*, 23096-23104.
- Imamov, O., G.-J. Shim, M. Warner and J.-Å. Gustafsson (2005). Estrogen Receptor beta in Health and Disease. *Biol Reprod* *73*, 866-871.
- Imhof, M. O. and D. P. McDonnell (1996). Yeast RSP5 and its human homolog hRPF1 potentiate hormone-dependent activation of transcription by human progesterone and glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* *16*, 2594-2605.
- Imitola, J., K. Raddassi, K. I. Park, F.-J. Mueller, M. Nieto, Y. D. Teng, D. Frenkel, J. Li, R. L. Sidman, C. A. Walsh, E. Y. Snyder and S. J. Khoury (2004). Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 $\alpha$ /CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *101*, 18117-18122.
- Infantino, S., B. Moepps and M. Thelen (2006). Expression and Regulation of the Orphan Receptor RDC1 and Its Putative Ligand in Human Dendritic and B Cells. *The Journal of Immunology* *176*, 2197-2207.
- Inoue, A., N. Yoshida, Y. Omoto, S. Oguchi, T. Yamori, R. Kiyama and S. Hayashi (2002). Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol* *29*, 175-192.
- Ishimura, K. and H. Fujita (1997). Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes. *Microsc Res Tech* *36*, 445-453.
- Ito, M., C.-X. Yuan, S. Malik, W. Gu, J. D. Fondell, S. Yamamura, Z.-Y. Fu, X. Zhang, J. Qin and R. G. Roeder (1999). Identity between TRAP and SMCC Complexes Indicates Novel Pathways for the Function of Nuclear Receptors and Diverse Mammalian Activators. *Mol Cell* *3*, 361-370.
- Iwao, K., Y. Miyoshi, C. Egawa, N. Ikeda and S. Noguchi (2000). Quantitative analysis of estrogen receptor- $\beta$  mRNA and its variants in human breast cancers. *Int J Cancer* *88*, 733-736.
- Jackson, T. A., J. K. Richer, D. L. Bain, G. S. Takimoto, L. Tung and K. B. Horwitz (1997). The Partial Agonist Activity of Antagonist-Occupied Steroid Receptors Is Controlled by a Novel Hinge Domain-Binding Coactivator L7/SPA and the Corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* *11*, 693-705.

- Jacob, F. and J. Monod (1961). Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. *J Mol Biol* 3, 218-356.
- Janknecht, R. and A. Nordheim (1996). MAP Kinase-Dependent Transcriptional Coactivation by Elk-1 and Its Cofactor CBP. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 831-837.
- Jauliac, S., C. Lopez-Rodriguez, L. M. Shaw, L. F. Brown, A. Rao and A. Toker (2002). The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 4, 540-544.
- Jelovac, D., G. Sabnis, B. J. Long, L. Macedo, O. G. Goloubeva and A. M. H. Brodie (2005). Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Xenografts and Cells during Prolonged Treatment with Aromatase Inhibitor Letrozole. *Cancer Res* 65, 5380-5389.
- Jeng, M., W. Yue, A. Eischeid, J. Wang and R. Santen (2000). Role of MAP kinase in the enhanced cell proliferation of long term estrogen deprived human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 62, 167-175.
- Jensen, E. V., G. Cheng, C. Palmieri, S. Saji, S. Mäkelä, S. Van Noorden, T. Wahlström, M. Warner, R. C. Coombes and J.-Å. Gustafsson (2001). Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 15197-15202.
- Jensen, E. V. and V. C. Jordan (2003). The Estrogen Receptor: A Model for Molecular Medicine. *Clin Cancer Res* 9, 1980-1989.
- Jepsen, K., O. Hermanson, T. M. Onami, A. S. Gleiberman, V. Lunnyak, R. J. McEvilly, R. Kurokawa, V. Kumar, F. Liu, E. Seto, S. M. Hedrick, G. Mandel, C. K. Glass, D. W. Rose and M. G. Rosenfeld (2000). Combinatorial Roles of the Nuclear Receptor Corepressor in Transcription and Development. *Cell* 102, 753-763.
- Jepson, S., M. Komatsu, B. Haq, M. E. Arango, D. Huang, C. A. Carothers Carraway and K. L. Carraway (2002). Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27kip, but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinaseB/Akt pathways. *Oncogene* 21, 7524-7532.
- Jeter, C. R., B. Liu, X. Liu, X. Chen, C. Liu, T. Calhoun-Davis, J. Repass, H. Zaehres, J. J. Shen and D. G. Tang (2011). NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* 30, 3833-3845.
- Ji-Kun, L., Y. Liang, S. Yun, Z. Li-Sheng, W. Yi-Cheng and Z. Jian-Hai (2008). Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 14, 2308-2313.
- Jiang, W., P. Zhou, S. M. Kahn, N. Tomita, M. D. Johnson and I. B. Weinstein (1994). Molecular Cloning of TPAR1, a Gene Whose Expression Is Repressed by the Tumor Promoter 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate (TPA). *Exp Cell Res* 215, 284-293.
- Jiang, X. and A. Sorkin (2003). Epidermal Growth Factor Receptor Internalization through Clathrin-Coated Pits Requires Cbl RING Finger and Proline-Rich Domains But Not Receptor Polyubiquitylation. *Traffic* 4, 529-543.
- Jin, F., U. Brockmeier, F. Otterbach and E. Metzen (2012). New Insight into the SDF-1/CXCR4 Axis in a Breast Carcinoma Model: Hypoxia-Induced Endothelial SDF-1 and Tumor Cell CXCR4 Are Required for Tumor Cell Intravasation. *Molecular Cancer Research* 10, 1021-1031.
- Jin, Y., Z. Desta, V. Stearns, B. Ward, H. Ho, K.-H. Lee, T. Skaar, A. M. Storniolo, L. Li, A. Araba, R. Blanchard, A. Nguyen, L. Ullmer, J. Hayden, S. Lemler, R. M. Weinshilboum, J. M. Rae, D. F. Hayes and D. A. Flockhart (2005). CYP2D6 Genotype, Antidepressant Use, and Tamoxifen Metabolism During Adjuvant Breast Cancer Treatment. *J Natl Cancer Inst* 97, 30-39.
- Joel, P. B., J. Smith, T. W. Sturgill, T. L. Fisher, J. Blenis and D. A. Lannigan (1998). pp90rsk1 Regulates Estrogen Receptor-Mediated Transcription through Phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol* 18, 1978-1984.

- Johansson, L., A. Båvner, J. S. Thomsen, M. Färnegårdh, J.-Å. Gustafsson and E. Treuter (2000). The Orphan Nuclear Receptor SHP Utilizes Conserved LXXLL-Related Motifs for Interactions with Ligand-Activated Estrogen Receptors. *Mol Cell Biol* 20, 1124-1133.
- Johansson, L., J. S. Thomsen, A. E. Damdimopoulos, G. Spyrou, J.-Å. Gustafsson and E. Treuter (1999). The Orphan Nuclear Receptor SHP Inhibits Agonist-dependent Transcriptional Activity of Estrogen Receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *J Biol Chem* 274, 345-353.
- Johnston, S. R. D. and M. Dowsett (2003). Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer* 3, 821-831.
- Jones, F. E. and D. F. Stern (1999). Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene* 18, 3481-3490.
- Jones, F. E., T. Welte, X.-Y. Fu and D. F. Stern (1999). ErbB4 Signaling in the Mammary Gland Is Required for Lobuloalveolar Development and Stat5 Activation during Lactation. *The Journal of Cell Biology* 147, 77-88.
- Jones, S. W., S. M. V. Brockbank, M. L. Mobbs, N. J. Le Good, S. Soma-Haddrick, A. J. Heuze, C. J. Langham, D. Timms, P. Newham and M. R. C. Needham (2006). The orphan G-protein coupled receptor RDC1: evidence for a role in chondrocyte hypertrophy and articular cartilage matrix turnover. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 597-608.
- Joo, E.-K., H. E. Broxmeyer, H.-J. Kwon, H. B. Kang, J. S. Kim, J. S. Lim, Y.-K. Choe, I. S. Choe, P. K. Myung and Y. Lee (2004). Enhancement of Cell Survival by Stromal Cell-Derived Factor-1/CXCL12 Involves Activation of CREB and Induction of Mcl-1 and c-Fos in Factor-Dependent Human Cell Line MO7e Stem Cells and Development 13, 563-570.
- Jordan, N., J. Gee, D. Barrow, A. Wakeling and R. Nicholson (2004). Increased constitutive activity of PKB/Akt in tamoxifen resistant breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 2, 167-180.
- Jordan, V. C. (2003). Antiestrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators as Multifunctional Medicines. 1. Receptor Interactions. *J Med Chem* 46, 883-908.
- Jordan, V. C. (2003). Antiestrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators as Multifunctional Medicines. 2. Clinical Considerations and New Agents. *J Med Chem* 46, 1081-1111.
- Jordan, V. C. (2004). Aromatase inhibitors that regulate estrogen target tissues selectively? *Bone* 34, 372-375.
- Jordan, V. C. and B. W. O'Malley (2007). Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol* 25, 5815-5824.
- Jorissen, R. N., F. Walker, N. Pouliot, T. P. J. Garrett, C. W. Ward and A. W. Burgess (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284, 31-53.
- Jourdan, P., J.-P. Vendrell, M.-F. Huguet, M. Segondy, J. Bousquet, J. Pène and H. Yssel (2000). Cytokines and Cell Surface Molecules Independently Induce CXCR4 Expression on CD4+CCR7+ Human Memory T Cells. *The Journal of Immunology* 165, 716-724.
- Justman, Q. A. and G. M. Clinton (2002). Herstatin, an Autoinhibitor of the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Tyrosine Kinase, Modulates Epidermal Growth Factor Signaling Pathways Resulting in Growth Arrest. *J Biol Chem* 277, 20618-20624.
- Kahlert, S., S. Nuedling, M. van Eickels, H. Vetter, R. Meyer and C. Grohé (2000). Estrogen Receptor  $\alpha$  Rapidly Activates the IGF-1 Receptor Pathway. *J Biol Chem* 275, 18447-18453.
- Kahn, J., T. Byk, L. Jansson-Sjostrand, I. Petit, S. Shvitiel, A. Nagler, I. Hardan, V. Deutsch, Z. Gazit, D. Gazit, S. Karlsson and T. Lapidot (2004). Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation. *Blood* 103, 2942-2949.

- Kajiyama, H., K. Shibata, K. Ino, A. Nawa, S. Mizutani and F. Kikkawa (2007). Possible involvement of SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-DPP-IV axis in TGF- $\beta$ 1-induced enhancement of migratory potential in human peritoneal mesothelial cells. *Cell Tissue Res* 330, 221-229.
- Kalatskaya, I., Y. A. Berchiche, S. Gravel, B. J. Limberg, J. S. Rosenbaum and N. Heveker (2009). AMD3100 Is a CXCR7 Ligand with Allosteric Agonist Properties. *Mol Pharmacol* 75, 1240-1247.
- Kamat, A., M. M. Hinshelwood, B. A. Murry and C. R. Mendelson (2002). Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13, 122-128.
- Kanda, N. and S. Watanabe (2003). 17[ $\beta$ ]-Estradiol Enhances the Production of Nerve Growth Factor in THP-1-Derived Macrophages or Peripheral Blood Monocyte-Derived Macrophages. *121*, 771-780.
- Kanda, N. and S. Watanabe (2003). 17[ $\beta$ ]-Estradiol Inhibits Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Keratinocytes by Promoting Bcl-2 Expression. *121*, 1500-1509.
- Kanda, N. and S. Watanabe (2004). 17[ $\beta$ ]-Estradiol Stimulates the Growth of Human Keratinocytes by Inducing Cyclin D2 Expression. *J Invest Dermatol* 123, 319-328.
- Kargı, A., Z. A. Dinç, O. Başok and A. Üçvet (2006). MUC4 expression and its relation to ErbB2 expression, apoptosis, proliferation, differentiation, and tumor stage in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Pathology - Research and Practice* 202, 577-583.
- Karin, M. (1995). The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-activated Protein Kinases. *J Biol Chem* 270, 16483-16486.
- Karlsön, P. (1963). New concepts on the mode of action of hormones. *Perspect Biol Med* 6, 203-214.
- Karlsön, P. and H. Hoffmeister (1963). On the biogenesis of ecdyson. I. Conversion of cholesterol into ecdyson. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 331, 289-300.
- Karunakaran, D., E. Tzahar, R. Beerli, X. Chen, D. Graus-Porta, B. Ratzkin, R. Seger, N. Hynes and Y. Yarden (1996). ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 15, 254-264.
- Kasina, S. and J. A. Macoska (2012). The CXCL12/CXCR4 axis promotes ligand-independent activation of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 351, 249-263.
- Kato, S. (2001). Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer* 8, 3-9.
- Kato, S., H. Endoh, Y. Masuhiro, T. Kitamoto, S. Uchiyama, H. Sasaki, S. Masushige, Y. Gotoh, E. Nishida, H. Kawashima, r. D. Metzger and P. Chambon (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.
- Kato, S., H. Endoh, Y. Masuhiro, T. Kitamoto, S. Uchiyama, H. Sasaki, S. Masushige, Y. Gotoh, E. Nishida, H. Kawashima, D. Metzger and P. Chambon (1995). Activation of the Estrogen Receptor Through Phosphorylation by Mitogen-Activated Protein Kinase. *Science* 270, 1491-1494.
- Kato, S., L. Tora, J. Yamauchi, S. Masushige, M. Bellard and P. Chambon (1992). A far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically. *Cell* 68, 731-742.
- Kawagoe, J., M. Ohmichi, T. Takahashi, C. Ohshima, S. Mabuchi, K. Takahashi, H. Igarashi, A. Mori-Abe, M. Saitoh, B. Du, T. Ohta, A. Kimura, S. Kyo, M. Inoue and H. Kurachi (2003). Raloxifene Inhibits Estrogen-induced Up-regulation of Telomerase Activity in a Human Breast Cancer Cell Line. *J Biol Chem* 278, 43363-43372.
- Kawai, T. and H. L. Malech (2009). WHIM Syndrome: Congenital Immune Deficiency Disease. *Curr Opin Hematol* 16, 20-26.
- Kayes-Wandover, K. M. and P. C. White (2000). Steroidogenic Enzyme Gene Expression in the Human Heart. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2519-2525.

- Kew, T. Y., J. A. Bell, S. E. Pinder, H. Denley, R. Srinivasan, W. J. Gullick, R. I. Nicholson, R. W. Blamey and I. O. Ellis (2000). c-erbB-4 protein expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 82, 1163-1170.
- Khaleque, M. A., A. Bharti, J. Gong, P. J. Gray, V. Sachdev, D. R. Ciocca, A. Stati, M. Fanelli and S. K. Calderwood (2007). Heat shock factor 1 represses estrogen-dependent transcription through association with MTA1. *Oncogene* 27, 1886-1893.
- Khoury, H., M. A. Naujokas, D. Zuo, V. Sangwan, M. M. Frigault, S. Petkiewicz, D. L. Dankort, W. J. Muller and M. Park (2005). HGF Converts ErbB2/Neu Epithelial Morphogenesis to Cell Invasion. *Mol Biol Cell* 16, 550-561.
- Kian Tee, M., I. Rogatsky, C. Tzagarakis-Foster, A. Cvorov, J. An, R. J. Christy, K. R. Yamamoto and D. C. Leitman (2004). Estradiol and Selective Estrogen Receptor Modulators Differentially Regulate Target Genes with Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Mol Biol Cell* 15, 1262-1272.
- Kiefer, T. L., L. Lai, L. Yuan, C. Dong, M. E. Burow and S. M. Hill (2005). Differential regulation of estrogen receptor alpha, glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor alpha transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins. *J Pineal Res* 38, 231-239.
- Kim, M. Y., L. J. Trudel and G. N. Wogan (2009). Apoptosis Induced by Capsaicin and Resveratrol in Colon Carcinoma Cells Requires Nitric Oxide Production and Caspase Activation. *Anticancer Res* 29, 3733-3740.
- Kim, M. Y., E. M. Woo, Y. T. E. Chong, D. R. Homenko and W. L. Kraus (2006). Acetylation of Estrogen Receptor  $\alpha$  by p300 at Lysines 266 and 268 Enhances the Deoxyribonucleic Acid Binding and Transactivation Activities of the Receptor. *Mol Endocrinol* 20, 1479-1493.
- Kino, T., E. Souvatzoglou, E. Charmandari, T. Ichijo, P. Driggers, C. Mayers, A. Alatsatianos, I. Manoli, H. Westphal, G. P. Chrousos and J. H. Segars (2006). Rho Family Guanine Nucleotide Exchange Factor Brx Couples Extracellular Signals to the Glucocorticoid Signaling System. *J Biol Chem* 281, 9118-9126.
- Kishimoto, H., Z. Wang, P. Bhat-Nakshatri, D. Chang, R. Clarke and H. Nakshatri (2005). The p160 family coactivators regulate breast cancer cell proliferation and invasion through autocrine/paracrine activity of SDF-1 $\alpha$ /CXCL12. *Carcinogenesis* 26, 1706-1715.
- Klein-Hitpaß, L., M. Schorpp, U. Wagner and G. U. Ryffel (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* 46, 1053-1061.
- Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29, 2905-2919.
- Klinge, C. M., D. L. Bodenner, D. Desai, R. M. Niles and A. M. Traish (1997). Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro. *Nucleic Acids Res* 25, 1903-1912.
- Knighton, D. R., D. L. Cadena, J. Zheng, L. F. Ten Eyck, S. S. Taylor, J. M. Sowadski and G. N. Gill (1993). Structural features that specify tyrosine kinase activity deduced from homology modeling of the epidermal growth factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 5001-5005.
- Knowlden, J. M., I. R. Hutcheson, D. Barrow, J. M. W. Gee and R. I. Nicholson (2005). Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Signaling in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer: A Supporting Role to the Epidermal Growth Factor Receptor. *Endocrinology* 146, 4609-4618.
- Knowlden, J. M., I. R. Hutcheson, H. E. Jones, T. Madden, J. M. W. Gee, M. E. Harper, D. Barrow, A. E. Wakeling and R. I. Nicholson (2003). Elevated Levels of Epidermal Growth Factor Receptor/c-erbB2 Heterodimers Mediate an Autocrine Growth Regulatory Pathway in Tamoxifen-Resistant MCF-7 Cells. *Endocrinology* 144, 1032-1044.
- Ko, L., G. R. Cardona, T. Iwasaki, K. S. Bramlett, T. P. Burris and W. W. Chin (2002). Ser-884 Adjacent to the LXXLL Motif of Coactivator TRBP Defines Selectivity for ERs and TRs. *Mol Endocrinol* 16, 128-140.

- Koehler, K. F., L. A. Helguero, L.-A. Haldosén, M. Warner and J.-Å. Gustafsson (2005). Reflections on the Discovery and Significance of Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocr Rev* 26, 465-478.
- Kok, M., C. Holm-Wigerup, M. Hauptmann, R. Michalides, O. Stål, S. Linn and G. Landberg (2009). Estrogen Receptor- $\alpha$  Phosphorylation at Serine-118 and Tamoxifen Response in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 101, 1725-1729.
- Kok, M., W. Zwart, C. Holm, R. Fles, M. Hauptmann, L. Van't Veer, L. A. Wessels, J. Neefjes, O. Stål, S. Linn, G. Landberg and R. Michalides (2011). PKA-induced phosphorylation of ER $\alpha$  at serine 305 and high PAK1 levels is associated with sensitivity to tamoxifen in ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 125, 1-12.
- Kokai, Y., J. N. Myers, T. Wada, V. I. Brown, C. M. LeVea, J. G. Davis, K. Dobashi and M. I. Greene (1989). Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell* 58, 287-292.
- Kondoh, K., N. Tsuji, K. Asanuma, D. Kobayashi and N. Watanabe (2007). Inhibition of estrogen receptor  $\beta$ -mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription via the suppression of mitogen-activated protein kinase signaling plays an important role in 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in cancer cells. *Exp Cell Res* 313, 3486-3496.
- Koš, M., G. Reid, S. Denger and F. Gannon (2001). Minireview: Genomic Organization of the Human ER $\alpha$  Gene Promoter Region. *Mol Endocrinol* 15, 2057-2063.
- Kousteni, S., T. Bellido, L. I. Plotkin, C. A. O'Brien, D. L. Bodenner, L. Han, K. Han, G. B. DiGregorio, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen, P. K. Roberson, R. S. Weinstein, R. L. Jilka and S. C. Manolagas (2001). Nongenotropic, Sex-Nonspecific Signaling through the Estrogen or Androgen Receptors: Dissociation from Transcriptional Activity. *Cell* 104, 719-730.
- Kousteni, S., J.-R. Chen, T. Bellido, L. Han, A. A. Ali, C. A. O'Brien, L. Plotkin, Q. Fu, A. T. Mancino, Y. Wen, A. M. Vertino, C. C. Powers, S. A. Stewart, R. Ebert, A. M. Parfitt, R. S. Weinstein, R. L. Jilka and S. C. Manolagas (2002). Reversal of Bone Loss in Mice by Nongenotropic Signaling of Sex Steroids. *Science* 298, 843-846.
- Kousteni, S., L. Han, J.-R. Chen, M. Almeida, L. I. Plotkin, T. Bellido and S. C. Manolagas (2003). Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *The Journal of Clinical Investigation* 111, 1651-1664.
- Kouzu-Fujita, M., Y. Mezaki, S. Sawatsubashi, T. Matsumoto, I. Yamaoka, T. Yano, Y. Taketani, H. Kitagawa and S. Kato (2009). Coactivation of Estrogen Receptor  $\beta$  by Gonadotropin-Induced Cofactor GIOT-4. *Mol Cell Biol* 29, 83-92.
- Kraichely, D. M., J. Sun, J. A. Katzenellenbogen and B. S. Katzenellenbogen (2000). Conformational Changes and Coactivator Recruitment by Novel Ligands for Estrogen Receptor- $\alpha$  and Estrogen Receptor- $\beta$ : Correlations with Biological Character and Distinct Differences among SRC Coactivator Family Members. *Endocrinology* 141, 3534-3545.
- Kraus, M., N. Popescu, S. Amsbaugh and C. King (1987). Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J* 3, 605-610.
- Krege, J. H., J. B. Hodgkin, J. F. Couse, E. Enmark, M. Warner, J. F. Mahler, M. Sar, K. S. Korach, J.-Å. Gustafsson and O. Smithies (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor  $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 15677-15682.
- Kressler, D., S. N. Schreiber, D. Knutti and A. Kralli (2002). The PGC-1-related Protein PERC Is a Selective Coactivator of Estrogen Receptor  $\alpha$ . *J Biol Chem* 277, 13918-13925.
- Krupnick, J. G. and J. L. Benovic (1998). THE ROLE OF RECEPTOR KINASES AND ARRESTINS IN G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR REGULATION. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319.

- Kubarek, L. and P. P. Jagodzinski (2007). Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 beta-estradiol and tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 581, 1441-1448.
- Kubarek, L., A. Kozłowska, M. Przybylski, M. Lianeri and P. P. Jagodzinski (2009). Down-regulation of CXCR4 expression by tamoxifen is associated with DNA methyltransferase 3B up-regulation in MCF-7 breast cancer cells. *Biomed Pharmacother* 63, 586-591.
- Kucia, M., R. Reza, K. Miekus, J. Wanzeck, W. Wojakowski, A. Janowska-Wieczorek, J. Ratajczak and M. Z. Ratajczak (2005). Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 23, 879-894.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 5925-5930.
- Kukreja, P., A. B. Abdel-Mageed, D. Mondal, K. Liu and K. C. Agrawal (2005). Up-regulation of CXCR4 Expression in PC-3 Cells by Stromal-Derived Factor-1 $\alpha$  (CXCL12) Increases Endothelial Adhesion and Transendothelial Migration: Role of MEK/ERK Signaling Pathway-Dependent NF- $\kappa$ B Activation. *Cancer Res* 65, 9891-9898.
- Kulbe, H., N. Levinson, I. F. Balkwil and J. Wilson (2004). The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement. *Int J Dev Biol* 48, 489-496.
- Kumar, R., B. Johnson and E. Thompson (2004). Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormone receptors. *Essays Biochem*, 27-39.
- Kumar, R. and G. Litwack (2009). Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids* 74, 877-883.
- Kumar, R., M. Mandal, A. Lipton, H. Harvey and C. B. Thompson (1996). Overexpression of HER2 modulates bcl-2, bcl-XL, and tamoxifen-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2, 1215-1219.
- Kumar, R. and E. B. Thompson (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310-319.
- Kumar, R. and E. B. Thompson (2003). Transactivation Functions of the N-Terminal Domains of Nuclear Hormone Receptors: Protein Folding and Coactivator Interactions. *Mol Endocrinol* 17, 1-10.
- Kumar, R., R.-A. Wang, A. Mazumdar, A. H. Talukder, M. Mandal, Z. Yang, R. Bagheri-Yarmand, A. Sahin, G. Hortobagyi, L. Adam, C. J. Barnes and R. K. Vadlamudi (2002). A naturally occurring MTA1 variant sequesters oestrogen receptor-[alpha] in the cytoplasm. *Nature* 418, 654-657.
- Kumar, R. and R. Yarmand-Bagheri (2001). The role of HER2 in angiogenesis. *Semin Oncol* 28, 27-32.
- Kunkel, S. and N. Godessart (2002). Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics. *Autoimmun Rev* 1, 313-320.
- Kuppers, R. (2009). The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 9, 15-27.
- Kwon, K. Y., J. Y. Ro, N. Singhal, D. E. Killen, A. Sienko, T. C. Allen, D. S. Zander, R. Barrios, A. Haque and P. T. Cagle (2007). MUC4 Expression in Non-Small Cell Lung Carcinomas: Relationship to Tumor Histology and Patient Survival. *Arch Pathol Lab Med* 131, 593-598.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski and W. A. Hendrickson (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648-659.
- Labrie, F., V. Luu-The, S. Lin, J. Simard, C. Labrie, M. El-Alfy, G. Pelletier and A. Belanger (2000). Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol* 25, 1-16.



- Lacroix, M. and G. Leclercq (2004). About GATA3, HNF3A, and XBP1, three genes co-expressed with the oestrogen receptor- $\alpha$  gene (ESR1) in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 219, 1-7.
- Laederich, M. B., M. Funes-Duran, L. Yen, E. Ingalla, X. Wu, K. L. Carraway and C. Sweeney (2004). The Leucine-rich Repeat Protein LRIG1 Is a Negative Regulator of ErbB Family Receptor Tyrosine Kinases. *J Biol Chem* 279, 47050-47056.
- Laherty, C. D., A. N. Billin, R. M. Lavinsky, G. S. Yochum, A. C. Bush, J.-M. Sun, T.-M. Mullen, J. R. Davie, D. W. Rose, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, D. E. Ayer and R. N. Eisenman (1998). SAP30, a Component of the mSin3 Corepressor Complex Involved in N-CoR-Mediated Repression by Specific Transcription Factors. *Mol Cell* 2, 33-42.
- Lahlou, H., T. Müller, V. Sanguin-Gendreau, C. Birchmeier and W. J. Muller (2012). Uncoupling of PI3K from ErbB3 Impairs Mammary Gland Development but Does Not Impact on ErbB2-Induced Mammary Tumorigenesis. *Cancer Res* 72, 3080-3090.
- Laños, I., F. Journé, D. Nonclercq, D. S. Vidal, R.-A. Toillon, G. Laurent and G. Leclercq (2005). Role of the proteasome in the regulation of estrogen receptor  $\alpha$  turnover and function in MCF-7 breast carcinoma cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 94, 347-359.
- Lam, H.-M., C. V. Suresh Babu, J. Wang, Y. Yuan, Y.-W. Lam, S.-M. Ho and Y.-K. Leung (2012). Phosphorylation of human estrogen receptor-beta at serine 105 inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Mol Cell Endocrinol* 358, 27-35.
- Lam, P., L. Burga, B. Wu, E. Hofstatter, K. Lu and G. Wulf (2008). Prolyl isomerase Pin1 is highly expressed in Her2-positive breast cancer and regulates erbB2 protein stability. *Molecular Cancer* 7, 91.
- Lammers, R., B. Bossenmaier, D. E. Cool, N. K. Tonks, J. Schlessinger, E. H. Fischer and A. Ullrich (1993). Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J Biol Chem* 268, 22456-22462.
- Lane, H. A., I. Beuvink, A. B. Motoyama, J. M. Daly, R. M. Neve and N. E. Hynes (2000). ErbB2 Potentiates Breast Tumor Proliferation through Modulation of p27Kip1-Cdk2 Complex Formation: Receptor Overexpression Does Not Determine Growth Dependency. *Mol Cell Biol* 20, 3210-3223.
- Lannigan, D. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68, 1-9.
- Lapidot, T., A. Dar and O. Kollet (2005). How do stem cells find their way home? *Blood* 106, 1901-1910.
- Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. Zhang, J. A. Holt, S. S. G. Ferguson, M. G. Caron and L. S. Barak (1999). The  $\beta$ 2-adrenergic receptor/ $\beta$ arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 3712-3717.
- Lapteva, N., A.-G. Yang, D. E. Sanders, R. W. Strube and S.-Y. Chen (2004). CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. *Cancer Gene Ther* 12, 84-89.
- Lataillade, J.-J., D. Clay, P. Bourin, F. Hérodin, C. Dupuy, C. Jasmin and M.-C. Le Bousse-Kerdilès (2002). Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G0/G1 transition in CD34+ cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood* 99, 1117-1129.
- Laurence, J. S., C. Blanpain, A. De Leener, M. Parmentier and P. J. LiWang (2001). Importance of Basic Residues and Quaternary Structure in the Function of MIP-1 $\beta$ : CCR5 Binding and Cell Surface Sugar Interactions†. *Biochemistry (Mosc)* 40, 4990-4999.
- Lavinsky, R. M., K. Jepsen, T. Heinzl, J. Torchia, T.-M. Mullen, R. Schiff, A. L. Del-Rio, M. Ricote, S. Ngo, J. Gemsch, S. G. Hilsenbeck, C. K. Osborne, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld and D. W. Rose (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 2920-2925.
- Lazennec, G., D. Bresson, A. Lucas, C. Chauveau and F. Vignon (2001). ER $\beta$  Inhibits Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 142, 4120-4130.

- Le Romancer, M., I. Treilleux, K. Bouchekioua-Bouzaghoul, S. Sentis and L. Corbo (2010). Methylation, a key step for nongenomic estrogen signaling in breast tumors. *Steroids* 75, 560-564.
- Le Romancer, M., I. Treilleux, N. Leconte, Y. Robin-Lespinasse, S. Sentis, K. Bouchekioua-Bouzaghoul, S. Goddard, S. Gobert-Gosse and L. Corbo (2008). Regulation of Estrogen Rapid Signaling through Arginine Methylation by PRMT1. *Mol Cell* 31, 212-221.
- Lecomte, J., S. Flament, S. Salamone, M. Boisbrun, S. Mazerbourg, Y. Chapleur and I. Grillier-Vuissoz (2008). Disruption of ERalpha signalling pathway by PPARgamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 112, 437-451.
- Lee-Hoeflich, S. T., L. Crocker, E. Yao, T. Pham, X. Munroe, K. P. Hoeflich, M. X. Sliwkowski and H. M. Stern (2008). A Central Role for HER3 in HER2-Amplified Breast Cancer: Implications for Targeted Therapy. *Cancer Res* 68, 5878-5887.
- Lee, B.-C., T.-H. Lee, R. Zagozdzon, S. Avraham, A. Usheva and H. K. Avraham (2005). Carboxyl-Terminal Src Kinase Homologous Kinase Negatively Regulates the Chemokine Receptor CXCR4 through YY1 and Impairs CXCR4/CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ )-Mediated Breast Cancer Cell Migration. *Cancer Res* 65, 2840-2845.
- Lee, H., R. W. Akita, M. X. Sliwkowski and N. J. Maimle (2001). A Naturally Occurring Secreted Human ErbB3 Receptor Isoform Inhibits Heregulin-stimulated Activation of ErbB2, ErbB3, and ErbB4. *Cancer Res* 61, 4467-4473.
- Lee, J. C., I. Vivanco, R. Beroukhi, J. H. Y. Huang, W. L. Feng, R. M. DeBiasi, K. Yoshimoto, J. C. King, P. Nghiemphu, Y. Yuza, Q. Xu, H. Greulich, R. K. Thomas, J. G. Paez, T. C. Peck, D. J. Linhart, K. A. Glatt, G. Getz, R. Onofrio, L. Ziaugra, R. L. Levine, S. Gabriel, T. Kawaguchi, K. O'Neill, H. Khan, L. M. Liao, S. F. Nelson, P. N. Rao, P. Mischel, R. O. Pieper, T. Cloughesy, D. J. Leahy, W. R. Sellers, C. L. Sawyers, M. Meyerson and I. K. Mellinghoff (2006). Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Glioblastoma through Novel Missense Mutations in the Extracellular Domain. *PLoS Med* 3, e485.
- Lee, J. W., Y. H. Soung, S. H. Seo, S. Y. Kim, C. H. Park, Y. P. Wang, K. Park, S. W. Nam, W. S. Park, S. H. Kim, J. Y. Lee, N. J. Yoo and S. H. Lee (2006). Somatic Mutations of ERBB2 Kinase Domain in Gastric, Colorectal, and Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res* 12, 57-61.
- Lee, K.-F., H. Simon, H. Chen, B. Bates, M.-C. Hung and C. Hauser (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394-398.
- Lee, R. J., C. Albanese, M. Fu, M. D'Amico, B. Lin, G. Watanabe, G. K. Haines, P. M. Siegel, M.-C. Hung, Y. Yarden, J. M. Horowitz, W. J. Muller and R. G. Pestell (2000). Cyclin D1 Is Required for Transformation by Activated Neu and Is Induced through an E2F-Dependent Signaling Pathway. *Mol Cell Biol* 20, 672-683.
- Leers, J., E. Treuter and J.-Å. Gustafsson (1998). Mechanistic Principles in NR Box-Dependent Interaction between Nuclear Hormone Receptors and the Coactivator TIF2. *Mol Cell Biol* 18, 6001-6013.
- Lefkowitz, R. J. and E. J. Whalen (2004).  $\beta$ -arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16, 162-168.
- Lemoine, N., D. Barnes, D. Hollywood, C. Hughes, P. Smith, E. Dublin, S. Prigent, W. Gullick and H. Hurst (1992). Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer* 66, 1116-1121.
- Lenferink, A. E. G., R. Pinkas-kramarski, M. L. M. V. D. Poll, M. J. H. V. Vugt, L. N. Klapper, E. Tzahar, H. Waterman, M. Sela, E. J. J. V. Zoelen and Y. Yarden (1998). Differential endocytic routing of homo- and hetero- dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *J Biol Chem* 273, 3385-3397.

- Lerdrup, M., S. Bruun, M. V. Grandal, K. Roepstorff, M. M. Kristensen, A. M. Hommelgaard and B. van Deurs (2007). Endocytic Down-Regulation of ErbB2 Is Stimulated by Cleavage of Its C-Terminus. *Mol Biol Cell* 18, 3656-3666.
- Lerdrup, M., A. M. Hommelgaard, M. Grandal and B. van Deurs (2006). Geldanamycin stimulates internalization of ErbB2 in a proteasome-dependent way. *J Cell Sci* 119, 85-95.
- Lessor, T. J., J.-Y. Yoo, X. Xia, N. Woodford and A. W. Hamburger (2000). Ectopic expression of the ErbB-3 binding protein Ebp1 inhibits growth and induces differentiation of human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 183, 321-329.
- Levi-Montalcini, R. (1952). EFFECTS OF MOUSE TUMOR TRANSPLANTATION ON THE NERVOUS SYSTEM. *Ann N Y Acad Sci* 55, 330-344.
- Levin, E. R. (1999). Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 10, 374-377.
- Levin, E. R. (2005). Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Mol Endocrinol* 19, 1951-1959.
- Levkowitz, G., H. Waterman, S. A. Ettenberg, M. Katz, A. Y. Tsygankov, I. Alroy, S. Lavi, K. Iwai, Y. Reiss, A. Ciechanover, S. Lipkowitz and Y. Yarden (1999). Ubiquitin Ligase Activity and Tyrosine Phosphorylation Underlie Suppression of Growth Factor Signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 4, 1029-1040.
- Levoye, A., K. Balabanian, F. Baleux, F. Bachelierie and B. Lagane (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113, 6085-6093.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689.
- Leygue, E., H. Dotzlaw, P. H. Watson and L. C. Murphy (1998). Altered Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Messenger RNA Expression during Human Breast Tumorigenesis. *Cancer Res* 58, 3197-3201.
- Li, B.-Q., M. A. Wetzel, J. A. Mikovits, E. E. Henderson, T. J. Rogers, W. Gong, Y. Le, F. W. Ruscetti and J. M. Wang (2001). The synthetic peptide WKYMVm attenuates the function of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 through activation of formyl peptide receptor-like 1. *Blood* 97, 2941-2947.
- Li, C., M. R. Briggs, T. E. Ahlborn, F. B. Kraemer and J. Liu (2001). Requirement of Sp1 and Estrogen Receptor  $\alpha$  Interaction in 17 $\beta$ -Estradiol-Mediated Transcriptional Activation of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Expression. *Endocrinology* 142, 1546-1553.
- Li, L.-C., C.-C. Yeh, D. Nojima and R. Dahiya (2000). Cloning and Characterization of Human Estrogen Receptor  $\beta$  Promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 682-689.
- Li, L., M. P. Haynes and J. R. Bender (2003). Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor  $\alpha$  variant (ER46) in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 4807-4812.
- Li, L., Z. Li, P. M. Howley and D. B. Sacks (2006). E6AP and Calmodulin Reciprocally Regulate Estrogen Receptor Stability. *J Biol Chem* 281, 1978-1985.
- Li, Y. M., Y. Pan, Y. Wei, X. Cheng, B. P. Zhou, M. Tan, X. Zhou, W. Xia, G. N. Hortobagyi, D. Yu and M.-C. Hung (2004). Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 6, 459-469.
- Li, Y. M., Y. Pan, Y. Wei, X. Cheng, B. P. Zhou, M. Tan, X. Zhou, W. Xia, G. N. Hortobagyi, D. Yu and M.-C. Hung (2004). Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer cell* 6, 459-469.
- Liang, Z., J. Brooks, M. Willard, K. Liang, Y. Yoon, S. Kang and H. Shim (2007). CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 716-722.
- Liang, Z., Y. Yoon, J. Votaw, M. M. Goodman, L. Williams and H. Shim (2005). Silencing of CXCR4 Blocks Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res* 65, 967-971.

- Libert, F., M. Parmentier, Lefort, J. E. Dumont and G. Vassart (1990). Complete nucleotide sequence of a putative G protein coupled receptor: RDC1. *Nucleic Acids Res* *18*, 1917.
- Libert, F., M. Parmentier, A. Lefort, C. Dinsart, S. J. Van, C. Maenhaut, M. Simons, t. J. Dumon and G. Vassart (1989). Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* *244*, 549-572.
- Libura, J., J. Drukala, M. Majka, O. Tomescu, J. M. Navenot, M. Kucia, L. Marquez, S. C. Peiper, F. G. Barr, A. Janowska-Wieczorek and M. Z. Ratajczak (2002). CXCR4–SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion: Presented at the Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 7-11, 2001. *Blood* *100*, 2597-2606.
- Likhite, V. S., F. Stossi, K. Kim, B. S. Katzenellenbogen and J. A. Katzenellenbogen (2006). Kinase-Specific Phosphorylation of the Estrogen Receptor Changes Receptor Interactions with Ligand, Deoxyribonucleic Acid, and Coregulators Associated with Alterations in Estrogen and Tamoxifen Activity. *Mol Endocrinol* *20*, 3120-3132.
- Lim, S.-J., G. Lopez-Berestein, M.-C. Hung, R. Lupu and A. M. Tari (2000). Grb2 downregulation leads to Akt inactivation in heregulin-stimulated and ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Oncogene* *19*, 6271-6276.
- Lin, C.-Y., V. B. Vega, J. S. Thomsen, T. Zhang, S. L. Kong, M. Xie, K. P. Chiu, L. Lipovich, D. H. Barnett, F. Stossi, A. Yeo, J. George, V. A. Kuznetsov, Y. K. Lee, T. H. Charn, N. Palanisamy, L. D. Miller, E. Cheung, B. S. Katzenellenbogen, Y. Ruan, G. Bourque, C.-L. Wei and E. T. Liu (2007). Whole-Genome Cartography of Estrogen Receptor  $\alpha$  Binding Sites. *PLoS Genet* *3*, e87.
- Lin, C. R., W. S. Chen, C. S. Lazar, C. D. Carpenter, G. N. Gill, R. M. Evans and M. G. Rosenfeld (1986). Protein kinase C phosphorylation at Thr 654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms. *Cell* *44*, 839-848.
- Lin, M. and K. van Golen (2004). Rho-regulatory proteins in breast cancer cell motility and invasion. *Breast Cancer Res Treat* *84*, 49-60.
- Lin, S.-Y., K. Makino, W. Xia, A. Matin, Y. Wen, K. Y. Kwong, L. Bourguignon and M.-C. Hung (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* *3*, 802-808.
- Lindberg, K., A. Strom, J. G. Lock, J. A. Gustafsson, L. A. Haldosen and L. A. Helguero (2010). Expression of estrogen receptor beta increases integrin alpha1 and integrin beta1 levels and enhances adhesion of breast cancer cells. *J Cell Physiol* *222*, 156-167.
- Liu, M.-M., C. Albanese, C. M. Anderson, K. Hilty, P. Webb, R. M. Uht, R. H. Price, R. G. Pestell and P. J. Kushner (2002). Opposing Action of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  on Cyclin D1 Gene Expression. *J Biol Chem* *277*, 24353-24360.
- Liu, X., G. W. Robinson, K. U. Wagner, L. Garrett, A. Wynshaw-Boris and L. Hennighausen (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* *11*, 179-186.
- Liu, Y.-Z., J. C. Chrivia and D. S. Latchman (1998). Nerve Growth Factor Up-regulates the Transcriptional Activity of CBP through Activation of the p42/p44MAPK Cascade. *J Biol Chem* *273*, 32400-32407.
- Liu, Z., J. Wong, S. Y. Tsai, M.-J. Tsai and B. W. O'Malley (2001). Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 12426-12431.
- Lo, H.-W., S.-C. Hsu, M. Ali-Seyed, M. Gunduz, W. Xia, Y. Wei, G. Bartholomeusz, J.-Y. Shih and M.-C. Hung (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* *7*, 575-589.

- Loetscher, M., T. Geiser, T. O'Reilly, R. Zwahlen, M. Baggiolini and B. Moser (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* *269*, 232-237.
- Lombardi, M., G. Castoria, A. Migliaccio, M. V. Barone, R. Di Stasio, A. Ciociola, D. Bottero, H. Yamaguchi, E. Appella and F. Auricchio (2008). Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *The Journal of Cell Biology* *182*, 327-340.
- Lonard, D. M., Z. Nawaz, C. L. Smith and B. W. O'Malley (2000). The 26S Proteasome Is Required for Estrogen Receptor- $\alpha$  and Coactivator Turnover and for Efficient Estrogen Receptor- $\alpha$  Transactivation. *Mol Cell* *5*, 939-948.
- Long, W., K.-U. Wagner, K. C. K. Lloyd, N. Binart, J. M. Shillingford, L. Hennighausen and F. E. Jones (2003). Impaired differentiation and lactational failure of Erbb4-deficient mammary glands identify ERBB4 as an obligate mediator of STAT5. *Development* *130*, 5257-5268.
- Long, X. and K. P. Nephew (2006). Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent Interacting Proteins Mediate Immobilization and Degradation of Estrogen Receptor- $\alpha$ . *J Biol Chem* *281*, 9607-9615.
- Lopez, G. N., C. W. Turck, F. Schaufele, M. R. Stallcup and P. J. Kushner (2001). Growth Factors Signal to Steroid Receptors through Mitogen-activated Protein Kinase Regulation of p160 Coactivator Activity. *J Biol Chem* *276*, 22177-22182.
- Loven, M. A., J. R. Wood and A. M. Nardulli (2001). Interaction of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  with estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol* *181*, 151-163.
- Lu, Q., D. C. Pallas, H. K. Surks, W. E. Baur, M. E. Mendelsohn and R. H. Karas (2004). Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor  $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 17126-17131.
- Lu, Y., H. Zhou, W. Chen, Y. Zhang and A. Hamburger (2011). The ErbB3 binding protein EBP1 regulates ErbB2 protein levels and tamoxifen sensitivity in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* *126*, 27-36.
- Lubahn, D. B., J. S. Moyer, T. S. Golding, J. F. Couse, K. S. Korach and O. Smithies (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *90*, 11162-11166.
- Luker, K. E. and G. D. Luker (2006). Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett* *238*, 30-41.
- Lund, K. A., C. S. Lazar, W. S. Chen, B. J. Walsh, J. B. Welsh, J. J. Herbst, G. M. Walton, M. G. Rosenfeld, G. N. Gill and H. S. Wiley (1990). Phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at threonine 654 inhibits ligand-induced internalization and down-regulation. *J Biol Chem* *265*, 20517-20523.
- Lupien, M., C. A. Meyer, S. T. Bailey, J. Eeckhoute, J. Cook, T. Westerling, X. Zhang, J. S. Carroll, D. R. Rhodes, X. S. Liu and M. Brown (2010). Growth factor stimulation induces a distinct ER $\alpha$  cistrome underlying breast cancer endocrine resistance. *Genes Dev* *24*, 2219-2227.
- Lusso, P. (2006). HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J* *25*, 447-456.
- Luttrell, L. M., S. S. G. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F.-T. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1999).  $\beta$ -Arrestin-Dependent Formation of  $\beta$ 2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes. *Science* *283*, 655-661.
- Luttrell, L. M., G. J. D. Rocca, T. van Biesen, D. K. Luttrell and R. J. Lefkowitz (1997). G $\beta\gamma$  Subunits Mediate Src-dependent Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor: A SCAFFOLD FOR G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR-MEDIATED Ras ACTIVATION. *J Biol Chem* *272*, 4637-4644.

- Lyne, J., M. Melhem, G. Finley, D. Wen, N. Liu, D. Deng and R. Salup (1997). Tissue expression of neu differentiation factor/heregulin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells in vitro. *Cancer J Sci Am* 3, 21-30.
- Ma, Q., D. Jones and T. A. Springer (1999). The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for the Retention of B Lineage and Granulocytic Precursors within the Bone Marrow Microenvironment. *Immunity* 10, 463-471.
- Ma, Y., S. Fan, C. Hu, Q. Meng, S. A. Fuqua, R. G. Pestell, Y. A. Tomita and E. M. Rosen (2010). BRCA1 Regulates Acetylation and Ubiquitination of Estrogen Receptor- $\alpha$ . *Mol Endocrinol* 24, 76-90.
- Macgregor, J. I. and V. C. Jordan (1998). Basic Guide to the Mechanisms of Antiestrogen Action. *Pharmacol Rev* 50, 151-196.
- Madden, S. L., B. P. Cook, M. Nacht, W. D. Weber, M. R. Callahan, Y. Jiang, M. R. Dufault, X. Zhang, W. Zhang, J. Walter-Yohrling, C. Rouleau, V. R. Akmaev, C. J. Wang, X. Cao, T. B. St. Martin, B. L. Roberts, B. A. Teicher, K. W. Klinger, R.-V. Stan, B. Lucey, E. B. Carson-Walter, J. Laterra and K. A. Walter (2004). Vascular Gene Expression in Nonneoplastic and Malignant Brain. *The American Journal of Pathology* 165, 601-608.
- Magee, P. J. and I. R. Rowland (2004). Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 91, 513-531.
- Maggiolini, M., A. Vivacqua, G. Fasanella, A. G. Recchia, D. Sisci, V. Pezzi, D. Montanaro, A. M. Musti, D. Picard and S. Andò (2004). The G Protein-coupled Receptor GPR30 Mediates c-fos Up-regulation by 17 $\beta$ -Estradiol and Phytoestrogens in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* 279, 27008-27016.
- Maihle, N., A. Baron, B. Barrette, C. Boardman, T. Christensen, E. Cora, J. Faupel-Badger, T. Greenwood, S. Juneja, J. Lafky, H. Lee, J. Reiter and K. Podratz (2002). EGF/ErbB receptor family in ovarian cancer. *Cancer Treat Res* 107, 247-258.
- Mallat, Z. (2008). PI3K $\gamma$  Helps an SDF Seeking Home ... for EPCs. *Circ Res* 102, 871-872.
- Mangelsdorf, D., I. C. Thumme, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon and R. Evans (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Manolagas, S. C., S. Kousteni and R. L. Jilka (2002). Sex Steroids and Bone. *Recent Prog Horm Res* 57, 385-409.
- Mantovani, A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 20, 254-257.
- Mantovani, A., B. Savino, M. Locati, L. Zammataro, P. Allavena and R. Bonecchi (2010). The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21, 27-39.
- Marchese, A. and J. L. Benovic (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* 276, 45509-45512.
- Marchese, A., C. Chen, Y.-M. Kim and J. L. Benovic (2003). The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci* 28, 369-376.
- Marchese, A., C. Raiborg, F. Santini, J. H. Keen, H. Stenmark and J. L. Benovic (2003). The E3 Ubiquitin Ligase AIP4 Mediates Ubiquitination and Sorting of the G Protein-Coupled Receptor CXCR4. *Developmental Cell* 5, 709-722.
- Marchionni, M. A., A. D. J. Goodearl, M. Su Chen, O. Bermingham-McDonogh, C. Kirk, M. Hendricks, F. Danehy, D. Misumi, J. Sudhalter, K. Kobayashi, D. Wroblewski, C. Lynch, M. Baldassare, I. Hiles, J. B. Davis, J. J. Hsuan, N. F. Totty, M. Otsu, R. N. McBurney, M. D. Waterfield, P. Stroobant and D. Gwynne (1993). Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362, 312-318.
- Margueron, R., V. Duong, A. Castet and V. Cavallès (2004). Histone deacetylase inhibition and estrogen signalling in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 68, 1239-1246.

- Marino, M., F. Acconcia, F. Bresciani, A. Weisz and A. Trentalance (2002). Distinct Nongenomic Signal Transduction Pathways Controlled by 17 $\beta$ -Estradiol Regulate DNA Synthesis and Cyclin D1 Gene Transcription in HepG2 Cells. *Mol Biol Cell* *13*, 3720-3729.
- Marino, M., F. Acconcia and A. Trentalance (2003). Biphasic Estradiol-induced AKT Phosphorylation Is Modulated by PTEN via MAP Kinase in HepG2 Cells. *Mol Biol Cell* *14*, 2583-2591.
- Marino, M., P. Ascenzi and F. Acconcia (2006). S-palmitoylation modulates estrogen receptor  $\alpha$  localization and functions. *Steroids* *71*, 298-303.
- Marino, M., E. Distefano, V. Pallottini, S. Caporali, G. Bruscalupi and A. Trentalance (2001). Activation of IP(3)-protein kinase C-alpha signal transduction pathway precedes the changes of plasma cholesterol, hepatic lipid metabolism and induction of low-density lipoprotein receptor expression in 17-beta-oestradiol-treated rats. *Exp Physiol* *86*, 39-45.
- Marino, M., E. Distefano, A. Trentalance and C. L. Smith (2001). Estradiol-induced IP3 mediates the estrogen receptor activity expressed in human cells. *Mol Cell Endocrinol* *182*, 19-26.
- Marino, M., P. Galluzzo and P. Ascenzi (2006). Estrogen Signaling and Gene Transcription. *Current Genomics* *7*, 497-508.
- Marino, M., P. Galluzzo, S. Leone, F. Acconcia and P. Ascenzi (2006). Nitric oxide impairs the 17 $\beta$ -estradiol-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cells. *Endocrine-Related Cancer* *13*, 559-569.
- Marino, M., V. Pallottini and A. Trentalance (1998). Estrogens Cause Rapid Activation of IP3-PKC- $\alpha$  Signal Transduction Pathway in HEPG2 Cells. *Biochem Biophys Res Commun* *245*, 254-258.
- Marks, P. A., V. M. Richon and R. A. Rifkind (2000). Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *J Natl Cancer Inst* *92*, 1210-1216.
- Marmor, M. D., K. B. Skaria and Y. Yarden (2004). Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* *58*, 903-913.
- Marmor, M. D. and Y. Yarden (2004). Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* *23*, 2057-2070.
- Marone, R., D. Hess, D. Dankort, W. J. Muller, N. E. Hynes and A. Badache (2004). Memo mediates ErbB2-driven cell motility. *Nat Cell Biol* *6*, 515-522.
- Marsaud, V., A. Gougelet, S. Maillard and J.-M. Renoir (2003). Various Phosphorylation Pathways, Depending on Agonist and Antagonist Binding to Endogenous Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), Differentially Affect ER $\alpha$  Extractability, Proteasome-Mediated Stability, and Transcriptional Activity in Human Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol* *17*, 2013-2027.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* *80*, 179-185.
- Martin, M. B., R. Reiter, T. Pham, Y. R. Avellanet, J. Camara, M. Lahm, E. Pentecost, K. Pratap, B. A. Gilmore, S. Divekar, R. S. Dagata, J. L. Bull and A. Stoica (2003). Estrogen-Like Activity of Metals in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology* *144*, 2425-2436.
- Martínez, A., S. Kapas, M.-J. Miller, Y. Ward and F. Cuttitta (2000). Coexpression of Receptors for Adrenomedullin, Calcitonin Gene-Related Peptide, and Amylin in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Endocrinology* *141*, 406-411.
- Maruyama, K., H. Endoh, H. Sasaki-Iwaoka, H. Kanou, E. Shimaya, S. Hashimoto, S. Kato and H. Kawashima (1998). A Novel Isoform of Rat Estrogen Receptor Beta with 18 Amino Acid Insertion in the Ligand Binding Domain as a Putative Dominant Negative Regulator of Estrogen Action. *Biochem Biophys Res Commun* *246*, 142-147.
- Marx, C., C. Yau, S. Banwait, Y. Zhou, G. K. Scott, B. Hann, J. W. Park and C. C. Benz (2007). Proteasome-Regulated ERBB2 and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer. *Mol Pharmacol* *71*, 1525-1534.
- Massarweh, S., C. K. Osborne, S. Jiang, A. E. Wakeling, M. Rimawi, S. K. Mohsin, S. Hilsenbeck and R. Schiff (2006). Mechanisms of Tumor Regression and Resistance to Estrogen Deprivation

- and Fulvestrant in a Model of Estrogen Receptor-Positive, HER-2/neu-Positive Breast Cancer. *Cancer Res* 66, 8266-8273.
- Masuda, M., H. Nakashima, T. Ueda, H. Naba, R. Ikoma, A. Otaka, Y. Terakawa, H. Tamamura, T. Ibuka, T. Murakami and e. al (1992). A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12,Lys7]-polyphemusin II). *Biochem Biophys Res Commun* 189, 845-850.
- Masuhira, Y., Y. Mezaki, M. Sakari, K.-i. Takeyama, T. Yoshida, K. Inoue, J. Yanagisawa, S. Hanazawa, B. W. O'Malley and S. Kato (2005). Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8126-8131.
- Masuyama, H. and Y. Hiramatsu (2004). Involvement of Suppressor for Gal 1 in the Ubiquitin/Proteasome-mediated Degradation of Estrogen Receptors. *J Biol Chem* 279, 12020-12026.
- Matsunaga, T., N. Takemoto, T. Sato, R. Takimoto, I. Tanaka, A. Fujimi, T. Akiyama, H. Kuroda, Y. Kawano, M. Kobune, J. Kato, Y. Hirayama, S. Sakamaki, K. Kohda, K. Miyake and Y. Niitsu (2003). Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med* 9, 1158-1165.
- Matthews, J. and J. Gustafsson (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3, 281-292.
- Mayer, M. R. and M. J. Stone (2001). Identification of Receptor Binding and Activation Determinants in the N-terminal and N-loop Regions of the CC Chemokine Eotaxin. *J Biol Chem* 276, 13911-13916.
- Mazumdar, A., L. Adam, D. Boyd and R. Kumar (2001). Heregulin Regulation of Urokinase Plasminogen Activator and its Receptor: Human Breast Epithelial Cell Invasion. *Cancer Res* 61, 400-405.
- Mazumdar, A., R.-A. Wang, S. K. Mishra, L. Adam, R. Bagheri-Yarmand, M. Mandal, R. K. Vadlamudi and R. Kumar (2001). Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nat Cell Biol* 3, 30-37.
- Mazzeinghi, B., E. Ronconi, E. Lazzeri, C. Sagrinati, L. Ballerini, M. L. Angelotti, E. Parente, R. Mancina, G. S. Netti, F. Becherucci, M. Gacci, M. Carini, L. Gesualdo, M. Rotondi, E. Maggi, L. Lasagni, M. Serio, S. Romagnani and P. Romagnani (2008). Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 479-490.
- McClelland, R. A., D. Barrow, T.-A. Madden, C. M. Dutkowski, J. Pamment, J. M. Knowlden, J. M. W. Gee and R. I. Nicholson (2001). Enhanced Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in MCF7 Breast Cancer Cells after Long-Term Culture in the Presence of the Pure Antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex). *Endocrinology* 142, 2776-2788.
- McCormick, P. J., M. Segarra, P. Gasperini, A. V. Gulino and G. Tosato (2009). Impaired Recruitment of Grk6 and  $\beta$ -Arrestin2 Causes Delayed Internalization and Desensitization of a WHIM Syndrome-Associated CXCR4 Mutant Receptor. *PLoS ONE* 4, e8102.
- McDonnell, D. P., D. L. Clemm, T. Hermann, M. E. Goldman and J. W. Pike (1995). Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 9, 659-669.
- McDonnell, D. P., S. L. Dana, P. A. Hoener, B. A. Lieberman, M. O. Imhof and R. B. Stein (1995). Cellular Mechanisms Which Distinguish between Hormone- and Antihormone-Activated Estrogen Receptor. *Ann N Y Acad Sci* 761, 121-137.
- McEwan, I. (2004). Sex, drugs and gene expression: signalling by members of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem*, 1-10.
- McEwan, I. (2004). Sex, drugs and gene expression: signalling by members of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem* 40, 1-10.
- McGuire, W. L., G. C. Chamness and S. A. W. Fuqua (1991). MINIREVIEW: Estrogen Receptor Variants in Clinical Breast Cancer. *Mol Endocrinol* 5, 1571-1577.



- McKenna, N. J., R. B. Lanz and B. W. O'Malley (1999). Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology. *Endocr Rev* 20, 321-344.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators. *Cell* 108, 465-474.
- Medunjanin, S., A. Hermani, B. De Servi, J. Grisouard, G. Rincke and D. Mayer (2005). Glycogen Synthase Kinase-3 Interacts with and Phosphorylates Estrogen Receptor  $\alpha$  and Is Involved in the Regulation of Receptor Activity. *J Biol Chem* 280, 33006-33014.
- Medzihradsky, K. F. (2005). Characterization of Protein N-Glycosylation. *Methods in Enzymology*. A. L. Burlingame, Academic Press. **Volume 405**: 116-138.
- Mehta, S. A., K. W. Christopherson, P. Bhat-Nakshatri, R. J. Goulet, Jr., H. E. Broxmeyer, L. Kopelovich and H. Nakshatri (2006). Negative regulation of chemokine receptor CXCR4 by tumor suppressor p53 in breast cancer cells: implications of p53 mutation or isoform expression on breast cancer cell invasion. *Oncogene* 26, 3329-3337.
- Meier, R. and B. Hemmings (1999). Regulation of Protein Kinase B. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 19, 121-128.
- Mellado, M., J. M. Rodríguez-Frade, S. Mañes and C. Martínez-A (2001). CHEMOKINE SIGNALING AND FUNCTIONAL RESPONSES: The Role of Receptor Dimerization and TK Pathway Activation. *Annu Rev Immunol* 19, 397-421.
- Mellon, S. H. and L. D. Griffin (2002). Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13, 35-43.
- Meng, S., D. Tripathy, S. Shete, R. Ashfaq, B. Haley, S. Perkins, P. Beitsch, A. Khan, D. Euhus, C. Osborne, E. Frenkel, S. Hoover, M. Leitch, E. Clifford, E. Vitetta, L. Morrison, D. Herlyn, L. W. M. M. Terstappen, T. Fleming, T. Fehm, T. Tucker, N. Lane, J. Wang and J. Uhr (2004). HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9393-9398.
- Mérot, Y., R. Métivier, G. Penot, D. Manu, C. Saligaut, F. Gannon, F. Pakdel, O. Kah and G. Flouriot (2004). The Relative Contribution Exerted by AF-1 and AF-2 Transactivation Functions in Estrogen Receptor  $\alpha$  Transcriptional Activity Depends upon the Differentiation Stage of the Cell. *J Biol Chem* 279, 26184-26191.
- Métivier, R., G. Penot, M. R. Hübner, G. Reid, H. Brand, M. Koš and F. Gannon (2003). Estrogen Receptor- $\alpha$  Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter. *Cell* 115, 751-763.
- Metivier, R., G. Reid and F. Gannon (2006). Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep* 7, 161-167.
- Meyer, D., T. Yamaai, A. Garratt, E. Riethmacher-Sonnenberg, D. Kane, L. E. Theill and C. Birchmeier (1997). Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 124, 3575-3586.
- Miao, Z., K. Luker, B. Summers, R. Berahovich, M. Bhojani, A. Rehemtulla, C. Kleer, J. Essner, A. Nasevicius, G. Luker, M. Howard and T. Schall (2007). CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15735 - 15740.
- Miao, Z., K. E. Luker, B. C. Summers, R. Berahovich, M. S. Bhojani, A. Rehemtulla, C. G. Kleer, J. J. Essner, A. Nasevicius, G. D. Luker, M. C. Howard and T. J. Schall (2007). CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 15735-15740.
- Michalides, R., A. Griekspoor, A. Balkenende, D. Verwoerd, L. Janssen, K. Jalink, A. Floore, A. Velds, L. van 't Veer and J. Neeftjes (2004). Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor  $\alpha$  after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell* 5, 597-605.

- Miekus, K., D. Jarocha, E. Trzyna and M. Marcin (2010). Role of I-TAC-binding receptors CXCR3 and CXCR7 in proliferation, activation of intracellular signaling pathways and migration of various tumor cell lines. *Folia Histochem Cytobiol* *48*, 104-111.
- Miesfeld, R., S. Okret, A. Wikström, O. Wrangé, J. Gustafsson and K. Yamamoto (1984). Characterization of a steroid hormone receptor gene and mRNA in wild-type and mutant cells. *Nature* *312*, 779-781.
- Miettinen, P. J., J. E. Berger, J. Meneses, Y. Phung, R. A. Pedersen, Z. Werb and R. Derynck (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* *376*, 337-341.
- Migliaccio, A., A. Rotondi and F. Auricchio (1986). Estradiol receptor: phosphorylation on tyrosine in uterus and interaction with anti-phosphotyrosine antibody. *EMBO J* *5*, 2867-2872.
- Miki, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L. Bennett, W. Ding and e. al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* *266*, 66-71.
- Miller, W. (1998). Steroid hormone biosynthesis and actions in the materno-feto-placental unit. *Clin Perinatal* *25*, 799-817.
- Milligan, G. (2003). Constitutive Activity and Inverse Agonists of G Protein-Coupled Receptors: a Current Perspective. *Mol Pharmacol* *64*, 1271-1276.
- Mineo, C., G. N. Gill and R. G. W. Anderson (1999). Regulated Migration of Epidermal Growth Factor Receptor from Caveolae. *J Biol Chem* *274*, 30636-30643.
- Mineo, C., G. L. James, E. J. Smart and R. G. W. Anderson (1996). Localization of Epidermal Growth Factor-stimulated Ras/Raf-1 Interaction to Caveolae Membrane. *J Biol Chem* *271*, 11930-11935.
- Minn, A. J., G. P. Gupta, P. M. Siegel, P. D. Bos, W. Shu, D. D. Giri, A. Viale, A. B. Olshen, W. L. Gerald and J. Massague (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* *436*, 518-524.
- Miodini, P., L. Fioravanti, G. D. Fronzo and V. Cappelletti (1999). The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *Br J Cancer* *80*, 1150-1155.
- Miyata, T., F. Tokunaga, T. Yoneya, K. Yoshikawa, S. Iwanaga, M. Niwa, T. Takao and Y. Shimonishi (1989). Antimicrobial Peptides, Isolated from Horseshoe Crab Hemocytes, Tachyplesin II, and Polyphemusins I and II: Chemical Structures and Biological Activity. *J Biochem (Tokyo)* *106*, 663-668.
- Molina, M. A., R. Sáez, E. E. Ramsey, M.-J. Garcia-Barchino, F. Rojo, A. J. Evans, J. Albanell, E. J. Keenan, A. Lluch, J. García-Conde, J. Baselga and G. M. Clinton (2002). NH2-terminal Truncated HER-2 Protein but not Full-Length Receptor Is Associated with Nodal Metastasis in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res* *8*, 347-353.
- Molis, T. M., L. L. Spriggs and S. M. Hill (1994). Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* *8*, 1681-1690.
- Molyneaux, K. A., H. Zinszner, P. S. Kunwar, K. Schaible, J. Stebler, M. J. Sunshine, W. O'Brien, E. Raz, D. Littman, C. Wylie and R. Lehmann (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* *130*, 4279-4286.
- Monroe, D. G., B. J. Getz, S. A. Johnsen, B. L. Riggs, S. Khosla and T. C. Spelsberg (2003). Estrogen receptor isoform-specific regulation of endogenous gene expression in human osteoblastic cell lines expressing either ER $\alpha$  or ER $\beta$ . *J Cell Biochem* *90*, 315-326.
- Monroe, D. G., F. J. Secreto, M. Subramaniam, B. J. Getz, S. Khosla and T. C. Spelsberg (2005). Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Heterodimers Exert Unique Effects on Estrogen- and Tamoxifen-Dependent Gene Expression in Human U2OS Osteosarcoma Cells. *Mol Endocrinol* *19*, 1555-1568.

- Monsalve, M., Z. Wu, G. Adelmant, P. Puigserver, M. Fan and B. M. Spiegelman (2000). Direct Coupling of Transcription and mRNA Processing through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Mol Cell* 6, 307-316.
- Montecclaro, F. S. and I. F. Charo (1996). The Amino-terminal Extracellular Domain of the MCP-1 Receptor, but Not the RANTES/MIP-1 $\alpha$  Receptor, Confers Chemokine Selectivity: EVIDENCE FOR A TWO-STEP MECHANISM FOR MCP-1 RECEPTOR ACTIVATION. *J Biol Chem* 271, 19084-19092.
- Montgomery, S., L. Shaw, N. Pantelides, M. Taggart and C. Austin (2003). Acute effects of oestrogen receptor subtype-specific agonists on vascular contractility. *Br J Pharmacol* 139, 1249-1253.
- Morelli, C., M. Lanzino, C. Garofalo, P. Maris, E. Brunelli, I. Casaburi, S. Catalano, R. Bruno, D. Sisci and S. Ando (2010). Akt2 inhibition enables the forkhead transcription factor FoxO3a to have a repressive role in estrogen receptor alpha transcriptional activity in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 30, 857-870.
- Moriuchi, M., H. Moriuchi and A. S. Fauci (1999). HTLV Type I Tax Activation of the CXCR4 Promoter by Association with Nuclear Respiratory Factor 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15, 821-827.
- Moriuchi, M., H. Moriuchi, D. M. Margolis and A. S. Fauci (1999). USF/c-Myc Enhances, While Yin-Yang 1 Suppresses, the Promoter Activity of CXCR4, a Coreceptor for HIV-1 Entry. *The Journal of Immunology* 162, 5986-5992.
- Moriuchi, M., H. Moriuchi, W. Turner and A. S. Fauci (1997). Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *The Journal of Immunology* 159, 4322-4329.
- Morley, P., J. F. Whitfield, B. C. Vanderhyden, B. K. Tsang and J. L. Schwartz (1992). A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* 131, 1305-1312.
- Mosselman, S., J. Polman and R. Dijkema (1996). ER $\beta$ : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49-53.
- Motomura, K., M. Ishitobi, Y. Komoike, H. Koyama, H. Nagase, H. Inaji and S. Noguchi (2010). Expression of estrogen receptor beta and phosphorylation of estrogen receptor alpha serine 167 correlate with progression-free survival in patients with metastatic breast cancer treated with aromatase inhibitors. *Oncology* 79, 55-61.
- Motoyama, A. B., N. E. Hynes and H. A. Lane (2002). The Efficacy of ErbB Receptor-targeted Anticancer Therapeutics Is Influenced by the Availability of Epidermal Growth Factor-related Peptides. *Cancer Res* 62, 3151-3158.
- Moyer, R. A., M. K. Wendt, P. A. Johannesen, J. R. Turner and M. B. Dwinell (2007). Rho activation regulates CXCL12 chemokine stimulated actin rearrangement and restitution in model intestinal epithelia. *Lab Invest* 87, 807-817.
- Mueller, M. D., J.-L. Vigne, A. Minchenko, D. I. Lebovic, D. C. Leitman and R. N. Taylor (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 10972-10977.
- Mukherjee, D. and J. Zhao (2013). The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *American journal of cancer research* 3, 46-57.
- Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. Wagner, J. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui and A. Zlotnik (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50 - 56.
- Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui and A. Zlotnik (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
- Munro, S. and H. R. B. Pelham (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.

- Muraoka, R. S., Y. Koh, L. R. Roebuck, M. E. Sanders, D. Brantley-Sieders, A. E. Gorska, H. L. Moses and C. L. Arteaga (2003). Increased Malignancy of Neu-Induced Mammary Tumors Overexpressing Active Transforming Growth Factor  $\beta$ 1. *Mol Cell Biol* 23, 8691-8703.
- Murdoch, C. and A. Finn (2000). Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95, 3032-3043.
- Murphy, A. J., P. M. Guyre, C. R. Wira and P. A. Pioli (2009). Estradiol Regulates Expression of Estrogen Receptor ER $\alpha$ 46 in Human Macrophages. *PLoS ONE* 4, e5539.
- Murphy, L., T. Cherlet, A. Lewis, Y. Banu and P. Watson (2003). New insights into estrogen receptor function in human breast cancer. *Ann Med* 35, 614-631.
- Murphy, L. C. and P. H. Watson (2006). Is oestrogen receptor-  $\beta$  a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer? *Endocrine-Related Cancer* 13, 327-334.
- Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hébert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power (2000). International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev* 52, 145-176.
- Muthuswamy, S. K., M. Gilman and J. S. Brugge (1999). Controlled Dimerization of ErbB Receptors Provides Evidence for Differential Signaling by Homo- and Heterodimers. *Mol Cell Biol* 19, 6845-6857.
- Nabel, G. and D. Baltimore (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 326, 711-713.
- Nagane, M., A. Levitzki, A. Gazit, W. K. Cavenee and H.-J. S. Huang (1998). Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 5724-5729.
- Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S.-i. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani and T. Kishimoto (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638.
- Nagasawa, T., H. Kikutani and T. Kishimoto (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 2305-2309.
- Nagy, L., H.-Y. Kao, D. Chakravarti, R. J. Lin, C. A. Hassig, D. E. Ayer, S. L. Schreiber and R. M. Evans (1997). Nuclear Receptor Repression Mediated by a Complex Containing SMRT, mSin3A, and Histone Deacetylase. *Cell* 89, 373-380.
- Nagy, P., E. Friedländer, M. Tanner, A. I. Kapanen, K. L. Carraway, J. Isola and T. M. Jovin (2005). Decreased Accessibility and Lack of Activation of ErbB2 in JIMT-1, a Herceptin-Resistant, MUC4-Expressing Breast Cancer Cell Line. *Cancer Res* 65, 473-482.
- Nakajima, A., S. Maruyama, M. Bohgaki, N. Miyajima, T. Tsukiyama, N. Sakuragi and S. Hatakeyama (2007). Ligand-dependent transcription of estrogen receptor  $\alpha$  is mediated by the ubiquitin ligase EFP. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 245-251.
- Nakamura, T., H. Furunaka, T. Miyata, F. Tokunaga, T. Muta, S. Iwanaga, M. Niwa, T. Takao and Y. Shimonishi (1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J Biol Chem* 263, 16709-16713.
- Nakashima, H., M. Masuda, T. Murakami, Y. Koyanagi, A. Matsumoto, N. Fujii and N. Yamamoto (1992). Anti-human immunodeficiency virus activity of a novel synthetic peptide, T22 ([Tyr-5,12, Lys-7]polyphemusin II): a possible inhibitor of virus-cell fusion. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 1249-1255.
- Nawaz, Z., D. M. Lonard, A. P. Dennis, C. L. Smith and B. W. O'Malley (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 1858-1862.

- Nawaz, Z., D. M. Lonard, C. L. Smith, E. Lev-Lehman, S. Y. Tsai, M.-J. Tsai and B. W. O'Malley (1999). The Angelman Syndrome-Associated Protein, E6-AP, Is a Coactivator for the Nuclear Hormone Receptor Superfamily. *Mol Cell Biol* *19*, 1182-1189.
- Nealen, M. L., K. V. Vijayan, E. Bolton and P. F. Bray (2001). Human Platelets Contain a Glycosylated Estrogen Receptor  $\beta$ . *Circ Res* *88*, 438-442.
- Neel, N. F., E. Schutyser, J. Sai, G.-H. Fan and A. Richmond (2005). Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine & Growth Factor Reviews* *16*, 637-658.
- Negro, A., B. K. Brar, Y. Gu, K. L. Peterson, W. Vale and K.-f. Lee (2006). erbB2 is required for G protein-coupled receptor signaling in the heart. *PNAS* *103*, 15889-15893.
- Neuhaus, T., S. Stier, G. Totzke, E. Gruenewald, S. Fronhoffs, A. Sachinidis, H. Vetter and Y. D. Ko (2003). Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Prolif* *36*, 75-86.
- Neve, R. M., H. Sutterlüty, N. Pullen, H. A. Lane, J. M. Daly, W. Krek and N. E. Hynes (2000). Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* *19*, 1647-1656.
- Nicholson, R. I., C. Staka, F. Boyns, I. R. Hutcheson and J. M. W. Gee (2004). Growth factor-driven mechanisms associated with resistance to estrogen deprivation in breast cancer: new opportunities for therapy. *Endocrine-Related Cancer* *11*, 623-641.
- Nidai Ozes, O., L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer and D. B. Donner (1999). NF- $\kappa$ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* *401*, 82-85.
- Nikolova, M., A. Tawab, A. Marie-Cardine, M. Bagot, L. Boumsell and A. Bensussan (2001). Increased Expression of a Novel Early Activation Surface Membrane Receptor in Cutaneous T Cell Lymphoma Cells. *J Investig Dermatol* *116*, 731-738.
- Nilsson, S. and J. A. Gustafsson (2011). Estrogen Receptors: Therapies Targeted to Receptor Subtypes. *Clin Pharmacol Ther* *89*, 44-55.
- Nilsson, S., S. Mäkelä, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner and J.-Å. Gustafsson (2001). Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol Rev* *81*, 1535-1565.
- Norris, J. D., L. A. Paige, D. J. Christensen, C.-Y. Chang, M. R. Huacani, D. Fan, P. T. Hamilton, D. M. Fowlkes and D. P. McDonnell (1999). Peptide Antagonists of the Human Estrogen Receptor. *Science* *285*, 744-746.
- O'Dowd, B. F., T. Nguyen, A. Marchese, R. Cheng, K. R. Lynch, H. H. Q. Heng, L. F. Kolakowski Jr and S. R. George (1998). Discovery of Three Novel G-Protein-Coupled Receptor Genes. *Genomics* *47*, 310-313.
- O'Lone, R., M. C. Frith, E. K. Karlsson and U. Hansen (2004). Genomic Targets of Nuclear Estrogen Receptors. *Mol Endocrinol* *18*, 1859-1875.
- O'Malley, B. W. (2005). A Life-Long Search for the Molecular Pathways of Steroid Hormone Action. *Mol Endocrinol* *19*, 1402-1411.
- O'Shaughnessy, P. J., P. J. Baker, M. Heikkilä, S. Vainio and A. P. McMahon (2000). Localization of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/17-Ketosteroid Reductase Isoform Expression in the Developing Mouse Testis—Androstenedione Is the Major Androgen Secreted by Fetal/Neonatal Leydig Cells. *Endocrinology* *141*, 2631-2637.
- Obara, Y., Y. Okano, S. Ono, A. Yamauchi, T. Hoshino, H. Kurose and N. Nakahata (2008).  $\beta\gamma$  subunits of Gi/o suppress EGF-induced ERK5 phosphorylation, whereas ERK1/2 phosphorylation is enhanced. *Cell Signal* *20*, 1275-1283.

- Ogawa, S., J. Chan, A. E. Chester, J.-Å. Gustafsson, K. S. Korach and D. W. Pfaff (1999). Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor  $\beta$  gene-deficient ( $\beta$ ERKO) male and female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 12887-12892.
- Ogawa, S., S. Inoue, T. Watanabe, H. Hiroi, A. Orimo, T. Hosoi, Y. Ouchi and M. Muramatsu (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor  $\beta$  (hER $\beta$ ) and Its Heterodimerization with ER  $\alpha$  in Vivo and in Vitro. *Biochem Biophys Res Commun* *243*, 122-126.
- Ogawa, S., S. Inoue, T. Watanabe, A. Orimo, T. Hosoi, Y. Ouchi and M. Muramatsu (1998). Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor  $\beta$ cx: A potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* *26*, 3505-3512.
- Ogawa, S., D. B. Lubahn, K. S. Korach and D. W. Pfaff (1997). Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *94*, 1476-1481.
- Ogishima, T., H. Shibata, H. Shimada, F. Mitani, H. Suzuki, T. Saruta and Y. Ishimura (1991). Aldosterone synthase cytochrome P-450 expressed in the adrenals of patients with primary aldosteronism. *J Biol Chem* *266*, 10731-10734.
- Okamoto, T., T. Katada, Y. Murayama, M. Ui, E. Ogata and I. Nishimoto (1990). A simple structure encodes G protein-activating function of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor. *Cell* *62*, 709-717.
- Oldham, W. and H. Hamm (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys* *39*, 117-166.
- Oliveira, I. C., N. Mukaida, K. Matsushima and J. Vilcek (1994). Transcriptional inhibition of the interleukin-8 gene by interferon is mediated by the NF-kappa B site. *Mol Cell Biol* *14*, 5300-5308.
- Oppenheim, J. J., C. O. C. Zachariae, N. Mukaida and K. Matsushima (1991). Properties of the Novel Proinflammatory Supergene "Interleukin" Cytokine Family. *Annu Rev Immunol* *9*, 617-648.
- Orimo, A., P. B. Gupta, D. C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naeem, V. J. Carey, A. L. Richardson and R. A. Weinberg (2005). Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* *121*, 335-348.
- Orsini, M., J. Parent, S. Mundell, a. Marchese and J. Benovic (2000). Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4: role of arrestins and identification of residues in the C-terminal tail that mediate receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* *275*, 25876.
- Orsini, M. J., J.-L. Parent, S. J. Mundell and J. L. Benovic (1999). Trafficking of the HIV Coreceptor CXCR4: Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem* *274*, 31076-31086.
- Osborne, C. K., V. Bardou, T. A. Hopp, G. C. Chamness, S. G. Hilsenbeck, S. A. W. Fuqua, J. Wong, D. C. Allred, G. M. Clark and R. Schiff (2003). Role of the Estrogen Receptor Coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* *95*, 353-361.
- Ouyang, X. and T. Gulliford (2013). The duration of phorbol-inducible ErbB2 tyrosine dephosphorylation parallels that of receptor endocytosis rather than threonine-686 phosphorylation : implications for the physiological role of protein kinase C in growth factor receptor signalling. *19*, 2013-2019.
- Owman, C., P. Blay, C. Nilsson and S. J. Lolait (1996). Cloning of Human cDNA Encoding a Novel Heptahelix Receptor Expressed in Burkitt's Lymphoma and Widely Distributed in Brain and Peripheral Tissues. *Biochem Biophys Res Commun* *228*, 285-292.
- Özcelik, C., B. Erdmann, B. Pilz, N. Wettschureck, S. Britsch, N. Hübner, K. R. Chien, C. Birchmeier and A. N. Garratt (2002). Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in

- cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 8880-8885.
- Pachmann, K., O. Camara, T. Kroll, M. Gajda, A. K. Gellner, J. Wotschadlo and I. B. Runnebaum (2011). Efficacy control of therapy using circulating epithelial tumor cells (CETC) as “Liquid Biopsy”: trastuzumab in HER2/neu-positive breast carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 137, 1317-1327.
- Paech, K., P. Webb, G. G. J. M. Kuiper, S. Nilsson, J.-Å. Gustafsson, P. J. Kushner and T. S. Scanlan (1997). Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 Sites. *Science* 277, 1508-1510.
- Pakdel, F., P. Le Goff and B. Katzenellenbogen (1993). An assessment of the role of domain F and PEST sequences in estrogen receptor half-life and bioactivity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46, 663-672.
- Pakianathan, D. R., E. G. Kuta, D. R. Artis, N. J. Skelton and C. A. Hébert (1997). Distinct but Overlapping Epitopes for the Interaction of a CC-Chemokine with CCR1, CCR3, and CCR5. *Biochemistry (Mosc)* 36, 9642-9648.
- Palacios, S. (2010). Third generation SERMs: anything new? *Maturitas* 67, 101-102.
- Palm, D., K. Lang, B. Brandt, K. S. Zaenker and F. Entschladen (2005). In vitro and in vivo imaging of cell migration: Two interdependent methods to unravel metastasis formation. *Semin Cancer Biol* 15, 396-404.
- Pan, Y. F., K. D. S. A. Wansa, M. H. Liu, B. Zhao, S. Z. Hong, P. Y. Tan, K. S. Lim, G. Bourque, E. T. Liu and E. Cheung (2008). Regulation of Estrogen Receptor-mediated Long Range Transcription via Evolutionarily Conserved Distal Response Elements. *J Biol Chem* 283, 32977-32988.
- Papoutsi, Z., C. Zhao, M. Putnik, J.-Å. Gustafsson and K. Dahlman-Wright (2009). Binding of estrogen receptor  $\alpha/\beta$  heterodimers to chromatin in MCF-7 cells. *J Mol Endocrinol* 43, 65-72.
- Park, K.-J., V. Krishnan, B. W. O'Malley, Y. Yamamoto and R. B. Gaynor (2005). Formation of an IKK $\alpha$ -Dependent Transcription Complex Is Required for Estrogen Receptor-Mediated Gene Activation. *Mol Cell* 18, 71-82.
- Park, S.-K., R. Miller, I. Krane and T. Vartanian (2001). The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *The Journal of Cell Biology* 154, 1245-1258.
- Paruthiyil, S., H. Parmar, V. Kerekatte, G. R. Cunha, G. L. Firestone and D. C. Leitman (2004). Estrogen Receptor  $\beta$  Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation and Tumor Formation by Causing a G2 Cell Cycle Arrest. *Cancer Res* 64, 423-428.
- Pattarozzi, A., M. Gatti, F. Barbieri, R. Würth, C. Porcile, G. Lunardi, A. Ratto, R. Favoni, A. Bajetto, A. Ferrari and T. Florio (2008). 17 $\beta$ -Estradiol Promotes Breast Cancer Cell Proliferation-Inducing Stromal Cell-Derived Factor-1-Mediated Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation: Reversal by Gefitinib Pretreatment. *Mol Pharmacol* 73, 191-202.
- Payne, A., L. Perkins, M. Georgiou and P. Quinn (1987). Intratesticular site of aromatase activity and possible function of testicular estradiol. *Steroids* 50, 435-448.
- Payne, A. H. and D. B. Hales (2004). Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocr Rev* 25, 947-970.
- Payne, A. H., R. P. Kelch, S. S. Musich and M. E. Halpern (1976). Intratesticular Site of Aromatization in the Human. *J Clin Endocrinol Metab* 42, 1081-1087.
- Payne, A. H. and G. L. Youngblood (1995). Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod* 52, 217-225.
- Peacock, J. W. and F. R. Jirik (1999). TCR Activation Inhibits Chemotaxis Toward Stromal Cell-Derived Factor-1: Evidence for Reciprocal Regulation Between CXCR4 and the TCR. *The Journal of Immunology* 162, 215-223.

- Pearce, S. T. and V. C. Jordan (2004). The biological role of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 50, 3-22.
- Pedersen, K., P.-D. Angelini, S. Laos, A. Bach-Faig, M. P. Cunningham, C. Ferrer-Ramón, A. Luque-García, J. García-Castillo, J. L. Parra-Palau, M. Scaltriti, S. R. y Cajal, J. Baselga and J. Arribas (2009). A Naturally Occurring HER2 Carboxy-Terminal Fragment Promotes Mammary Tumor Growth and Metastasis. *Mol Cell Biol* 29, 3319-3331.
- Pedersen, N. M., I. H. Madshus, C. Haslekås and E. Stang (2008). Geldanamycin-Induced Down-Regulation of ErbB2 from the Plasma Membrane Is Clathrin Dependent but Proteasomal Activity Independent. *Molecular Cancer Research* 6, 491-500.
- Pedram, A., M. Razandi, M. Aitkenhead, C. C. W. Hughes and E. R. Levin (2002). Integration of the Non-genomic and Genomic Actions of Estrogen: MEMBRANE-INITIATED SIGNALING BY STEROID TO TRANSCRIPTION AND CELL BIOLOGY. *J Biol Chem* 277, 50768-50775.
- Pedram, A., M. Razandi, R. C. A. Sainson, J. K. Kim, C. C. Hughes and E. R. Levin (2007). A Conserved Mechanism for Steroid Receptor Translocation to the Plasma Membrane. *J Biol Chem* 282, 22278-22288.
- Peles, E., R. Ben-Levy, E. Tzahar, N. Liu, D. Wen and Y. Yarden (1993). Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/heregulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. *EMBO J* 12, 961-971.
- Pelkmans, L. and A. Helenius (2002). Endocytosis Via Caveolae. *Traffic* 3, 311-320.
- Pelletier, G., S. Li, V. Luu-The, Y. Tremblay, A. Belanger and F. Labrie (2001). Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17)) in rat adrenal cortex and gonads. *J Endocrinol* 171, 373-383.
- Peng, B., B. Lu, E. Leygue and L. Murphy (2003). Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J Mol Endocrinol* 30, 13-29.
- Peng, D., Z. Fan, Y. Lu, T. DeBlasio, H. Scher and J. Mendelsohn (1996). Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody 225 Up-Regulates p27KIP1 and Induces G1 Arrest in Prostatic Cancer Cell Line DU145. *Cancer Res* 56, 3666-3669.
- Penning, T. M. (1997). Molecular Endocrinology of Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Endocr Rev* 18, 281-305.
- Penot, G., C. Le Péron, Y. Mérot, E. Grimaud-Fanouillère, F. Ferrière, N. Boujrad, O. Kah, C. Saligaut, B. Ducouret, R. Métivier and G. Flouriot (2005). The Human Estrogen Receptor- $\alpha$  Isoform hER $\alpha$ 46 Antagonizes the Proliferative Influence of hER $\alpha$ 66 in MCF7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 146, 5474-5484.
- Percherancier, Y., Y. A. Berchiche, I. Slight, R. Volkmer-Engert, H. Tamamura, N. Fujii, M. Bouvier and N. Heveker (2005). Bioluminescence Resonance Energy Transfer Reveals Ligand-induced Conformational Changes in CXCR4 Homo- and Heterodimers. *J Biol Chem* 280, 9895-9903.
- Perkins, L. M. and A. H. Payne (1988). Quantification of P450scc, P45017 $\alpha$ , and Iron Sulfur Protein Reductase in Leydig Cells and Adrenals of Inbred Strains of Mice. *Endocrinology* 123, 2675-2682.
- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A.-L. Borresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
- Peschard, P. and M. Park (2003). Escape from Cbl-mediated downregulation: A recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer Cell* 3, 519-523.
- Petit, I., P. Goichberg, A. Spiegel, A. Peled, C. Brodie, R. Seger, A. Nagler, R. Alon and T. Lapidot (2005). Atypical PKC- $\zeta$  regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 168-176.



- Pettersson, K., F. Delaunay and J.-Å. Gustafsson (2000). Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* *19*, 4970-4978.
- Petz, L. N. and A. M. Nardulli (2000). Sp1 Binding Sites and An Estrogen Response Element Half-Site Are Involved in Regulation of the Human Progesterone Receptor A Promoter. *Mol Endocrinol* *14*, 972-985.
- Phillips, R. J., J. Mestas, M. Gharaee-Kermani, M. D. Burdick, A. Sica, J. A. Belperio, M. P. Keane and R. M. Strieter (2005). Epidermal Growth Factor and Hypoxia-induced Expression of CXCR4 Chemokine Receptor 4 on Non-small Cell Lung Cancer Cells Is Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway and Activation of Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem* *280*, 22473-22481.
- Picard, D., V. Kumar, P. Chambon and K. R. Yamamoto (1990). Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul* *1*, 291-299.
- Picard, N., V. Caron, S. Bilodeau, M. Sanchez, X. Mascle, M. Aubry and A. Tremblay (2012). Identification of Estrogen Receptor  $\beta$  as a SUMO-1 Target Reveals a Novel Phosphorylated Sumoylation Motif and Regulation by Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ . *Mol Cell Biol* *32*, 2709-2721.
- Picard, N., C. Charbonneau, M. Sanchez, A. Licznar, M. Busson, G. Lazennec and A. Tremblay (2008). Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* *22*, 317-330.
- Picard, N., C. Charbonneau, M. Sanchez, A. Licznar, M. Busson, G. Lazennec and A. Tremblay (2008). Phosphorylation of Activation Function-1 Regulates Proteasome-Dependent Nuclear Mobility and E6-Associated Protein Ubiquitin Ligase Recruitment to the Estrogen Receptor  $\beta$ . *Mol Endocrinol* *22*, 317-330.
- Pietras, R., J. Arboleda, D. Reese, N. Wongvipat, M. Pegram, L. Ramos, C. Gorman, M. Parker, M. Sliwkowski and D. Slamon (1995). HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* *10*, 2435-2446.
- Pietras, R. J., J. Arboleda, D. M. Reese, N. Wongvipat, M. D. Pegram, L. Ramos, C. M. Gorman, M. G. Parker, M. X. Sliwkowski and D. J. Slamon (1995). HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* *10*, 2435-2446.
- Pietras, R. J., D. C. Márquez, H.-W. Chen, E. Tsai, O. Weinberg and M. Fishbein (2005). Estrogen and growth factor receptor interactions in human breast and non-small cell lung cancer cells. *Steroids* *70*, 372-381.
- Pinkas-Kramarski, R., R. Eilam, I. Alroy, G. Levkowitz, P. Lonai and Y. Yarden (1997). Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB-3 and ErbB-4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. *Oncogene* *15*, 2803-2815.
- Pinkas-Kramarski, R., L. Soussan, H. Waterman, G. Levkowitz, I. Alroy, L. Klapper, S. Lavi, R. Seger, B. J. Ratzkin, M. Sela and Y. Yarden (1996). Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* *15*, 2452-2467.
- Plowman, G. D., J. M. Culouscou, G. S. Whitney, J. M. Green, G. W. Carlton, L. Foy, M. G. Neubauer and M. Shoyab (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *90*, 1746-1750.
- Plowman, G. D., G. S. Whitney, M. G. Neubauer, J. M. Green, V. L. McDonald, G. J. Todaro and M. Shoyab (1990). Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *87*, 4905-4909.

- Polo, S., S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M. R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli and P. P. Di Fiore (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* *416*, 451-455.
- Ponglikitmongkol, M., H. WhiteJ and P. Chambon (1990). Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J* *9*, 2221-2231.
- Ponomyrov, T., A. Peled, I. Petit, R. S. Taichman, L. Habler, J. Sandbank, F. Arenzana-Seisdedos, A. Magerus, A. Caruz, N. Fujii, A. Nagler, M. Lahav, M. Szyper-Kravitz, D. Zipori and T. Lapidot (2000). Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *The Journal of Clinical Investigation* *106*, 1331-1339.
- Porcile, C., A. Bajetto, F. Barbieri, S. Barbero, R. Bonavia, M. Biglieri, P. Pirani, T. Florio and G. Schettini (2005). Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation. *Exp Cell Res* *308*, 241-253.
- Porter, G. A., R. Bogoroch and I. S. Edelman (1964). ON THE MECHANISM OF ACTION OF ALDOSTERONE ON SODIUM TRANSPORT: THE ROLE OF RNA SYNTHESIS. *Proc Natl Acad Sci U S A* *52*, 1326-1333.
- Porter, W., B. Saville, D. Hoivik and S. Safe (1997). Functional Synergy between the Transcription Factor Sp1 and the Estrogen Receptor. *Mol Endocrinol* *11*, 1569-1580.
- Porter, W., F. Wang, W. Wang, R. Duan and S. Safe (1996). Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol Endocrinol* *10*, 1371-1378.
- Power, C. A. (2003). Knock out models to dissect chemokine receptor function in vivo. *J Immunol Methods* *273*, 73-82.
- Power, R., S. Mani, J. Codina, O. Conneely and B. O'Malley (1991). Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* *254*, 1636-1639.
- Prall, O. W. J., B. Sarcevic, E. A. Musgrove, C. K. W. Watts and R. L. Sutherland (1997). Estrogen-induced Activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S Phase Progression Is Accompanied by Increased Cyclin D1 Expression and Decreased Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Association with Cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem* *272*, 10882-10894.
- Prasad, A., A. Z. Fernandis, Y. Rao and R. K. Ganju (2004). Slit Protein-mediated Inhibition of CXCR4-induced Chemotactic and Chemoinvasive Signaling Pathways in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* *279*, 9115-9124.
- Prenzel, N., O. M. Fischer, S. Streit, S. Hart and A. Ullrich (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer* *8*, 11-31.
- Prossnitz, E. R., J. B. Arterburn and L. A. Sklar (2007). GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol* *265-266*, 138-142.
- Proudfoot, A. E. I., T. M. Handel, Z. Johnson, E. K. Lau, P. LiWang, I. Clark-Lewis, F. Borlat, T. N. C. Wells and M. H. Kosco-Vilbois (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 1885-1890.
- Qin, C., P. Singh and S. Safe (1999). Transcriptional Activation of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-4 by 17 $\beta$ -Estradiol in MCF-7 Cells: Role of Estrogen Receptor-Sp1 Complexes. *Endocrinology* *140*, 2501-2508.
- Qiu, X.-b. and A. L. Goldberg (2002). Nrdp1 FLRF is a ubiquitin ligase promoting ubiquitination and degradation of the epidermal growth factor receptor family member , ErbB3. *99*.
- Qiu, X.-B. and A. L. Goldberg (2002). Nrdp1/FLRF is a ubiquitin ligase promoting ubiquitination and degradation of the epidermal growth factor receptor family member, ErbB3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 14843-14848.
- Qutob, M. S., R. N. Bhattacharjee, E. Pollari, S. P. Yee and J. Torchia (2002). Microtubule-Dependent Subcellular Redistribution of the Transcriptional Coactivator p/CIP. *Mol Cell Biol* *22*, 6611-6626.

- Radhakrishnan, Y., L. A. Maile, Y. Ling, L. M. Graves and D. R. Clemmons (2008). Insulin-like Growth Factor-I Stimulates Shc-dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation via Grb2-associated p85 in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* 283, 16320-16331.
- Raggo, C., R. Ruhl, S. McAllister, H. Koon, B. J. Dezube, K. Früh and A. V. Moses (2005). Novel Cellular Genes Essential for Transformation of Endothelial Cells by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Cancer Res* 65, 5084-5095.
- Rahimi, M., J. George and C. Tang (2010). EGFR variant-mediated invasion by enhanced CXCR4 expression through transcriptional and post-translational mechanisms. *Int J Cancer* 126, 1850-1860.
- Rajagopal, S., J. Kim, S. Ahn, S. Craig, C. M. Lam, N. P. Gerard, C. Gerard and R. J. Lefkowitz (2010).  $\beta$ -arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 628-632.
- Rajendran, R. R., A. C. Nye, J. Frasor, R. D. Balsara, P. G. V. Martini and B. S. Katzenellenbogen (2003). Regulation of Nuclear Receptor Transcriptional Activity by a Novel DEAD Box RNA Helicase (DP97). *J Biol Chem* 278, 4628-4638.
- Raman, D., P. J. Baugher, Y. M. Thu and A. Richmond (2007). Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 256, 137-165.
- Ramos, E. A. S., M. Grochoski, K. Braun-Prado, G. G. Seniski, I. J. Cavalli, E. M. S. F. Ribeiro, A. A. Camargo, F. F. Costa and G. Klassen (2011). Epigenetic Changes of CXCR4 and Its Ligand CXCL12 as Prognostic Factors for Sporadic Breast Cancer. *PLoS ONE* 6, e29461.
- Ray, A., K. E. Prefontaine and P. Ray (1994). Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *J Biol Chem* 269, 12940-12946.
- Razandi, M., P. Oh, A. Pedram, J. Schnitzer and E. R. Levin (2002). ERs Associate with and Regulate the Production of Caveolin: Implications for Signaling and Cellular Actions. *Mol Endocrinol* 16, 100-115.
- Razandi, M., A. Pedram, G. L. Greene and E. R. Levin (1999). Cell Membrane and Nuclear Estrogen Receptors (ERs) Originate from a Single Transcript: Studies of ER $\alpha$  and ER $\beta$  Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *Mol Endocrinol* 13, 307-319.
- Razandi, M., A. Pedram and E. R. Levin (2000). Estrogen Signals to the Preservation of Endothelial Cell Form and Function. *J Biol Chem* 275, 38540-38546.
- Razandi, M., A. Pedram, I. Merchenthaler, G. L. Greene and E. R. Levin (2004). Plasma Membrane Estrogen Receptors Exist and Functions as Dimers. *Mol Endocrinol* 18, 2854-2865.
- Razandi, M., A. Pedram, S. T. Park and E. R. Levin (2003). Proximal Events in Signaling by Plasma Membrane Estrogen Receptors. *J Biol Chem* 278, 2701-2712.
- Razandi, M., A. Pedram, E. M. Rosen and E. R. Levin (2004). BRCA1 Inhibits Membrane Estrogen and Growth Factor Receptor Signaling to Cell Proliferation in Breast Cancer. *Mol Cell Biol* 24, 5900-5913.
- Razani, B., A. Schlegel, J. Liu and M. P. Lisanti (2001). Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans* 29, 494-499.
- Reid, G., S. Denger, M. Kos and F. Gannon (2002). Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci* 59, 821-831.
- Reid, G., M. R. Hübner, R. Métivier, H. Brand, S. Denger, D. Manu, J. Beaudouin, J. Ellenberg and F. Gannon (2003). Cyclic, Proteasome-Mediated Turnover of Unliganded and Liganded ER $\alpha$  on Responsive Promoters Is an Integral Feature of Estrogen Signaling. *Mol Cell* 11, 695-707.
- Reiter, E. and R. J. Lefkowitz (2006). GRKs and  $\beta$ -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 17, 159-165.
- Resh, M. (2004). Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem* 37, 217-232.

- Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1451, 1-16.
- Revankar, C. M., D. F. Cimino, L. A. Sklar, J. B. Arterburn and E. R. Prossnitz (2005). A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science* 307, 1625-1630.
- Rhéaume, E., Y. Lachance, H.-F. Zhao, N. Breton, M. Dumont, Y. d. Launoit, C. Trudel, V. Luu-The, J. Simard and F. Labrie (1991). Structure and Expression of a New Complementary DNA Encoding the almost Exclusive  $3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -Isomerase in Human Adrenals and Gonads. *Mol Endocrinol* 5, 1147-1157.
- Rhodes, L. V., M. R. Bratton, Y. Zhu, S. L. Tilghman, S. E. Muir, V. A. Salvo, C. R. Tate, S. Elliott, K. P. Nephew, B. M. Collins-Burow and M. E. Burow (2011). Effects of SDF-1-CXCR4 signaling on microRNA expression and tumorigenesis in estrogen receptor-alpha (ER- $\alpha$ )-positive breast cancer cells. *Exp Cell Res* 317, 2573-2581.
- Rice, D. A., M. S. Kronenberg, A. R. Mouw, L. D. Aitken, A. Franklin, B. P. Schimmer and K. L. Parker (1990). Multiple regulatory elements determine adrenocortical expression of steroid 21-hydroxylase. *J Biol Chem* 265, 8052-8058.
- Richardson, R. M., K. Tokunaga, R. Marjoram, T. Sata and R. Snyderman (2003). Interleukin-8-mediated Heterologous Receptor Internalization Provides Resistance to HIV-1 Infectivity: ROLE OF SIGNAL STRENGTH AND RECEPTOR DESENSITIZATION. *J Biol Chem* 278, 15867-15873.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* 302, 1704-1709.
- Riese, D. J., T. M. van Raaij, G. D. Plowman, G. C. Andrews and D. F. Stern (1995). The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol* 15, 5770-5776.
- Riethmacher, D., E. Sonnenberg-Riethmacher, V. Brinkmann, T. Yamaai, G. R. Lewin and C. Birchmeier (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389, 725-730.
- Riggins, R. B., R. S. Schrecengost, M. S. Guerrero and A. H. Bouton (2007). Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett* 256, 1-24.
- Ringerike, T., F. D. Blystad, F. O. Levy, I. H. Madshus and E. Stang (2002). Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *J Cell Sci* 115, 1331-1340.
- Ringold, G. M., K. R. Yamamoto, J. M. Bishop and H. E. Varmus (1977). Glucocorticoid-stimulated accumulation of mouse mammary tumor virus RNA: increased rate of synthesis of viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2879-2883.
- Rishi, A. K., Z.-M. Shao, R. G. Baumann, X.-S. Li, M. S. Sheikh, S. Kimura, N. Bashirelahi and J. A. Fontana (1995). Estradiol Regulation of the Human Retinoic Acid Receptor  $\alpha$  Gene in Human Breast Carcinoma Cells Is Mediated via an Imperfect Half-Palindromic Estrogen Response Element and Sp1 Motifs. *Cancer Res* 55, 4999-5006.
- Roberts, A. B., L. C. Lamb, D. L. Newton, M. B. Sporn, J. E. De Larco and G. J. Todaro (1980). Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3494-3498.
- Rodrigue-Way, A., A. Demers, H. Ong and A. Tremblay (2007). A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology* 148, 1009-1018.

- Rogatsky, I., J. M. Trowbridge and M. J. Garabedian (1999). Potentiation of Human Estrogen Receptor  $\alpha$  Transcriptional Activation through Phosphorylation of Serines 104 and 106 by the Cyclin A-CDK2 Complex. *J Biol Chem* *274*, 22296-22302.
- Roger, P., M. E. Sahla, S. Mäkelä, J. Å. Gustafsson, P. Baldet and H. Rochefort (2001). Decreased Expression of Estrogen Receptor  $\beta$  Protein in Proliferative Preinvasive Mammary Tumors. *Cancer Res* *61*, 2537-2541.
- Roland, J., B. J. Murphy, B. Ahr, V. Robert-Hebmann, V. Delauzun, K. E. Nye, C. Devaux and M. Biard-Piechaczyk (2003). Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* *101*, 399-406.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). NF- $\kappa$ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* *401*, 86-90.
- Rombouts, E. J. C., B. Pavic, B. Löwenberg and R. E. Ploemacher (2004). Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood* *104*, 550-557.
- Ross, J. S. and J. A. Fletcher (1998). The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Stem Cells* *16*, 413-428.
- Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annu Rev Immunol* *18*, 217-242.
- Rousseau, G. and J. Crabbé (1968). Stimulation by aldosterone of a rapidly labelled RNA fraction in toad bladder tissue. *Biochem Biophys Acta* *157*, 25-32.
- Rousseau, G. G. (2013). Fifty years ago: The quest for steroid hormone receptors. *Mol Cell Endocrinol* *375*, 10-13.
- Rousseau, G. G., S. J. Higgins, J. D. Baxter, D. Gelfand and G. M. Tomkins (1975). Binding of glucocorticoid receptors to DNA. *J Biol Chem* *250*, 6015-6021.
- Routledge, E. J., R. White, M. G. Parker and J. P. Sumpter (2000). Differential Effects of Xenoestrogens on Coactivator Recruitment by Estrogen Receptor (ER)  $\alpha$  and ER $\beta$ . *J Biol Chem* *275*, 35986-35993.
- Rowan, B. G., N. L. Weigel and B. W. O'Malley (2000). Phosphorylation of Steroid Receptor Coactivator-1: IDENTIFICATION OF THE PHOSPHORYLATION SITES AND PHOSPHORYLATION THROUGH THE MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE PATHWAY. *J Biol Chem* *275*, 4475-4483.
- Rubin, J. B. (2009). Chemokine signaling in cancer: One hump or two? *Semin Cancer Biol* *19*, 116-122.
- Rubin, J. B., A. L. Kung, R. S. Klein, J. A. Chan, Y. Sun, K. Schmidt, M. W. Kieran, A. D. Luster and R. A. Segal (2003). A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 13513-13518.
- Ruff, M., M. Gangloff, J. Marie Wurtz and D. Moras (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res* *2*, 353 - 359.
- Russell, D. W. and J. D. Wilson (1994). Steroid 5 $\alpha$ -Reductase: Two Genes/Two Enzymes. *Annu Rev Biochem* *63*, 25-61.
- Russell, K. S. and M.-C. Hung (1992). Transcriptional Repression of the neu Protooncogene by Estrogen Stimulated Estrogen Receptor. *Cancer Res* *52*, 6624-6629.
- Sabbah, M., D. Courilleau, J. Mester and G. Redeuilh (1999). Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: Involvement of a cAMP response-like element. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 11217-11222.
- Sabnis, G. J., D. Jelovac, B. Long and A. Brodie (2005). The Role of Growth Factor Receptor Pathways in Human Breast Cancer Cells Adapted to Long-term Estrogen Deprivation. *Cancer Res* *65*, 3903-3910.

- Saez, J. M. (1994). Leydig Cells: Endocrine, Paracrine, and Autocrine Regulation. *Endocr Rev* 15, 574-626.
- Saji, S., N. Okumura, H. Eguchi, S. Nakashima, A. Suzuki, M. Toi, Y. Nozawa, S. Saji and S.-i. Hayashi (2001). MDM2 Enhances the Function of Estrogen Receptor  $\alpha$  in Human Breast Cancer Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 259-265.
- Salcedo, R., K. Wasserman, H. A. Young, M. C. Grimm, O. M. Z. Howard, M. R. Anver, H. K. Kleinman, W. J. Murphy and J. J. Oppenheim (1999). Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells: In Vivo Neovascularization Induced by Stromal-Derived Factor-1 $\alpha$ . *The American Journal of Pathology* 154, 1125-1135.
- Samara, G. J., D. M. Lawrence, C. J. Chiarelli, M. D. Valentino, S. Lyubsky, S. Zucker and G. G. Vaday (2004). CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 214, 231-241.
- Sanchez, M., N. Picard, K. Sauve and A. Tremblay (2010). Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends Endocrinol Metab* 21, 104-110.
- Sanchez, M., N. Picard, K. Sauve and A. Tremblay (2013). Coordinate regulation of estrogen receptor [beta] degradation by Mdm2 and CREB-binding protein in response to growth signals. *Oncogene* 32, 117-126.
- Sanchez, M., K. Sauve, N. Picard and A. Tremblay (2007). The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem* 282, 4830-4840.
- Santiskulvong, C. and E. Rozengurt (2007). Protein kinase C $\alpha$  mediates feedback inhibition of EGF receptor transactivation induced by Gq-coupled receptor agonists. *Cell Signal* 19, 1348-1357.
- Sarwar, N., J.-S. Kim, J. Jiang, D. Peston, H. D. Sinnett, P. Madden, J. M. Gee, R. I. Nicholson, A. E. Lykkesfeldt, S. Shousha, R. C. Coombes and S. Ali (2006). Phosphorylation of ER $\alpha$  at serine 118 in primary breast cancer and in tamoxifen-resistant tumours is indicative of a complex role for ER $\alpha$  phosphorylation in breast cancer progression. *Endocrine-Related Cancer* 13, 851-861.
- Sasano, H., M. Okamoto, J. I. Mason, E. R. Simpson, C. R. Mendelson, N. Sasano and S. G. Silverberg (1989). Immunolocalization of aromatase, 17 $\alpha$ -hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary. *J Reprod Fertil* 85, 163-169.
- Sasano, H., M. Uzuki, T. Sawai, H. Nagura, G. Matsunaga, O. Kashimoto and N. Harada (1997). Aromatase in Human Bone Tissue. *J Bone Miner Res* 12, 1416-1423.
- Sauvé, K., J. Lepage, M. Sanchez, N. Heveker and A. Tremblay (2009). Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res* 69, 5793-5800.
- Savage, C. R., T. Inagami and S. Cohen (1972). The Primary Structure of Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem* 247, 7612-7621.
- Savarin-Vuailat, C. and R. M. Ransohoff (2007). Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? *Neurotherapeutics* 4, 590-601.
- Saville, B., M. Wormke, F. Wang, T. Nguyen, E. Enmark, G. Kuiper, J.-Å. Gustafsson and S. Safe (2000). Ligand-, Cell-, and Estrogen Receptor Subtype ( $\alpha/\beta$ )-dependent Activation at GC-rich (Sp1) Promoter Elements. *J Biol Chem* 275, 5379-5387.
- Scala, S., A. Ottaiano, P. A. Ascierto, M. Cavalli, E. Simeone, P. Giuliano, M. Napolitano, R. Franco, G. Botti and G. Castello (2005). Expression of CXCR4 Predicts Poor Prognosis in Patients with Malignant Melanoma. *Clin Cancer Res* 11, 1835-1841.
- Scaltriti, M., S. Chandralapaty, L. Prudkin, C. Aura, J. Jimenez, P. D. Angelini, G. Sánchez, M. Guzman, J. L. Parra, C. Ellis, R. Gagnon, M. Koehler, H. Gomez, C. Geyer, D. Cameron, J. Arribas, N. Rosen and J. Baselga (2010). Clinical Benefit of Lapatinib-Based Therapy in Patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Tumors Coexpressing the Truncated p95HER2 Receptor. *Clin Cancer Res* 16, 2688-2695.

- Scaltriti, M., F. Rojo, A. Ocaña, J. Anido, M. Guzman, J. Cortes, S. Di Cosimo, X. Matias-Guiu, S. Ramon y Cajal, J. Arribas and J. Baselga (2007). Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* *99*, 628-638.
- Schabath, H., S. Runz, S. Joumaa and P. Altevogt (2006). CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci* *119*, 314-325.
- Schechter, A., M. Hung, L. Vaidyanathan, R. Weinberg, T. Yang-Feng, U. Francke, A. Ullrich and L. Coussens (1985). The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* *229*, 976-978.
- Schechter, A., D. Stern, L. Vaidyanathan, S. Decker, J. Drebin, M. Greene and R. Weinberg (1984). The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* *312*, 513-516.
- Scher, C. D. and G. J. Todaro (1971). Selective growth of human neoplastic cells in medium lacking serum growth factor. *Exp Cell Res* *68*, 479-481.
- Scher, H. I., X. Jia, J. S. de Bono, M. Fleisher, K. J. Pienta, D. Raghavan and G. Heller (2009). Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *The Lancet Oncology* *10*, 233-239.
- Schiff, R., S. Massarweh, J. Shou, L. Bharwani, S. Mohsin and C. Osborne (2004). Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res* *10*, 331S-336S.
- Schiller, M. R. (2006). Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases—GEFs what's the link. *Cell Signal* *18*, 1834-1843.
- Schioppa, T., B. Uranchimeg, A. Saccani, S. K. Biswas, A. Doni, A. Rapisarda, S. Bernasconi, S. Saccani, M. Nebuloni, L. Vago, A. Mantovani, G. Melillo and A. Sica (2003). Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia. *The Journal of Experimental Medicine* *198*, 1391-1402.
- Schlegel, A., R. Pestell and M. Lisanti (2000). Caveolins in cholesterol trafficking and signal transduction: implications for human disease. *Front Biosci* *5*, D929-937.
- Schlessinger, J. (2000). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* *103*, 211-225.
- Schmid, B., M. Rudas, G. Reznicek, S. Leodolter and R. Zeillinger (2004). CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia. *Breast Cancer Res Treat* *84*, 247-250.
- Schmid, E., W. Schmid, M. Jantzen, D. Mayer, B. Jastorff and G. SchÜTZ (1987). Transcription activation of the tyrosine aminotransferase gene by glucocorticoids and cAMP in primary hepatocytes. *Eur J Biochem* *165*, 499-506.
- Schmitt, M., P. Bausero, P. Simoni, D. Queuche, V. Geoffroy, C. Marschal, J. Kempf and C. Quirin-Stricker (1995). Positive and negative effects of nuclear receptors on transcription activation by AP-1 of the human choline acetyltransferase proximal promoter. *J Neurosci Res* *40*, 152-164.
- Schönemeier, B., A. Kolodziej, S. Schulz, S. Jacobs, V. Hoellt and R. Stumm (2008). Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* *510*, 207-220.
- Schroeder, J. and D. Lee (1998). Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland. *Cell Growth Differ* *9*, 451-464.
- Schutyser, E., Y. Su, Y. Yu, M. Gouwy, S. Zaja-Milatovic, J. Van Damme and A. Richmond (2007). Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. *Eur Cytokine Netw* *18*, 59-70.
- Schwabe, J. W. R., L. Chapman, J. T. Finch and D. Rhodes (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. *Cell* *75*, 567-578.

- Schweitzer, R., R. Howes, R. Smith, B.-Z. Shilo and M. Freeman (1995). Inhibition of *Drosophila* EGF receptor activation by the secreted protein Argos. *Nature* *376*, 699-702.
- Scotton, C. J., J. L. Wilson, K. Scott, G. Stamp, G. D. Wilbanks, S. Fricker, G. Bridger and F. R. Balkwill (2002). Multiple Actions of the Chemokine CXCL12 on Epithelial Tumor Cells in Human Ovarian Cancer. *Cancer Res* *62*, 5930-5938.
- Sebastian, J., R. Richards, M. Walker, J. Wiesen, Z. Werb, R. Derynck, Y. Hom, G. Cunha and R. DiAugustine (1998). Activation and function of the epidermal growth factor receptor and erbB-2 during mammary gland morphogenesis. *Cell Growth Differ* *9*, 777-785.
- Secreto, F. J., D. G. Monroe, S. Dutta, J. N. Ingle and T. C. Spelsberg (2007). Estrogen receptor  $\alpha/\beta$  isoforms, but not  $\beta\text{cx}$ , modulate unique patterns of gene expression and cell proliferation in Hs578T cells. *J Cell Biochem* *101*, 1125-1147.
- See, R. H., D. Calvo, Y. Shi, H. Kawa, M. P.-S. Luke, Z. Yuan and Y. Shi (2001). Stimulation of p300-mediated Transcription by the Kinase MEKK1. *J Biol Chem* *276*, 16310-16317.
- Selleri, C., N. Montuori, P. Ricci, V. Visconte, M. V. Carriero, N. Sidenius, B. Serio, F. Blasi, B. Rotoli, G. Rossi and P. Ragno (2005). Involvement of the urokinase-type plasminogen activator receptor in hematopoietic stem cell mobilization. *Blood* *105*, 2198-2205.
- Sentis, S., M. Le Romancer, C. Bianchin, M.-C. Rostan and L. Corbo (2005). Sumoylation of the Estrogen Receptor  $\alpha$  Hinge Region Regulates Its Transcriptional Activity. *Mol Endocrinol* *19*, 2671-2684.
- Seol, W., H. Choi and D. Moore (1996). An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* *272*, 1336-1339.
- Shah, Y. M. and B. G. Rowan (2005). The Src Kinase Pathway Promotes Tamoxifen Agonist Action in Ishikawa Endometrial Cells through Phosphorylation-Dependent Stabilization of Estrogen Receptor  $\alpha$  Promoter Interaction and Elevated Steroid Receptor Coactivator 1 Activity. *Mol Endocrinol* *19*, 732-748.
- Shang, Y. (2007). Hormones and cancer. *Cell Res* *17*, 277-279.
- Shang, Y. and M. Brown (2002). Molecular Determinants for the Tissue Specificity of SERMs. *Science* *295*, 2465-2468.
- Shang, Y., X. Hu, J. DiRenzo, M. A. Lazar and M. Brown (2000). Cofactor Dynamics and Sufficiency in Estrogen Receptor-Regulated Transcription. *Cell* *103*, 843-852.
- Shao, W., E. K. Keeton, D. P. McDonnell and M. Brown (2004). Coactivator AIB1 links estrogen receptor transcriptional activity and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11599-11604.
- Shaywitz, A. J. and M. E. Greenberg (1999). CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by A Diverse Array of Extracellular Signals. *Annu Rev Biochem* *68*, 821-861.
- Sheeler, C., D. Singleton and S. Khan (2003). Mutation of serines 104, 106, and 118 inhibits dimerization of the human estrogen receptor in yeast. *Endocr Res* *29*, 237-255.
- Shen, Q., I. P. Uray, Y. Li, T. I. Krisko, T. E. Strecker, H. T. Kim and P. H. Brown (2007). The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. *Oncogene* *27*, 366-377.
- Shen, W., L. J. Bendall, D. J. Gottlieb and K. F. Bradstock (2001). The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. *Exp Hematol* *29*, 1439-1447.
- Sherman, L. S., T. A. Rizvi, S. Karyala and N. Ratner (2000). Cd44 Enhances Neuregulin Signaling by Schwann Cells. *The Journal of Cell Biology* *150*, 1071-1084.
- Shi, G., S. Partida-Sánchez, R. S. Misra, M. Tighe, M. T. Borchers, J. J. Lee, M. I. Simon and F. E. Lund (2007). Identification of an alternative G $\alpha$ q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes. *The Journal of Experimental Medicine* *204*, 2705-2718.
- Shi, X.-P., S. Miao, Y. Wu, W. Zhang, X.-F. Zhang, H.-Z. Ma, H.-L. Xin, J. Feng, A.-D. Wen and Y. Li (2013). Resveratrol Sensitizes Tamoxifen in Antiestrogen-Resistant Breast Cancer Cells



- with Epithelial-Mesenchymal Transition Features. *International Journal of Molecular Sciences* *14*, 15655-15668.
- Shi, Y., M. Downes, W. Xie, H.-Y. Kao, P. Ordentlich, C.-C. Tsai, M. Hon and R. M. Evans (2001). Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes Dev* *15*, 1140-1151.
- Shiau, A. K., D. Barstad, P. M. Loria, L. Cheng, P. J. Kushner, D. A. Agard and G. L. Greene (1998). The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell* *95*, 927-937.
- Shigematsu, H., T. Takahashi, M. Nomura, K. Majmudar, M. Suzuki, H. Lee, I. I. Wistuba, K. M. Fong, S. Toyooka, N. Shimizu, T. Fujisawa, J. D. Minna and A. F. Gazdar (2005). Somatic Mutations of the HER2 Kinase Domain in Lung Adenocarcinomas. *Cancer Res* *65*, 1642-1646.
- Shim, G.-J., L. Wang, S. Andersson, N. Nagy, L. L. Kis, Q. Zhang, S. Mäkelä, M. Warner and J.-Å. Gustafsson (2003). Disruption of the estrogen receptor  $\beta$  gene in mice causes myeloproliferative disease resembling chronic myeloid leukemia with lymphoid blast crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 6694-6699.
- Shimizu, N., Y. Soda, K. Kanbe, H.-y. Liu, R. Mukai, T. Kitamura and H. Hoshino (2000). A Putative G Protein-Coupled Receptor, RDC1, Is a Novel Coreceptor for Human and Simian Immunodeficiency Viruses. *J Virol* *74*, 619-626.
- Shin, I. and C. L. Arteaga (2006). Expression of active Akt protects against tamoxifen-induced apoptosis in MCF-7 Cells. *IUBMB Life* *58*, 664-669.
- Shintani, S., T. Funayama, Y. Yoshihama, R. Alcalde and T. Matsumura (1995). Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* *95*, 79-83.
- Shiozawa, T., T. Miyamoto, H. Kashima, K. Nakayama, T. Nikaido and I. Konishi (2004). Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-Jun to an AP-1 sequence. *Oncogene* *23*, 8603-8610.
- Shirozu, M., T. Nakano, J. Inazawa, K. Tashiro, H. Tada, T. Shinohara and T. Honjo (1995). Structure and Chromosomal Localization of the Human Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF1) Gene. *Genomics* *28*, 495-500.
- Shou, J., S. Massarweh, C. K. Osborne, A. E. Wakeling, S. Ali, H. Weiss and R. Schiff (2004). Mechanisms of Tamoxifen Resistance: Increased Estrogen Receptor-HER2/neu Cross-Talk in ER/HER2-Positive Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* *96*, 926-935.
- Siegel, P. M., E. D. Ryan, R. D. Cardiff and W. J. Muller (1999). Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J* *18*, 2149-2164.
- Siegel, P. M., W. Shu, R. D. Cardiff, W. J. Muller and J. Massagué (2003). Transforming growth factor  $\beta$  signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 8430-8435.
- Sierro, F., C. Biben, L. Martínez-Muñoz, M. Mellado, R. M. Ransohoff, M. Li, B. Woehl, H. Leung, J. Groom, M. Batten, R. P. Harvey, C. Martínez-A, C. R. Mackay and F. Mackay (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 14759-14764.
- Sigismund, S., T. Woelk, C. Puri, E. Maspero, C. Tacchetti, P. Transidico, P. P. Di Fiore and S. Polo (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 2760-2765.
- Signoret, N., J. Oldridge, A. Pelchen-Matthews, P. J. Klasse, T. Tran, L. F. Brass, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, W. Holmes, W. Dallas, M. A. Luther, T. N. C. Wells, J. A. Hoxie and M. Marsh (1997). Phorbol Esters and SDF-1 Induce Rapid Endocytosis and Down Modulation of the Chemokine Receptor CXCR4. *The Journal of Cell Biology* *139*, 651-664.

- Signoret, N., M. M. Rosenkilde, P. J. Klasse, T. W. Schwartz, M. H. Malim, J. A. Hoxie and M. Marsh (1998). Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *J Cell Sci* *111*, 2819-2830.
- Simard, J., F. Durocher, F. Mébarki, C. Turgeon, R. Sanchez, Y. Labrie, J. Couet, C. Trudel, E. Rhéaume, Y. Morel, V. Luu-The and F. Labrie (1996). Molecular biology and genetics of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 isomerase gene family. *J Endocrinol* *150*, S189-S207.
- Simoncini, T., A. Hafezi-Moghadam, D. P. Brazil, K. Ley, W. W. Chin and J. K. Liao (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* *407*, 538-541.
- Simpson, E. R., C. Clyne, G. Rubin, W. C. Boon, K. Robertson, K. Britt, C. Speed and M. Jones (2002). AROMATASE—A BRIEF OVERVIEW. *Annu Rev Physiol* *64*, 93-127.
- Simpton, N., W. Cunliffe and M. Hodgins (1983). The relationship between the vitro activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta 4-5-isomerase in human sebaceous glands and their secretory activity in vivo. *J Invest Dermatol* *81*, 139-144.
- Singer, M. F. and P. Leder (1966). Messenger RNA: An Evaluation. *Annu Rev Biochem* *35*, 195-230.
- Singh, N., M. Nigam, V. Ranjan, R. Sharma, A. K. Balapure and S. K. Rath (2009). Caspase Mediated Enhanced Apoptotic Action of Cyclophosphamide- and Resveratrol-Treated MCF-7 Cells. *Journal of Pharmacological Sciences* *109*, 473-485.
- Singleton, D. W., Y. Feng, C. J. Burd and S. A. Khan (2003). Nongenomic Activity and Subsequent c-fos Induction by Estrogen Receptor Ligands Are Not Sufficient to Promote Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Human Endometrial Adenocarcinoma Cells. *Endocrinology* *144*, 121-128.
- Sipkins, D. A., X. Wei, J. W. Wu, J. M. Runnels, D. Cote, T. K. Means, A. D. Luster, D. T. Scadden and C. P. Lin (2005). In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* *435*, 969-973.
- Skafar, D. and C. Zhao (2008). The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine* *33*, 1-8.
- Skelton, N., C. Quan, D. Reilly and H. Lowman (1999). Structure of a CXC chemokine-receptor fragment in complex with interleukin-8. *Structure* *7*, 157-168.
- Skliris, G., A. Lewis, E. Emberley, B. Peng, W. Weebadda, A. Kemp, J. Davie, R. C. Shiu, P. Watson and L. Murphy (2007). Estrogen receptor- $\beta$  regulates psoriasin (S100A7) in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* *104*, 75-85.
- Skliris, G. P., E. Leygue, L. Curtis-Snell, P. H. Watson and L. C. Murphy (2006). Expression of oestrogen receptor-[beta] in oestrogen receptor-[alpha] negative human breast tumours. *Br J Cancer* *95*, 616-626.
- Slagsvold, T., A. Marchese, A. Brech and H. Stenmark (2006). CISK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4. *EMBO J* *25*, 3738-3749.
- Slamon, D., G. Clark, S. Wong, W. Levin, A. Ullrich and W. McGuire (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* *9*, 177-182.
- Slamon, D., W. Godolphin, L. Jones, J. Holt, S. Wong, D. Keith, W. Levin, S. Stuart, J. Udove, A. Ullrich and e. al (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* *12*, 707-712.
- Sliwkowski, M. X., G. Schaefer, R. W. Akita, J. A. Lofgren, V. D. Fitzpatrick, A. Nuijens, B. M. Fendly, R. A. Cerione, R. L. Vandlen and K. L. Carraway (1994). Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* *269*, 14661-14665.
- Smith, C. L., Z. Nawaz and B. W. O'Malley (1997). Coactivator and Corepressor Regulation of the Agonist/Antagonist Activity of the Mixed Antiestrogen, 4-Hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* *11*, 657-666.

- Smith, C. L. and B. W. O'Malley (2004). Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. *Endocr Rev* 25, 45-71.
- Smith, M., K. Luker, J. Garbow, J. Prior, E. Jackson, D. Piwnica-Worms and G. Luker (2004). CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 64, 8604 - 8612.
- Smith, M. C. P., K. E. Luker, J. R. Garbow, J. L. Prior, E. Jackson, D. Piwnica-Worms and G. D. Luker (2004). CXCR4 Regulates Growth of Both Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res* 64, 8604-8612.
- Smotrys, J. E. and M. E. Linder (2004). PALMITOYLATION OF INTRACELLULAR SIGNALING PROTEINS: Regulation and Function. *Annu Rev Biochem* 73, 559-587.
- Soltoff, S. P. and L. C. Cantley (1996). p120 Is a Cytosolic Adapter Protein That Associates with Phosphoinositide 3-Kinase in Response to Epidermal Growth Factor in PC12 and Other Cells. *J Biol Chem* 271, 563-567.
- Song, R. X.-D., R. A. McPherson, L. Adam, Y. Bao, M. Shupnik, R. Kumar and R. J. Santen (2002). Linkage of Rapid Estrogen Action to MAPK Activation by ER $\alpha$ -Shc Association and Shc Pathway Activation. *Mol Endocrinol* 16, 116-127.
- Sosa, M. S., C. Lopez-Haber, C. Yang, H. Wang, M. A. Lemmon, J. M. Busillo, J. Luo, J. L. Benovic, A. Klein-Szanto, H. Yagi, J. S. Gutkind, R. E. Parsons and M. G. Kazanietz (2010). Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an Essential Mediator of ErbB Signaling in Breast Cancer. *Mol Cell* 40, 877-892.
- Sosa, M. S., C. Lopez-Haber, C. Yang, H. Wang, M. a. Lemmon, J. M. Busillo, J. Luo, J. L. Benovic, A. Klein-Szanto, H. Yagi, J. S. Gutkind, R. E. Parsons and M. G. Kazanietz (2010). Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol Cell* 40, 877-892.
- Spencer, K. S. R., D. Graus-Porta, J. Leng, N. E. Hynes and R. L. Klemke (2000). ErbB2 Is Necessary for Induction of Carcinoma Cell Invasion by ErbB Family Receptor Tyrosine Kinases. *The Journal of Cell Biology* 148, 385-397.
- Sperinde, J., X. Jin, J. Banerjee, E. Penuel, A. Saha, G. Diedrich, W. Huang, K. Leitzel, J. Weidler, S. M. Ali, E.-M. Fuchs, C. F. Singer, W. J. Köstler, M. Bates, G. Parry, J. Winslow and A. Lipton (2010). Quantitation of p95HER2 in Paraffin Sections by Using a p95-Specific Antibody and Correlation with Outcome in a Cohort of Trastuzumab-Treated Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 16, 4226-4235.
- Spiegel, A., O. Kollet, A. Peled, L. Abel, A. Nagler, B. Bielorai, G. Rechavi, J. Vormoor and T. Lapidot (2004). Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling. *Blood* 103, 2900-2907.
- Spillane, J. B. and M. A. Henderson (2007). CANCER STEM CELLS: A REVIEW. *ANZ Journal of Surgery* 77, 464-468.
- Springael, J.-Y., E. Urizar and M. Parmentier (2005). Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 611-623.
- St-Laurent, V., M. Sanchez, C. Charbonneau and A. Tremblay (2005). Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 94, 23-37.
- St-Laurent, V., M. Sanchez, C. Charbonneau and A. Tremblay (2005). Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 94, 23-37.
- Staal, A., A. J. van Wijnen, J. C. Birkenhäger, H. A. Pols, J. Prahl, H. DeLuca, M. P. Gaub, J. B. Lian, G. S. Stein, J. P. van Leeuwen and J. L. Stein (1996). Distinct conformations of vitamin D receptor/retinoid X receptor-alpha heterodimers are specified by dinucleotide differences in the vitamin D-responsive elements of the osteocalcin and osteopontin genes. *Mol Endocrinol* 10, 1444-1456.

- Staller, P., J. Sulitkova, J. Lisztwan, H. Moch, E. J. Oakeley and W. Krek (2003). Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* *425*, 307-311.
- Stanišić, V., A. Malovannaya, J. Qin, D. M. Lonard and B. W. O'Malley (2009). OTU Domain-containing Ubiquitin Aldehyde-binding Protein 1 (OTUB1) Deubiquitinates Estrogen Receptor (ER)  $\alpha$  and Affects ER $\alpha$  Transcriptional Activity. *J Biol Chem* *284*, 16135-16145.
- Staub, O. and D. Rotin (2006). Role of Ubiquitylation in Cellular Membrane Transport. *Physiol Rev* *86*, 669-707.
- Stender, J. D., J. Frasor, B. Komm, K. C. N. Chang, W. L. Kraus and B. S. Katzenellenbogen (2007). Estrogen-Regulated Gene Networks in Human Breast Cancer Cells: Involvement of E2F1 in the Regulation of Cell Proliferation. *Mol Endocrinol* *21*, 2112-2123.
- Stender, J. D., K. Kim, T. H. Charn, B. Komm, K. C. N. Chang, W. L. Kraus, C. Benner, C. K. Glass and B. S. Katzenellenbogen (2010). Genome-Wide Analysis of Estrogen Receptor  $\alpha$  DNA Binding and Tethering Mechanisms Identifies Runx1 as a Novel Tethering Factor in Receptor-Mediated Transcriptional Activation. *Mol Cell Biol* *30*, 3943-3955.
- Stenoien, D. L., K. Patel, M. G. Mancini, M. Dutertre, C. L. Smith, B. W. O'Malley and M. A. Mancini (2001). FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-[alpha] is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol* *3*, 15-23.
- Stephens, P., C. Hunter, G. Bignell, S. Edkins, H. Davies, J. Teague, C. Stevens, S. O'Meara, R. Smith, A. Parker, A. Barthorpe, M. Blow, L. Brackenbury, A. Butler, O. Clarke, J. Cole, E. Dicks, A. Dike, A. Drozd, K. Edwards, S. Forbes, R. Foster, K. Gray, C. Greenman, K. Halliday, K. Hills, V. Kosmidou, R. Lugg, A. Menzies, J. Perry, R. Petty, K. Raine, L. Ratford, R. Shepherd, A. Small, Y. Stephens, C. Tofts, J. Varian, S. West, S. Widaa, A. Yates, F. Brasseur, C. S. Cooper, A. M. Flanagan, M. Knowles, S. Y. Leung, D. N. Louis, L. H. J. Looijenga, B. Malkowicz, M. A. Pierotti, B. Teh, G. Chenevix-Trench, B. L. Weber, S. T. Yuen, G. Harris, P. Goldstraw, A. G. Nicholson, P. A. Futreal, R. Wooster and M. R. Stratton (2004). Lung cancer: Intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* *431*, 525-526.
- Stoner, M., F. Wang, M. Wormke, T. Nguyen, I. Samudio, C. Vyhlidal, D. Marme, G. Finkenzeller and S. Safe (2000). Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in HEC1A Endometrial Cancer Cells through Interactions of Estrogen Receptor  $\alpha$  and Sp3 Proteins. *J Biol Chem* *275*, 22769-22779.
- Stossi, F., D. H. Barnett, J. Frasor, B. Komm, C. R. Lyttle and B. S. Katzenellenbogen (2004). Transcriptional Profiling of Estrogen-Regulated Gene Expression via Estrogen Receptor (ER)  $\alpha$  or ER $\beta$  in Human Osteosarcoma Cells: Distinct and Common Target Genes for These Receptors. *Endocrinology* *145*, 3473-3486.
- Ström, A., J. Hartman, J. S. Foster, S. Kietz, J. Wimalasena and J.-Å. Gustafsson (2004). Estrogen receptor  $\beta$  inhibits 17 $\beta$ -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1566-1571.
- Suárez Pestana, E., T. Tenev, S. Gro, B. Stoyanov, M. Ogata and F.-D. Böhmer (1999). The transmembrane protein tyrosine phosphatase RPTPsigma modulates signaling of the epidermal growth factor receptor in A431 cells. *Oncogene* *18*, 4069-4079.
- Subramanian, K., D. Jia, P. Kapoor-Vazirani, D. R. Powell, R. E. Collins, D. Sharma, J. Peng, X. Cheng and P. M. Vertino (2008). Regulation of Estrogen Receptor  $\alpha$  by the SET7 Lysine Methyltransferase. *Mol Cell* *30*, 336-347.
- Sudhir, K., T. M. Chou, K. Chatterjee, E. P. Smith, T. C. Williams, J. P. Kane, M. J. Malloy, K. S. Korach and G. M. Rubanyi (1997). Premature Coronary Artery Disease Associated With a Disruptive Mutation in the Estrogen Receptor Gene in a Man. *Circulation* *96*, 3774-3777.
- Sudhir, K., T. M. Chou, L. M. Messina, S. J. Hutchison, K. S. Korach, K. Chatterjee and G. M. Rubanyi (1997). Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *The Lancet* *349*, 1146-1147.

- Suen, C.-S., T. J. Berrodin, R. Mastroeni, B. J. Cheskis, C. R. Lyttle and D. E. Frail (1998). A Transcriptional Coactivator, Steroid Receptor Coactivator-3, Selectively Augments Steroid Receptor Transcriptional Activity. *J Biol Chem* *273*, 27645-27653.
- Sugawa, N., A. J. Ekstrand, C. D. James and V. P. Collins (1990). Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *87*, 8602-8606.
- Sun, G., W. Porter and S. Safe (1998). Estrogen-Induced Retinoic Acid Receptor  $\alpha 1$  Gene Expression: Role of Estrogen Receptor-Sp1 Complex. *Mol Endocrinol* *12*, 882-890.
- Sun, T., N. Aceto, Kristen L. Meerbrey, Jessica D. Kessler, C. Zhou, I. Migliaccio, Don X. Nguyen, Natalya N. Pavlova, M. Botero, J. Huang, Ronald J. Bernardi, E. Schmitt, G. Hu, M. Z. Li, N. Dephoure, Steven P. Gygi, M. Rao, Chad J. Creighton, Susan G. Hilsenbeck, Chad A. Shaw, D. Muzny, Richard A. Gibbs, David A. Wheeler, C. K. Osborne, R. Schiff, M. Bentires-Alj, Stephen J. Elledge and Thomas F. Westbrook (2011). Activation of Multiple Proto-oncogenic Tyrosine Kinases in Breast Cancer via Loss of the PTPN12 Phosphatase. *Cell* *144*, 703-718.
- Sun, Y., Z. Cheng, L. Ma and G. Pei (2002). Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem* *277*, 49212-49219.
- Sun, Y., D. McGarrigle and X.-Y. Huang (2007). When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Molecular BioSystems* *3*, 849-854.
- Sung, B., S. Jhurani, K. S. Ahn, Y. Mastuo, T. Yi, S. Guha, M. Liu and B. B. Aggarwal (2008). Zerumbone Down-regulates Chemokine Receptor CXCR4 Expression Leading to Inhibition of CXCL12-Induced Invasion of Breast and Pancreatic Tumor Cells. *Cancer Res* *68*, 8938-8944.
- Suratt, B. T., J. M. Petty, S. K. Young, K. C. Malcolm, J. G. Lieber, J. A. Nick, J.-A. Gonzalo, P. M. Henson and G. S. Worthen (2004). Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* *104*, 565-571.
- Svtelis, A., N. Gévry, G. Grondin and L. Gaudreau (2010). H2A.Z overexpression promotes cellular proliferation of breast cancer cells. *Cell Cycle* *9*, 364-370.
- Sweeney, C. and K. L. Carraway (2004). Negative regulation of ErbB family receptor tyrosine kinases. *Br J Cancer* *90*, 289-293.
- Szego, C. and J. Davis (1967). Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* *58*, 1711-1718.
- Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S.-i. Nishikawa, T. Kishimoto and T. Nagasawa (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* *393*, 591-594.
- Takada, Y., C. Kato, S. Kondo, R. Korenaga and J. Ando (1997). Cloning of cDNAs Encoding G Protein-Coupled Receptor Expressed in Human Endothelial Cells Exposed to Fluid Shear Stress. *Biochem Biophys Res Commun* *240*, 737-741.
- Tamamura, H., Y. Xu, T. Hattori, X. Zhang, R. Arakaki, K. Kanbara, A. Omagari, A. Otaka, T. Ibuka, N. Yamamoto, H. Nakashima and N. Fujii (1998). A Low-Molecular-Weight Inhibitor against the Chemokine Receptor CXCR4: A Strong Anti-HIV Peptide T140. *Biochem Biophys Res Commun* *253*, 877-882.
- Tamura, T., J. Kitawaki, T. Yamamoto, Y. Osawa, S. Kominami, S. Takemori and H. Okada (1992). Immunohistochemical localization of 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-20 lyase and aromatase cytochrome P-450 in the human ovary during the menstrual cycle. *J Endocrinol* *135*, 589-NP.
- Tan, M., P. Li, K. S. Klos, J. Lu, K.-H. Lan, Y. Nagata, D. Fang, T. Jing and D. Yu (2005). ErbB2 Promotes Src Synthesis and Stability: Novel Mechanisms of Src Activation That Confer Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res* *65*, 1858-1867.

- Tan, S. K., Z. H. Lin, C. W. Chang, V. Varang, K. R. Chng, Y. F. Pan, E. L. Yong, W. K. Sung and E. Cheung (2011). AP-2[ $\gamma$ ] regulates oestrogen receptor-mediated long-range chromatin interaction and gene transcription. *EMBO J* 30, 2569-2581.
- Tang, C. K., C. Perez, T. Grunt, C. Waibel, C. Cho and R. Lupu (1996). Involvement of Heregulin- $\beta$ 2 in the Acquisition of the Hormone-independent Phenotype of Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 56, 3350-3358.
- Tarasova, N. I., R. H. Stauber and C. J. Michejda (1998). Spontaneous and Ligand-induced Trafficking of CXC-Chemokine Receptor 4. *J Biol Chem* 273, 15883-15886.
- Tashiro, K., H. Tada, R. Heilker, M. Shirozu, T. Nakano and T. Honjo (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600-603.
- Tateishi, Y., Y.-i. Kawabe, T. Chiba, S. Murata, K. Ichikawa, A. Murayama, K. Tanaka, T. Baba, S. Kato and J. Yanagisawa (2004). Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J* 23, 4813-4823.
- Tateishi, Y., R. Sonoo, Y.-i. Sekiya, N. Sunahara, M. Kawano, M. Wayama, R. Hirota, Y.-i. Kawabe, A. Murayama, S. Kato, K. Kimura and J. Yanagisawa (2006). Turning Off Estrogen Receptor  $\beta$ -Mediated Transcription Requires Estrogen-Dependent Receptor Proteolysis. *Mol Cell Biol* 26, 7966-7976.
- Teglund, S., C. McKay, E. Schuetz, J. M. van Deursen, D. Stravopodis, D. Wang, M. Brown, S. Bodner, G. Grosveld and J. N. Ihle (1998). Stat5a and Stat5b Proteins Have Essential and Nonessential, or Redundant, Roles in Cytokine Responses. *Cell* 93, 841-850.
- Teis, D., W. Wunderlich and L. A. Huber (2002). Localization of the MP1-MAPK Scaffold Complex to Endosomes Is Mediated by p14 and Required for Signal Transduction. *Developmental Cell* 3, 803-814.
- Tessier, C., S. Deb, A. Prigent-Tessier, S. Ferguson-Gottschall, G. B. Gibori, R. P. C. Shiu and G. Gibori (2000). Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in Rat Decidua Cells: Cell-Specific Expression and Differential Regulation by Steroid Hormones and Prolactin. *Endocrinology* 141, 3842-3851.
- Tham, T. N., F. Lazarini, I. A. Franceschini, F. Lachapelle, A. Amara and M. Dubois-Dalcq (2001). Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 13, 845-856.
- Tharakan, R., P. Lepont, D. Singleton, R. Kumar and S. Khan (2008). Phosphorylation of estrogen receptor alpha, serine residue 305 enhances activity. *Mol Cell Endocrinol* 295, 70-78.
- Thelen, M. (2001). Dancing to the the tune of chemokines. *Nature Immunology* 2, 129-134.
- Thelen, M. and S. Thelen (2008). CXCR7, CXCR4 and CXCL12: An eccentric trio? *J Neuroimmunol* 198, 9-13.
- Theodorou, V., R. Stark, S. Menon and J. S. Carroll (2013). GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility. *Genome Res* 23, 12-22.
- Thomas, P., Y. Pang, E. J. Filardo and J. Dong (2005). Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 146, 624-632.
- Thomas, R. S., N. Sarwar, F. Phoenix, R. C. Coombes and S. Ali (2008). Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor- $\alpha$  activity. *J Mol Endocrinol* 40, 173-184.
- Thompson, E. B., G. M. Tomkins and J. F. Curran (1996). Induction of tyrosine alpha-ketoglutarate transaminase by steroid hormones in a newly established tissue culture cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 296-303.
- Tidcombe, H., A. Jackson-Fisher, K. Mathers, D. F. Stern, M. Gassmann and J. P. Golding (2003). Neural and mammary gland defects in ErbB4 knockout mice genetically rescued from embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 8281-8286.
- Todaro, G., J. De Larco and S. Cohen (1976). Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells. *Nature* 264, 26-31.

- Todaro, G. J., C. Fryling and J. E. De Larco (1980). Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 5258-5262.
- Toft, D. and J. Gorski (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55, 1574-1581.
- Törn, S., P. Nokelainen, R. Kurkela, A. Pulkka, M. Menjivar, S. Ghosh, M. Coca-Prados, H. Peltoketo, V. Isomaa and P. Vihko (2003). Production, purification, and functional analysis of recombinant human and mouse 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 7. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 37-45.
- Totta, P., F. Acconcia, S. Leone, I. Cardillo and M. Marino (2004). Mechanisms of Naringenin-induced Apoptotic Cascade in Cancer Cells: Involvement of Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Signalling. *IUBMB Life* 56, 491-499.
- Totta, P., F. Acconcia, F. Virgili, A. Cassidy, P. D. Weinberg, G. Rimbach and M. Marino (2005). Daidzein-Sulfate Metabolites Affect Transcriptional and Antiproliferative Activities of Estrogen Receptor- $\beta$  in Cultured Human Cancer Cells. *The Journal of Nutrition* 135, 2687-2693.
- Tournamille, C., C. L. Van Kim, P. Gane, D. Blanchard, A. E. Proudfoot, J. P. Cartron and Y. Colin (1997). Close Association of the First and Fourth Extracellular Domains of the Duffy Antigen/Receptor for Chemokines by a Disulfide Bond Is Required for Ligand Binding. *J Biol Chem* 272, 16274-16280.
- Trebst, C., R. M. Ransohoff, A. Windhagen and M. Stangel (2003). Chemokine-possible new options for the treatment of multiple sclerosis. *Der Nervenarzt* 74, 850-857.
- Treeck, O., C. Lattrich, A. Springwald and O. Ortmann (2010). Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat* 120, 557-565.
- Tremblay, A. and V. Giguère (2001). Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor  $\beta$ . *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 77, 19-27.
- Tremblay, A., G. B. Tremblay, F. Labrie and V. Giguère (1999). Ligand-Independent Recruitment of SRC-1 to Estrogen Receptor  $\beta$  through Phosphorylation of Activation Function AF-1. *Mol Cell* 3, 513-519.
- Tremblay, G. B., A. Tremblay, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, F. Labrie and V. Giguère (1997). Cloning, Chromosomal Localization, and Functional Analysis of the Murine Estrogen Receptor  $\beta$ . *Mol Endocrinol* 11, 353-365.
- Tremblay, G. B., A. Tremblay, F. Labrie and V. Giguère (1998). Ligand-independent Activation of the Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  by Mutations of a Conserved Tyrosine Can Be Abolished by Antiestrogens. *Cancer Res* 58, 877-881.
- Treuter, E., T. Albrechtsen, L. Johansson, J. Leers and J.-Å. Gustafsson (1998). A Regulatory Role for RIP140 in Nuclear Receptor Activation. *Mol Endocrinol* 12, 864-881.
- Treuter, E., L. Johansson, J. S. Thomsen, A. Wärnmark, J. Leers, M. Pelto-Huikko, M. Sjöberg, A. P. H. Wright, G. Spyrou and J.-Å. Gustafsson (1999). Competition between Thyroid Hormone Receptor-associated Protein (TRAP) 220 and Transcriptional Intermediary Factor (TIF) 2 for Binding to Nuclear Receptors: IMPLICATIONS FOR THE RECRUITMENT OF TRAP AND p160 COACTIVATOR COMPLEXES. *J Biol Chem* 274, 6667-6677.
- Trivedi, S., M. Piccart, C. Muquardt, N. Gilot, S. Hadiy, I. D. Pate and G. Leclercq (1996). Tamoxifen aziridine labeling of the estrogen receptor-potential utility in detecting biologically aggressive breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 40, 231-241.
- Tsai, H.-W., J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen and M. A. Shupnik (2004). Protein Kinase A Activation of Estrogen Receptor  $\alpha$  Transcription Does Not Require Proteasome Activity and Protects the Receptor from Ligand-Mediated Degradation. *Endocrinology* 145, 2730-2738.

- Tzahar, E., H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunakaran, S. Lavi, B. J. Ratzkin and Y. Yarden (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16, 5276-5287.
- Tzukerman, M. T., A. Esty, D. Santiso-Mere, P. Danielian, M. G. Parker, R. B. Stein, J. W. Pike and D. P. McDonnell (1994). Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 8, 21-30.
- Uchida, D., T. Onoue, N.-M. Begum, N. Kuribayashi, Y. Tomizuka, T. Tamatani, H. Nagai and Y. Miyamoto (2009). Vesnarinone downregulates CXCR4 expression via upregulation of Kruppel-like factor 2 in oral cancer cells. *Molecular Cancer* 8, 62.
- Ullrich, A., L. Coussens, J. Hayflick, T. Dull, A. Gray, A. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. Libermann, J. Schlessinger and e. al. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-425.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212.
- Urbinati, G., V. Marsaud, V. Plassat, E. Fattal, S. Lesieur and J.-M. Renoir (2010). Liposomes loaded with histone deacetylase inhibitors for breast cancer therapy. *Int J Pharm* 397, 184-193.
- Ursini-Siegel, J., W. R. Hardy, Y. Zheng, C. Ling, D. Zuo, C. Zhang, L. Podmore, T. Pawson and W. J. Muller (2012). The ShcA SH2 domain engages a 14-3-3/PI3[prime]K signaling complex and promotes breast cancer cell survival. *Oncogene* 31, 5038-5044.
- Urtreger, A. J., V. C. Grossoni, K. B. Falbo, M. G. Kazanietz and E. D. Bal de Kier Joffé (2005). Atypical protein kinase C- $\zeta$  modulates clonogenicity, motility, and secretion of proteolytic enzymes in murine mammary cells. *Mol Carcinog* 42, 29-39.
- Vadlamudi, R. K., B. Manavathi, S. Balasenthil, S. S. Nair, Z. Yang, A. A. Sahin and R. Kumar (2005). Functional Implications of Altered Subcellular Localization of PELP1 in Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 65, 7724-7732.
- Valenzuela-Fernández, A. n., T. Planchenault, F. Baleux, I. Staropoli, K. Le-Barillec, D. Leduc, T. Delaunay, F. Lazarini, J.-L. Virelizier, M. Chignard, D. Pidard and F. Arenzana-Seisdedos (2002). Leukocyte Elastase Negatively Regulates Stromal Cell-derived Factor-1 (SDF-1)/CXCR4 Binding and Functions by Amino-terminal Processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem* 277, 15677-15689.
- Valladares, L. E. and A. H. Payne (1979). Acute stimulation of aromatization in Leydig cells by human chorionic gonadotropin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4460-4463.
- Valladares, L. E. and A. H. Payne (1981). Effects of hCG and Cyclic AMP on Aromatization in Purified Leydig Cells of Immature and Mature Rats. *Biol Reprod* 25, 752-758.
- Varricchio, L., A. Migliaccio, G. Castoria, H. Yamaguchi, A. de Falco, M. Di Domenico, P. Giovannelli, W. Farrar, E. Appella and F. Auricchio (2007). Inhibition of Estradiol Receptor/Src Association and Cell Growth by an Estradiol Receptor  $\alpha$  Tyrosine-Phosphorylated Peptide. *Molecular Cancer Research* 5, 1213-1221.
- Vazquezprado, J. (2003). G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal* 15, 549-557.
- Veldkamp, C. T., C. Seibert, F. C. Peterson, T. P. Sakmar and B. F. Volkman (2006). Recognition of a CXCR4 Sulfotyrosine by the Chemokine Stromal Cell-derived Factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12). *J Mol Biol* 359, 1400-1409.
- Vendrell, J. A., I. Bieche, C. Desmetz, E. Badia, S. Tozlu, C. Nguyen, J. C. Nicolas, R. Lidereau and P. A. Cohen (2005). Molecular changes associated with the agonist activity of hydroxy-tamoxifen and the hyper-response to estradiol in hydroxy-tamoxifen-resistant breast cancer cell lines. *Endocrine-Related Cancer* 12, 75-92.



- Vermeer, P. D., M. Bell, K. Lee, D. W. Vermeer, B. G. Wieking, E. Bilal, G. Bhanot, R. I. Drapkin, S. Ganesan, A. J. Klingelhutz, W. J. Hendriks and J. H. Lee (2012). ErbB2, EphrinB1, Src Kinase and PTPN13 Signaling Complex Regulates MAP Kinase Signaling in Human Cancers. *PLoS ONE* 7, e30447.
- Vial, E., E. Sahai and C. J. Marshall (2003). ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* 4, 67-79.
- Vicari, A. and C. Caux (2002). Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 143-154.
- Vicente-Manzanares, M., M. Rey, D. R. Jones, D. Sancho, M. Mellado, J. M. Rodriguez-Frade, M. a. del Pozo, M. Yáñez-Mó, a. M. de Ana, C. Martínez-A, I. Mérida and F. Sánchez-Madrid (1999). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 163, 4001-4012.
- Vigushin, D. M., S. Ali, P. E. Pace, N. Mirsaidi, K. Ito, I. Adcock and R. C. Coombes (2001). Trichostatin A Is a Histone Deacetylase Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Breast Cancer in Vivo. *Clin Cancer Res* 7, 971-976.
- VILA-CORO, A. J., J. M. RODRÍGUEZ-FRADE, A. MARTÍN DE ANA, M. C. MORENO-ORTÍZ, C. MARTÍNEZ-A and M. MELLADO (1999). The chemokine SDF-1 $\alpha$  triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *The FASEB Journal* 13, 1699-1710.
- Virgili, F., F. Acconcia, R. Ambra, A. Rinna, P. Totta and M. Marino (2004). Nutritional Flavonoids Modulate Estrogen Receptor  $\alpha$  Signaling. *IUBMB Life* 56, 145-151.
- Vivacqua, A., D. Bonofiglio, L. Albanito, A. Madeo, V. Rago, A. Carpino, A. M. Musti, D. Picard, S. Andò and M. Maggiolini (2006). 17 $\beta$ -Estradiol, Genistein, and 4-Hydroxytamoxifen Induce the Proliferation of Thyroid Cancer Cells through the G Protein-Coupled Receptor GPR30. *Mol Pharmacol* 70, 1414-1423.
- Vivacqua, A., D. Bonofiglio, A. G. Recchia, A. M. Musti, D. Picard, S. Andò and M. Maggiolini (2006). The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Mediates the Proliferative Effects Induced by 17 $\beta$ -Estradiol and Hydroxytamoxifen in Endometrial Cancer Cells. *Mol Endocrinol* 20, 631-646.
- Vivar, O. I., X. Zhao, E. F. Saunier, C. Griffin, O. S. Mayba, M. Tagliaferri, I. Cohen, T. P. Speed and D. C. Leitman (2010). Estrogen Receptor  $\beta$  Binds to and Regulates Three Distinct Classes of Target Genes. *J Biol Chem* 285, 22059-22066.
- Vladusic, E. A., A. E. Hornby, F. K. Guerra-Vladusic and R. Lupu (1998). Expression of Estrogen Receptor  $\beta$  Messenger RNA Variant in Breast Cancer. *Cancer Res* 58, 210-214.
- Vyhldal, C., I. Samudio, M. Klade and S. Safe (2000). Transcriptional activation of transforming growth factor alpha by estradiol: requirement for both a GC-rich site and an estrogen response element half-site. *J Mol Endocrinol* 24, 329-338.
- Wakeling, A. E., M. Dukes and J. Bowler (1991). A Potent Specific Pure Antiestrogen with Clinical Potential. *Cancer Res* 51, 3867-3873.
- Wald, O., I. D. Weiss, E. Galun and A. Peled (2007). Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* 39, 50-62.
- Wallasch, C., F. Weiss, G. Niederfellner, B. Jallal, W. Issing and A. Ullrich (1995). Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J* 14, 4267-4275.
- Wallaschl, C., F. U. Weii, G. Niederfellnerl, B. Jallall, W. Issing and A. Ullrichl (1995). Heregulin-dependent regulation of HER2 / neu oncogenic signaling by heterodimerization with. *14*, 4267-4275.
- Walter, P., S. Green, G. Greene, A. Krust, J. M. Bornert, J. M. Jeltsch, A. Staub, E. Jensen, G. Scrace and M. Waterfield (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 7889-7893.

- Wang, C., M. Fu, R. H. Angeletti, L. Siconolfi-Baez, A. T. Reutens, C. Albanese, M. P. Lisanti, B. S. Katzenellenbogen, S. Kato, T. Hopp, S. A. W. Fuqua, G. N. Lopez, P. J. Kushner and R. G. Pestell (2001). Direct Acetylation of the Estrogen Receptor  $\alpha$  Hinge Region by p300 Regulates Transactivation and Hormone Sensitivity. *J Biol Chem* 276, 18375-18383.
- Wang, C., J. A. Mayer, A. Mazumdar, K. Fertuck, H. Kim, M. Brown and P. H. Brown (2011). Estrogen Induces c-myc Gene Expression via an Upstream Enhancer Activated by the Estrogen Receptor and the AP-1 Transcription Factor. *Mol Endocrinol* 25, 1527-1538.
- Wang, C., M. Mayo and A. J. Baldwin (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274, 784-787.
- Wang, H.-y., S. Doronin and C. C. Malbon (2000). Insulin Activation of Mitogen-activated Protein Kinases Erk1,2 Is Amplified via  $\beta$ -adrenergic Receptor Expression and Requires the Integrity of the Tyr350 of the Receptor. *J Biol Chem* 275, 36086-36093.
- Wang, J.-F., I.-W. Park and J. E. Groopman (2000). Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 95, 2505-2513.
- Wang, J., G. J. Babcock, H. Choe, M. Farzan, J. Sodroski and D. Gabuzda (2004). N-linked glycosylation in the CXCR4 N-terminus inhibits binding to HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology* 324, 140-150.
- Wang, J., E. Guan, G. Roderiquez, V. Calvert, R. Alvarez and M. A. Norcross (2001). Role of Tyrosine Phosphorylation in Ligand-independent Sequestration of CXCR4 in Human Primary Monocytes-Macrophages. *J Biol Chem* 276, 49236-49243.
- Wang, J., Y. Shiozawa, Y. Wang, Y. Jung, K. Pienta, R. Mehra, R. Loberg and R. Taichman (2008). The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 283, 4283 - 4294.
- Wang, J., J. Wang, Y. Sun, W. Song, J. E. Nor, C. Y. Wang and R. S. Taichman (2005). Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis. *Cell Signal* 17, 1578-1592.
- Wang, L., S. Andersson, M. Warner and J.-Å. Gustafsson (2001). Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor  $\beta$  knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 2792-2796.
- Wang, L., S. Andersson, M. Warner and J.-Å. Gustafsson (2003). Estrogen receptor (ER) $\beta$  knockout mice reveal a role for ER $\beta$  in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 703-708.
- Wang, P., P. Kumar, C. Wang and K. A. Defea (2007). Differential regulation of class IA phosphoinositide 3-kinase catalytic subunits p110 $\alpha$  and  $\beta$  by protease-activated receptor 2 and  $\beta$ -arrestins. *Biochem J* 408, 221-230.
- Wang, Y., S. Pennock, X. Chen and Z. Wang (2002). Endosomal Signaling of Epidermal Growth Factor Receptor Stimulates Signal Transduction Pathways Leading to Cell Survival. *Mol Cell Biol* 22, 7279-7290.
- Wang, Z., X. Zhang, P. Shen, B. W. Loggie, Y. Chang and T. F. Deuel (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1023-1027.
- Wang, Z., X. Zhang, P. Shen, B. W. Loggie, Y. Chang and T. F. Deuel (2006). A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , hER- $\alpha$ 36: Transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9063-9068.
- Wärnmark, A., T. Almlöf, J. Leers, J.-Å. Gustafsson and E. Treuter (2001). Differential Recruitment of the Mammalian Mediator Subunit TRAP220 by Estrogen Receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *J Biol Chem* 276, 23397-23404.

- Wärnmark, A., E. Treuter, A. P. H. Wright and J.-Å. Gustafsson (2003). Activation Functions 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcriptional Activation. *Mol Endocrinol* *17*, 1901-1909.
- Warren, C. M. and R. Landgraf (2006). Signaling through ERBB receptors: Multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* *18*, 923-933.
- Watanabe, M., J. Yanagisawa, H. Kitagawa, K.-i. Takeyama, S. Ogawa, Y. Arao, M. Suzawa, Y. Kobayashi, T. Yano, H. Yoshikawa, Y. Masuhiro and S. Kato (2001). A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor [alpha] coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J* *20*, 1341-1352.
- Waterman, H., M. Katz, C. Rubin, K. Shtiegman, S. Lavi, A. Elson, T. Jovin and Y. Yarden (2002). A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. *EMBO J* *21*, 303-313.
- Waters, C., S. Pyne and N. J. Pyne (2004). The role of G-protein coupled receptors and associated proteins in receptor tyrosine kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* *15*, 309-323.
- Watson, C. S. and B. Gametchu (2003). Proteins of Multiple Classes May Participate in Nongenomic Steroid Actions. *Exp Biol Med* *228*, 1272-1281.
- Webb, P., P. Nguyen, J. Shinsako, C. Anderson, W. Feng, M. P. Nguyen, D. Chen, S.-M. Huang, S. Subramanian, E. McKinerney, B. S. Katzenellenbogen, M. R. Stallcup and P. J. Kushner (1998). Estrogen Receptor Activation Function 1 Works by Binding p160 Coactivator Proteins. *Mol Endocrinol* *12*, 1605-1618.
- Wegner, S. A., P. K. Ehrenberg, G. Chang, D. E. Dayhoff, A. L. Sleeker and N. L. Michael (1998). Genomic Organization and Functional Characterization of the Chemokine Receptor CXCR4, a Major Entry Co-receptor for Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Biol Chem* *273*, 4754-4760.
- Weigel, N. and Y. Zhang (1998). Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med* *76*, 469-479.
- Weihua, Z., S. Andersson, G. Cheng, E. R. Simpson, M. Warner and J.-Å. Gustafsson (2003). Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* *546*, 17-24.
- Weihua, Z., S. Mäkelä, L. C. Andersson, S. Salmi, S. Saji, J. I. Webster, E. V. Jensen, S. Nilsson, M. Warner and J.-Å. Gustafsson (2001). A role for estrogen receptor  $\beta$  in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 6330-6335.
- Weiss, J., M. L. Bernhardt, M. M. Laronda, L. A. Hurley, C. Glidewell-Kenney, S. Pillai, M. Tong, K. S. Korach and J. L. Jameson (2008). Estrogen actions in the male reproductive system involve estrogen response element-independent pathways. *Endocrinology* *149*, 6198-6206.
- Weitsman, G. E., L. Li, G. P. Skliris, J. R. Davie, K. Ung, Y. Niu, L. Curtis-Snell, L. Tomes, P. H. Watson and L. C. Murphy (2006). Estrogen Receptor- $\alpha$  Phosphorylated at Ser118 Is Present at the Promoters of Estrogen-Regulated Genes and Is Not Altered Due to HER-2 Overexpression. *Cancer Res* *66*, 10162-10170.
- Welboren, W.-J., M. A. van Driel, E. M. Janssen-Megens, S. J. van Heeringen, F. C. G. J. Sweep, P. N. Span and H. G. Stunnenberg (2009). ChIP-Seq of ER[alpha] and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *EMBO J* *28*, 1418-1428.
- Wells, A. and U. Marti (2002). Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 697-702.
- Wells, A., J. Welsh, C. Lazar, H. Wiley, G. Gill and M. Rosenfeld (1990). Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science* *247*, 962-964.
- Wells, T. N. C., F. Guyecoulin and K. B. Bacon (1995). Peptides from the Amino Terminus of Rantes Cause Chemotaxis of Human T-Lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *211*, 100-105.
- Wen, Y., M. C.-T. Hu, K. Makino, B. Spohn, G. Bartholomeusz, D.-H. Yan and M.-C. Hung (2000). HER-2/neu Promotes Androgen-independent Survival and Growth of Prostate Cancer Cells through the Akt Pathway. *Cancer Res* *60*, 6841-6845.

- White, P. C. (2003). Aldosterone: Direct Effects on and Production by the Heart. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2376-2383.
- Wijayarathne, A. L. and D. P. McDonnell (2001). The Human Estrogen Receptor- $\alpha$  Is a Ubiquitinated Protein Whose Stability Is Affected Differentially by Agonists, Antagonists, and Selective Estrogen Receptor Modulators. *J Biol Chem* 276, 35684-35692.
- Wijesuriya, S. D., G. Zhang, A. Dardis and W. L. Miller (1999). Transcriptional Regulatory Elements of the Human Gene for Cytochrome P450c21 (Steroid 21-Hydroxylase) Lie within Intron 35 of the Linked C4B Gene. *J Biol Chem* 274, 38097-38106.
- Wilde, A., E. C. Beattie, L. Lem, D. A. Riethof, S.-H. Liu, W. C. Mobley, P. Soriano and F. M. Brodsky (1999). EGF Receptor Signaling Stimulates SRC Kinase Phosphorylation of Clathrin, Influencing Clathrin Redistribution and EGF Uptake. *Cell* 96, 677-687.
- Wiley, H. S. (2003). Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* 284, 78-88.
- Williams, C., A. Basu, A. El-Gharbawy, L. Carrier, C. Smith and B. Rowan (2009). Identification of four novel phosphorylation sites in estrogen receptor alpha: impact on receptor-dependent gene expression and phosphorylation by protein kinase CK2. *BMC Biochemistry* 10, 36.
- Williams, C., K. Edvardsson, S. A. Lewandowski, A. Strom and J. A. Gustafsson (2008). A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 27, 1019-1032.
- Williams, C. C., J. G. Allison, G. A. Vidal, M. E. Burow, B. S. Beckman, L. Marrero and F. E. Jones (2004). The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *The Journal of Cell Biology* 167, 469-478.
- Wingett, D., A. Long, D. Kelleher and N. S. Magnuson (1996). pim-1 proto-oncogene expression in anti-CD3-mediated T cell activation is associated with protein kinase C activation and is independent of Raf-1. *The Journal of Immunology* 156, 549-557.
- Woerner, B. M., N. M. Warrington, A. L. Kung, A. Perry and J. B. Rubin (2005). Widespread CXCR4 activation in astrocytomas revealed by phospho-CXCR4-specific antibodies. *Cancer Res* 65, 11392-11399.
- Wolpowitz, D., T. B. A. Mason, P. Dietrich, M. Mendelsohn, D. A. Talmage and L. W. Role (2000). Cysteine-Rich Domain Isoforms of the Neuregulin-1 Gene Are Required for Maintenance of Peripheral Synapses. *Neuron* 25, 79-91.
- Wong, A. J., J. M. Ruppert, S. H. Bigner, C. H. Grzeschik, P. A. Humphrey, D. S. Bigner and B. Vogelstein (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 2965-2969.
- Wong, E., C. Fong, J. Lim, P. Yusoff, B. Low, W. Langdon and G. Guy (2002). Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J* 21, 4796-4808.
- Wong, E., C. Fong, J. Lim, P. Yusoff, B. Low, W. Langdon and G. Guy (2002). Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J* 21, 4796-4808.
- Wood, J. R., V. S. Likhite, M. A. Loven and A. M. Nardulli (2001). Allosteric Modulation of Estrogen Receptor Conformation by Different Estrogen Response Elements. *Mol Endocrinol* 15, 1114-1126.
- Wu, F., I. Ivanov, R. Xu and S. Safe (2009). Role of SP transcription factors in hormone-dependent modulation of genes in MCF-7 breast cancer cells: microarray and RNA interference studies. *J Mol Endocrinol* 42, 19-33.
- Wu, J., E. Geimonen and J. Andersen (2000). Increased expression of estrogen receptor beta in human uterine smooth muscle at term. *European Journal of Endocrinology* 142, 92-99.

- Wu, R.-C., J. Qin, Y. Hashimoto, J. Wong, J. Xu, S. Y. Tsai, M.-J. Tsai and B. W. O'Malley (2002). Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator Activity by I $\kappa$ B Kinase. *Mol Cell Biol* 22, 3549-3561.
- Wu, X., H. Li and J. D. Chen (2001). The Human Homologue of the Yeast DNA Repair and TFIIH Regulator MMS19 Is an AF-1-specific Coactivator of Estrogen Receptor. *J Biol Chem* 276, 23962-23968.
- Wu, X., M. Subramaniam, S. Grygo, Z. Sun, V. Negron, W. Lingle, M. Goetz, J. Ingle, T. Spelsberg and J. Hawse (2011). Estrogen receptor-beta sensitizes breast cancer cells to the anti-estrogenic actions of endoxifen. *Breast Cancer Research* 13, R27.
- Xia, W., Y.-K. Lau, H.-Z. Zhang, F.-Y. Xiao, D. A. Johnston, A.-R. Liu, L. Li, R. L. Katz and M.-C. Hung (1999). Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 Is a Stronger Predictor for the Outcome of Oral Squamous Cell Carcinoma Than Any Individual Family Members. *Clin Cancer Res* 5, 4164-4174.
- Xu, F. J., S. Stack, C. Boyer, K. O'Briant, R. Whitaker, G. B. Mills, Y. H. Yu and R. C. Bast (1997). Heregulin and agonistic anti-p185(c-erbB2) antibodies inhibit proliferation but increase invasiveness of breast cancer cells that overexpress p185(c-erbB2): increased invasiveness may contribute to poor prognosis. *Clin Cancer Res* 3, 1629-1634.
- Xu, L., C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9, 140-147.
- Xu, W., M. Marcu, X. Yuan, E. Mimnaugh, C. Patterson and L. Neckers (2002). Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12847-12852.
- Xu, W., X. Yuan, K. Beebe, Z. Xiang and L. Neckers (2007). Loss of Hsp90 Association Up-Regulates Src-Dependent ErbB2 Activity. *Mol Cell Biol* 27, 220-228.
- Yager, J. D. and N. E. Davidson (2006). Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N Engl J Med* 354, 270-282.
- Yamakawa, K. and J. Arita (2004). Cross-talk between the estrogen receptor-, protein kinase A-, and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling pathways in the regulation of lactotroph proliferation in primary culture. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 88, 123-130.
- Yamamoto, T., S. Ikawa, T. Akiyama, K. Semba, N. Nomura, N. Miyajima, T. Saito and K. Toyoshima (1986). Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319, 230-234.
- Yamashita, H., M. Nishio, S. Kobayashi, Y. Ando, H. Sugiura, Z. Zhang, M. Hamaguchi, K. Mita, Y. Fujii and H. Iwase (2005). Phosphorylation of estrogen receptor alpha serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research* 7, R753 - R764.
- Yamashita, H., M. Nishio, T. Toyama, H. Sugiura, N. Kondo, S. Kobayashi, Y. Fujii and H. Iwase (2008). Low phosphorylation of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) serine 118 and high phosphorylation of ER $\alpha$  serine 167 improve survival in ER-positive breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 15, 755-763.
- Yamauchi, T., K. Ueki, K. Tobe, H. Tamemoto, N. Sekine, M. Wada, M. Honjo, M. Takahashi, T. Takahashi, H. Hirai, T. Tushima, Y. Akanuma, T. Fujita, I. Komuro, Y. Yazaki and T. Kadowaki (1997). Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 390, 91-96.
- Yamnik, R. L., A. Digilova, D. C. Davis, Z. N. Brodt, C. J. Murphy and M. K. Holz (2009). S6 Kinase 1 Regulates Estrogen Receptor  $\alpha$  in Control of Breast Cancer Cell Proliferation. *J Biol Chem* 284, 6361-6369.
- Yamnik, R. L. and M. K. Holz (2010). mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor  $\alpha$  serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett* 584, 124-128.

- Yang, A.-G., X. Bai, X. F. Huang, C. Yao and S.-Y. Chen (1997). Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR-5 by intrakines as potential therapeutic approach for HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *94*, 11567-11572.
- Yang, J. and R. A. Weinberg (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell* *14*, 818-829.
- Yang, Y., E. Spitzer, D. Meyer, M. Sachs, C. Niemann, G. Hartmann, K. M. Weidner, C. Birchmeier and W. Birchmeier (1995). Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *The Journal of Cell Biology* *131*, 215-226.
- Yarden, Y. and G. Pines (2012). The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature reviews Cancer* *12*, 553-563.
- Yarden, Y. and J. Schlessinger (1985). The EGF receptor kinase: evidence for allosteric activation and intramolecular self-phosphorylation. *Ciba Found Symp* *116*, 23-45.
- Yarden, Y. and J. Schlessinger (1987). Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry (Mosc)* *26*, 1443-1451.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 127-137.
- Yarden, Y. and A. Ullrich (1988). Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases. *Annu Rev Biochem* *57*, 443-478.
- Yarden, Y. and R. A. Weinberg (1989). Experimental approaches to hypothetical hormones: detection of a candidate ligand of the neu protooncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *86*, 3179-3183.
- Yasukawa, M., A. Hasegawa, I. Sakai, H. Ohminami, J. Arai, S. Kaneko, Y. Yakushijin, K. Maeyama, H. Nakashima, R. Arakaki and S. Fujita (1999). Down-Regulation of CXCR4 by Human Herpesvirus 6 (HHV-6) and HHV-7. *The Journal of Immunology* *162*, 5417-5422.
- Yasuoka, H., R. Kodama, M. Tsujimoto, K. Yoshidome, H. Akamatsu, M. Nakahara, M. Inagaki, T. Sanke and Y. Nakamura (2009). Neuropilin-2 expression in breast cancer: correlation with lymph node metastasis, poor prognosis, and regulation of CXCR4 expression. *BMC Cancer* *9*, 220.
- Yi, P., M. D. Driscoll, J. Huang, S. Bhagat, R. Hilf, R. A. Bambara and M. Muyan (2002). The Effects of Estrogen-Responsive Element- and Ligand-Induced Structural Changes on the Recruitment of Cofactors and Transcriptional Responses by ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Mol Endocrinol* *16*, 674-693.
- Young, M. J., C. D. Clyne, T. J. Cole and J. W. Funder (2001). Cardiac Steroidogenesis in the Normal and Failing Heart. *J Clin Endocrinol Metab* *86*, 5121-5126.
- Yu, D. and M.-c. Hung (2000). Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *2*, 6115-6121.
- Yu, D., T. Jing, B. Liu, J. Yao, M. Tan, T. J. McDonnell and M.-C. Hung (1998). Overexpression of ErbB2 Blocks Taxol-Induced Apoptosis by Upregulation of p21Cip1, which Inhibits p34Cdc2 Kinase. *Mol Cell* *2*, 581-591.
- Yu, D., B. Liu, T. Jing, D. Sun, J. E. Price, S. E. Singletary, N. Ibrahim, G. N. Hortobagyi and M.-C. Hung (1998). Overexpression of both p185c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol. *Oncogene* *16*, 2087-2094.
- Yu, H. N., E. M. Noh, Y. R. Lee, S. G. Roh, E. K. Song, M. K. Han, Y. C. Lee, I. K. Shim, S. J. Lee, S. H. Jung, J. S. Kim and H. J. Youn (2008). Troglitazone enhances tamoxifen-induced growth inhibitory activity of MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* *377*, 242-247.
- Yuan, L. W., J.-W. Soh and I. B. Weinstein (2002). Inhibition of histone acetyltransferase function of p300 by PKC $\delta$ . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1592*, 205-211.
- Zabel, B. A., Y. Wang, S. Lewén, R. D. Berahovich, M. E. T. Penfold, P. Zhang, J. Powers, B. C. Summers, Z. Miao, B. Zhao, A. Jalili, A. Janowska-Wieczorek, J. C. Jaen and T. J. Schall

- (2009). Elucidation of CXCR7-Mediated Signaling Events and Inhibition of CXCR4-Mediated Tumor Cell Transendothelial Migration by CXCR7 Ligands. *The Journal of Immunology* *183*, 3204-3211.
- Zaitseva, M., K. Peden and H. Golding (2003). HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochem Biophys Acta* *1614*, 51-61.
- Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle and E. Roos (2003). The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for Outgrowth of Colon Carcinoma Micrometastases. *Cancer Res* *63*, 3833-3839.
- Zeelenberg, I. S., L. R.-V. Stalle and E. Roos (2001). Retention of CXCR4 in the endoplasmic reticulum blocks dissemination of a T cell hybridoma. *The Journal of Clinical Investigation* *108*, 269-277.
- Zhang, H., L. Sun, J. Liang, W. Yu, Y. Zhang, Y. Wang, Y. Chen, R. Li, X. Sun and Y. Shang (2006). The catalytic subunit of the proteasome is engaged in the entire process of estrogen receptor-regulated transcription. *EMBO J* *25*, 4223-4233.
- Zhang, J., X. Hu and M. A. Lazar (1999). A Novel Role for Helix 12 of Retinoid X Receptor in Regulating Repression. *Mol Cell Biol* *19*, 6448-6457.
- Zhang, Q.-X., Å. Borg, D. M. Wolf, S. Oesterreich and S. A. W. Fuqua (1997). An Estrogen Receptor Mutant with Strong Hormone-independent Activity from a Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res* *57*, 1244-1249.
- Zhang, W. B., J. M. Navenot, B. Haribabu, H. Tamamura, K. Hiramatu, A. Omagari, G. Pei, J. P. Manfredi, N. Fujii, J. R. Broach and S. C. Peiper (2002). A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists. *J Biol Chem* *277*, 24515-24521.
- Zhang, X.-F., J.-F. Wang, E. Matczak, J. Proper and J. E. Grooman (2001). Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ -induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood* *97*, 3342-3348.
- Zhang, X. T., L. G. Kang, L. Ding, S. Vranic, Z. Gatalica and Z. Y. Wang (2011). A positive feedback loop of ER-[alpha]36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* *30*, 770-780.
- Zhao, C., H. Gao, Y. Liu, Z. Papoutsi, S. Jaffrey, J.-Å. Gustafsson and K. Dahlman-Wright (2010). Genome-Wide Mapping of Estrogen Receptor- $\beta$ -Binding Regions Reveals Extensive Cross-Talk with Transcription Factor Activator Protein-1. *Cancer Res* *70*, 5174-5183.
- Zhao, M., R. G. Discipio, A. G. Wimmer and I. U. Schraufstatter (2006). Regulation of CXCR4-mediated nuclear translocation of extracellular signal-related kinases 1 and 2. *Mol Pharmacol* *69*, 66-75.
- Zhao, X.-p., Y.-y. Huang, Y. Huang, P. Lei, J.-l. Peng, S. Wu, M. Wang, W.-h. Li, H.-f. Zhu and G.-x. Shen (2010). Transforming growth factor-[beta]1 upregulates the expression of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) in human breast cancer MCF-7 cells. *Acta Pharmacol Sin* *31*, 347-354.
- Zhao, Y.-Y., O. Feron, C. Dessy, X. Han, M. A. Marchionni and R. A. Kelly (1999). Neuregulin Signaling in the Heart: Dynamic Targeting of erbB4 to Caveolar Microdomains in Cardiac Myocytes. *Circ Res* *84*, 1380-1387.
- Zheng, B., C. Lavoie, T.-d. Tang, P. Ma, T. Meerloo, A. Beas and M. G. Farquhar (2004). Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Degradation by Heterotrimeric G  $\alpha$  s Protein. *J Biol Chem* *279*, 5538-5550.
- Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, B. Spohn, M.-H. Lee and M.-C. Hung (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* *3*, 245-252.
- Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, Y. Zou, B. Spohn and M.-C. Hung (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* *3*, 973-982.

- Zhou, G., R. Cummings, Y. Li, S. Mitra, H. A. Wilkinson, A. Elbrecht, J. D. Hermes, J. M. Schaeffer, R. G. Smith and D. E. Moller (1998). Nuclear Receptors Have Distinct Affinities for Coactivators: Characterization by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Mol Endocrinol* *12*, 1594-1604.
- Zhou, H. and H.-H. Tai (1999). Characterization of Recombinant Human CXCR4 in Insect Cells: Role of Extracellular Domains and N-Glycosylation in Ligand Binding. *Arch Biochem Biophys* *369*, 267-276.
- Zhou, N., Z. Luo, J. Luo, D. Liu, J. W. Hall, R. J. Pomerantz and Z. Huang (2001). Structural and Functional Characterization of Human CXCR4 as a Chemokine Receptor and HIV-1 Co-receptor by Mutagenesis and Molecular Modeling Studies. *J Biol Chem* *276*, 42826-42833.
- Zhou, P., N. Fernandes, I. L. Dodge, A. L. Reddi, N. Rao, H. Safran, T. a. DiPetrillo, D. E. Wazer, V. Band and H. Band (2003). ErbB2 degradation mediated by the co-chaperone protein CHIP. *The Journal of biological chemistry* *278*, 13829-13837.
- Zhou, Y., P. H. Larsen, C. Hao and V. W. Yong (2002). CXCR4 Is a Major Chemokine Receptor on Glioma Cells and Mediates Their Survival. *J Biol Chem* *277*, 49481-49487.
- Zhoua, W. and G. Carpenter (2001). Heregulin-dependent translocation and hyperphosphorylation of ErbB-2. *Oncogene* *20*, 3918-3920.
- Zhu, Y., L. L. Sullivan, S. S. Nair, C. C. Williams, A. K. Pandey, L. Marrero, R. K. Vadlamudi and F. E. Jones (2006). Coregulation of Estrogen Receptor by ERBB4/HER4 Establishes a Growth-Promoting Autocrine Signal in Breast Tumor Cells. *Cancer Res* *66*, 7991-7998.
- Ziada, A., A. Barqawi, L. M. Glode, M. Varella-Garcia, F. Crighton, S. Majeski, M. Rosenblum, M. Kane, L. Chen and E. D. Crawford (2004). The use of trastuzumab in the treatment of hormone refractory prostate cancer; phase II trial. *The Prostate* *60*, 332-337.
- Zilliacus, J., E. Holter, H. Wakui, H. Tazawa, E. Treuter and J.-Å. Gustafsson (2001). Regulation of Glucocorticoid Receptor Activity by 14-3-3-Dependent Intracellular Relocalization of the Corepressor RIP140. *Mol Endocrinol* *15*, 501-511.
- Zlotnik, A. (2004). Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* *14*, 181-185.
- Zou, Y.-R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi and D. R. Littman (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* *393*, 595-599.
- Zou, Y., W. B. Tsai, C. J. Cheng, C. Hsu, Y. M. Chung, P. C. Li, S. H. Lin and M. C. Hu (2008). Forkhead box transcription factor FOXO3a suppresses estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* *10*, R21.
- Zwart, W., R. de Leeuw, M. Rondaij, J. Neeffjes, M. A. Mancini and R. Michalides (2010). The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci* *123*, 1253-1261.
- Zwart, W., A. Griekspoor, V. Berno, K. Lakeman, K. Jalink, M. Mancini, J. Neeffjes and R. Michalides (2007). PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ER[alpha] towards co-activator SRC-1. *EMBO J* *26*, 3534-3544.