

Université de Montréal

**CONTRÔLE DE L'ACTION PHYSIOLOGIQUE DES ŒSTROGENES :
EXPRESSION DU RECEPTEUR DES ŒSTROGENES ALPHA ET
REGULATION DE SON ACTIVITÉ**

**Par
Walter Rocha**

**Programme de Biochimie
Faculté de Médecine**

**Thèse présentée à la Faculté des Etudes Supérieures
En vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)
Mention Biochimie**

Décembre 2005

© Walter Rocha



W

4

V58

2006

V.097

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal
Faculté des Etudes Supérieures**

**Cette thèse intitulée :
CONTRÔLE DE L'ACTION PHYSIOLOGIQUE DES ŒSTROGENES :
EXPRESSION DU RECEPTEUR DES ŒSTROGENES ALPHA ET
REGULATION DE SON ACTIVITÉ**

**Présentée par :
Walter Rocha**

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

**Président rapporteur : Mme Muriel Aubry, Ph.D.
Directeur de recherche : Mme Sylvie Mader, Ph.D.
Membre du jury : M. Pierre Chartrand, Ph.D.
Examineur externe : M. Marc Billaud, Ph.D.
Représentant du Doyen : M. André Tremblay, Ph.D.**

SOMMAIRE

Les œstrogènes (E2) jouent un rôle important dans le développement et la physiologie des glandes mammaires et du tractus génital femelle. Au niveau moléculaire, les effets de E2 sont majoritairement assurés par les récepteurs des œstrogènes alpha (ER α) et beta (ER β) qui sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires. En présence d'E2, ER dimerise, se lie au niveau de ses promoteurs cibles et module ainsi l'expression génique. Pour ce faire, ER α recrute différents coactivateurs permettant la nucléation de protéines ayant une activité histone acétyltransférase (HAT). Ainsi, ER α favorise une décondensation chromatinienne par acétylation des histones rendant ainsi le promoteur accessible à d'autres facteurs de transcription et ou de l'ARN polymérase II. La déacétylation des histones par les histones déacétylases (HDAC) conduit à la condensation chromatinienne et à la répression de l'expression génique. L'activité transcriptionnelle de ER α est donc intimement reliée à l'acétylation des histones et les inhibiteurs de HDAC (HDACi) sont actuellement une nouvelle classe émergente d'agent anti-cancéreux.

Aussi, nous avons entrepris dans une première partie de caractériser les effets des HDACi sur les fonctions transcriptionnelles d'ER α dans les cellules endométriales humaines Ishikawa qui l'expriment naturellement. Nos résultats démontrent que trichostatin A (TSA) et le butyrate de sodium (NaBu), deux HDACi, inhibent l'effet de E2 tant au niveau d'un promoteur artificiel rapporteur qu'au niveau d'ALPPL2, un gène cible naturel. Nous avons aussi mis en évidence que cette inhibition est due à l'inhibition de l'expression d'ER α , dès 6 H de traitement. La cause en est l'inhibition transcriptionnelle des promoteurs A, B, C régissant l'expression d'ER α dans les cellules Ishikawa.

Dans le but de comprendre le fonctionnement d'ER α , nous avons entrepris dans une deuxième partie d'isoler par GST-pulldown des cofacteurs potentiels d'ER α sur la base d'une interaction dépendante de E2. Ainsi, nous avons identifié la protéine striatin (STRN) qui présente toutes les caractéristiques d'une molécule adaptatrice, notamment par la présence de domaine de liaison à la cavéoline, la calmoduline et un domaine d'interaction protéine-protéine, WD-

repeat. STRN et ER α endogènes interagissent *in vivo* dans les cellules MCF7. Afin de mettre en lumière le but d'une telle interaction, nous avons entrepris de diminuer l'expression protéique de STRN dans les cellules MCF7 par la méthode des siRNA. Si l'ablation de STRN n'a pas d'effet sur l'expression des gènes cibles endogènes de ER α , l'activation non génomique des MAPK par E2 est en revanche, abolie dans les cellules MCF7.

Deux-tiers des tumeurs mammaires expriment ER α et dépendent d'E2 pour leur prolifération. Aussi, les fonctions de facteurs de transcription et d'activateur des voies non génomiques d'ER α seraient possiblement impliqués dans la tumorigénèse des cellules mammaires. La compréhension de la diminution de l'expression d'ER α par les HDACi et de l'activation des MAPK par le complexe STRN-ER α pourrait favoriser l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mot clefs : Récepteur des œstrogènes, inhibiteurs des HDAC, Striatin, activation non génomique des MAPK

SUMMARY

Estrogens play (E2) important role in the development and the physiology of the female mammary gland and genital tract. At the molecular level, E2 effects are mainly propagated by the estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β) that belong to the nuclear receptor transcription factor family. Upon E2 stimulation, ER dimerizes and interacts with its target gene promoters. Then, ER α locally recruits different coactivators mainly histone acetyltransferases (HAT). Consequently, coactivators-ER α complex nucleation lead to histone acetylation, chromatin relaxation and transcription by RNA polymerase II recruitment on the promoter. On the otherside, histone deacetylation by histone deacetylases (HDAC) triggers chromatin compaction and gene repression. So, the ER α transcription abilities are closely linked to histone acetylation. Of interest, histone deacetylase inhibitors (HDACi) have emerged as a new class of anticancer agents.

In a first study, we compared the effect of HDACi on transcriptional activation by E2 in ER α ⁺ endometrial Ishikawa cells. Using episomal reporter vectors containing minimal promoters to avoid promoter-specific effects, we observed that incubation with HDACi markedly repressed ER-dependent signaling. These effects were reproduced on endogenous ALPPL2 target gene. Repression of estrogen signaling was due to direct inhibition of transcription from multiple ER α promoters and correlated with decreased histone acetylation of these promoters.

In a second study, we screened for new ER α cofactors by GST-pulldown on HeLa nuclear extracts. We identified striatin (STRN) that interacts *in vitro* with the ligand binding domain of ER α in a hormone-dependent manner. At the molecular level, STRN presents the signatures of a scaffolding protein : it interacts with caveolin-1 and calmodulin, arbors WD repeat domain. Moreover STRN and ER α are coimmunoprecipitated *in vivo* at the endogenous level in mammary adenocarcinoma MCF7 cell line. In order to elucidate STRN-ER α function, we depleted STR by a siRNA approach. No major difference on endogenous target gene expression was observed. However, we found that STR

depletion abrogates E2-induced non genomic MAPK activity in MCF7. Our results suggest that STR may participate to E2 non genomic pathway.

Two thirds of breast tumors are dependent on E2 for their proliferation. Thus ER α functions either in the nucleus as transcription factors or at the membrane as MAPK activator, are likely key elements in breast cancer formation. Therefore, understanding ER α expression inhibition by HDACi and ER α -STRN complex function could lead to alternative treatments.

Keywords : Estrogen receptor, HDAC inhibitors, Striatin, Non genomic MAPK activity

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	III
SUMMARY	V
TABLE DES MATIERES.....	VII
LISTE DES FIGURES	X
ABBREVIATIONS.....	XII
REMERCIEMENTS	XIV
INTRODUCTION.....	1
EMERGENCE DES CONCEPTS D'« HORMONE » ET DE « RECEPTEUR NUCLEAIRE » .	2
1. RÔLE PHYSIOLOGIQUE DES ŒSTROGÈNES	3
1.1. Production des œstrogènes	3
1.2. Tissus cibles des œstrogènes	4
1.2.1. L'appareil reproducteur	4
1.2.2. Le tissu osseux.....	5
1.2.3. Le système cardiovasculaire.....	5
1.2.4. Le système nerveux	5
1.3. Oestrogenes et cancer	6
2. LES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES	7
2.1. Les acteurs classiques ER α et ER β	7
2.2.1. Organisation modulaire des ERs	8
2.2.2. Fonctions transcriptionnelles du ER.....	9
2.2.2.1. La voie génomique directe	10
2.2.2.2. Voies génomiques indirecte : le cas Sp1	11
2.2.2.3. Voies génomiques indirectes : le cas AP-1	11
2.2.2.4. Les voies génomiques indirectes : le cas NF κ B.....	12
2.2.3. ERs, protéines de signalisation à la membrane cytoplasmique.....	12
2.2.3.1 Présence de ER α à la membrane	12
2.2.3.2. Effets non génomiques des œstrogènes.....	13
2.2.3.2.1 Activation de Erk.....	14
2.2.3.2.2. Activation de eNOS.....	15
2.2. GPR30, nouveau médiateur des effets non génomiques de L'E2	16
3 L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DU ER : ANATOMIE MOLÉCULAIRE	17

3.1 Les coactivateurs	17
3.1.1. Modifications de la structurales du LBD suite à la fixation du ligand.....	17
3.1.2. Différents coactivateurs d'ER et leurs fonctions propres.....	18
3.1.2.1. Coactivateurs de type p160	18
3.1.2.2. Les complexes SWI/SNF	19
3.1.2.3. Le complexe médiateur et initiation de la transcription	20
3.1.3. Participation d'AF-1 dans l'activité transcriptionnelle d'ER.....	22
3.2 Les corépresseurs.....	23
3.2.1. SMRT/NCoR.....	23
3.2.2. Autres corépresseurs.....	24
4. CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DE ER α	25
4.1. Expression d' er α à partir de promoteurs alternatifs	25
4.1.1. Promoteurs d'ER α et expression tissulaire.....	25
4.1.2 Différents isoformes d'ER α	26
4.2. Modulation de l'expression d'er α	28
4.2.1. Régulation transcriptionnelle d'ER α	28
4.2.2. Stabilité de l'ARNm d'ER α	29
4.2.3. Régulation épigénétique de l'expression d'ER α	29
4.2.3.1. Méthylation des îlots CpG.....	29
4.2.3.2. La déacétylation des histones	30
4.2.3.2.1. Les classes de HDAC	30
4.2.3.2.2. Les inhibiteurs des HDAC de classe I et II	31
4.2.3.2.3. HDACi et réexpression d'ER	32
<u>5.1.</u> Première partie : Effet des inhibiteurs de desacetylases des histones sur la voie de signalisation des œstrogènes.....	34
5.2. Striatin, un cofacteur de ER α dans les voies non génomiques de l'œstradiol.....	35
RESULTATS	36
ARTICLE 1	37
: Opposite effects of HDAC inhibitors on glucocorticoid and estrogen signaling in human endometrial Ishikawa cells.....	37
ARTICLE 2	82

: Striatin interacts with the ligand binding domain of estrogen receptor alpha and regulates the rapid stimulation of MAPK activity by estradiol	82
DISCUSSION	128
1. MÉCANISMES DE LA RÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE ER α PAR LES HDACI	129
1.1 Répression de l'expression d'er α par inhibition d'un activateur transcriptionnel	130
1.2. Inhibition de l'expression et recrutement d'un complexe répresseur..	133
1.2.1 Recrutement de facteurs de répression	133
1.2.2. Méthylation du promoteur d'ER α	134
1.3. Identification de(s) protéine(s) HDACs jouant un rôle dans l'activité transcriptionnelle du ER α	135
2. UTILISATION DES HDACI COMME TRAITEMENT POTENTIEL DANS LE CANCER DU SEIN.....	135
3. STRIATIN EST-IL UN NOUVEAU PROTO-ONCOGÈNE DANS LA PROGRESSION DES TUMEURS MAMMAIRES	137
3.1. Caractérisation du complexe STRN-ER α	138
3.2. STRN participe-t-il à la prolifération des cellules mammaires ER α ⁺ .	139
CONCLUSION	141
RÉFÉRENCES	142
ANNEXE 1.....	XV

LISTE DES FIGURES

Figure_1 : Domaines structuraux et fonctionnels des récepteurs humains des œstrogènes α et β	9
Figure 2 : Représentation schématique de l'activation de l'expression génique par l'ER.	21
Figure 3 : Organisation génomique du gène humain <i>ESR1</i> codant pour ER α . ..	27
Figure 4 : Régulation de l'expression d'ER α par des mécanismes épigénétiques.	33

ARTICLE 1 :

Opposite effects of HDAC inhibitors on glucocorticoid and estrogen signaling in human endometrial Ishikawa cells

Figure 1: The HDAC inhibitors trichostatin A and sodium butyrate have opposite effects on GR and ER transcriptional activity.....	74
Figure 2. Expression of HDACs and dose- and time-dependent effects of trichostatin A on histone acetylation in Ishikawa cells.	75
Figure 3. Long-term coincubation with trichostatin A is necessary for effects on GR and ER-dependent expression in Ishikawa reporter cell lines.	76
Figure 4. HDACi repress estradiol-stimulated expression of ALPPL2 and stimulate induction of the TAT gene by dexamethasone.	77
Figure 5. The repressive effects of HDACi on estrogen signaling are due to repression of ER α expression in parental Ishikawa cells.	78
Figure 6. HDACi decrease ER α transcription from promoters A, B, and C in Ishikawa cells in the absence of <i>de novo</i> translation.	79
Figure 8 Overexpression of the p160 coactivator derivative TIF2.1 attenuates the trichostatin A stimulation of GR-dependent transcription.	81

ARTICLE 2**Striatin interacts with the ligand binding domain of estrogen receptor alpha and regulates the rapid stimulation of MAPK activity by estradiol**

Figure 1 : Striatin interacts with the EF region of ER α in a hormone-dependent manner	121
Figure 2 : The EF domain of ER α is the main striatin-interacting domain <i>in vitro</i>	122
Figure 3: Mapping of the estrogen receptor interacting domain in striatin.	123
Figure 4: The STRN-ERID interacts with the EF region of ER α in a hormone-dependent manner that does not necessitate the VRALL and the putative PP2A interacting domain motifs.	124
Figure 5: Striatin and ER α interact <i>in vivo</i>	126
Figure 6: Striatin depletion in MCF7 prevents non-genomic activation of MAPK by estradiol.	127

ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyrobonucléique complémentaire
AF-1	Fonction 1 d'activation
AF-2	Fonction 2 d'activation
AIB1	<i>Amplified in breast cancer 1</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
AR	Récepteur des androgènes
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BAF57	<i>Brg-1 associated factor 57</i>
bHLH	Hélice-boucle-hélice basique
BSA	Albumine de sérum bovin
C-terminal	Carboxy-terminal
CARM1	<i>coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
E2	17- β -oestradiol
EGF	<i>Epithelial growth factor</i>
ER	Récepteur des oestrogènes
ERE	Élément de réponse aux oestrogènes
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GRIP-1	<i>Glucocorticoid receptor interacting protein 1</i>
GST	Glutathion-S-transférase
H	Hélice
HAT	Histone acétyl-transférase
HDAC	Histone déacétylase
HEG0	Récepteur des oestrogènes alpha
HSB	Tampon à haute teneur en sel
ICI	ICI 182,780
JNK	<i>Jun amino-terminal kinase</i>

LCoR	<i>Ligand-dependent corepressor</i>
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MNAR	<i>modulator of nongenomic activity of estrogen receptor</i>
NaBu	Butyrate de sodium
N-term	Amino-terminal
NCoA	<i>Nuclear receptor coactivator</i>
NCoR	<i>Nuclear receptor corepressor</i>
NID	Domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires
NR	Récepteur nucléaire
NRIP-1	<i>Nuclear receptor interacting protein 1</i>
OHT	4-hydroxy-tamoxifène
P/CAF	<i>p300/CBP associated factor</i>
PBS	Tampon salin de phosphate
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIP3	Phosphatidylinositol triphosphate
PolII	ADN polymérase II
PR	Récepteur de la progestérone
RAC3	<i>Receptor-associated coactivator 3</i>
RIP140	<i>Receptor interacting protein 140</i>
RPF1	<i>RNA processing factor 1</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i>
SMRT	Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SRC-1	<i>Steroid receptor coactivator 1</i>
SRC-2	<i>Steroid receptor coactivator 2</i>
SRC-3	<i>Steroid receptor coactivator 3</i>
STRN	<i>Striatin</i>
TAF	<i>TBP associated factor</i>
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TFII	<i>Transcription factor II</i>
TIF-2	<i>Transcription intermediary factor 2</i>
TRAP220	<i>Thyroid hormone receptor-associated protein complex component</i>
TRIP1	<i>Thyroid receptor interacting protein 1</i>
TSA	<i>Trichostatin A</i>

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je souhaite exprimer toute ma reconnaissance envers ma directrice de recherche, le Dr. Sylvie Mader. Non seulement, elle a su me faire profiter de sa passion, de sa curiosité et de son esprit aiguisé mais elle m'a aussi inculqué une rigueur et un amour du travail bien fait qui sont indispensables à l'exercice de la recherche. Enfin, elle a toujours fait preuve de beaucoup de disponibilité et de compréhension à mon endroit et ce parfois hors du cadre professionnel. L'exemple d'un pair peut être une motivation; j'ai eu ce privilège, merci Sylvie!

Je tiens aussi à remercier les principaux collaborateurs qui m'ont aidé le long de ce doctorat : Le Dr. Rocio Sanchez, Julie Deschênes, Anick Auger, Elise Hébert, le Dr. John White, Gisèle Marguier, Martine Bail, Samuel Chagon, le Dr. Zhi Li, Denis Nguyen et mon sympathique stagiaire Gabriel Péloquin.

Je voudrais ensuite dire combien je suis heureux d'avoir été aussi bien entouré ces cinq dernières années. Il existe dans le laboratoire une ambiance saine, chaleureuse et de camaraderie qui est un véritable soutien au quotidien quand les manip ne vont pas comme on le voudrait. Aussi, je remercie l'ensemble du laboratoire et en particulier Véronique Bourdeau, Julie Deschênes, Élise Hébert, Virginie Dupont, Samuel Chagnon et Mathieu Lupien.

Puis, je me dois de remercier le Département de Biochimie et la F.E.S. de l'Université de Montréal, ainsi que le M.C.E.T.C. pour leur support financier.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres de jury d'avoir corrigé ma thèse.

INTRODUCTION

EMERGENCE DES CONCEPTS D'« HORMONE » ET DE « RECEPTEUR NUCLEAIRE »

Le concept d' « hormone » qui vient du grec *hormôn* signifiant exciter, remonte au début des années 1900 et a été énoncé par Ernest Starling alors qu'il se consacrait à l'étude du pancréas et de ses sécrétions [1]. Ce terme est venu désigner un type particulier de messager chimique, dont l'existence avait été suggérée par Claude Bernard cinquante ans auparavant, qui est synthétisé par un groupe de cellules, transporté par le flux sanguin, et qui coordonne l'activité et la croissance de différentes parties du corps. Ces études pionnières ont ouvert un champ entier de recherche conduisant à l'identification de différents messagers hormonaux. Ainsi, Edward Kendall purifia dans les années 20, le premier stéroïde : le cortisol. Suivit l'agrandissement de la famille des stéroïdes par l'identification des œstrogènes, de la progestérone et de la testostérone par Adolf Butenandt, Tadeus Reichstein et Edward Adelbert Doisy dans les années 20-30. Il faut attendre cependant les années 60 pour que la recherche dans le domaine des hormones stéroïdiennes vive un second souffle du fait de l'observation que les stéroïdes administrés *in vivo* affectent la synthèse de protéines. Ceci conduisit à l'émergence du concept de stimulation transcriptionnelle par les stéroïdes puis à sa démonstration *in vitro* dans des systèmes acellulaires.

Nous devons la première preuve de l'existence des récepteurs nucléaires à Elwood Jensen qui, en 1961, révéla la présence d'une entité protéique liant le 17β -œstradiol radioactif dans le noyau cellulaire de tissus utérins [2]. C'est ensuite le clonage des différents récepteurs qui permit la caractérisation de leurs mécanismes d'action dans le contrôle transcriptionnel et de leurs contributions aux rôles physiologiques des hormones correspondantes. En 1985, au coude à coude, Ron Evans clona le récepteur des glucocorticoïdes et Pierre Chambon le récepteur des œstrogènes [3, 4], conduisant à une révolution du concept hormone-récepteur. Contrastant avec les ligands de récepteurs membranaires comme l'insuline, qui provoquent une cascade de signalisation intracellulaire permettant la transmission du signal de la membrane au noyau, les stéroïdes interagissent avec un récepteur interne nucléaire qui agit directement sur la transcription. Ce mode d'action est commun aux autres membres de la superfamille des récepteurs

nucléaires, clonés par la suite par homologie avec les récepteurs stéroïdiens, et ont comme ligands naturels des hormones, des dérivés de vitamines ou autres petites molécules liposolubles.

Cependant, ce mécanisme d'action des récepteurs nucléaires, devenu le schéma classique de leur mode de fonctionnement, ne permet pas d'expliquer des observations précoces démontrant que les hormones stéroïdiennes ou autres ligands de récepteurs nucléaires peuvent avoir des effets intracellulaires rapides décrits dans la revue de Wehling [5]. Dès 1942, Hans Selye décrivait les effets anesthésiques immédiats provoqués par l'exposition à la progestérone. Spach *et al.* en 1964 rapportaient l'action de l'aldostérone sur les flux de sodium dans les érythrocytes dépourvus de noyaux. Enfin Pietras et Szego en 1975 faisaient mention de l'action rapide des oestrogènes sur le flux calcique dans les cellules utérines. Ces observations ont conduit à la découverte plus tardive des mécanismes d'action dits « non-génomiques » des oestrogènes, qui permettent des interconnexions entre les voies de signalisation des récepteurs membranaires et celles des récepteurs nucléaires.

1. RÔLE PHYSIOLOGIQUE DES ŒSTROGÈNES

1.1. PRODUCTION DES ŒSTROGÈNES

Chez la femme pré-ménopausée, les œstrogènes sont principalement synthétisés par les ovaires et fonctionnent en tant qu'hormones circulantes, atteignant leurs tissus cibles par l'intermédiaire de la circulation sanguine. Les œstrogènes sont synthétisés par les cellules de la granulosa à partir d'androgènes en C19, principalement l'androstènedione. Ce dernier est produit par les cellules ovariennes thécales à partir du cholestérol sous l'action de l'enzyme CYP17. L'androstènedione diffuse alors vers la couche cellulaire avasculaire de la granulosa et est aromatisée en œstrone par l'enzyme CYP19 (aromatase), une enzyme de type cytochrome P450. L'œstrone subit finalement une hydroxylation catalysée par la 17 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase pour donner le 17 β -œstradiol, principal œstrogène circulant actif [6].

En revanche, chez la femme ménopausée, dont les ovaires ont cessé de produire des ovules, ou chez l'homme, les œstrogènes ne fonctionnent plus

comme hormones systémiques mais exclusivement comme facteurs autocrines/paracrines. En effet, les sites extra-gonadiques de production sont les cellules mésenchymateuses du tissu gras, mais aussi les cellules mammaires, les ostéoblastes osseux et les cellules endothéliales [7]. Les quantités d'œstrogènes produits circulants demeurent faibles même si les niveaux locaux peuvent être très élevés [8]. Il est intéressant de noter que les sites extra-ovariens sont incapables de convertir le cholestérol en androgènes et dépendent donc des androgènes circulants issus des glandes surrénales ou des cellules thécales de l'ovaire, qui seront aromatisés in situ par CYP19.

1.2. TISSUS CIBLES DES ŒSTROGÈNES

Les œstrogènes ont des effets multiples sur de nombreux tissus cibles, certains de ces effets restant controversés. Dans un souci de clarté, seuls les effets bien établis seront ici détaillés.

1.2.1. L'appareil reproducteur

Une des cibles majeures des œstrogènes est le système reproducteur. Cependant, bien que les œstrogènes soient cruciaux pour la détermination des caractères sexuels féminins, ils ne semblent pas indispensables à la différenciation du tractus génital. En effet, les souris invalidées pour le gène du récepteur des œstrogènes alpha (*ESR1*), appelées communément ER α KO, ne répondent plus aux œstrogènes, mais l'utérus quoique hypoplasique se développe normalement. De plus, l'ovaire de ces souris semble normal pendant la période pré-pubertaire alors qu'après celle-ci il devient élargi, hémorragique et anovulatoire. [9, 10].

De façon similaire, le développement fœtal des glandes mammaires ne semble pas dépendre des œstrogènes. En effet, chez les mammifères, les glandes mammaires sont essentiellement immatures à la naissance, connaissent une croissance à la suite de la puberté et ne sont que fonctionnelles qu'au moment de la gestation et de la lactation [11-13]. Les œstrogènes stimulent la croissance et la

différenciation de l'épithélium constituant les canaux galactophores et les formations lobo-alvéolaires essentielles à la lactation [14, 15].

1.2.2. Le tissu osseux

Les œstrogènes ont un rôle prépondérant dans la croissance et le remodelage du tissu osseux [16]. La preuve en est que la ménopause entraîne une diminution de la masse osseuse ainsi que sa fragilisation, phénomène connu sous le nom d'ostéoporose. L'intégrité du squelette est dû à un équilibre dynamique entre résorption et synthèse de la matrice osseuse, résultant respectivement de l'action des ostéoclastes et ostéoblastes. Il est actuellement admis que l'effet protecteur des œstrogènes sur l'homéostasie osseuse implique une induction de l'apoptose des cellules ostéoclastes tandis qu'ils protègent de celle-ci les ostéoblastes et les ostéocytes [17-21].

1.2.3. Le système cardiovasculaire

Les œstrogènes semblent avoir un effet protecteur sur le système cardiovasculaire. Ceci étant suggéré par l'augmentation significative des cas de maladies cardiovasculaires faisant suite à la chute du taux d'œstrogènes circulants à la ménopause [22]. Cependant les résultats des tests cliniques de thérapie hormonale des femmes ménopausées par les œstrogènes, n'ont démontré aucun effet protecteur [23, 24]. Le débat n'est pas clos, étant donnée la participation des œstrogènes à la réduction des dommages post-infarctus [25] [26] et l'atténuation de l'hypertrophie cardiaque [27, 28].

1.2.4. Le système nerveux

De nombreuses observations suggèrent une action neuroprotectrice des œstrogènes au niveau de l'encéphale notamment dans la diminution de l'incidence des pathologies neurodégénératives telles les maladies d'Alzeihmer et

de Parkinson, mais aussi des accidents cérébraux vasculaires. Plusieurs études relatent l'implication des œstrogènes dans des phénomènes aussi variés que la synaptogénèse, la protection contre l'apoptose et l'inflammation [29-32]. Si cette activité protectrice semble reposer sur l'action des différents récepteurs des œstrogènes, des propriétés antioxydantes des œstrogènes indépendantes de ces récepteurs ne sont toutefois pas écartées [33].

1.3. OESTROGENES ET CANCER

Les œstrogènes semblent impliqués dans de nombreuses pathologies à savoir les cancers de l'endomètre, de l'ovaire et de la prostate. Néanmoins, le rôle le mieux documenté des œstrogènes demeure dans le cancer du sein, qui est actuellement une priorité de santé publique dans les pays occidentalisés.

Au Canada, une femme sur neuf développera au cours de sa vie un cancer du sein, ce dernier étant le cancer le plus diagnostiqué. Cependant, il faut opposer à cette incidence élevée le taux de mortalité qui est d'une femme sur vingt-sept. Une telle différence est due à l'avancée des connaissances en termes de diagnostique, de thérapie et de prévention. Ainsi, les statistiques actuelles démontreraient une tendance à la baisse concernant la mortalité associée au cancer du sein (www.cancer.ca).

Les données expérimentales, cliniques et épidémiologiques suggèrent une contribution nette des œstrogènes au développement d'un cancer mammaire. Ceci est appuyé par le constat que les femmes connaissant une ménopause précoce (avant l'âge de 40 ans) voient l'incidence de développer un cancer du sein significativement réduite. Toutefois, les mécanismes moléculaires demeurent en grande partie inconnus. L'hypothèse généralement admise est que les œstrogènes stimulent la prolifération cellulaire de l'épithélium mammaire et ce faisant augmentent l'apparition de mutations somatiques au moment de la réplication de l'ADN. Quand ces mutations affectent des gènes critiques requis pour la prolifération cellulaire, la veille et la réparation de l'ADN, l'apoptose et l'angiogénèse et apportent un avantage sélectif, des néoplasmes peuvent apparaître [34].

Une hypothèse alternative originale mais controversée repose sur l'activité génotoxique et mutagène des métabolites de l'œstradiol [35]. Ainsi l'hydroxylation de l'œstradiol en 4-hydroxy-œstradiol conduit à la synthèse d'œstradiol-3,4-quinone. Ce dernier peut lier de façon covalente les bases guanine et adénine et les déstabilise. En effet, les composés de type œstradiol-N7-guanine et -N3-adénine sont labiles et créent au sein de l'ADN des sites apuriniques générateurs de mutations [36].

2. LES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES

Depuis les travaux de Jensen dans les années 60, notre compréhension des voies de signalisation des œstrogènes n'a cessé de croître. La découverte du récepteur des œstrogènes alpha ($ER\alpha$) a été une avancée majeure, ouvrant la porte à l'analyse des domaines fonctionnels de cette protéine. Le tableau s'est ensuite éclairé et complexifié par la découverte d'un deuxième récepteur nucléaire, $ER\beta$. Enfin, le domaine connaît une troisième révolution, par l'identification récente d'un récepteur sans lien d'homologie avec les précédents, GPR30, membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G.

2.1. LES ACTEURS CLASSIQUES $ER\alpha$ ET $ER\beta$

Les ERs ($ER\alpha$ et $ER\beta$) sont des facteurs de transcription dont l'activité est conditionnelle à la liaison d'un ligand, qui appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires et la famille des récepteurs des stéroïdes. Celle-ci comprend les récepteurs des glucocorticoïdes GR (Glucocorticoid receptor), des androgènes AR (Androgen receptor), de la progestérone PR (Progestérone receptor) et des minéralocorticoïdes MR (Mineralocorticoid receptor) [37].

Les ERs sont situés en grande partie dans le noyau en absence d'œstrogènes. Le modèle classique d'activation du ER est le suivant : le 17β -œstradiol (E2) (ou les autres œstrogènes circulants) diffuse passivement à travers les membranes lipidiques cellulaires (annexe I, figure 1.). Une fois lié à l'E2, l'ER est libéré d'un complexe protéique comprenant des protéines de choc thermique et des

immunophilines [38], dimérise et interagit spécifiquement avec des éléments de réponse au niveau des promoteurs des gènes cibles. Des essais de précipitation de la chromatine ont confirmé l'association induite par l'E2 de ER α avec des gènes cibles comme *TFF1*, *C-MYC* ou *CATHEPSIN D* [39]. Une fois lié à l'ADN, il est convenu qu'ER module l'expression génique par le recrutement local de différents coactivateurs, et de cointégrateurs. Certains de ces coactivateurs possèdent des activités enzymatiques histone acétyltransférase (HAT) et histone méthyltransférase. Ces dernières permettent une décondensation locale de la chromatine et facilitent l'accès du promoteur à d'autres facteurs de transcription et à la machinerie transcriptionnelle de base qui est stabilisé par le complexe médiateur. Le complexe SWI/SNF est également impliqué en modifiant la structure des nucléosomes par son activité hélicase [40-42].

2.2.1. Organisation modulaire des ERs

Les ERs partagent l'organisation en domaines fonctionnels typique de la superfamille des récepteurs nucléaires (Fig. 1). Ces domaines correspondent à peu près aux régions d'homologie définies par comparaison des séquences primaires de ces récepteurs. La partie région A/B N-terminale contient une fonction de transactivation AF-1 (Activation Function 1). La région centrale C extrêmement conservée correspond au domaine de liaison à l'ADN ou DBD (DNA Binding Domain), composé de deux doigts de zinc de type C4 (où 4 cystéines lient un atome de zinc). Une courte région-charnière D précède la région E C-terminale relativement bien conservée dont les fonctions sont la liaison à l'E2, la dimérisation, la localisation nucléaire et la transactivation dépendante du ligand ou AF-2. Enfin à l'extrémité C-terminale se situe la région F dont la fonction reste encore obscure.

Dix ans après le clonage de ER α , un second récepteur fut découvert à partir de tissu prostatique de rat et de cellules leucocytaires humaines [43, 44]. ER β est le produit d'un gène distinct [45]. Les deux récepteurs présentent un très fort degré d'identité dans le DBD (96%) et une conservation plus faible (58%) au niveau du domaine de liaison au ligand ou LBD (ligand Binding Domain), se

traduisant par la reconnaissance des mêmes éléments de réponse ou ERE (Estrogen Response Element) et des mêmes ligands [46]. En revanche, les domaines A/B sont les moins conservés (28%), suggérant une fonction propre à chaque récepteur.

Les profils d'expression des ERs sont distincts. Cependant dans les tissus où les deux sous-types coexistent une hétérodimérisation est possible conférant une diversité fonctionnelle [47]. En revanche, les phénotypes différents des souris invalidées pour chacun des deux récepteurs laissent à supposer que les hétérodimères ne semblent jouer un rôle important *in vivo* [10, 48].

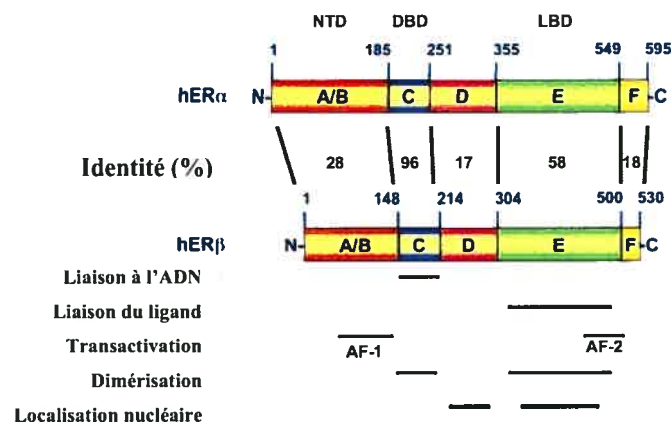


Figure 1 : Domaines structuraux et fonctionnels des récepteurs humains des œstrogènes α et β .

Les positions des acides aminés délimitant chaque domaine (de A à F) sont indiquées en bleu. Les fonctions (liaison à l'ADN, liaison du ligand, transactivation, dimérisation et localisation nucléaire) attribuées à chaque région sont soulignées en noir. Enfin les degrés d'identité entre chaque domaine des deux sous-types sont données en pourcentage. Légende : NTD (N-Terminal Domain) ou domaine N-terminal, DBD (DNA Binding Domain) ou domaine de liaison à l'ADN, LBD (Ligand Binding Domain) ou domaine de liaison au ligand, AF-1, -2 (Activation Function-1, -2) ou fonctions d'activation 1 et 2. (Figure adaptée de Kœhler *et al.* [49]).

2.2.2. Fonctions transcriptionnelles du ER

L'ER est une protéine complexe. En effet, sa fonction est contrôlée par les œstrogènes et met en jeu plusieurs mécanismes différents : il peut être à la fois activateur et inhibiteur transcriptionnel dans ce qui est appelé communément les

voies génomiques et apparaît depuis peu comme un récepteur membranaire de l'E2 dans des voies non génomiques [50].

2.2.2.1. La voie génomique directe

La comparaison des séquences des différents promoteurs de gènes répondant à l'E2 permet l'identification d'une séquence consensus, responsable de l'induction hormonale appelée ERE (Estrogen Response Element). Cette séquence, un élément palindromique de type PuGGTCAnnnTGACCPyr, permet une interaction de haute affinité avec un dimère du ER via le DBD. La séquence et l'organisation spatiale du ERE sont importantes pour l'affinité et la spécificité de liaison [50]. Signalons que les motifs PuGAACA et PuGTTCA qui sont liés par GR ou par le récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque respectivement, ne sont pas reconnus par ER.

L'approche d'étude par mutagenèse des promoteurs des gènes cibles des œstrogènes a conduit à l'identification de séquences de ce type dans quelques gènes humains *EBAG9*, *COX72AL*, et *ZNF147/EFP* ou de xénope *VITELLOGENIN A2* [51-53]. Le séquençage du génome humain a cependant offert la possibilité de rechercher ces séquences à l'échelle génomique. Aussi plusieurs équipes dont notre laboratoire ont utilisé une méthode bioinformatique afin d'inventorier les ERE parfaits ou de haute affinité (déterminé par retard sur gel *in vitro*) potentiellement régulés par ER et par là-même d'identifier de nouveaux gènes cibles directs [54, 55]. Notons aussi que des approches d'immunoprécipitation de la chromatine combinées à une analyse par biopuce à ADN ont permis d'identifier des gènes cibles directes du ER confirmées par la présence d'un ERE parfait ou variant [56-58]. Cependant, la présence d'un ERE dans un promoteur n'est pas la preuve irréfutable d'une régulation hormonale en raison d'une distribution aléatoire possible des bases dans le génome et d'un accès du récepteur à ces séquences qui peut être modulé par la structure chromatinienne. De plus, d'autres séquences d'ADN peuvent médier les effets des œstrogènes sur leurs gènes cibles du fait de la coopération du ER avec d'autres facteurs de transcription dans la régulation de la transcription ou l'activation des voies non génomiques.

2.2.2.2. Voies génomiques indirecte : le cas Sp1

A côté d'une interaction classique du ER avec son ERE, la modulation de l'expression génique peut passer par des éléments de réponse composites de type Sp1/demi-ERE où un motif PuGGTCA est associé à une boîte riche en GC liée par le facteur de transcription Sp1. La distance et l'orientation du demi-ERE et du site pour Sp1 sont variables [50]. Si pour les gènes *RAR α* et *CATHEPSIN D*, l'induction hormonale requiert la présence du site Sp1 et du demi-ERE, il existe des situations plus complexes où la seule présence des sites Sp1 paraît être suffisante, comme pour les gènes *HSP27*, *BCL-2*, *IGFBP4* et *E2F1* [59, 60]. Signalons de plus que la coopération Sp1-ER s'appuie sur une interaction physique directe ou indirecte entre ces deux facteurs de transcription et que la régulation par l'E2 de promoteur composite est modulée par le type cellulaire [59]. En effet, les cellules HeLa n'exprimant pas ER, connaissent peu d'activité œstrogénique via Sp1 quand ER α y est transfecté [61]. La preuve d'une telle participation de ER et Sp1 dans la médiation transcriptionnelle de la réponse à l'E2 fut apportée en utilisant la technologie des siRNA qui permet une dégradation spécifique d'ARN messager (ARNm). Ainsi l'ablation de Sp1 diminue l'induction par l'E2 d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *VEGF* dans les cellules ZR75 [62].

2.2.2.3. Voies génomiques indirectes : le cas AP-1

La régulation de l'expression génique par les ERs ne se cantonne pas à Sp1. Ainsi, AP-1 (Activating Protein-1), qui est un complexe hétérodimérique des facteurs de transcription Jun et Fos, est capable de lier l'ER en présence de E2. La stimulation de l'expression des gènes *IGF1* et *COLLAGENASE* sous E2 est dépendante d'AP-1 et peut être aussi observée en présence du ER mutant avec une délétion du DBD suggérant une interaction indirecte du ER avec les promoteurs des gènes [63-65]. Toutefois, des expériences de transcription *in vitro* démontrent qu'autant le DBD que le LBD sont requis afin de réguler l'expression génique sous le contrôle d'un promoteur artificiel contenant deux sites de liaison à AP-1 [66].

Une étude globale a été conduite par DeNardo *et al.* [67] dans le but d'identifier les gènes co-régulés par ER et AP-1. Tam67, un dominant négatif de

Jun, a été exprimé dans les cellules de carcinome mammaire MCF7, qui expriment ER alpha. A l'aide de biopuces d'ADN, un profil d'expression des gènes réprimés en présence d'E2 et de TAM67 a été dressé, conduisant à l'identification d'une vingtaine de nouveaux gènes.

2.2.2.4. Les voies génomiques indirectes : le cas NFκB

Un autre exemple bien connu de régulation transcriptionnelle par ER est le cas intéressant du gène *IL-6* (Interleukine-6). Celui-ci diffère des autres gènes car ER agit ici en répresseur. ER empêcherait la liaison de RelA, un membre de la famille NFκB, avec son élément de réponse situé dans le promoteur [68], permettrait la nucléation d'un complexe ternaire inhibiteur entre C/EBP, ER et NFκB [69], ou bloquerait la localisation nucléaire de NFκB [70].

2.2.3. ERs, protéines de signalisation à la membrane cytoplasmique

Dans les années 70, alors que toute la communauté scientifique dans le domaine des récepteurs stéroïdiens était tournée vers la caractérisation des gènes cibles des œstrogènes, Richard Pietras et Clara Szego annonçaient qu'une forme membranaire du ER était couplée à une signalisation intracellulaire rapide [71]. Depuis, de nombreuses observations allant dans cette direction ont été décrites, définissant une nouvelle voie de signalisation des stéroïdes et de l'E2 en particulier : la voie « non-génomique ». Celle-ci est caractérisée par : i) une réponse à l'hormone dans des temps très courts se comptant en secondes et en minutes, considérés trop rapides pour que la transcription et la traduction s'opèrent; ii) une réponse non affectée par les inhibiteurs de la transcription (actinomycine D) et de la traduction (cycloheximide); iii) enfin une réponse qui à la capacité d'être initiée par de l'E2 conjuguée à une macromolécule comme l'albumine sérique bovine, et donc en théorie strictement extracellulaire [72].

2.2.3.1 Présence de ERα à la membrane

De nombreuses expériences ont renforcé l'idée que l'ER membranaire était le même récepteur que celui qui propage les effets transcriptionnels de l'E2

dans le noyau. Diverses preuves convergentes ont été apportées : i) détection de ER α à la membrane par immunohistochimie en utilisant divers anticorps spécifiques [73] ; ii) perte du récepteur membranaire après administration d'oligonucléotides antisens contre le ER α [74] ; iii) détection à la membrane du ER α dans des cellules CHO transfectées ne l'exprimant pas de façon endogène [75] ; iv) détection de l'ER endogène dans des cellules endothéliales dans les caveolae, sous-domaines structuraux et fonctionnels de la membrane cytoplasmique riche en cholestérol et en cavéoline [76] v) perte du récepteur membranaire chez les souris invalidées pour les deux récepteurs [77].

Des travaux récents de Razandi *et al.* [78] ont mis en évidence que le domaine E ou LBD du ER était nécessaire et suffisant à la localisation membranaire. En outre, ils ont identifié la sérine S522 du LBD comme le point d'ancrage du ER à la protéine cavéoline-1. De plus des interactions entre la région A/B du ER et la molécule adaptatrice Shc pourraient contribuer à son positionnement membranaire [79]. Enfin, des modifications post-traductionnelles du ER ont été rapportées, notamment la palmylation indépendante d'E2 de la cystéine 447. Cette dernière serait requise pour l'interaction avec cavéoline-1 [80]. Il est à noter cependant que l'interaction du ER avec cavéoline-1 reste controversée [76].

2.2.3.2. Effets non génomiques des œstrogènes

De nombreux effets non génomiques d'E2 ont été rapportés incluant notamment la mobilisation du calcium intracellulaire, la production du messager vasodilatateur NO (oxyde nitrique) et la stimulation de l'adénylate cyclase conduisant à la synthèse accrue d'AMPc (AMPcyclique) activateur de PKA (Protein kinase A) [81]. L'activation des MAPK (Mitogen activated protein kinase) par E2 est sans aucun doute le phénomène qui a suscité le plus de recherches dans de nombreux types cellulaires dont les cellules tumorales mammaires, les cellules endothéliales, les cellules osseuses et des cellules de neuroblastome. E2 peut aussi activer la voie de signalisation de la PI3-kinase (Phosphatidyle-inositol-3phosphate) dans les cellules endothéliales et les cellules mammaires cancéreuses. De nombreux partenaires de ER α impliqués à un niveau

proximal dans les voies de signalisation ont été identifiés : les protéines G, la kinase Src et Ras, la sous-unité régulatrice p85 α de la PI3-kinase et Shc [82].

2.2.3.2.1 Activation de Erk

Erk appartient à la famille des MAPK (Erk, p38 et Jnk) et est impliquée essentiellement dans la prolifération cellulaire. Les MAPK sont les substrats de MAPK kinases activées en amont ou MAPKK (MEK) qui sont elles-mêmes les substrats de kinases proximales MAPKKK (MEKK ou Raf) [83]. Les Raf sont activées par les récepteurs à activité tyrosine-kinase intrinsèque (EGF-R, IGF-R), par la kinase Src, la protéine kinase C (PKC) et la protéine kinase B PKB/Akt. En général les voies de signalisation des MAPK sont activées par des signaux extracellulaires qui sont transduits par des récepteurs membranaires. Plusieurs études ont démontré qu'E2 stimule l'interaction Src-ER α / β et l'activité kinase de Src. A un niveau physiologique, l'activation de Src par E2 serait impliquée dans la stimulation de la prolifération des cellules mammaires MCF7 ER⁺ et non des cellules ER⁻ MDA-MB-231 [84]. Dans cette étude, la transfection des fibroblastes de type NIH-3T3 avec ER α confère une croissance induite par E2, de même qu'un mutant de ER α transcriptionnellement inactif (E247G) indiquant que les voies génomiques seraient secondaires dans la prolifération cellulaire. Cependant, l'implication des voies non génomiques dans la prolifération des cellules MCF7 n'est pas à ce jour clarifiée. Ainsi dans une étude récente, Harrington *et al.* constatent en utilisant de l'E2 couplée à une macromolécule dont la répartition est strictement membranaire et cytoplasmique, que Erk, Src et Shc sont activés mais ne conduisent pas à la prolifération cellulaire [85]. La conformation du récepteur en présence d'un tel ligand n'est malheureusement pas discutée et pourrait invalider certaines fonctions non génomiques d'ER, notamment par encombrement stérique.

L'interaction ER-Src ferait intervenir le domaine SH2 de Src et la phosphotyrosine 537 dans le LBD de ER ; la mutation de cette dernière abolissant l'interaction avec Src et sa stimulation [86]. Suite à la formation du complexe ER-Src, deux substrats de Src, Shc et Ras-GAP-p190 sont activés et engendreraient l'activation de Erk1/Erk2 [87]. Il est important de noter que Src jouerait un rôle primordial dans l'activation des MAPK par E2. En effet,

Kousteni *et al.* ont démontré que l'activité induite par ER α était de beaucoup ralentie dans des fibroblastes de souris homozygotes invalidées pour le gène Src [19]. Une protéine impliquée dans la formation du complexe ER-Src a été récemment mise en évidence. MNAR (modulator of nongenomic activity of ER) favorise une interaction dépendante d'E2 entre ER α et Src [88]. Cette interaction entre ER α et Src, stimule l'activité catalytique de cette dernière et favorise ainsi l'activation des MAPK. De plus, Barletta *et al.* ont mis en évidence que MNAR interagit avec ER α par le biais de deux motifs LxxLL en présence d'E2 et que la surexpression de MNAR augmente l'activité transcriptionnelle de ER seulement quand celui-ci est phosphorylable (S104, 106, 118 et Y537) [89]. MNAR permettrait donc une convergence des voies non-génomiques et génomiques en augmentant via Src l'activité transcriptionnelle d'ER α .

Il a été également rapporté par Song *et al.* qu'une association apparaît entre la protéine adaptatrice Shc et ER α après 3 min. de stimulation avec E2, conduisant à la phosphorylation de Shc et de Erk [79]. De plus, la diminution du contenu cellulaire en Shc par siRNA réduit la localisation membranaire de ER α dans les MCF7, particulièrement au niveau d'un complexe ER/Shc/IGF1-R [90]. L'ablation de chacune des protéines conduit à l'inhibition de l'activation de Erk par E2 [90].

Enfin, il a été mis en lumière par Razandi *et al.* qu'E2 active Erk par le biais du récepteur à l'EGF en activant les métalloprotéases MMP2/9 qui catalysent la sécrétion de la forme membranaire du ligand EGF complexée à l'héparine [91]. EGF peut donc ainsi activer son récepteur et stimuler Erk. Le mécanisme d'activation est cependant complexe car il nécessite Src et la protéine G α i. Enfin, Filardo *et al.* relatent d'un autre côté l'existence d'un nouveau récepteur de l'E2, GPR30, dont l'activité conduirait à la stimulation d'EGF-R et *in fine* des MAPK [92].

2.2.3.2.2. Activation de eNOS

Xu *et al.* ont les premiers démontré que le niveau d'expression de eNOS est stimulée par E2 *in vivo*. En effet, l'ovariectomie chez la ratte diminue l'expression protéique de eNOS et son activité. En parallèle à un effet

transcriptionnel d'ER sur eNOS, cette dernière est activée par un flux brutal de Ca^{2+} intracellulaire induit par E2. Chambliss *et al.* ont rapporté la colocalisation d'ER et eNOS dans les caveolae de cellules endothéliales [93]. En outre, Goetz *et al.* ont mis en évidence qu'E2 permet la délocalisation d'eNOS des caveolae où elle est maintenue dans une conformation inactive par la cavéoline [94]. Au niveau du mécanisme moléculaire d'activation d'eNOS, il a été rapporté que : i) E2 promeut l'association entre la chaperone Hsp90 (Heat shock protein 90) et eNOS favorisant la synthèse de NO, inhibée par la geldanamycine (inhibiteur de Hsp90) et l'antioestrogène ICI182,780 [95]; ii) E2 active la voie PI3K-Akt qui entraîne la phosphorylation et l'activation de eNOS [96]. Rappelons que Simoncini *et al.* ont mis en évidence une interaction rapide dépendante d'E2 entre $\text{ER}\alpha$ et la sous-unité régulatrice p85 α de la PI3K et établi un lien entre l'activation de Akt et la synthèse de NO [97].

2.2. GPR30, nouveau médiateur des effets non génomiques de L'E2

D'après des études récentes, les ERs ne sembleraient pas avoir le monopole des effets œstrogéniques non génomiques. GPR30, un récepteur à sept domaines transmembranaires associé aux protéines G, pourrait être impliqué. Celui-ci fut cloné à l'origine sur la base d'une expression préférentielle dans les lignées cellulaires et tumeurs exprimant $\text{ER}\alpha$ [98]. Ainsi, il a été par la suite mis en évidence que GPR30, en présence d'E2, active ERK1/2 via la transactivation d'EGF-R (Epithelial Growth Factor-Receptor) dans les cellules MCF7 aussi bien que dans les cellules négatives pour $\text{ER}\alpha$ [92]. En outre, GPR30 lie bel et bien le E2. Cependant sa capacité de liaison des ligands œstrogéniques, n'est pas totalement superposable à celle des récepteurs nucléaires des œstrogènes puisqu'il ne fixe ni le 17α -œstradiol ni l'œstrone; ceci suggère une fonction spécifique de ce récepteur, qui doit être prise en compte pour le traitement du cancer du sein par les anti-œstrogènes puisque le GPR30 fixe également ces ligands.

La localisation de GPR30 n'est actuellement pas claire car ce dernier est retrouvé à la membrane plasmique dans certaines études mais est strictement associé à la membrane du réticulum endoplasmique dans d'autres [99, 100].

Enfin, il est à remarquer que la présence de GPR30 dans les cellules mammaires SKBR3 qui n'expriment pas ER pourrait expliquer des effets œstrogéniques dans ces cellules [101].

3 L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DU ER : ANATOMIE MOLÉCULAIRE

Nous avons brièvement décrit les différentes fonctions du ER α . La compréhension de l'activité nucléaire du ER ne pourrait se faire sans résumer le travail colossal qui a été mené afin d'identifier les différents cofacteurs qui jouent un rôle dans son activité transcriptionnelle.

3.1 LES COACTIVATEURS

Des expériences de mutagenèse ont permis de cartographier les différents domaines d'activation de la transcription du facteur ER et d'identifier les deux fonctions d'activation AF-1 et AF-2, situées respectivement dans les parties N et C-terminale, qui participent toutes deux à l'expression finement contrôlée des gènes cibles de ER (cf. Figure 2). Si AF-1 n'est pas dépendante de la liaison au ligand, AF-2 quant à elle, démontre une dépendance hormonale [2]. L'activité des deux fonctions AF-1 et AF-2 est modulée par le contexte de la cellule et du promoteur ciblé [102].

3.1.1. Modifications de la structurales du LBD suite à la fixation du ligand.

La fixation d'un ligand (agoniste ou antagoniste) induit des changements de structure du domaine de liaison au ligand des récepteurs nucléaires. Ceci a été démontré initialement par des expériences de sensibilité aux protéases, et par

modification de la migration du complexe récepteur/élément de réponse dans des essais de retard sur gel [103, 104]. La structure du LBD du ER α en présence d'E2, a ensuite été révélée par analyse cristallographique [105, 106]. Les LBD des récepteurs nucléaires sont composés de douze hélices : un noyau central compact est formé par les hélices 5,6,9 et 10, et est entouré par les hélices 2,3,4,7,8,et 11. L'hélice 1 ne fait pas partie de ce «sandwich» d'hélices et l'hélice H12 a une position variable. En présence d'E2, H12 forme le couvercle de la cavité de liaison à l'hormone. Des résidus présents dans les hélices 3,4,5,et 12 forment alors le sillon de liaison des coactivateurs (SLC). En revanche, en présence d'antagonistes partiels comme le 4-hydroxytamoxifène, H12 est réorientée et occlut partiellement le SLC [105]. Enfin, en présence d'ICI182,780, un antagoniste total de type stéroïdien, la chaîne carbonée du composé déplace complètement H12 et occupe le SLC, abolissant totalement la liaison des coactivateurs [107].

3.1.2. Différents coactivateurs d'ER et leurs fonctions propres

3.1.2.1. Coactivateurs de type p160

SRC1 (Steroid Receptor Coactivator-1) est le premier membre de la famille p160 à avoir été cloné sur la base de son interaction avec PR en présence de progestérone [108]. L'interaction a lieu au niveau du SLC dans le domaine de liaison du ligand, mais met également en jeu la région A/B. SRC2/TIF-2/GRIP1 et SRC3/AIB1/RAC3/ACTR/TRAM-1/pCIP ont été clonés par la suite [109-115]. Des expériences de mutagenèse dirigée ont cartographié des motifs LxxLL (où L est une leucine et X n'importe quel acide aminé) au sein de nombreux coactivateurs dont les p160. Ce motif est critique à l'interaction dépendante d'E2 des coactivateurs au niveau du SLC [116, 117]. La structure des LBDs en présence d'agoniste a démontré que des résidus issus de H3, H5 et H12 sont importants pour la reconnaissance des motifs LxxLL [105, 106].

Les membres de la famille p160 affichent non seulement une homologie de séquence mais aussi une homologie fonctionnelle : i) ils possèdent une activité HAT démontrée pour SRC1 et SRC3 [112, 118]; ii) ils recrutent des complexes présentant une activité HAT, en particulier CBP/p300 qui recrute p/CAF [119]; iii) ils interagissent avec CARM1 et PRMT1, des méthyltransférases des histones

[120]. Shang *et al.* [39] ont démontré que la liaison du ER au promoteur du gène cible *TFF1* est cyclique pendant l'exposition à l'E2. Fait à souligner, p300 participe uniquement à l'interaction initiale, CBP le remplaçant pour les cycles suivants [121]. Enfin, Chen *et al.* [112] ont mis à jour un mécanisme de régulation négative passant par l'acétylation de SRC3 par CBP. Une fois acétylé au niveau d'un de ses motifs LxxLL, SRC3 voit son affinité pour ER diminuée. Cependant, aucune preuve n'a été à ce jour apportée afin de montrer une acétylation des p160 précédant une clairance d'ER du promoteur cible.

Les p160, CBP/p300 et CARM1 fonctionnent en synergie pour augmenter la capacité transcriptionnelle du ER via AF-2 [122, 123]. L'acétylation des histones a pour conséquence une décondensation locale de la chromatine, rendant ainsi l'ADN accessible à des facteurs de transcription et/ou à la machinerie transcriptionnelle de base.

3.1.2.2. Les complexes SWI/SNF

D'autres complexes importants constituant «l'enhanceosome» nucléé par ER au niveau des promoteurs des gènes cibles sous stimulation à E2 sont les complexes SWI/SNF. Ceux-ci relâchent la chromatine en déplaçant les histones par une activité hélicase ATPasique attenante aux protéines Brg1 ou Brm [124]. Par la technique du 2-hybride dans la levure, Ichinose *et al.* [125] ont les premiers mis à jour un recrutement hormono-dépendant de Brm et Brg1 au niveau de leur domaine amino-terminal, précédant leur domaine catalytique. La surexpression des hélicases Brg1 ou Brm augmente la transcription dirigée par ER comme la surexpression des sous-unités les composants par exemple, BAF250 (Brg1-Associated Factor) [126]. En outre, le recrutement de SWI/SNF semble complexe et dépend en partie de BAF57, qui interagit non seulement avec ER en présence d'E2, mais aussi avec les trois p160 par le biais de leur domaine PAS amino-terminal. Ce recrutement est de plus visible sur le promoteur du gène cible de ER *TFF1* [127]. Enfin, récemment, Xu *et al.* [128] en isolant les protéines associées à CARM1, ont mis en évidence une superposition partielle entre le complexe SWI/SNF et un nouveau complexe NUMAC (Nucleosomal Methylation Activator Complex). CARM1 et Brg1 participent de façon synergique et coopèrent sur les promoteurs cibles d'ER.

3.1.2.3. Le complexe médiateur et initiation de la transcription

Un autre complexe coactivateur a été identifié sur la base d'une interaction dépendante de l'hormone avec les LBDs des récepteurs nucléaires à la vitamine D (VDR, Vitamin D Hormone Receptor) et aux hormones thyroïdiennes (TR, Thyroid Hormone Receptor). Ce complexe, appelé TRAP (TR associated proteins) ou DRIP (Vitamin D receptor interacting proteins) Ce est recruté par l'intermédiaire de la sous-unité DRIP205/TRAP220 qui lie AF-2 via un motif LxxLL. Ce complexe est non seulement recruté par les récepteurs nucléaires dont ER [129] mais aussi par NFkB, Sp1. Plusieurs des protéines de ce complexe sont des composants du complexe médiateur, à savoir d'un complexe de facteurs requis pour le recrutement de l'ARN polymérase II et l'initiation de la transcription

Signalons de plus que des interactions directes et indirectes entre ER et différents membres de la machinerie transcriptionnelle de base (TBP, sous unités de TFIID, et TFIIH) ont également été décrites *in vitro*. Il a été rapporté qu'un tel recrutement augmente l'activité transcriptionnelle du ER [130].

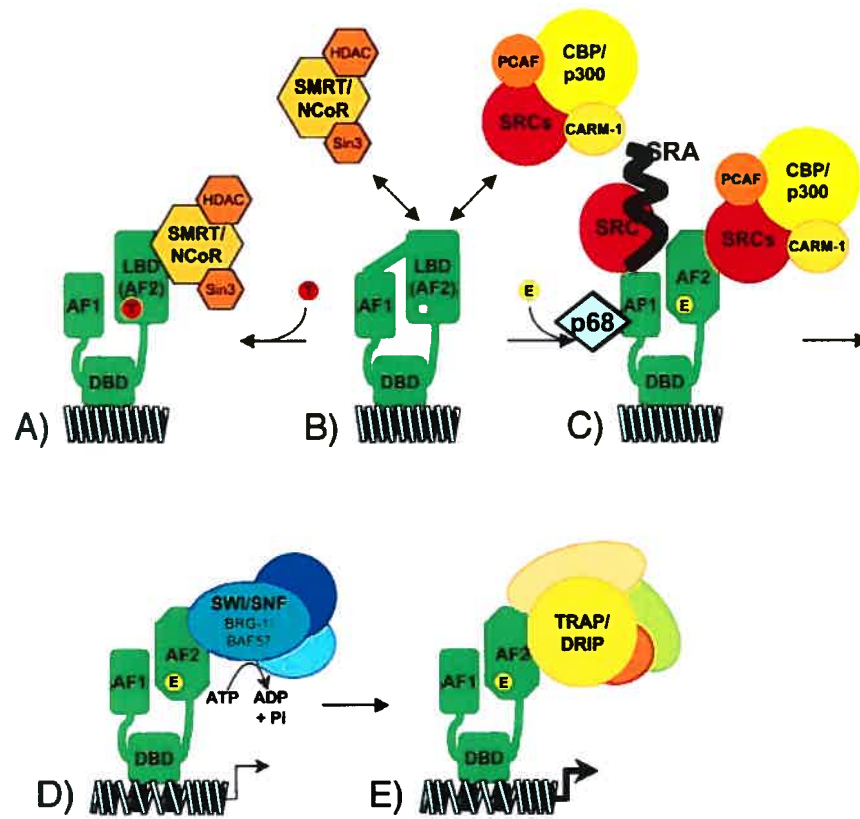


Figure 2 : Représentation schématique de l'activation de l'expression génique par l'ER.

A) En présence d'anti-œstrogènes comme le tamoxifène (T), ER interagit avec un complexe répressionnel comprenant SMRT/NCOR qui maintient la chromatine dans un état condensé. Le récepteur sans ligand (B) est inactif, possiblement suite à une interaction intramolécule entre région AF1 et AF2, mais peut activer la transcription en présence de certains stimuli extracellulaires. C) En présence d'E2 (E), différents coactivateurs sont recrutés, en particulier les p160 qui permettent la mise en place d'un complexe de remodelage de la chromatine comprenant les HATs CBP/p300, pCAF et l'histone méthyltransférase CARM-1. Différents complexes agissent de concert afin d'optimiser la transactivation d'ER, notamment les complexes SWI/SNF (D) (remodelage ATP dépendant de la chromatine) et TRAP/DRIP (E) point d'ancrage de l'ARN polymérase II. AF-1,2 (Activation Function-1&2), DBD (DNA Binding Domain), HDAC (Histone deacetylase). Figure adaptée de Smith *et al.* [119].

3.1.3. Participation d'AF-1 dans l'activité transcriptionnelle d'ER

La liaison des coactivateurs à ER conditionnelle à la présence d'E2 est un événement clé dans l'activité d'AF-2 et de ce fait dans la modulation hormonale de l'expression génique. Toutefois, le facteur de transcription ER nécessite également AF-1 pour atteindre des niveaux optimaux de transactivation. Aussi existe-il de nombreux mécanismes impliquant AF-1 dans l'activité transcriptionnelle d'ER. En voici quelques exemples.

Métivier *et al.* [131] ont démontré que ER α en absence d'hormone était dans un état inactif impliquant une interaction intramoléculaire entre le sillon de liaison des coactivateurs (AF-2) et la région A amino-terminale. L'E2, induit un changement de conformation, libérant la région A et exposant AF-1 à ses corégulateurs. Ainsi, il a été relevé que la région A/B peut être une interface supplémentaire pour les coactivateurs de type p160. Cette fois-ci, l'interaction n'est pas assurée par les motifs LxxLL mais en partie par une région carboxy-terminale, riche en polyglutamine [132, 133].

Il a été de plus déterminé par Lanz *et al.* [134] que l'ARN SRA (Steroid receptor RNA Coactivator) pouvait servir de coactivateur. En effet, SRA transactive AF-1 et se retrouve complexé avec SRC1. Il a été en outre remarqué que la transactivation via SRA requiert l'activité de l'enzyme mPus1p dont l'activité de pseudouridylation est impliquée dans structuration fonctionnelle des ARN [135].

Les hélicases à ARN p68 et p72 sont aussi des coactivateurs spécifiques d'AF-1. Cependant leur fonction hélicase semble dispensable à l'activation en *trans* de ER. En revanche, elles interagissent avec SRA et participeraient à un complexe ribonucléoprotéique activateur [136, 137].

La région AF-1 subit aussi des modifications post-traductionnelles qui peuvent modifier son activité. La phosphorylation des résidus sérine S104, S106, S118 et S167 a été décrite et stimule l'activité AF-1 en absence de ligand. [138-145]. Diverses molécules favorisent la phosphorylation d'ER. Citons l'EGF, le TGF- α (Transforming growth factor), insuline, l'IGF1/2, l'héréguline, la

dopamine, la cycline D1, la cycline A/CDK2, l'AMPc (AMP cyclique), l'acide okadaïque et les esters de phorbol [138, 146-164].

La participation de la voie de signalisation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) est bien documentée concernant la phosphorylation de S118 [148, 165, 166]. La mutation de S118 en alanine inhibe la phosphorylation et l'activation d'ER par les facteurs de croissance [167].

Il est important de noter que la phosphorylation de la sérine 118 est aussi stimulée par E2 : en présence d'E2, TFIIH est recruté entre autres par sa sous-unité p62 qui contient un motif LxxLL. TFIIH à son tour engage CDK7 qui phosphoryle S118 et stimule la réponse hormonale. Ainsi l'E2 favorise l'interaction d'AF-2 avec des coactivateurs mais favoriserait de plus la nucléation des coactivateurs en AF-1. Aussi p68 et p72 connaissent-ils une affinité plus élevée pour AF-1 quand S118 est phosphorylée. Enfin, la phosphorylation de S118 connaît une régulation négative par la protéine phosphatase PP2A, dont la sous-unité catalytique est recrutée dans la région B d'ER. L'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque diminuerait la transactivation d'ER et particulièrement l'expression du gène cible ENOS (Endothelial NO synthase) [168].

La phosphorylation d'une autre sérine, S167, dépendante de la kinase spécifique des résidus sérine/thréonine pp90rsk1, de la kinase de la caséine CKII, et de la PI3-kinase contribue aussi à l'activation d'AF-1 par les facteurs de croissance. La phosphorylation de S167 pourrait augmenter la liaison à l'ADN et le recrutement de coactivateurs [166, 169].

3.2 LES CORÉPRESSEURS

3.2.1. SMRT/NCoR

Les corépresseurs servent de régulateurs négatifs dans les voies de signalisation des récepteurs nucléaires. Contrairement aux récepteurs de type stéroïdien, les récepteurs des rétinoïdes RAR (Retinoic Acid Receptor) et TR lient leurs éléments de réponse en absence d'hormone. Cependant en absence de ligand, ils interagissent avec deux répresseurs SMRT (Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone) et NCoR (Nuclear receptor Co Repressor) et

de fait répriment de façon constitutive l'expression génique. SMRT/NCoR lient RAR et TR non ligandés par le biais de motifs LxxxI/HIxxxI/L. En présence de ligand, SMRT/NCoR se dissocient de RAR et TR qui peuvent dès lors recruter les coactivateurs de type p160, permettant l'activation de la transcription. Les répresseurs participent à des complexes protéiques ayant une activité déacétylase des histones (HDAC, Histone deacetylase), qui augmente le niveau de compaction de la chromatine la rendant plus réfractaire à la transcription.

En ce qui concerne les récepteurs des stéroïdes, la liaison aux corépresseurs en absence de ligand est moins claire. En revanche, ER interagit avec les corépresseurs en présence d'antagoniste partiel comme le 4-hydroxytamoxifène (OHT). Ainsi, il a été nettement montré par Shang et Brown [170] qu'ER en présence d'OHT est recruté sur le promoteur des gènes cibles *C-MYC* et *IGF-1* dans les cellules MCF7, et y est accompagné par NCoR/SMRT, les HDAC (2&4). De plus, l'injection intracellulaire d'anticorps neutralisant anti-NCoR ou SMRT diminue l'effet antagoniste d'OHT, le rendant agoniste [159]. Enfin, l'OHT présente des effets œstrogéniques dans les fibroblastes murins invalidés pour le gène *NCOR* [171].

3.2.2. Autres corépresseurs

D'autres corépresseurs d'ER interagissant en présence d'agonistes ont été mis en évidence. Citons notamment LCoR qui interagit avec ER en présence d'E2, tout comme RIP140 [172, 173]. Ces derniers recrutent des HDACs ainsi que les protéines CtBp et CtIP et assureraient la fin du signal œstrogénique. La cinétique précise de leur recrutement dans le cycle d'association-dissociation de ER avec le promoteur pS2 n'a pas encore été décrit. En outre, REA, un autre corépresseur, fonctionnerait en entrant en compétition avec les coactivateurs [174].

4. CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DE ER α

Si les voies de l'E2 peuvent être modulées par différents paramètres à savoir le contexte tissulaire et les voies de signalisation en présence, la réponse œstrogénique est à la base dépendante de l'expression du ER et de ses différents variants. Après avoir résumé l'organisation génomique du gène *ESR1*, qui code pour ER α , le point des connaissances sera fait sur les facteurs régissant son expression.

4.1. EXPRESSION D'ER α À PARTIR DE PROMOTEURS ALTERNATIFS

Le gène codant pour ER α (*ESR1* ou *NR3A1*) se situe chez l'Homme sur le chromosome 6 au niveau du locus 6q25. Le gène codant pour ER β (*ESR2* ou *NR3A2*), quant à lui se retrouve sur le chromosome 14 à la frontière entre les loci 14q11.1 et 14q11.2.

4.1.1. Promoteurs d'ER α et expression tissulaire

L'expression d'*ESR1* est très complexe en raison de la présence d'au moins six promoteurs (Figure 3) et de huit exons codants s'étalant sur 450 kb [175]. Fait remarquable, l'utilisation alternative des différents promoteurs résulte généralement en l'expression d'ARNm (ARN messenger) qui varient seulement dans leur région non traduite en 5' (5'UTR). Ainsi chaque promoteur promeut l'expression d'un premier exon non codant qui est épissé avec un site accepteur d'épissage commun situé en amont du codon initiateur se trouvant en position +163 dans le premier exon codant. En conséquence, ces différents ARNm sont traduits dans tous les cas en une même protéine : l'ER α sauvage de 66 kDa.

Par contre, il a été avancé que ces différents promoteurs seraient impliqués dans le contrôle tissulaire de l'expression d'ER α [176]. Ainsi les promoteurs A et C sont utilisés dans les cellules MCF7, alors que dans une autre lignée cellulaire de carcinome mammaire, ZR75, seulement A semble actif [177].

Le promoteur E1-E2 permet l'expression d'ER α spécifiquement dans le foie [178]. Enfin F semble prédominant dans le tissu osseux [179].

4.1.2 Différents isoformes d'ER α

Il a été démontré qu'en plus de la forme sauvage de 66 kDa, il existe dans le tissu osseux et les cellules MCF7 une forme plus courte de 46 kDa. Celle-ci est issue du promoteur F qui peut être épissé avec un deuxième site accepteur situé au niveau du second exon codant. L'ARNm qui en découle code pour un variant d'ER α qui ne présente plus de région A/B et par conséquent de fonction AF-1 [180]. La forme 46 kDa conserve la capacité à lier un ERE et peut former des hétérodimères avec la forme 66 kDa. Points intéressants, la forme 46 kDa homodimérique lie un ERE avec une plus haute affinité et l'hétérodimère 46/66 kDa se constitue préférentiellement par rapport à l'homodimère de 66 kDa [180]. Ainsi dans les cellules où la fonction AF-1 prédomine dans la transactivation du ER α , comme les cellules hépatiques HepG2, la forme 46 kDa inhibe la transactivation du ER α 66 kDa. La réponse d'une cellule à l'E2 est donc dépendante du profil d'expression des isoformes d'ER α et des différents coactivateurs spécifiques d'AF-1 et ou d'AF-2. Récemment, Métivier *et al.* ont démontré que si les ER α 66 et 46 kDa recrutent en présence d'E2 les mêmes complexes de coactivateurs sur le promoteur du gène *TFF1*, les formes non-ligandés se comportaient différemment en absence d'E2 : seul ER α 46 kDa recrute les corépresseurs SMRT/NCOR ainsi que les HDAC 1,3,7, expliquant le niveau d'expression plus faible de *TFF1* dans des cellules MDA-MB-231 qui expriment de manière stable la forme 46 kDa par rapport aux cellules exprimant ER α 66 kDa [181].

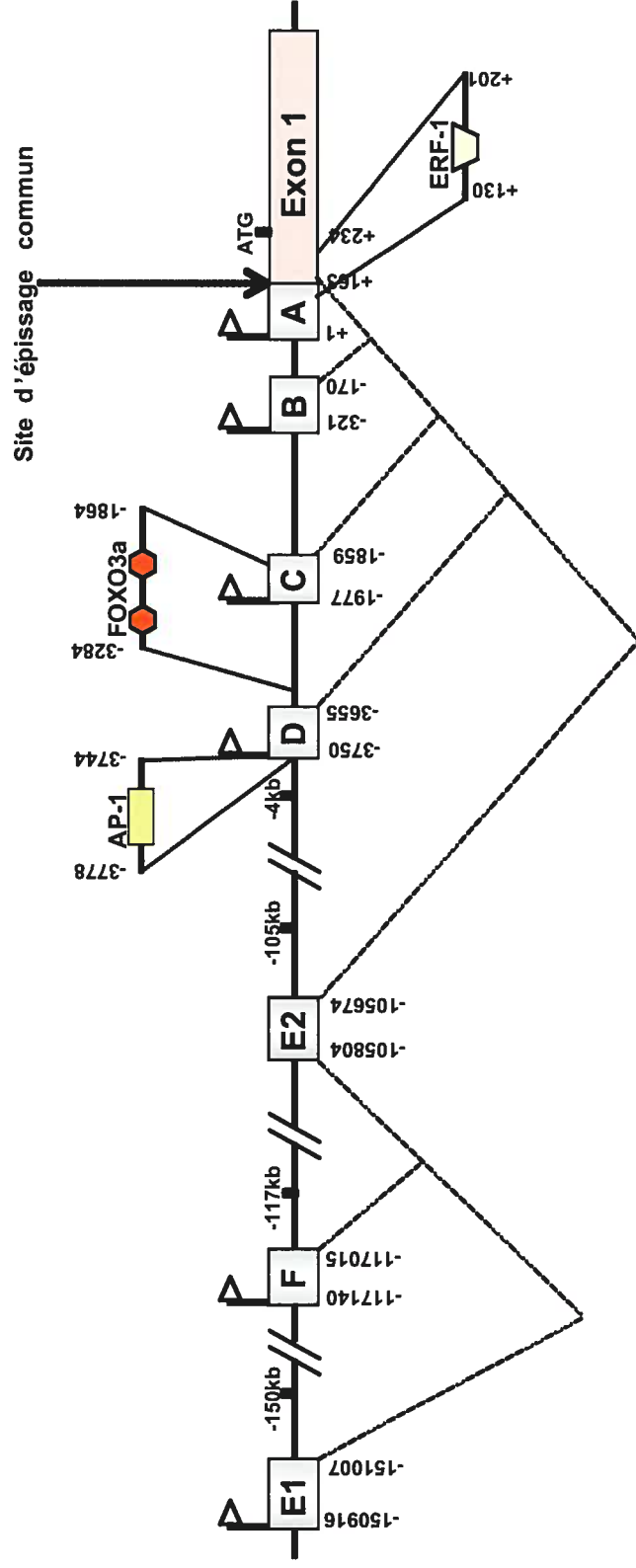


Figure 3 : Organisation génomique du gène humain *ESR1* codant pour ER α .

Les différents promoteurs d'ER α contenus dans une séquence de 150 kb conduisant à l'expression d'exons non traduits (représentés par des rectangles gris désignés A, B, C, D, E1 et F) épissés avec un site accepteur commun en +163. La position des limites de ces exons est indiquée par des chiffres verticaux. Les principaux éléments de réponse des facteurs de transcription qui participent à l'expression de ER α : AP-1, FOXO3a et ERF-1 sont indiqués, accompagnés de leur position (adapté de Kos *et al.* [175]).

4.2. MODULATION DE L'EXPRESSION D'ER α

4.2.1. Régulation transcriptionnelle d'ER α

Le contrôle transcriptionnel de l'expression d'ER α n'est pas très bien compris. La majorité des études de l'expression d'ER α portent sur les modifications survenant lors de la tumorigénèse mammaire. La raison en est le rôle essentiel d'ER α , qui est exprimé ou sur-exprimé dans deux tumeurs sur trois et leur confère une prolifération accrue dépendante des œstrogènes. De plus, certaines tumeurs évoluent vers une indépendance de croissance vis-à-vis des œstrogènes et voient l'expression d'ER α diminuer [182].

Différents éléments de contrôle transcriptionnel ont été mis en évidence dans les cellules de tumeurs mammaires positives ou négatives pour ER α . Tang *et al.* ont démontré qu'une séquence de 35 bp à la position -3,7 kb est un élément enhanceur majeur, requis pour l'expression d'ER α . Cet élément est un site de liaison pour AP-1 et pour d'autres facteurs non identifiés par les auteurs [183]. En outre de Coninck *et al.* ont répertorié un élément *cis* dans la région 5'UTR en +190 bp qui serait un site de fixation du facteur AP2- γ impliqué dans l'expression d'ER α [184]. Cependant, l'expression d'AP2- γ n'est pas superposable à l'expression d'ER α dans les tumeurs mammaires, indiquant la présence de mécanismes additionnels. Il faut aussi signaler que dans l'étude de Tang *et al.* la délétion du site AP2- γ au niveau du promoteur d'ER α ne modifiait pas l'expression d'un gène rapporteur [183]. Suite à l'observation d'une corrélation entre l'expression d'ER α et du facteur de transcription FOXO3a dans les cellules de tumeurs mammaires MCF7 et ZR75, Guo *et al.* ont identifié deux sites de liaison pour FOXO3a entre les positions -1864 et -3284 bp (promoteur C) [185]. Après avoir démontré une telle liaison par immunoprécipitation de la chromatine, ils ont prouvé une inhibition de l'expression d'ER α par l'activation de la voie Her2/PI3K/Akt. Il est connu que la voie Akt inhibe FOXO3a en le phosphorylant. Les auteurs

auraient ainsi fait le lien moléculaire entre activation d'Her2 et la perte de l'expression de ER α ; ceci pouvant expliquer la progression vers l'indépendance hormonale des tumeurs mammaires.

4.2.2. Stabilité de l'ARNm d'ER α

La région 3'UTR de 4,3 kb d'ER α est relativement longue comparativement à l'ensemble des messagers eucaryotes, se classant parmi les 5% les plus longues (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Une analyse de séquence a mis en évidence un enrichissement en séquences pouvant contribuer à une instabilité des ARNm [186]. Ces séquences de type AUUUA ont été identifiées initialement dans les séquences nucléiques des proto-oncogènes c-myc et c-fos dont la stabilité est très faible [187, 188].

Kenealy *et al.* ont dressé la topographie d'une région déstabilisatrice de 1 kb au sein des 4,3 kb du 3'UTR [189]. De façon surprenante, la délétion d'un quadruple motif AUUUA n'affecte en rien la stabilité de l'ARNm d'ER α . En revanche, une stabilisation dépendante de l'E2 a été rapportée dans les cellules Ishikawa d'adénocarcinome humain de l'endomètre : le messager en présence d'E2 voit sa demi-vie passer de 6 h à 10 h [190]. Enfin, Keen *et al.* ont établi que le traitement des cellules de carcinomes mammaires MCF7 et T47D par l'acide okadaïque, inhibiteur de PP2A, diminue la stabilité de l'ARNm d'ER α [191]. La dégradation spécifique de l'ARNm de PP2A par siRNA a montré les mêmes effets. Ces derniers sont toutefois à confronter avec ceux de Lu *et al.* où la transactivation par ER α endogène était augmentée en présence d'acide okadaïque dans les cellules endothéliales [168].

4.2.3. Régulation épigénétique de l'expression d'ER α

4.2.3.1. Méthylation des îlots CpG

Les régulations épigénétiques sont des mécanismes importants de contrôle de l'expression génique (Figure 4). L'absence d'expression d'ER α dans de nombreux tissus comme le colon, le poumon, le cœur et la prostate a

été attribué à la méthylation de l'ADN [192]. Ce mécanisme de verrouillage transcriptionnel a été particulièrement étudié dans les cellules de cancer du sein afin d'expliquer l'acquisition de résistance hormonale et anti-hormonale. De nombreuses études ont confirmé l'absence de méthylation du promoteur d'ER α dans les tissus mammaires sains et dans les tumeurs l'exprimant (ER $^+$). En revanche, le promoteur subit une méthylation dans les cellules cancéreuses n'exprimant pas ER α (ER $^-$) [193, 194]. Les méthyltransférases de l'ADN ou DNMT (DNA Methyl Transferase) transfèrent des groupes méthyle sur les cytosines d'îlots CpG présents dans les promoteurs des gènes. Les CpG méthylés sont des signatures reconnues par des protéines de type MBD (Methyl-Binding-Domain) et MeCP (Methyl-Cytosine binding Protein) qui interagissent avec les HDAC qui condensent la chromatine et répriment l'expression génique. DNMT1 joue un rôle dans la transmission des CpG méthylés de la cellule-mère aux deux cellules-filles lors de la réplication de l'ADN, contribuant ainsi à l'héritabilité de l'inhibition de l'expression [195]. Fait à noter, le niveau et l'activité de DNMT1 sont augmentés de 2 à 10 fois dans les cellules cancéreuses mammaires ER $^-$ [193]. L'utilisation d'un inhibiteur des DNMT, 5-azacytosine conduit à la déméthylation des CpG du promoteur d'ER α et à sa réexpression [196]. De plus, une relation inverse entre le niveau de méthylation et l'expression d'ER α a été trouvée par Lapidus *et al.* par cartographie des CpG méthylés dans la région promotrice d'ER α grâce à la technique de MSP (Methylation Specific PCR) [194].

4.2.3.2. La déacétylation des histones

4.2.3.2.1. Les classes de HDAC

Actuellement, dix-huit HDAC humaines ont été recensées et classées en trois classes : la classe I comprend les HDAC 1,2,3 et 8; la classe II se compose des HDAC 4-7, 9-11. HDAC1 et 2, les premières clonées, sont associées à des complexes protéiques répressionnels qui contiennent Sin3 (Switch independent protein 3) et NuRD (Nucleosome remodelling and histone deacetylase) [197] [198]. Ces complexes peuvent être recrutés par de nombreux facteurs de transcription par l'intermédiaire de SMRT/NCOR.

HDAC3 et la classe II ne sont pas liées à Sin3 et NuRD mais à SMRT/NCOR [199].

Les membres de la classe III ou sirtuines ne présentent pas d'homologie avec les membres des classes I et II. Sept sirtuines ont été clonées à ce jour et leur activité enzymatique, contrairement aux HDAC des classes I et II, dépend du coenzyme NAD (Nicotinamide adénine dinucléotide) et n'est donc pas inhibée par les inhibiteurs classiques des HDAC comme la trichostatine A (TSA) et le butyrate de sodium (NaBu) [200, 201].

4.2.3.2.2. Les inhibiteurs des HDAC de classe I et II

Il existe à ce jour une grande variété de HDACi. Voici les plus utilisés à ce jour. Les premiers inhibiteurs appartiennent la famille des acides gras à chaîne courte : le NaBu, le phénylbutyrate et l'acide valproïque. Ce dernier est utilisé en clinique pour le traitement de l'épilepsie. Ces composés quoique efficaces sur l'inhibition de la déacétylation des histones, requièrent d'être utilisés à de très hautes doses, de l'ordre du mM [197].

Une autre classe est la famille des hydroxamates dont le composé fondateur est TSA. TSA est une molécule naturelle antibiotique produite par *Streptomyces hygroscopicus* [202]. TSA est assez puissant et inhibe les HDAC à des concentrations de l'ordre du nM. L'inhibiteur dérivé de TSA le plus connu est SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) [203]. Ces deux composés ont été utilisés en co-cristallisation avec une HDAC bactérienne HDLP (HDAC-like protein) indiquant que TSA et SAHA sont capables de chélater le zinc de la poche catalytique et ainsi d'inactiver réversiblement l'enzyme [204].

D'autres inhibiteurs ont été décrits notamment la classe des trapoxines qui inhibent irréversiblement les HDAC I et II à l'exception de HDAC6 qui demeure résistante [205].

Les HDACi induisent l'apoptose ou la différenciation en fonction du type cellulaire. Ils bloquent la prolifération des cellules tumorales de glande mammaire, de l'endomètre et de l'ovaire [206]. Aussi les HDACi sont-ils des agents anticancéreux potentiels et font l'objet d'essais cliniques. L'analyse de l'expression des gènes de cellules lymphoïdes en réponse à TSA a de façon surprenante démontré qu'environ 2% des gènes étaient affectés dans le sens

d'une activation ou d'une répression transcriptionnelle: ceci suggère une faible corrélation entre activation transcriptionnelle et acétylation des histones [207]. Enfin des études récentes par biopuces ont mis en évidence une modulation de l'expression d'environ 7 à 9% des gènes en présence de TSA dans des lignées issues de carcinome du colon et de lymphome [208, 209]. Ainsi, malgré un effet sur l'acétylation globale des histones, un très faible pourcentage des gènes est affecté au niveau transcriptionnel.

4.2.3.2.3. HDACi et réexpression d'ER

L'utilisation des HDACi a été largement employée afin de rétablir l'expression d'ER α dans les cellules ER $^-$. Yang *et al.* [210] ont traité une série de cellules tumorales mammaires ER $^-$ avec l'inhibiteur des HDAC, trichostatin A (TSA). L'ARNm d'ER α est réexprimé dans ces cellules de manière proportionnelle à la dose et au temps de traitement. Cependant, les îlots CpG demeurent méthylés, indiquant un effet transitoire sur l'expression et le maintien du verrouillage épigénétique d'ER α [210]. Dans une autre étude, Yang *et al.* démontrent un effet synergique de TSA et 5-azacytosine sur la réexpression d'ER α et constatent une diminution de l'expression de DNMT1, une hyperacétylation des histones H3 et H4 et une déméthylation partielle des îlots CpG [211]. Enfin, Chen *et al.* (1998) ont isolé un sous-clone (C4 : 2) dérivé des cellules T47D qui n'expriment plus ER α suite à leur maintien dans un milieu sans œstrogènes [212]. Les îlots CpG dans les cellules C4 : 2 sont étonnamment dépourvus de groupes méthyle indiquant que la méthylation du promoteur n'est pas responsable dans ce cas de la perte de l'expression d'ER α . Cependant, l'expression des différents facteurs de transcription responsables de l'expression d'ER α n'a pas été considérée dans cette étude.

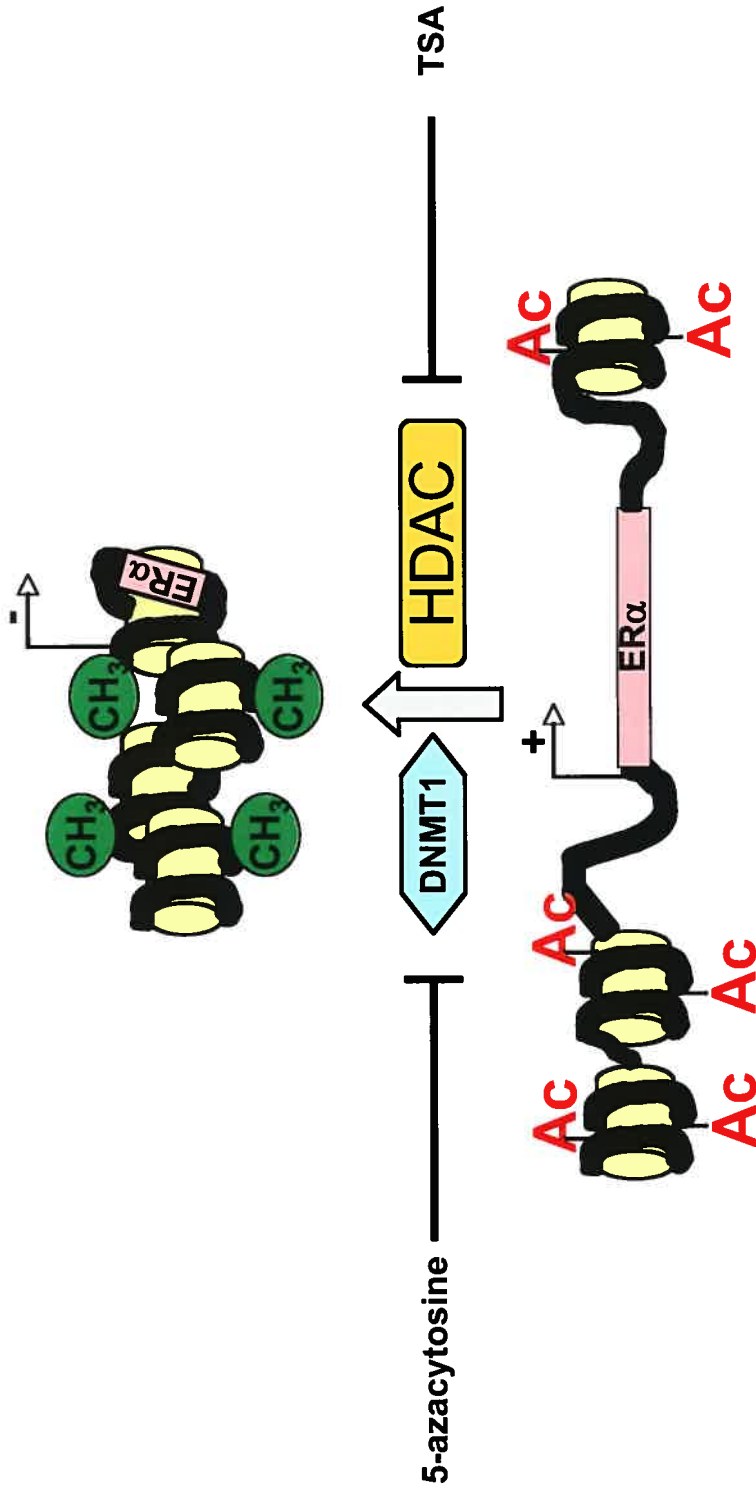


Figure 4 : Régulation de l'expression d'ERα par des mécanismes épigénétiques.

L'expression d'ERα est contrôlée par des mécanismes épigénétiques incluant la méthylation de l'ADN (trait noir épais) et l'acétylation des histones (cylindres jaunes). La méthyltransférase DNMT1 transfère des groupes méthyle (CH₃) sur les cytosines des îlots CpG au niveau du promoteur d'ERα inhibant ainsi la transcription. La chromatine transcriptionnellement active au niveau du gène codant pour ERα est caractérisée par la présence de groupes acétyles (Ac) sur les histones. L'hydrolyse des groupes acétyles par les HDAC condense la chromatine et inhibe l'expression d'ERα. L'inhibiteur des DNMT 5-azacytosine et l'inhibiteur des HDAC, trichostatine A (TSA) agissent en synergie dans la réexpression d'ERα (adapté de Pinzone *et al.* [192])

5.1. PREMIÈRE PARTIE : EFFET DES INHIBITEURS DE DESACETYLASES DES HISTONES SUR LA VOIE DE SIGNALISATION DES ŒSTROGÈNES

Si l'expression d'ER α dans les cellules ne l'exprimant pas est généralement rétablie par la déméthylation de l'ADN et la décondensation de la chromatine au niveau de son promoteur, l'effet des inhibiteurs des HDAC (HDACi) sur les voies transcriptionnelles régulées par E2 ne fait pas le consensus.

En effet Ruh *et al.* ont démontré que TSA stimule la transcription induite par E2 dans les cellules MCF7 [213], tout comme Mao et Shapiro dans les cellules HepG2 transfectées de manière stable avec le promoteur rapporteur de la vitellogénine [214]. Ces résultats sont compatibles avec le recrutement de coactivateurs à activité HAT par les récepteurs des œstrogènes.

Des effets des HDACi à un autre niveau de la voie de signalisation des œstrogènes ont été également décrits. Kawai *et al.* ont démontré que la surexpression stable de HDAC1 dans les cellules MCF7 entraîne la perte de l'expression d'ER α ; celle-ci est rétablie par un traitement avec TSA [215]. Rappelons que si la réexpression d'ER α en présence de TSA dans les cellules ER- MDA-MB-231 a été rapportée [210], une autre étude démontre que seul ER β y est induit sous ce même traitement [216]. De plus l'acide valproïque induit l'expression d'ER α dans les cellules Ishikawa (endométriales) et dans les cellules MCF7 [217]. En revanche, d'autres équipes ont rapporté une inhibition de l'expression d'ER α par les HDACi dans les cellules cancéreuses ER+ [218] [219, 220].

Enfin Fu *et al.* ont démontré qu'ER α est acétylé par p300 au niveau de deux lysines dans la région D, augmentant sa sensibilité à E2 et sa transactivation [221].

En raison des effets complexes des HDACi sur la transcription induite par ER α , nous avons entrepris de vérifier l'effet de TSA et NaBu sur la transcription médiée par ER dans les cellules Ishikawa transfectées de manière stable avec un vecteur rapporteur épisomal ERE3-EBV-CAT. Celui-ci présente l'avantage de contenir un promoteur minimal fort, à savoir trois ERE et une boîte TATA, limitant ainsi les interférences dues à la présence de sites de liaison pour d'autres facteurs de

transcription, cibles potentiels des HDACi et permettant d'obtenir une image globale de l'effet des HDACi sur la régulation transcriptionnelle par les œstrogènes. De plus, l'avantage d'un vecteur épisomal est de permettre l'assemblage de la chromatine de manière dépendante de la réplication de l'ADN, en absence d'effets clonaux provenant de l'intégration à des sites spécifiques dans le génome.

5.2. DEUXIEME PARTIE : STRIATIN, UN COFACTEUR DE ER α DANS LES VOIES NON GÉNOMIQUES DE L'ŒSTRADIOL

Les récepteurs nucléaires ne comptent pas moins de cent cinquante cofacteurs à ce jour. Dans le but de comprendre la régulation de l'expression génique modulée par ER α , nous avons donc entrepris de mettre en évidence de nouveaux cofacteurs. Si bon nombres d'études similaires ont été réalisées avec succès par une approche double hybride, nous avons utilisé une méthode de «gst-pulldown» en prenant la région EF de ER α , qui contient le LBD et AF2, impliquée dans le recrutement des coactivateurs. Le gst-pulldown a permis une rétention des protéines interagissant spécifiquement avec EF en présence d'hormone. Nous avons isolé et séquencée une protéine de 110 kDa, Striatin qui présente les caractéristiques d'une protéine d'échafaudage.

RESULTATS

**ARTICLE 1: OPPOSITE EFFECTS OF HDAC INHIBITORS ON GLUCOCORTICOID
AND ESTROGEN SIGNALING IN HUMAN ENDOMETRIAL ISHIKAWA CELLS**

Publié dans *Molecular Pharmacology*: 68(6):1852-62 (2005)

Opposite effects of HDAC inhibitors on glucocorticoid and estrogen signaling in human endometrial Ishikawa cells

Walter Rocha, Rocio Sanchez, Julie Deschênes, Anick Auger, Elise Hébert, John H. White and Sylvie Mader

Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal QC H3C 3J7 (W.R., R.S., J.D., A.A., E.H., S.M.), Institute of Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal QC H3C 3J7 (W.R., J.D., E.H., S.M.), Montreal Center for Experimental Therapeutics in Cancer, Jewish General Hospital, Montreal QC H3T 1E2 (W.R., J.D., E.H., J.H.W., S.M.), Department of Physiology, McGill University, Montréal QC H3J 1Y6 (J.H.W.), Department of Medicine, McGill University, Montréal QC H3J 1Y6 (J.H.W., S.M.).

Running title. Effects of HDAC inhibitors on steroid receptor signaling.

Corresponding author : Sylvie Mader, Département de Biochimie, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

Tel: 514 343 6111 ext 15173; **Fax:** 514 343 2210; **email:**

████████████████████

Number of text pages, 31;

number of tables, 0;

number of figures, 8;

number of references, 40;

number of words in Abstract, 209

number of words in Introduction, 750

number of words in Discussion, 1498.

ABBREVIATIONS

CAT, chloramphenicol acetyltransferase; ChIP, chromatin immunoprecipitation; ERE, estrogen response element; GRE, glucocorticoid response element; HAT, histone acetyltransferase; HDACi, histone deacetylase inhibitor; MMTV, mouse mammary tumor virus.

ABSTRACT

Histone deacetylase inhibitors (HDACi), which have emerged as a new class of anticancer agents, act by modulating expression of genes controlling apoptosis or cell proliferation. Here, we compared the effect of HDACi on transcriptional activation by estrogen (ER) or glucocorticoid (GR) receptors, two members of the steroid receptor family with cell growth regulatory properties. Like other transcription factors, steroid receptors modulate histone acetylation on target promoters. Using episomal reporter vectors containing minimal promoters to avoid promoter-specific effects, we observed that long-term (24 h) incubation with HDACi strongly stimulated GR-dependent, but markedly repressed ER-dependent signaling in ER+/GR+ human endometrial carcinoma Ishikawa cells. These effects were reproduced on endogenous target genes, and required incubation periods with HDACi substantially longer than necessary to increase global histone acetylation. Repression of estrogen signaling was due to direct inhibition of transcription from multiple ER α promoters and correlated with decreased histone acetylation of these promoters. On the other hand, the strong HDACi stimulation of GR-dependent gene regulation was not accounted for by increased GR expression, but was mimicked by overexpression of the histone acetyltransferase (HAT) complex component TIF2. Taken together, our results demonstrate striking and opposite effects of HDACi on ER and GR signaling which involve regulatory events independent of histone hyperacetylation on receptor target promoters.

INTRODUCTION

Incorporation of DNA into chromatin plays a major role in regulating gene expression. Decondensed chromatin (euchromatin) is associated with transcriptional activity, whereas condensed heterochromatin is transcriptionally inactive. N-terminal tails of histones, which are subject to several post-translational modifications (Jenuwein and Allis, 2001), play an important role in regulation of chromatin structure. Positively charged histone tails of nucleosomes interact with DNA, other histones and chromatin components. Acetylation of lysines by histone acetyltransferases (HATs) neutralizes their positive charges, destabilizes nucleosomes, and can enhance or block other types of modifications, resulting in differential binding of many different chromatin proteins (Jenuwein and Allis, 2001).

Transcriptional activators recruit cofactors including HATs. For example, nuclear receptors exhibit hormone-dependent recruitment of HAT complexes composed of p160 (SRC-1/TIF2/AIB1), CBP/p300 and pCAF families of coactivators (Rosenfeld and Glass, 2001). Histone acetylation is remarkably dynamic on hormone-regulated promoters, as recruitment of HAT complexes alternates with that of histone deacetylases (HDACs) on the estrogen target promoter pS2 (Metivier et al., 2003). Nuclear receptor corepressors such as N-CoR and SMRT (Rosenfeld and Glass, 2001) or NRIP1/RIP140 and LCoR (White et al., 2004) recruit HDACs in the absence or presence of hormone, respectively. In addition, HATs and probably also HDACs are active with non-histone protein substrates, including E2F, pRb and p53 (McLaughlin and La Thangue, 2004).

HDACi have emerged as a new class of anticancer agents for treatment of both solid and hematological tumors (McLaughlin and La Thangue, 2004). The

naturally occurring anti-fungal antibiotic trichostatin A has been invaluable in validating HDACs as potential anti-cancer targets. Structurally-related inhibitors, including SAHA, PXD101 and LAQ-824, are currently in clinical trials (Kelly et al., 2003). Aliphatic acids valproate and butyrate function as less potent HDACi (McLaughlin and La Thangue, 2004). HDACi induce apoptosis or differentiation depending on the cell type (McLaughlin et al., 2003), and, notably, block proliferation of breast, endometrial, and ovarian cancer cells (Munster et al., 2001; Strait et al., 2002; Takai et al., 2004). Different HDACi alter transcription of a common set of genes that control pathways important for cell survival and proliferation (Glaser et al., 2003; Peart et al., 2005). Notably, both enhancement and repression of gene expression were observed in these studies, suggesting more complex mechanisms of action than enhancement of histone acetylation.

HDACi influence steroid receptor gene regulation in a cell-, promoter- and receptor- dependent manner. HDACi prevented activation of transiently transfected, episomal or chromosomal MMTV promoters by glucocorticoids (Kinyamu and Archer, 2004; Mulholland et al., 2003). While sodium butyrate inhibited glucocorticoid induction of the tyrosine aminotransferase gene in rat HTC cells (Plesko et al., 1983), it enhanced glucocorticoid induction of alkaline phosphatase in HeLa S3 cells (Littlefield and Cidlowski, 1984). Finally, trichostatin A induced estrogen-dependent transcription in MCF-7 cells (Ruh et al., 1999) and in stably transfected HepG2 cells (Mao and Shapiro, 2000).

Some of the effects of HDACi on estrogen target genes appear mediated by modulation of estrogen receptor (ER) expression. Inhibition of ER α expression by

HDAC1 in MCF-7 breast cancer cells was reversed by trichostatin A (Kawai et al., 2003). Trichostatin A induced ER α expression in ER-negative breast cancer cells (e.g. Yang et al., 2001), whereas another study found that trichostatin A induced ER β , but not ER α expression in MDA-MB-231 cells (Jang et al., 2004). Finally, valproic acid induced ER α expression in endometrial carcinoma Ishikawa and in MCF-7 cells (Graziani et al., 2003). Conversely, others reported inhibition of ER α expression by HDACi, which may explain the increased sensitivity of ER+ breast cancer cell lines to HDACi (Alao et al., 2004; Margueron et al., 2004b; Reid et al., 2005). Finally, HDACi may induce hyperacetylation of nuclear receptors by associated HAT complexes, altering their function. Indeed, acetylation of ER α modulated sensitivity to hormone (Fu et al., 2004).

Variations in cell lines and/or target promoters, which can be regulated by steroid receptors through different mechanisms (Sanchez et al., 2002), probably account for the variability in the reported effects of HDACi on steroid-mediated transcription. Here we compared the effects of HDACi on ER α and GR-dependent transcription on reporter vectors containing minimal estrogen or glucocorticoid-responsive promoters propagated as episomes in human endometrial carcinoma Ishikawa cells, which express both receptors. Using this system, modulation by HDACi of receptor-dependent transcription can be monitored in the absence of a confounding influence of other transcription factors or of variable sites of chromosomal integration. Our results indicate striking and opposite effects of HDACi on estrogen and glucocorticoid signaling, leading us to explore the

mechanisms underlying this differential regulation of two closely related steroid receptors in Ishikawa cells.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids and reagents

17 β -estradiol (E2), 4-hydroxytamoxifen (OHT), dexamethasone (Dex), sodium butyrate (SB), cycloheximide (CHX), anisomycin, (Aniso), puromycin (Puro) and actinomycin D (Act. D) were purchased from Sigma (Oakville, ON, Canada), ICI182,780 (ICI) was purchased from Tocris Cookson Ltd (Ballwin, MO, USA), and trichostatin A was procured from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan). pSG5-hER α and pSG5-TIF2.1 were kind gifts from Prof. Pierre Chambon. pCDNA3.1-ER α and pCDNA3.1-ER α (K302A/K303A) were constructed as follows. cDNAs for the wt ER α cDNA and the ER α (K302A/K303A) mutant were released from pSG5-hER α and pCI-*neo*-ER α (K302A/K303A) (a kind gift from Dr. Richard G. Pestell), respectively, by *Eco*RI digest (MBI Fermentas, Burlington, ON, Canada) and ligated into the *Eco*RI site of pCDNA3.1 (Invitrogen Burlington, ON, Canada). Reporter vectors GRE5-TATA-CAT/EBV, ERE3-TATA-CAT/EBV and ERE3-TATA-LUC have been previously described (Barsalou et al., 2002; Fernandes et al., 2003).

Cell lines and reporter assays

MCF-7 breast carcinoma and endometrial carcinoma Ishikawa cells were maintained in α MEM (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% and 5% fetal bovine serum, respectively (Sigma, Oakville, ON, Canada) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). Stable reporter cell lines Ishikawa-GRE5/EBV and Ishikawa-ERE3/EBV (Barsalou et al., 2002)

were maintained in the same medium as the parental cells supplemented with hygromycin B (50 µg/ml).

Three days before experiments, Ishikawa cells were switched to phenol red-free DMEM medium containing 5% charcoal-stripped serum, 1% sodium pyruvate (Wisent, St-Bruno, QC, Canada), 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine (Wisent, Canada). For CAT assays, cells were stimulated 24 h after seeding with 17-β estradiol (E2, 25 nM) or dexamethasone (Dex, 25 nM), and either trichostatin A (300 nM), sodium butyrate (5 mM) or vehicle (ethanol) for another 24 h. Whole cell extracts were prepared in 0.25 M Tris-HCl, pH 7.5 by three cycles of freeze-thawing and were standardized for protein amount. CAT assays were performed as described previously (Barsalou et al., 2002). Each assay included triplicates for each condition and was repeated at least three times. A typical experiment is shown.

For luciferase assays, Ishikawa cells were transfected with the calcium-phosphate method (Barsalou et al., 2002) in 6 well plates (2×10^6 cells/well). Typically, a DNA mix contained 150 ng expression vector, 350 ng ERE3-TATA-Luc reporter vector, 2 µg of pBluescript as carrier; after 24 h, cells were washed with fresh medium and stimulated for another 24 h with 17-β estradiol (E2, 25 nM), and/or trichostatin A (300 nM) or vehicle (ethanol). Cells were washed two times with PBS 1X and harvested in lysis buffer (Tris-HCl 100 mM pH 7.9, 0.5% NP40, 1 mM DTT). Luciferase activity was measured in the presence of luciferin with a Fusion Universal Microplate Analyser (Perkin-Elmer, Canada). Each transfection was carried out in triplicate and repeated at least three times. Proteins were quantified by BioRad reagent (BioRad, Mississauga, ON, Canada).

Alkaline phosphatase assays

Alkaline phosphatase assay were conducted as described before (Barsalou et al., 2002). Treatments were performed in triplicates for 24 h, after which cells were washed in PBS twice, frozen at -80°C for 15 min, and incubated with 50 μl reaction buffer (p-nitrophenyl phosphate, 5 mM; MgCl_2 , 0.24 mM; diethanolamine pH 9.8, 1M). Plates were incubated at room temperature until production of a yellow color, and levels of p-nitrophenyl were quantified by measuring absorption at 410 nm.

RNA extraction and RT-PCR assays

Ishikawa cells were seeded in 6 well plates (2.5×10^5 cells per well) and treated with trichostatin A (300 nM) or sodium butyrate (5 mM), with or without estradiol (E2, 25 nM) or dexamethasone (Dex, 25 nM) for different times (as indicated in the text). For treatments with actinomycin D (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), cycloheximide (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), anisomycin (5 μM) or puromycin (5 μM), incubation was initiated 1 h before HDACi addition and continued for 6 h thereafter. The medium was then removed and total RNA extracted in 1 mL TRIZOL reagent (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and quantified by U.V. absorption. RNAs (2 μg) were reverse transcribed using the RevertAid H first minus strand cDNA synthesis kit (MBI Fermentas, Burlington, ON, Canada) as recommended by the manufacturer. Sequences of oligonucleotides used for PCR amplification are available upon request. Primers used for alternative ER α 5' exons were designed according to published GenBank references (Kos et al., 2001). PCR was performed using TAQ

polymerase (MBI Fermentas, Burlington, ON, Canada). Amplified cDNA fragments were resolved on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. Each assay was reproduced at least 3 times. A typical experiment is shown.

Western analysis

Ishikawa cells were treated with estradiol (E2, 25 nM), OHT (100 nM), ICI182,780 (100 nM), or vehicle for 24 h with or without HDACi (trichostatin A 300 nM or sodium butyrate 5 mM). Cells were harvested in ice-cold PBS, and whole cell extracts were prepared by three freeze-thaw cycles in high salt buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.1 mM EDTA, pH 8.0; 400 mM NaCl; 10% glycerol; 1 mM dithiothreitol; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; and protease inhibitors). After electrophoresis on a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel (7.5% acrylamide), proteins were transferred onto PVDF membranes (Hybond P, Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada). Blots were incubated with anti-ER α mouse monoclonal or anti-TIF2 mouse monoclonal antibodies (B10 and 3Ti-3F1, respectively, both kind gifts from Prof. P. Chambon), anti-GR rabbit polyclonal antibody (PA1-511, ABR, Canada), anti-acetylated-H3, anti-acetylated-H4 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York, USA) or anti- β -actin mouse monoclonal antibody (Sigma, Oakville, ON, Canada). Immunodetection was performed using ECL (NEN Life Science Products) as recommended by the manufacturer. Each result was reproduced at least 3 times. A typical experiment is shown.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays

Ishikawa cells were treated with 1.5% formaldehyde for 10 min at room temperature and fragmented by sonication as previously reported (Bourdeau et al., 2004), yielding fragments of approximately 350 bp average size. Antibodies against acetylated H3 and acetylated H4 were purchased from Upstate Biotechnology. The sequences of the primers used in ChIP assays are available upon request. ChIP experiments were performed twice with similar results. A representative set of results is shown.

RESULTS

To investigate the effect of HDACi on steroid receptor-mediated transcription, we used stably transfected Ishikawa cell lines carrying Epstein Barr virus episomal reporter vectors sensitive to either glucocorticoids or estrogens. The reporter vectors contain a CAT reporter gene under control of minimal promoters composed of a TATA box placed downstream of either 5 glucocorticoid response elements (GRE5-TATA-CAT/EBV; Mader and White, 1993) or 3 estrogen response elements (ERE3-TATA-CAT/EBV; Barsalou et al., 2002). The use of minimal promoters and the absence of integration into the host cell chromosomes enables monitoring the effects of HDACi on transcriptional activation by GR or ER without confounding cooperative effects of transcription factors. Surprisingly, in contrast to the reported repressive effects of HDACi on glucocorticoid stimulation of the MMTV promoter (Kinyamu and Archer, 2004; Mulholland et al., 2003; and refs. therein), a marked and dose-dependent increase in the GRE5-TATA reporter activity was observed with increasing concentrations of the HDACi sodium butyrate (SB, 0.5-5 mM) in the presence of dexamethasone (Dex, 25 nM), but not in its absence, in the Ishikawa-GRE5/EBV cell line. The maximal stimulation by sodium butyrate, obtained at the highest concentration tested, was ~10-fold (Fig. 1A).

The effects of sodium butyrate on reporter expression from Ishikawa-ERE3/EBV cells were opposite to those observed from GRE5/EBV, in that a dose-dependent decrease in reporter activity in the presence of estradiol (E2, 25 nM), reaching more than 4-fold repression at 5 mM (Fig.1B). The differential effects observed here with the two reporter cell lines suggest that sodium butyrate has a differential functional impact on estrogen and glucocorticoid signaling pathways

rather than a general effect on global transcription, or on the stability of the CAT enzyme.

To verify that the effects of sodium butyrate on both signaling pathways are related to its HDAC inhibitory properties, we incubated the two reporter cell populations with trichostatin A, a structurally-unrelated HDACi. Similar to results described above, glucocorticoid-stimulated reporter gene expression was markedly enhanced by increasing concentrations of trichostatin A (Fig. 1C), and estrogen-induced expression was repressed at the highest dose assayed (300 nM, Fig. 1D). Note that the apparent increase in E2-regulated expression at lower trichostatin A concentrations was not statistically significant. The comparable actions of sodium butyrate and trichostatin A on estrogen- and glucocorticoid-driven reporter gene expression suggest that they are acting through a common mechanism, i.e. the inhibition of one or several of the HDACs expressed in Ishikawa cells (HDACs 1-10, see Fig. 2A).

To confirm that HDACi treatment increases global histone acetylation in the two episomal cell populations, we performed Western analysis of Ishikawa cell nuclear extracts using antibodies specific for acetylated H3 and H4 (Fig. 2B). Marked increases in acetylation were observed in both cell populations at 1 h after treatment using 300 nM trichostatin A (Fig. 2B). Furthermore, experiments using extracts from cells harvested at different times after trichostatin A treatment indicate that elevated histone acetylation was detectable for at least 16 h after incubation with 300 nM trichostatin A, but was much more transient after treatment with a 30 nM dose (Fig. 2C). The high levels of trichostatin A necessary to obtain maximum alteration of dexamethasone- and estradiol-mediated expression at 24 h (Fig. 1)

suggest that prolonged exposure to trichostatin A is necessary to induce the observed changes in gene expression.

Time course experiments of treatment with dexamethasone or estradiol indicate that increases in levels of the CAT enzyme were gradual, being detectable at 6-8 h and rising through 24 h (Fig. 3A-B). Trichostatin A (300 nM) had little effect at 8 h on reporter gene expression, while its effects became pronounced at 24h. Trichostatin A only affected minimally dexamethasone- or estradiol-dependent expression if added during the last 8 h of a 24 h exposure to either hormone (Fig. 3C-D). Finally, addition of an 18 h pretreatment with trichostatin A prior to treatment with dexamethasone and trichostatin A boosted the stimulatory effect of trichostatin A on GR-dependent expression (from 20 to 30-fold, Fig. 3E) and its repressive effect on ER-dependent expression (from 2.5 fold to 10-fold, Fig. 3F). Taken together, these results indicate that the effects of trichostatin A on steroid-induced expression from our minimal promoters require higher concentrations and are much slower than its effects on global histone acetylation levels.

To verify that HDACi have global effects on ER- and GR-mediated pathways as suggested by experiments using minimal reporter vectors, we examined the effect of HDACi on expression of endogenous estrogen and glucocorticoid target genes. The ALPPL2 alkaline phosphatase gene is strongly induced by estrogen at the transcriptional level in Ishikawa cells, and to a lesser extent by the partial antiestrogen 4-hydroxytamoxifen (OHT), but not by the full antiestrogen ICI182,780 (Fig. 4A). Alkaline phosphatase activity is also markedly induced by estrogen at 24 h (Fig. 4B), whereas induction by 4-hydroxytamoxifen is detectable only at later times. Treatment with trichostatin A had a slight stimulatory effect on basal levels of

ALPPL2 activity, an effect that was independent of ER function as it was not repressed by treatment with the full antiestrogen ICI182,780. However, the stimulatory effects of estrogen on transcription of ALPPL2 (Fig. 4A, arrows) and on alkaline phosphatase activity (Fig. 4B) were both lost upon HDACi treatment. The weak stimulation of alkaline phosphatase activity by 4-hydroxytamoxifen in the presence of trichostatin A, although consistently observed in three experiments, was not statistically significant in a Student's t test analysis.

The human tyrosine aminotransferase (TAT) gene is a strongly-induced glucocorticoid target gene in fetal liver (Nagao et al., 1987). Dexamethasone treatment was found to stimulate the expression of TAT transcripts in Ishikawa cells (Fig. 4C). Trichostatin A treatment alone did not affect TAT expression, but co-treatment with dexamethasone and trichostatin A markedly augmented the effect of dexamethasone alone. Thus, the effects of HDACi on expression of endogenous estrogen and glucocorticoid target genes in parental Ishikawa cells were similar to those observed with our reporter cell lines, supporting the notion that components essential to ER and GR signaling are regulated by HDACi, with opposite effects on the activities of these two pathways.

HDACi could potentially affect the ER signaling pathway at several levels. Since the delayed kinetics of HDACi effects on ER-dependent transcription are compatible with modulation of receptor expression, we assessed mRNA levels of ER α and ER β in Ishikawa cells treated with sodium butyrate or trichostatin A. While no significant effects were observed on ER β expression (data not shown), ER α expression was strongly repressed by sodium butyrate (5 mM), and by trichostatin A

(300 nM) at 16 h irrespective of ligand treatment (Fig. 5A). At 24 h, receptor levels were returned to near-untreated levels in the presence of trichostatin A, but not of sodium butyrate (Fig. 5A), consistent with the stronger repression of estrogen reporter gene expression observed with sodium butyrate (see Fig. 1). Accordingly, sodium butyrate also repressed ER α protein levels to a greater extent than trichostatin A over a 24 h treatment period (Fig. 5B).

If inhibition of ER α expression by HDACi is the main basis for their repressive effects on ER target genes, then expression of exogenous ER α should reverse this repression. Indeed, while estradiol-induced expression from a transfected ERE-TATA-Luc reporter vector was repressed by trichostatin A in Ishikawa cells, co-transfection of the pCDNA3.1-ER α expression vector led to a marked synergism between trichostatin A and estradiol for reporter gene expression (Fig. 5C). This synergism was in part due to a stimulatory effect of trichostatin A on ER α expression from the pCDNA3.1 vector (Fig. 5D), and was colinear with the concentration of exogenous expression vector co-transfected (data not shown). Finally, similar results were obtained when an expression vector for ER α (K302A/K303A) was cotransfected instead of the vector expressing wild-type ER α . K302 and K303 are tandem lysine residues that are acetylated by p300 (Wang et al., 2001). This suggests that acetylation of the receptor does not play a major role in the effects of HDACi under our experimental conditions (Fig. 5C-D). Effects of HDACi on exogenous ER α expression are likely due to a stimulation of the CMV promoter of the expression vector, as expression from a CMV- β Gal reporter vector was also markedly stimulated (data not shown).

Expression of ER α is driven from several promoters that function in a tissue-specific manner (Kos et al., 2001). In Ishikawa cells, we detected ER α transcripts expressed from promoters A, B, and C (Fig. 6A). Expression from promoter F was detectable only in MCF-7 cells (Fig. 6A). In Ishikawa cells, levels of transcripts originating from promoters A, B, and C were reduced by trichostatin A or sodium butyrate, while expression of GAPDH was not affected (Fig. 6B). In MCF7 cells, trichostatin A also reduced levels of transcripts originating from promoters A, B, F, and to a lower extent C, while expression of GAPDH was not affected (Fig. 6C). Western blot analysis confirmed that both the 66 kDa form of ER α , originating from promoters A, B, and C, and the 46 kDa form originating from promoter F were less abundant in MCF7 after treatment with trichostatin A (Fig. 6D).

Trichostatin A could exert its effects through regulation of transcript stability by a mechanism involving regulatory sequences common to all repressed RNA isoforms. Therefore, we assessed whether repression by HDACi would be observed in the presence of the transcriptional inhibitor actinomycin D (Act-D). While, as expected, basal ER α transcript levels were repressed by actinomycin D treatment at 6 h, no further repression by sodium butyrate was observed (Fig. 6E). This suggests that HDACi repress transcription from the ER α promoters rather than mRNA stability. We then investigated the levels of acetylated histones H3 and H4 on ER α promoters A, B, and C in Ishikawa cells in the presence or absence of HDACi. Treatment with trichostatin A for 6 h led to a reduction in the levels of acetylated H3 or H4 associated with these promoters (Fig. 6F), in spite of the large increase in overall acetylated histone levels in the cell at this time (Fig. 2C). These results

suggest that these promoters are in a transcriptionally less active state in the presence of HDACi. Finally, we investigated whether the transcriptional repression of ER α by HDACi is independent of protein synthesis. The repressive effects of trichostatin A on promoters A, B, and C were maintained, although attenuated, in the presence of protein synthesis inhibitors cycloheximide (10 μ g/ml), anisomycin (5 μ M) or puromycin (5 μ M), indicating that *de novo* protein synthesis was not required for at least part of the repressive effect (Fig. 6G). Similarly, repression by sodium butyrate was also still observed in the presence of cycloheximide (data not shown).

We then examined whether sodium butyrate or trichostatin A increased endogenous GR mRNA levels in Ishikawa cells, which would provide a mechanism for the observed stimulation of GR-dependent expression. Trichostatin A did not alter GR mRNA expression at 8 or 24 h (Fig. 7A) or GR protein levels at 1, 8 or 24 h (Fig. 7B). Treatment with sodium butyrate also did not change GR mRNA or protein levels at 24 h (data not shown). To test whether the effects of HDACi on glucocorticoid signaling can be mimicked by increased HAT activity, we transiently transfected a truncated form of the p160 coactivator TIF2/SRC2, TIF2.1, which contains the receptor interaction domain and activation domains (Voegel et al., 1998). TIF2.1 increased GR-dependent expression by 10-fold, but attenuated the effects of HDAC inhibitors from ~10- to ~2-fold (Fig. 8). Thus, increased expression of TIF2.1, which can recruit HAT activities such as CBP/p300 and PCAF, has the same effect as global suppression of HDAC activity. This suggests that a substrate common to the type I/II HDACs expressed in Ishikawa cells and to the HAT activities in the p160-CBP/p300-PCAF complex stimulates GR signaling in these cells in an acetylation-dependent manner.

DISCUSSION

In this study we have used minimal reporter vectors to assess the overall effects of HDACi on two steroid receptor genomic pathways. Estrogen and glucocorticoid receptors are closely related and share similar functional properties, but have distinct DNA binding specificities. Synthetic promoters composed of their respective binding sites inserted upstream of a TATA box thus allow easy monitoring of the activity of the corresponding signaling pathways, with minimal influence from other transcription factors. Our reporter vectors are propagated as episomes, which are stably maintained at moderate copy number in the form of chromatin, circumventing variations in promoter activity due to different sites of chromosomal integration (Mader and White, 1993). As both receptors recruit coactivators with HAT activity in order to remodel chromatin at target promoters, it might be expected that HDACi treatment would enhance both ER- and GR-mediated transcription. Acetylation of steroid receptors themselves has also been shown to occur in a dynamic manner and may impact their transcriptional activation properties (Fu et al., 2004).

Remarkably, our results indicate that HDACi had opposite effects on estrogen and glucocorticoid genomic signaling in Ishikawa cells. Effects on endogenous target genes were similar to those obtained with our reporter vectors. Dose-dependent stimulation of glucocorticoid signaling by HDACi was unexpected because studies of integrated or episomal MMTV reporter vectors in different cell lines have reported repressive effects of HDACi on glucocorticoid-mediated transcription at the concentrations used in this study. Also unexpected was the requirement for high doses of HDACi and long incubation periods in order to observe these effects. Both

factors are in fact intricately linked, since our observations indicate that trichostatin A has a relatively transient effect on histone acetylation in Ishikawa cells, which can be prolonged by use of higher doses of this inhibitor. These requirements suggest that the observed effects of HDACi may involve long-term effects on components of the receptor signaling pathways rather than immediate modulation of target promoter histone acetylation.

Modulatory effects of HDAC inhibitors on ER expression have been described in the literature, although with variable end results. While ER α expression was found to be repressed in breast cancer cells in several studies (e.g. Alao et al., 2004; Margueron et al., 2004a; Reid et al., 2005), induction of ER α expression has also been reported in breast cancer cells by HDACi (e.g. Keen et al., 2003; Yang et al., 2001), and in Ishikawa cells by the HDACi valproate (Graziani et al., 2003). Induction of ER β by trichostatin A was also observed in MDA-MB-231 cells (Jang et al., 2004). We did not observe significant effects on ER β expression in Ishikawa cells, but detected a strong reduction in ER α transcription. It is unclear whether the difference between these repressive effects of trichostatin A or butyrate and the previously reported induction of ER α by valproate in Ishikawa cells results from use of different HDACi or different isolates of the Ishikawa cell line. Note however that valproate stimulated growth of Ishikawa cells (Graziani et al., 2003), whereas sodium butyrate and trichostatin A inhibit proliferation under our experimental conditions (data not shown). Further analysis confirmed that reduction in ER α mRNA levels requires transcription, i.e. that mRNA destabilization by HDACi is not involved. Several alternative promoters control ER α expression in Ishikawa and in

MCF7 cells. The various transcript isoforms encode the same 66 kDa protein except for transcripts originating from promoter F. In MCF7 cells, 10% of these transcripts give rise through alternative splicing to a truncated 46 kDa form (Kos et al., 2001).

Interestingly, repression of transcripts originating from all active promoters was observed both in Ishikawa and in MCF7 cell types. Note that promoter F is located ~115 kb upstream of promoter C, indicating either long-range or multiple sites of transcriptional shut-off. It is unlikely that induced expression of a repressor is involved, as the effects of HDACi were also observed in the presence of three different protein synthesis inhibitors. Our results differ in this respect from those of Reid et al. (Reid et al., 2005), who reported that the repressive effects of valproate or trichostatin A on ER α expression in MCF7 cells are abolished by cycloheximide, but compatible with the lack of effect of cycloheximide on repression of ER α expression observed with trichostatin A by Alao et al. (Alao et al., 2004). Potential mechanisms may be activation of a transcriptional repressor or loss/repression of a transcriptional activator by acetylation, both being compatible with the observed decrease in histone acetylation on the repressed promoters. Of note, Reid et al. (Reid et al., 2005) reported recruitment of the methyl binding protein MeCP2 on the ER α A promoter in the presence of valproate, suggesting induction of promoter methylation by this HDACi, an event often associated with decreased histone acetylation.

The strong dose-dependent stimulatory effects of HDACi on GRE5-TATA-CAT and endogenous TAT gene expression differs markedly from previously reported results demonstrating down-regulation of the stimulatory effect of glucocorticoids on the MMTV promoter in various cell types (Kinyamu and Archer,

2004; Mulholland et al., 2003) and references therein) or on the TAT gene in rat hepatoma cells (Plesko et al., 1983). Our results are on the other hand compatible with earlier observations that sodium butyrate enhances dexamethasone responsiveness of the alkaline phosphatase gene in HeLa S3 cells (Littlefield and Cidlowski, 1984). Although the long time course of induction of glucocorticoid reporter vectors in Ishikawa cells may suggest indirect effects mediated by the altered expression of a component of the glucocorticoid signaling pathway, our assays for GR mRNA and protein levels are not consistent with an induction in GR expression. Interestingly, transient expression of the p160 coactivator derivative TIF2.1, which is highly expressed and contain all domains of TIF2 required for coactivation of nuclear receptors (Voegel et al., 1998), mimicked the effect of HDACi. TIF2, like other p160 members, is a component of HAT complexes containing cofactors CBP/p300 and PCAF (Rosenfeld and Glass, 2001). While overexpression of a HAT coactivator is thus a plausible hypothesis, no increases in the mRNA levels of the HAT coactivators of steroid receptors were detected by RT-PCR in the presence of HDACi (data not shown). It remains possible that expression of a HAT coactivator may be affected at the post-transcriptional level, or alternatively that HAT/HDAC activities may affect the expression of a common substrate that plays an important role in glucocorticoid signaling.

We have also considered two other potential mechanisms by which HDACi could synergize with glucocorticoids for GR-mediated transcription. Decreased expression/activity of an enzyme involved in degradation of glucocorticoids might in theory explain the observed effects of HDACi on increased GR activity, but this is unlikely to be the case under in our experimental system as dose-response curves of

dexamethasone stimulation at 24h did not reveal a shift in the exogenous hormone concentrations required for the response (data not shown). In addition, RT-PCR amplification of the 11β -HSD type II enzyme, which is responsible for limiting the antiproliferating activity of glucocorticoids in breast cancer cells (Lipka et al., 2004) did not reveal differences in expression in the absence or presence of HDACi (data not shown). Another potential mechanism may be effects of HDACi on the cell cycle, as most HDACi induce a block at the G1/S transition in different cell lines. The GR has been reported to have differential transcription activity in G1 and S phases (permissive) and in G2/M phases (non permissive) (Hsu and DeFranco, 1995; King and Cidlowski, 1998). Long-term (3 days) effects of sodium butyrate on GR activation of the alkaline phosphatase gene in HeLa S3 cells was attributed to synchronization of the cells in the permissive G1 phase (Littlefield and Cidlowski, 1984). Note however that a recent study reported that treatment with 300 nM trichostatin A for three days is accompanied by a decrease in the proportion of cells in both the G0/G1 and S phases, and an increase in cells in G2/M (Takai et al., 2004). Thus, effects on the cell cycle appear unlikely to explain the synergism observed in Ishikawa cells between glucocorticoids and HDACi at the level of GR transcription.

While additional experiments will be needed to further pinpoint the exact mechanisms of action of HDACi in Ishikawa cells, including an assessment of whether distinct subsets of the HDACs expressed in Ishikawa cells are involved in the effects of HDACis on estrogen or glucocorticoid signaling, it is of interest that signaling pathways involving different nuclear receptors can be modulated differentially by HDACi, whose use in cancer treatment appears promising.

Inhibition of ER α expression would be of benefit in the treatment of ER α positive breast tumors if it entails repression of growth-stimulatory ER α target genes, although the reversible character of this inhibition may require repeated administration of high doses of HDACis. In addition, glucocorticoid receptors have been reported to have growth inhibitory properties in several hematological and solid tumor cells, including in Ishikawa cells (King and Cidlowski, 1998). It will be of interest in the future to assess whether HDACi also have a stimulatory effect on the glucocorticoid target genes that mediate these antiproliferative activities.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Drs Pierre Chambon and Richard Pestell for kind gifts of reagents.

REFERENCES

- Alao JP, Lam EW, Ali S, Buluwela L, Bordogna W, Lockey P, Varshochi R, Stavropoulou AV, Coombes RC and Vigushin DM (2004) Histone deacetylase inhibitor trichostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation of cyclin D1 in human breast carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* **10**:8094-104.
- Barsalou A, Dayan G, Anghel SI, Alaoui-Jamali M, Van de Velde P and Mader S (2002) Growth-stimulatory and transcriptional activation properties of raloxifene in human endometrial Ishikawa cells. *Mol Cell Endocrinol* **190**:65-73.
- Bourdeau V, Deschenes J, Metivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, Gannon F, White JH and Mader S (2004) Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol* **18**:1411-27.
- Fernandes I, Bastien Y, Wai T, Nygard K, Lin R, Cormier O, Lee HS, Eng F, Bertos NR, Pelletier N, Mader S, Han VK, Yang XJ and White JH (2003) Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell* **11**:139-50.
- Fu M, Wang C, Zhang X and Pestell RG (2004) Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol* **68**:199-208.
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG and Davidsen SK (2003) Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* **2**:151-63.
- Graziani G, Tentori L, Portarena I, Vergati M and Navarra P (2003) Valproic acid increases the stimulatory effect of estrogens on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells. *Endocrinology* **144**:2822-8.
- Hsu SC and DeFranco DB (1995) Selectivity of cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem* **270**:3359-64.

- Jang ER, Lim SJ, Lee ES, Jeong G, Kim TY, Bang YJ and Lee JS (2004) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor alpha-negative breast cancer cells to tamoxifen. *Oncogene* **23**:1724-36.
- Jenuwein T and Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**:1074-80.
- Kawai H, Li H, Avraham S, Jiang S and Avraham HK (2003) Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha. *Int J Cancer* **107**:353-8.
- Keen JC, Yan L, Mack KM, Pettit C, Smith D, Sharma D and Davidson NE (2003) A novel histone deacetylase inhibitor, scriptaid, enhances expression of functional estrogen receptor alpha (ER) in ER negative human breast cancer cells in combination with 5-aza 2'-deoxycytidine. *Breast Cancer Res Treat* **81**:177-86.
- Kelly WK, Richon VM, O'Connor O, Curley T, MacGregor-Curtelli B, Tong W, Klang M, Schwartz L, Richardson S, Rosa E, Drobnjak M, Cordon-Cordo C, Chiao JH, Rifkind R, Marks PA and Scher H (2003) Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin Cancer Res* **9**:3578-88.
- King KL and Cidlowski JA (1998) Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* **60**:601-17.
- Kinyamu HK and Archer TK (2004) Modifying chromatin to permit steroid hormone receptor-dependent transcription. *Biochim Biophys Acta* **1677**:30-45.
- Kos M, Reid G, Denger S and Gannon F (2001) Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol* **15**:2057-63.
- Lipka C, Mankertz J, Fromm M, Lubbert H, Buhler H, Kuhn W, Ragosch V and Hundertmark S (2004) Impairment of the antiproliferative effect of glucocorticosteroids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 overexpression in MCF-7 breast-cancer cells. *Horm Metab Res* **36**:437-44.
- Littlefield BA and Cidlowski JA (1984) Increased steroid responsiveness during sodium butyrate-induced "differentiation" of HeLa S3 cells. *Endocrinology* **114**:566-75.

- Mader S and White JH (1993) A steroid-inducible promoter for the controlled overexpression of cloned genes in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:5603-7.
- Mao C and Shapiro DJ (2000) A histone deacetylase inhibitor potentiates estrogen receptor activation of a stably integrated vitellogenin promoter in HepG2 cells. *Endocrinology* **141**:2361-9.
- Margueron R, Duong V, Bonnet S, Escande A, Vignon F, Balaguer P and Cavailles V (2004a) Histone deacetylase inhibition and estrogen receptor alpha levels modulate the transcriptional activity of partial antiestrogens. *J Mol Endocrinol* **32**:583-94.
- Margueron R, Duong V, Castet A and Cavailles V (2004b) Histone deacetylase inhibition and estrogen signalling in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* **68**:1239-46.
- McLaughlin F, Finn P and La Thangue NB (2003) The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age. *Drug Discov Today* **8**:793-802.
- McLaughlin F and La Thangue NB (2004) Histone deacetylase inhibitors open new doors in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* **68**:1139-44.
- Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M and Gannon F (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**:751-63.
- Mulholland NM, Soeth E and Smith CL (2003) Inhibition of MMTV transcription by HDAC inhibitors occurs independent of changes in chromatin remodeling and increased histone acetylation. *Oncogene* **22**:4807-18.
- Munster PN, Troso-Sandoval T, Rosen N, Rifkind R, Marks PA and Richon VM (2001) The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res* **61**:8492-7.
- Nagao M, Oyanagi K, Tsuchiyama A, Aoyama T and Nakao T (1987) Studies on the expression of liver-specific functions of human fetal hepatocytes in primary culture. *Tohoku J Exp Med* **152**:23-9.

- Pearl MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, Holloway AJ and Johnstone RW (2005) Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Plesko MM, Hargrove JL, Granner DK and Chalkley R (1983) Inhibition by sodium butyrate of enzyme induction by glucocorticoids and dibutyryl cyclic AMP. A role for the rapid form of histone acetylation. *J Biol Chem* **258**:13738-44.
- Reid G, Metivier R, Lin CY, Denger S, Ibberson D, Ivacevic T, Brand H, Benes V, Liu ET and Gannon F (2005) Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A. *Oncogene* **24**:4894-907.
- Rosenfeld MG and Glass CK (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* **276**:36865-68.
- Ruh MF, Tian S, Cox LK and Ruh TS (1999) The effects of histone acetylation on estrogen responsiveness in MCF-7 cells. *Endocrine* **11**:157-64.
- Sanchez R, Nguyen D, Rocha W, White JH and Mader S (2002) Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays* **24**:244-54.
- Strait KA, Dabbas B, Hammond EH, Warnick CT, Istrup SJ and Ford CD (2002) Cell cycle blockade and differentiation of ovarian cancer cells by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A are associated with changes in p21, Rb, and Id proteins. *Mol Cancer Ther* **1**:1181-90.
- Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I and Koeffler HP (2004) Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clin Cancer Res* **10**:1141-9.
- Voegel JJ, Heine MJ, Tini M, Vivat V, Chambon P and Gronemeyer H (1998) The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *Embo J* **17**:507-19.
- Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, Lisanti MP, Katzenellenbogen BS, Kato S, Hopp T, Fuqua SA, Lopez GN, Kushner

PJ and Pestell RG (2001) Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* **276**:18375-83.

White JH, Fernandes I, Mader S and Yang XJ (2004) Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam Horm* **68**:123-43.

Yang X, Phillips DL, Ferguson AT, Nelson WG, Herman JG and Davidson NE (2001) Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res* **61**:7025-9.

FOONOTES

Supported by operating grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to SM (MT-13147; IC1-70246) and JW (MT-11704). SM holds the CIBC Breast Cancer Research Chair at Université de Montréal, and is a Senior Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). WR was supported by fellowships from the Montreal Center for Experimental Therapeutics in Cancer–CIHR training program and from the Faculté des Etudes Supérieures de l'Université de Montréal (FES). J.D. was supported by fellowships from the FRSQ and FES.

Person to receive reprint requests: Sylvie Mader, Département de Biochimie, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

Tel: 514 343 6111 ext 15173; Fax: 514 343 2210; email:

████████████████████

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. The HDAC inhibitors trichostatin A and sodium butyrate have opposite effects on GR and ER transcriptional activity with episomal reporter vectors containing minimal steroid-responsive promoters. Ishikawa-GRE5/EBV (A, C) or Ishikawa-ERE3/EBV (B, D) cells, which propagate the GRE₅-TATA-CAT/EBV or ERE₃-TATA-CAT/EBV episomal reporter vectors, respectively, were treated for 24 h with or without dexamethasone (Dex, 25 nM, A, C) or estradiol (E2, 25 nM, B, D) and either sodium butyrate (SB, A, B) or trichostatin A (TSA, C, D) at the indicated concentrations. CAT activity was assayed in whole cell extracts and normalized on protein concentration.

Fig. 2. Expression of HDACs and dose- and time-dependent effects of trichostatin A on histone acetylation in Ishikawa cells. **A.** Expression of HDACs at the mRNA level in Ishikawa cells was monitored by RT-PCR from total RNAs using primers specific for each HDAC. **B.** Trichostatin A (TSA) treatment (300 nM, 1h) increases global acetylation levels of histone H3 and H4 in Ishikawa-ERE3/EBV and Ishikawa-GRE5/EBV cells. Levels of acetyl-H3 (Ac-H3) and Acetyl-H4 (Ac-H4) were detected by Western analysis as described in Materials and Methods. **C.** Hyperacetylation of histone H3 by trichostatin A (TSA, 30 or 300 nM) is reversible in a time and concentration-dependent manner.

Fig. 3. Long-term coincubation with trichostatin A is necessary for effects on GR and ER-dependent expression in Ishikawa reporter cell lines. Ishikawa-GRE5/EBV

(A, C, E) or Ishikawa-ERE3/EBV (B, D, F) cells were treated for different times with or without dexamethasone (Dex, 25 nM, A, C, E) or estradiol (E2, 25 nM, B, D, F) and trichostatin A (TSA) at the indicated concentrations and times. A time course of co-treatment with hormones and trichostatin A indicates that a long-term incubation (24 h) is required for marked effects (A-B). Addition of trichostatin A during the last 8 h of hormone treatment (16 to 24h after hormone addition) does not lead to significant effects (C-D). On the other hand, pretreatment with trichostatin A for 18 h (+) prior to hormone addition further increased the magnitude of these effects (E-F).

Fig. 4. HDACi repress estradiol-stimulated expression of ALPPL2 and stimulate induction of the TAT gene by dexamethasone. **A-B** Ishikawa cells were treated with estradiol (E2, 25 nM), or with antiestrogens 4-hydroxytamoxifen (OHT, 100 nM) or ICI182,780 (ICI, 100 nM) in the absence or presence of sodium butyrate (SB, 5 mM) or of trichostatin A (TSA, 300 nM) for 24 h. mRNA levels of the ALPPL2 gene were assessed by RT-PCR (A), and alkaline phosphatase activity was assayed by p-nitrophenyl hydrolysis (B). **C.** Ishikawa cells were treated with dexamethasone (Dex, 25 nM) or trichostatin A (300 nM) or both for 24 h. mRNA levels of the human TAT gene and of the control housekeeping GAPDH gene were monitored by RT-PCR.

Fig. 5. The repressive effects of HDACi on estrogen signaling are due to repression of ER α expression in parental Ishikawa cells. **A-B** ER α expression is inhibited by HDACi at the mRNA and protein levels. Ishikawa cells were treated with estradiol (E2, 25 nM), or with antiestrogens 4-hydroxytamoxifen or ICI182,780 (100 nM) in

the absence or presence of sodium butyrate (SB, 5 mM) or of trichostatin A (trichostatin A, 300 nM) for 16 h or 24 h. mRNA levels of the human ER α and of the control β -actin gene were monitored by RT-PCR. Primers for ER α were chosen in the coding region common to all transcripts. **C-D** reexpression of ER α by transient transfection prevents the repressive effects of trichostatin A independently from acetylation of the receptor. Ishikawa cells were transiently transfected with an ERE3-TATA-Luc reporter vector with expression vectors for wt ER α or for the ER α (K302A/K303A) mutant affected in the acetylation sites, or with the parental pCDNA3.1 expression vector. Cells were treated with estradiol (E2, 25 nM) and/or trichostatin A (TSA, 300 nM) as indicated for 24 h (C). Western analysis of ER α expression levels was performed in parallel, and indicates that trichostatin A increases expression directed by the CMV promoter in the pCDNA3.1 vector (D).

Fig. 6. HDACi decrease ER α transcription from promoters A, B, and C in Ishikawa cells in the absence of *de novo* translation. **A.** Promoters A, B, and C drive expression of ER α in Ishikawa cells, as demonstrated by detection of the corresponding transcripts with alternative 5' exons. Note that promoter A and promoter F are more active in MCF-7 cells. **B.** Treatment with trichostatin A (TSA, 300 nM) or sodium butyrate (SB, 5 mM) for 6 h represses expression from all active promoters (A, B, and C) in Ishikawa cells, while GAPDH expression is not affected. **C.** Treatment with trichostatin A (TSA, 300 nM) for 6 h represses expression from all active promoters (A, B, C, and F) in MCF7 cells **D.** Expression of both the 66 kDa and 46 kDa isoforms of ER α is inhibited by TSA treatment (300 nM, 6 h) in

MCF7 cells. **E.** Actinomycin-D (Act-D) treatment (2 $\mu\text{g/ml}$) prevents repression of ER α expression by sodium butyrate (5 mM, 6h). **F.** Chromatin immunoprecipitation experiments indicate that treatment of Ishikawa cells with TSA (300 nM, 6h) leads to hypoacetylation of histones H3 and H4 on promoters A, B and C. **G.** Treatment with translation inhibitors cycloheximide (CHX, 10 $\mu\text{g/ml}$), puromycin (Puro, 5 μM), anisomycin (Aniso, 5 μM) does not prevent repression of ER α transcription by trichostatin A (300 nM, 6h).

Fig. 7. HDACi do not increase glucocorticoid receptor expression in Ishikawa cells.

A. Treatment of Ishikawa cells with sodium butyrate (SB, 5 mM) or trichostatin A (TSA, 300 nM) does not lead to increases in glucocorticoid receptor (GR) mRNA in the absence or presence of dexamethasone (Dex, 25 nM) at 8 or 24 h. Expression of the GAPDH mRNA is shown as a control. **B.** GR protein levels, detected by western analysis using the polyclonal rabbit PA1-511 antibody, were not upregulated at 1, 8 or 24 h. Expression of β -actin is shown as a control.

Fig. 8 Overexpression of the p160 coactivator derivative TIF2.1 attenuates the trichostatin A stimulation of GR-dependent transcription. **A.** Ishikawa cells were transiently transfected with 2 μg GRE₅-TATA-CAT/EBV and 2 μg of pSG5-TIF2.1 by the calcium phosphate method. After 18 h, cells were treated with dexamethasone (Dex, 25 nM) in the presence of trichostatin A (TSA, 30 or 300 nM) for 24 h. Expression of the transfected TIF2.1 is confirmed by Western blot analysis using the mouse monoclonal antibody 3Ti-3F1 (inset)

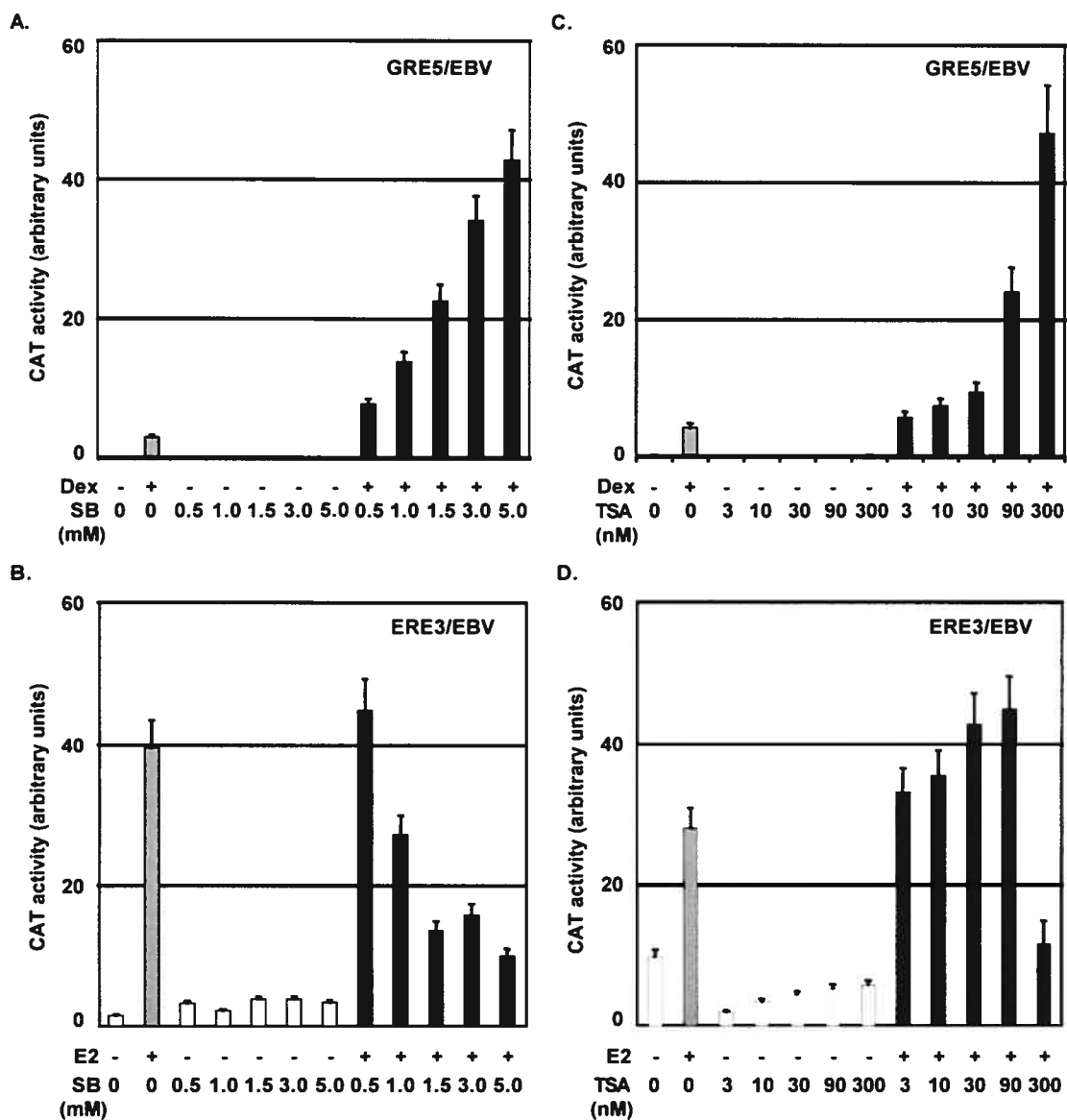


Figure 1: The HDAC inhibitors trichostatin A and sodium butyrate have opposite effects on GR and ER transcriptional activity

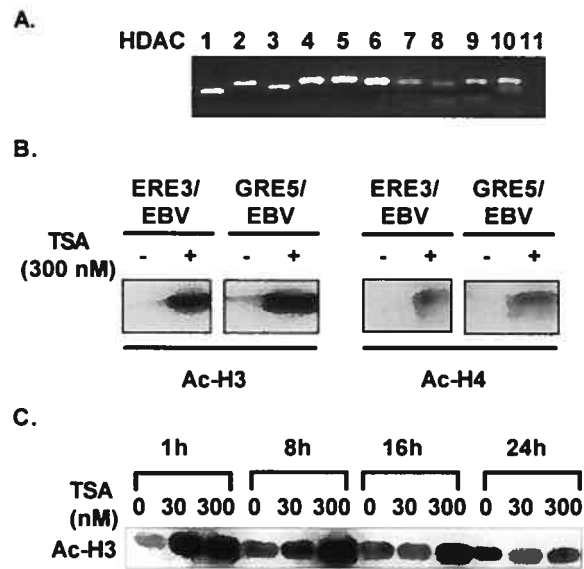


Figure 2. Expression of HDACs and dose- and time-dependent effects of trichostatin A on histone acetylation in Ishikawa cells.

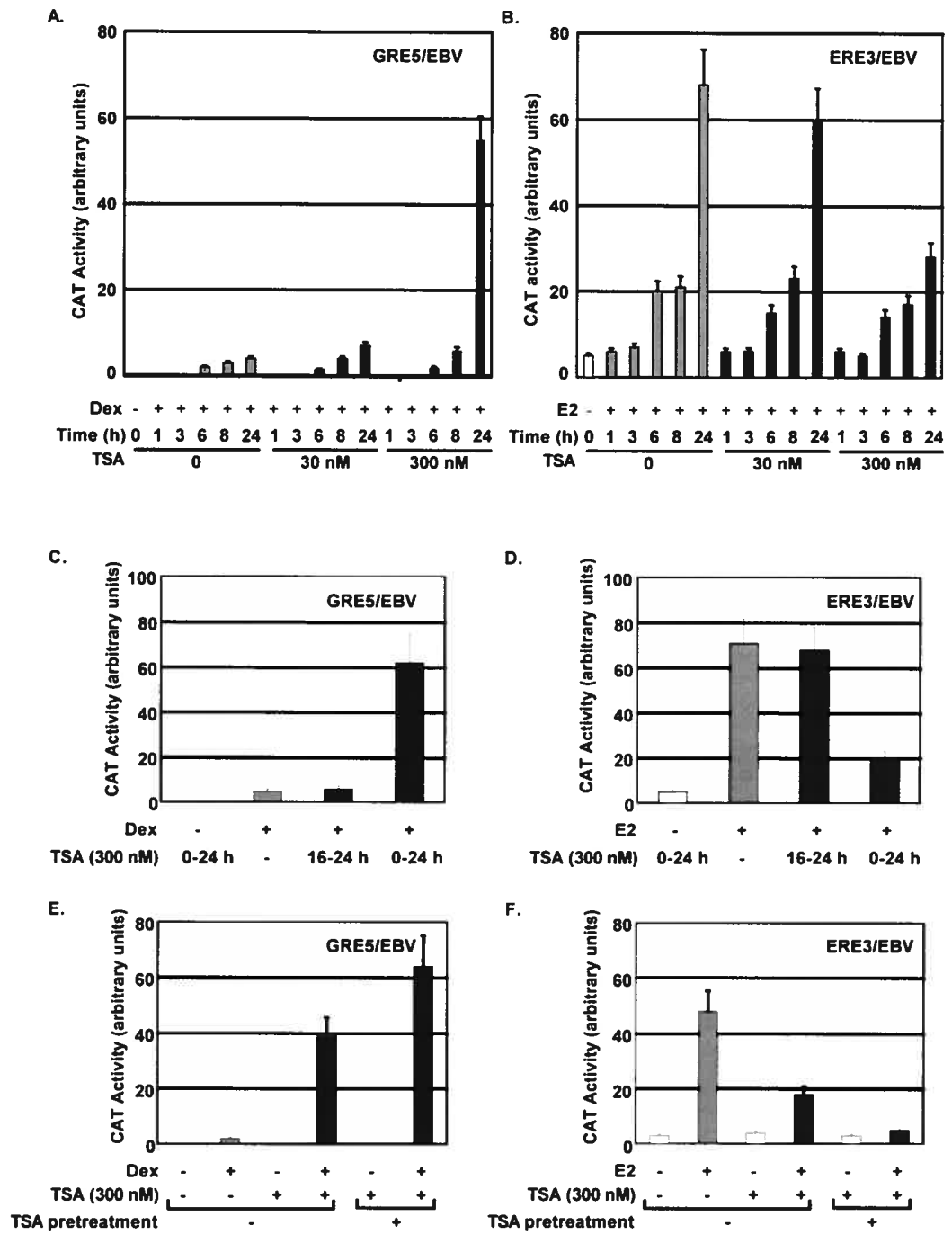


Figure 3. Long-term coincubation with trichostatin A is necessary for effects on GR and ER-dependent expression in Ishikawa reporter cell lines.

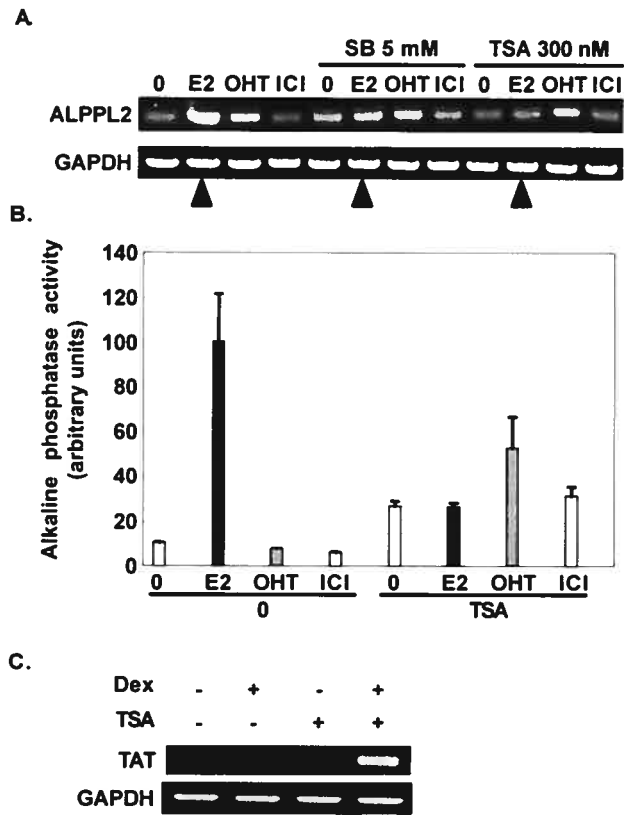


Figure 4. HDACi repress estradiol-stimulated expression of ALPPL2 and stimulate induction of the TAT gene by dexamethasone.

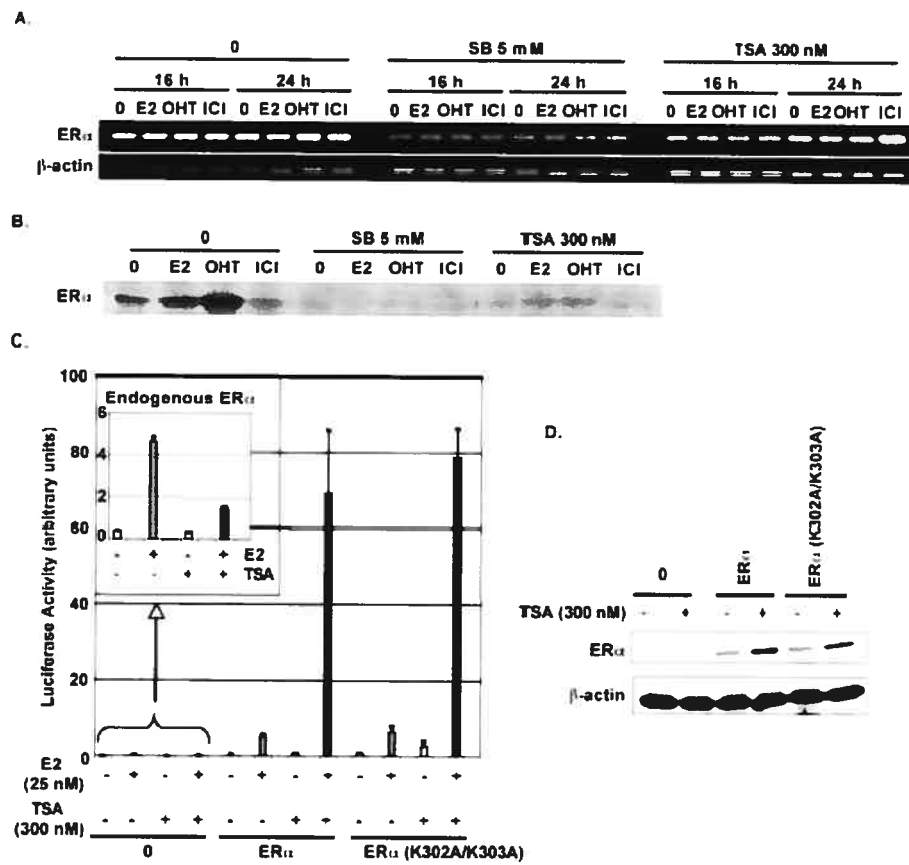


Figure 5. The repressive effects of HDACi on estrogen signaling are due to repression of ER α expression in parental Ishikawa cells.

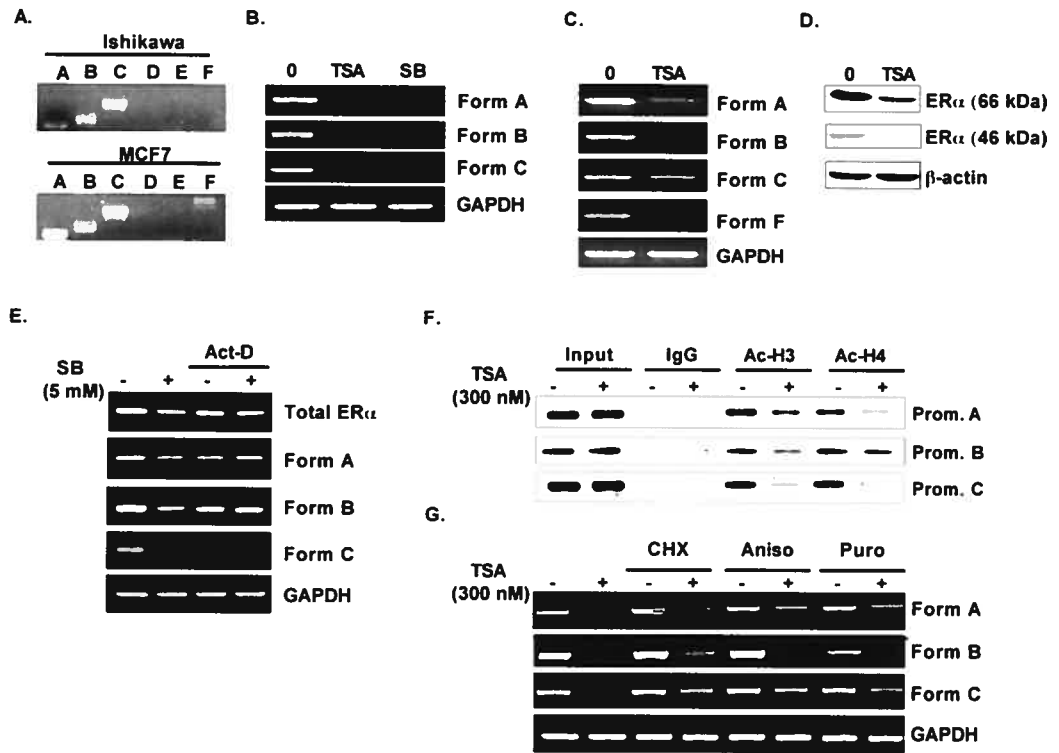


Figure 6. HDACi decrease ER α transcription from promoters A, B, and C in Ishikawa cells in the absence of *de novo* translation.

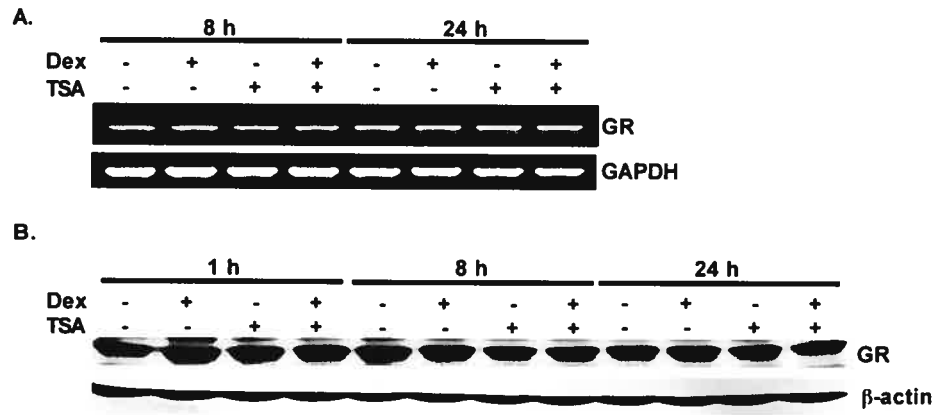


Figure 7. HDACi do not increase glucocorticoid receptor expression in Ishikawa cells.

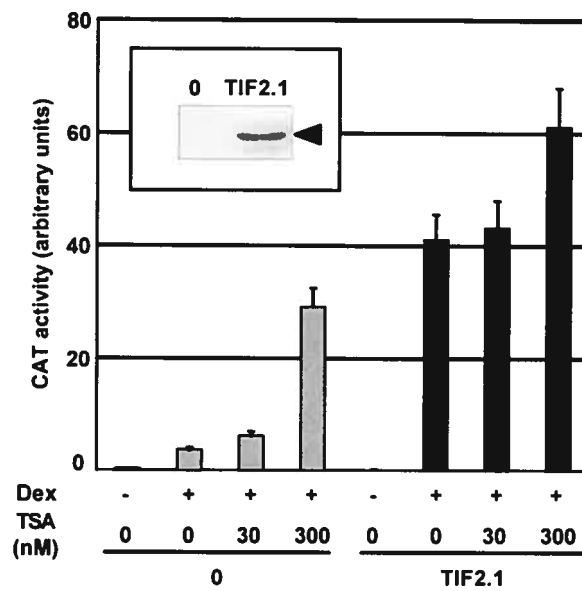


Figure 8 Overexpression of the p160 coactivator derivative TIF2.1 attenuates the trichostatin A stimulation of GR-dependent transcription.

ARTICLE 2: STRIATIN INTERACTS WITH THE LIGAND BINDING DOMAIN OF ESTROGEN RECEPTOR ALPHA AND REGULATES THE RAPID STIMULATION OF MAPK ACTIVITY BY ESTRADIOL

Manuscrit en préparation

Striatin interacts with the ligand binding domain of estrogen receptor alpha and regulates the rapid stimulation of MAPK activity by estradiol

Walter Rocha, Martine Bail, Gisèle Marguier, Gabriel Péroquin, and Sylvie Mader

Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal QC H3C 3J7 (W.R., G.M., M.B., G.P., S.C., Z.L., S.M.), Institute of Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal QC H3C 3J7 (W.R., M.B., S.M.), Montreal Center for Experimental Therapeutics in Cancer, Jewish General Hospital, Montreal QC H3T 1E2 (W.R., G.M., S.M.), Department of Medicine, McGill University, Montréal QC H3J 1Y6 (S.M.).

Running title. Role of striatin in estradiol-induced MAPK activity

Corresponding author : Sylvie Mader, Département de Biochimie,
Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec
H3C 3J7, Canada.

Tel: 514 343 6111 ext 15173; Fax: 514 343 2210;

email: [REDACTED]

ABBREVIATIONS

STRN, *Striatin*; PP2A, *Protein phosphatase 2A*, MAPK, *Mitogen-activated protein kinase*.

ABSTRACT

Estrogens (E2) play important roles in the development and the physiology of the female reproductive tract. Estrogenic effects in target tissues are mediated mainly by estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β). Besides its well established genomic function as transcription factor, ER α was shown to localize at the cell membrane, particularly in caveolae subdomains. Moreover, a lot of studies illustrate E2-induced non genomic on MAPK, mainly by interaction with Src kinase or shc and MNAR scaffolding proteins. We report the isolation of striatin (STRN), an adaptor protein, which interacts *in vitro* with ER α ligand binding domain (LBD) in a hormone-dependent manner. We mapped the receptor interaction domain in STRN to a central region that does not overlap with previously described protein-protein interaction domains, suggesting that ER α may assemble with other proteins onto STRN. Finally, we demonstrate that siRNA-mediated depletion of STRN has little effect on expression of estrogen target genes, but abolishes the rapid induction of MAPK activity in mammary adenocarcinoma MCF7 cells.

INTRODUCTION

Estrogens (E2) play important roles in the development and the physiology of the female reproductive tract. Estrogenic effects in target tissues are mediated mainly by estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β). Upon estrogen stimulation, ERs are released from inactive complexes with chaperone proteins [1], dimerize and interact with target gene flanking sequences either directly via recognition of its cognate estrogen response element (ERE) or indirectly via complex formation with AP1 or Sp1 transcription factors [2]. ER contains distinct structural and functional domains consisting of a central DNA binding (DBD), a C-terminal ligand-binding domain (LBD), and two transcription activation functions (AF1 and AF2). The activity of AF1, located in the N-terminus region, is ligand-independent but cell type- and promoter-specific [3]. AF2, composed of LBD determinants including helix 12 [4], is active in an E2-inducible manner [5, 6]

A large number of studies were conducted to identify AF2-specific nuclear receptor cofactors. Yeast 2-hybrid and far-western experiments using nuclear receptor LBD in the presence of hormone, led to the discovery of the p160 coactivators SRC1/ERAP160 [7, 8], TIF2/GRIP1 [9, 10], AIB1/SRC3/ACTR/TRAM1/RAC3/pCIP [11-16]. Hormone-dependent recruitment on AF2 is mediated by LXXLL motifs present in the p160 family members and in a variety of other coactivators [17, 18]. Of interest, p160 proteins interact also with AF1, increasing AF1 activity in a LXXLL-independent manner [19]. The p160 coactivators recruit histone acetyltransferase (HAT) activities p300/CBP and pCAF [20], and histone

methyltransferases CARM1 and PRMT1 [21, 22]. Consequently, recruitment of ER α -coactivator complexes on target promoters leads to histone acetylation, facilitates recruitment of the RNA polymerase II pre-initiation complex (PIC) [23] and induces gene expression. In addition, recruitment of the PIC is increased by the DRIP/TRAP mediator complex, which was shown to interact with nuclear receptor LBDs in GST pulldown approaches [24-27].

While a variety of cofactors mediating the transcriptional activity of ERs have been characterized, much less is known concerning proteins that mediate the non-genomic mechanisms of action of estrogens. In the MCF7 and T47D human mammary cell lines, estrogens activate the Src/Ras/ERK pathway [28, 29], which plays a role in cell proliferation [30, 31], suggesting that stimulation of cell growth may be achieved in part independently from ER-mediated transcription. Activation of this pathway is dependent on interactions between ER α and Src kinase but also with scaffolding proteins Shc and MNAR [32, 33]. Of interest, under estradiol MNAR plays an adaptor role between ER α and Src and stimulates Src kinase activity and subsequently ERK phosphorylation [33].

In order to identify new E2-recruited cofactors, we performed pulldown experiments with HeLa nuclear extracts using the GST-ER α LBD fusion. One major proteins interacting with the ER α LBD in a hormone-dependent manner was identified as striatin (STRN) [34], an adaptor protein that interacts with caveolin-1 and calmodulin [35, 36] and with the serine-threonine phosphatase PP2A [37], acting as a B subunit of this phosphatase and targeting MOB1 for dephosphorylation [38]. STRN was recently reported by Lu et al. to interact in vitro with the ER α DBD [39]. In contrast, our results

indicate that STRN interacts with the ER α through its ligand binding domain. We mapped the receptor interaction domain in STRN to a central region that does not overlap with previously described protein-protein interaction domains, suggesting that ER α may assemble with other proteins onto STRN. Finally, we demonstrate that siRNA-mediated depletion of STRN has little effect on expression of estrogen target genes, but abolishes the rapid induction of MAPK activity in mammary adenocarcinoma MCF7 cells.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids and reagents

17 β -estradiol (E2) was purchased from Sigma (Oakville, ON, Canada) and ICI182,780 (ICI) was purchased from Tocris Cookson Ltd (Ballwin, MO, USA). pSG5-hER α , pSG5-TIF2.1, pGEX-EF, -AB were kind gifts from Prof. Pierre Chambon. pGEX-C and EF Δ H12 were constructed by PCR amplification. pCDNA3.1-ER α (K302A/K303A) construct was previously described (Rocha et al., 2005). pSG5-striatin was constructed as follows: 2 μ g total RNA from HeLa cells were reverse transcribed using the RevertAid H first minus strand cDNA synthesis kit (MBI Fermentas, Burlington, ON, Canada). A 2.1 kb striatin cDNA fragment was amplified from reverse transcribed RNAs using TAQ polymerase (MBI) with primers containing BglIII and XhoI restriction sites, digested by these enzymes and cloned into the same sites in a modified version of pSG5 vector. Integrity of the human striatin cDNA was confirmed by sequencing. The striatin deletion mutants (described in the text) were constructed by PCR amplification with specific primers (sequences available upon request) and cloned in the pSG5 or pGEX-6P2 vectors (Pharmacia).

MCF-7 breast carcinoma cells were maintained in α MEM (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma,

Oakville, ON, Canada) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). HeLa cells were maintained in DMEM (Wisent, St-Bruno, QC, Canada), supplemented with 5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 1% sodium pyruvate (Wisent, St-Bruno, QC, Canada).

Three days before experiments, MCF7 or HeLa were switched to phenol red-free DMEM medium containing 10% charcoal-stripped serum, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine. HeLa cells were electroporated as previously described [40].

GST pulldown assays

Expression of GST-AB, -EF, -C, -STR(ERID) in BL21 bacteria transformed with the corresponding pGEX vectors was induced for 3 h at RT with 0,1 mM IPTG when the O.D. (600 nM) reached 0.6. Bacteria were resuspended in PBS 1X, 0.1% NP40, sonicated with a Branson sonicator and proteins in the supernatant fraction were incubated with glutathione-sepharose beads for 1 h at 4°C. Purified fusion proteins bound to beads were washed 3 times with binding buffer (20 mM Tris-HCl pH7.6, 100 mM KCl, 1 mM EDTA pH8.0, 1% NP40, 1 mM DTT, 50 mM PMSF). Quantitation and purity were evaluated by SDS-PAGE, and 5 µg from each fusion were used per pulldown. *In vitro* transcription and translation (TnT) of the pSG5-hER α , -ER α (CDEF), -ER α (ABC), -TIF2.1, -striatin or deletion mutants thereof, or pcDNA3-ER α (K302-303A) cDNA matrices were performed according to the manufacturer's instructions (Promega). The proteins were radiolabeled with S³⁵ methionine. Prior to the pulldown assay, fusion proteins bound to beads

were blocked from non-specific binding in binding buffer containing 0,1% BSA, 1 h at 4°C. TnT reactions (2 to 5 µl) were then added to the beads, with or without E2 (10^{-7} M), ICI182,780 (10^{-7} M). Pulldown assays were performed in 500 µl final volume of binding buffer during 2 h at 4°C. Beads were washed 4 times in binding buffer with or without hormones, antiestrogens or vehicle. Finally, the pellets were dried in a speed-vac, resuspended in 1X Laemmli buffer and heated at 85°C for 5 min. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and revealed by autoradiography.

For GST-pulldown of nuclear extracts, a slightly modified protocol was used. Prior to the pulldown assay, purified fusion proteins (20 µg per reaction) bound to beads were washed 3 times in wash buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% NP40, 1 mM DTT), blocked for 1 h in binding buffer (20 mM Tris-HCl pH7.9, 180 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0,05% NP40, 1 mM DTT) containing 0.1% BSA and hormones when required. 1.5 mg nuclear proteins, extracted using the Dignam's method [41], were used per pulldown. After 3 h at 4°C, pulled-down material was washed 3 times with wash buffer containing hormone when required. Bound proteins were eluted with wash buffer containing 0.2 % sarkosyl and loaded on PAGE-SDS. Silver staining was performed as described [25].

Immunoprecipitation and Western-blot assays.

Immunoprecipitation (IP) from HeLa nuclear extracts were performed using 2 µg anti-striatin (BD Biosciences, Mississauga, ON, CA), 20 µl of a 50% slurry of sepharose-protein G (GE Healthcare Bio-Sciences Inc., Baie d'Urfé, QC, CA) and protein extracts (1 mg) in binding buffer (20 mM Tris-

HCl pH7.9, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0,05% NP40, 1 mM DTT). After 3 washes with binding buffer, proteins were eluted in Laemmli buffer at 85°C for 10 min. IP from MCF7 cells were performed as follows. Cells were washed 2 times with PBS 1X and cell pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.6, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 1% NP40). LCell debris were removed from lysates by centrifugatio (15 min, 16000 g, 4°C). IP was performed using 2 µg of anti-ERα (HC20, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), or of normal rabbit serum (Santa Cruz). After 3 washes with lysis buffer, proteins were eluted as above. Half of the IP was loaded on a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel. Proteins were transferred onto PVDF membranes (Hybond P, GE Healthcare Bio-Sciences Inc., Baie d'Urfé, QC, Canada). Blots were incubated with anti-ERα mouse monoclonal antibodies (B10 or F3A6, both kind gifts from Prof. P. Chambon), anti-striatin antibodies (BD or Upstate, Charlottesville, VA, USA, as mentioned in the legends), anti-AIB1 (Upstate), or anti-β-actin mouse monoclonal (Sigma, Oakville, ON, Canada) antibodies. Immunodetection was performed using ECL (NEN Life Science Products) as recommended by the manufacturer. Each result was reproduced at least 3 times. A typical experiment is shown.

siRNA-mediated inhibition of gene expression

siRNA duplexes or pools targeting striatin, GAPDH or luciferase were ordered from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Transfections of siRNAs were performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, MCF7 cells were seeded at 3×10^5 cells per well in a 6 well-plate the day before transfection in antibiotic-free DMEM containing 10% FBS, 1% glutamine, 1%

sodium pyruvate. siRNAs (200 pmole) were complexed to the DharmaFect#1 reagent during 20 min and added to each well containing 2 ml of medium (final concentration 100 nM). Cells were incubated with siRNAs for different time (as mentioned in the text). To test the efficiency of siRNA-mediated gene suppression, total RNA from MCF7 cells was extracted with TRIZOL (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) reagent according to the manufacturer's recommendations after 60 h. Total RNA (2 ug) was reverse-transcribed. Expression of striatin, zinedin, GAPDH, or β -actin mRNA was assessed by PCR amplification of reverse-transcribed RNAs with TAQ polymerase (MBI) using specific primers (sequences available on request). Proteins from the TRIZOL extracts were obtained as mentioned by the manufacturer except that the final solubilization of the protein pellet was achieved in urea 8M, 50 mM β -mercaptoethanol O/N at 4°C. Proteins were quantified using BioRad reagent (BioRad, Mississauga, ON, Canada).

Analysis of ERK1/2 phosphorylation

MCF7 cells were transfected with siRNA duplex#4 (sequence available upon request) or an off-target siRNA specific for the firefly luciferase as described above. After 24 h, the culture medium was renewed. After another 36 h, cells were rinsed 2 times with PBS and switched to serum-free medium for 2 h. Cells were stimulated with E2 (10 nM) or ethanol for 30 min. Medium was aspirated and cells were directly lysed in 200 μ l of TRIZOL and proteins were extracted as described above. Western-blot was performed using anti-phospho-ERK1/2, or anti-ERK1/2 antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

RESULTS

Striatin interacts with the estrogen receptor ligand binding domain in an AF2-dependent manner *in vitro*.

To characterize proteins interacting with the estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) in an AF2-dependent manner, we performed GST-pulldown assays with the wt $ER\alpha$ ligand binding domain (LBD) or with a mutated version carrying a deletion of helix H12, which corresponds to the AF2 core [4]. Nuclear protein extracts from HeLa cells were incubated with these fusion proteins in the absence or presence of estradiol, and bound proteins were separated by SDS-PAGE and revealed by silver staining. Two main bands were observed in the presence of hormone with the wt LBD (GST-EF), but not with the H12-deleted LBD (GST-EF Δ H12) (Fig.1B, compare lanes 4 and 6) or with either construct in the absence of hormone (Fig.1B, lanes 3 and 5). These bands were not detected with GST alone (lane 1) or GST fused to the AB region of $ER\alpha$ (lane2).

Since antiestrogens inactivate AF2 function [5, 6, 42] we examined whether the patterns of proteins bound in an AF2-dependent manner to $ER\alpha$ were specific to the agonist-induced conformation of the receptor. Neither band 1 or 2 were detected in the presence of the partial antiestrogen 4-hydroxytamoxifen (OHT) or the full antagonist ICI182,780 (ICI) (Fig 1B, compare lanes 4-5 to lane 3), confirming that the corresponding proteins interact with $ER\alpha$ in an AF2-dependent manner.

To identify proteins in bands 1 and 2, in-gel trypsin digestion was performed and the resulting protein peptides were analyzed by Liquid Chromatography /Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS-MS).

Analysis of peptide sequences indicated that band 1 contained p160 family members AIB1 and SRC1, whereas band 2 yielded 11 peptides from striatin (Fig. 1D), a protein previously identified as a PP2A B subunit [37]. Striatin is part of a family of proteins including also SG2NA and zinedin, characterized by the presence of caveolin-, calmodulin- and WD40 repeat domains [34, 36, 43]. Of interest, interaction between striatin (STRN) and ER α was previously reported but shown to be mediated by the DNA binding region (residues 183-253) [39], which is absent in our bait construct. To verify that striatin interacts with the ER α EF region in a hormone-dependent manner, we performed a Western analysis of the proteins bound to GST-EF beads in the presence or absence of estradiol or OHT (Fig. 1E). Use of a monoclonal antibody directed against STRN confirmed that this protein like the p160 coactivator AIB1 interacts with the ER α LBD in the presence of hormone only.

To further map domains of ER α that mediate interaction with *STRN in vitro*, we performed GST pulldown assays with fusion proteins containing the AB (aa 1-184), C (aa 175-283) and DEF (aa 270-595) regions and whole cell extracts from MCF7 cells (Fig. 2A). The GST-EF protein interacted specifically with STRN in the presence of ligand, as demonstrated by detection with a rabbit polyclonal antibody specific for STRN [37] while β -actin was not present in the bound fraction (Fig. 2A lanes 5-6). On the other hand, no interaction between STRN and either the GST-AB or the GST-C

fusions was detected in a pulldown assay (Fig. 2B). Note that the C region interacted with the full length ER α in a pull-down assay (Fig. 2C) and bound an estrogen response element in a gel shift assay (Fig. 2D), and that GST-AB interacted with coactivator p68 [44] (Fig. 2E), demonstrating the functionality of these proteins. Similar results were obtained using *in vitro*-translated STRN (Fig. 2B) or the *in vitro*-translated central domain of coactivator TIF2 (TIF2.1, Fig. 2B) [9]. To compare the determinants of the ER α LBD recognized by STRN and TIF2.1, we used GST fusions with the ER LBD containing different point mutations in helix 3, which forms a critical part of the static region of the coactivator binding pocket [6]. In particular, the integrity of lysine 362 at the C terminus of helix 3 [5] is essential for ligand-dependent binding of p160 coactivators [45]. While the K362Q mutation disrupted both TIF-2.1 and STRN binding, mutations T347A, I352T, H356R, and N359S had a minimal effect on interaction of TIF-2.1, but partially or completely abolished binding of STRN (Fig. 2F). The above data indicate that STRN and TIF-2.1 recognize overlapping binding sites, but that STRN interacts with residues on helix 3 that are distinct from those recognized by TIF-2.

Striatin interacts with the estrogen receptor independently from its interaction with calmodulin.

STRN has the features of an adaptor protein, containing different domains implicated in protein-protein interaction, including a caveolin-binding domain (aa 53-63) [36], a coiled-coil region (aa 70-116) and a calmodulin-binding site (aa 149-166) [34, 35]. In addition, the C-terminus

contains a WD repeat domain reported by Lu et al., (2004) to interact with Gαi (Fig. 3A). To map the STRN domains involved in the interaction with ERα, we performed GST pulldown assays using GST-EF and STRN mutants carrying different truncations. Deletion of the coiled-coil region, caveolin- and calmodulin-binding domains did not prevent hormone-dependent interaction with GST-EF (Fig. 3B). Further deletion of the WD repeat domain was without effect on interaction with the ligand binding domain or ERα. We therefore conclude that the ERα Interacting Domain (ERID) of STRN maps to its central region (amino-acids 171-410). Note that the total anti-estrogen ICI182,780 was not permissive for interaction either with STRN-ERID or TIF2.1, consistent with dependency on AF2 function (Fig. 3B).

As previously reported [35], STRN interacts with a calmodulin-sepharose resin in a calcium-dependent manner when expressed endogenously in HeLa cells or *in vitro* (data not shown). Deletion of the coiled coil and caveolin-interaction domain did not prevent interaction with calmodulin (Fig. 3C, ΔCC mutant), but a further deletion including the previously characterized calmodulin-binding site [35] abolished interaction with the calmodulin resin (Fig 3C, ΔCCC mutant). Together with the above-described results of GST pulldown experiments with the ERα EF region, these results suggest that binding to calmodulin and ERα is mediated via different regions of STRN.

Interaction between STRN and ERα was confirmed in a reverse manner using GST fused to STRN-ERID and *in vitro* translated ERα. STRN-ERID interacted with ERα in an E2-dependent manner (Fig. 4B), and this interaction was not prevented by deletion of the AB region (CDEF mutant). On the other hand, consistent with results obtained with the full-length STRN,

deletion of helix H12 of ER α dramatically diminished interaction and abolished hormone-dependency (Fig. 4B, ER Δ H12). These results confirm that STRN ERID interacts with ER α in an AF2-dependent manner.

As LXXLL motifs are often found in cofactors of nuclear receptors interacting in an AF2-dependent manner, we searched for these motifs in STRN ERID. While no LXXLL motif was present, we found at the N-terminus of the ERID domain a VXXLL motif (aa 183-187). Replacement of the first leucine in the LXXLL motif by valine was shown to be tolerated for interaction with estrogen receptors [18]. In addition, two basic amino acids are found at the N-terminus of the STRN VXXLL motif, as in several LXXLL motifs in the p160 coactivator family [46]. Nevertheless, deletion of this motif did not affect hormone-dependent interaction of STRN ERID with ER α (Fig. 4B). In addition, deletion of a putative PP2A interaction motif did not affect interaction either (Fig. 4B).

Finally, we tested for the importance of two lysine residues in region D of ER α (K302, 303) in interaction with STRN. These 2 lysines were previously implicated in binding of ER α with calmodulin [47]. Mutagenesis of both lysines to alanines did not affect interaction of STRN ERID with ER α (Fig 4B). This result together with the lack of effect of deletion of the calmodulin binding motif in striatin (see above) suggests that the interaction between STRN and ER α is not mediated by calmodulin.

Striatin interacts with the estrogen receptor *in vivo*.

In order to examine whether STRN and ER α interact *in vivo*, we performed co-immunoprecipitation assays in transiently transfected HeLa cells. A monoclonal antibody against striatin precipitated the endogenous STRN from nuclear extracts. Transiently expressed ER α was also detected in the immunoprecipitates both in the absence and in the presence of hormone (Fig. 5A, lanes 5 and 6). Coimmunoprecipitation assays were also performed in MCF7 cells. A rabbit polyclonal antibody against ER α immunoprecipitated not only ER α but also STRN, whether in the absence or in the presence of hormone. (Fig. 5B, lanes 3 and 5). Moreover, a mouse monoclonal antibody against STRN immunoprecipitated STRN and ER α (Fig 5C lanes 3 and 4). Note that neither STRN nor ER α were immunoprecipitated in the isotypic control (Fig. 5B, lanes 4 and 6; Fig 5C, lane 5).

Striatin is necessary for estradiol induction of MAP kinase activity in MCF7 cells.

To establish the functional importance of interaction with STRN in ER α signaling, we depleted STRN in MCF7 cells using an siRNA approach. Four different siRNA duplexes were efficient at suppressing STRN mRNA levels either separately or as a pool, but did not affect GAPDH mRNA levels (Fig. 6A). Conversely a pool of siRNAs targeting GAPDH repressed GAPDH mRNA levels without affecting STRN levels. Note that all siRNAs target the 3' UTR sequence of STRN which diverges within the striatin-zinedin-SG2NA

family [43]. Indeed, the pool of siRNAs against STRN had no effect on expression of the zinedin mRNA (Fig. 6C). In addition, levels of ER α mRNAs were not affected by treatment with siRNAs against STRN (data not shown).

Western analysis of endogenous STRN confirmed that protein content was also strongly reduced under the same conditions (60 h after treatment with siRNAs (Fig. 6B and D). We next assessed the effect of depletion of STRN protein levels on induction of target gene transcription by estrogen. No major difference was observed in induction of pS2, PR or GREB1 mRNAs (data not shown). We then assessed whether STRN expression levels could have an impact on the non-genomic effects of estradiol. As previously described, ERK1/2 phosphorylation is stimulated by estradiol in MCF7 cells at 30 min (Fig. 6D). This effect was not sensitive to the presence of an off-target siRNA directed against luciferase, which did not repress STRN protein levels. On the other hand, siRNAs directed against STRN abrogated the induction of ERK1/2 phosphorylation by estradiol without affecting expression levels of the ERK1/2 or β -actin protein (Fig. 6D). Together, these results suggest that interaction of ER α with STRN plays a crucial role in the stimulation of MAP kinase activity by estradiol in MCF7 cells.

DISCUSSION

Results described in this paper suggest that STRN is a cofactor of ER α playing a specific role in its non-genomic mechanism of action. Interaction with STRN was observed using the ligand binding domain of ER α , and was dependent on hormone and on the integrity of the ER α AF2 region. These results contrast with those of Lu et al. (2004), who also observed an interaction of STRN with ER α in a yeast two hybrid assay using a human heart cDNA library but mapped the interaction domain to the C region of ER α [39]. In our experimental conditions, no interaction was detected with region C, whereas interaction with the EF region was readily detectable. Differences in the experimental approaches used may explain this discrepancy. We note that protein extracts used in GST pulldown assays by Lu et al. were purified by immunoprecipitation with an anti-STRN antibody and denatured prior to incubation with fusion proteins between GST and ER α . Nevertheless, the STRN clone characterized in the two-hybrid assay by these authors corresponds to the N-terminal half of the protein (1-203), a region that overlaps partially with the minimal interaction region mapped in our study (189-410).

The N-terminal half of the STRN protein contains also other interaction domains, including with calmodulin and caveolin, which were also previously reported to interact with ER α [48, 49]. PP2A was also reported to interact with both ER α and STRN [50]. We could rule out in this study that the hormone-dependent interaction between STRN and ER α detected in GST pulldown assays was dependent on calmodulin, since neither the calmodulin

interaction domain in STRN nor amino acids 302-303 of ER α , previously shown to be crucial for its interaction with calmodulin [47], were necessary. The caveolin-interaction domain of STRN was not necessary either. Finally, while the domain of interaction of PP2A of STRN has not been mapped, deletion of a potential PP2A interaction motif (amino acids 277-292) in the STRN ERID [37] did not affect interaction with ER α (data not shown). In addition, PP2A was previously shown to interact with ER α between amino acids 176-183 [50], a region present in the GST-AB fusion, which did not interact with STRN, but absent in the GST-EF fusion. Therefore, our results strongly suggest that interaction between STRN and ER α is not mediated via known partners of STRN or ER α .

We did not detect the presence of canonical LXXLL motifs in the ERID domain of STRN. Note that whereas LXXLL motifs are often implicated in ER α cofactors interacting in an AF2-dependent manner, this is not always the case, as for instance with the ERAP140 or DRIP150 cofactors [51, 52]. In addition, motifs that diverge slightly from this canonical motif have been shown to be functional [53]. Deletion of a VXXLL motif found at the N-terminus of the ERID did not abrogate the interaction, suggesting that other sequences may be involved. Note that while the interaction with STRN involved the same amino acids implicated in interaction with the p160 cocativator TIF2, additional residues also played a role, suggested that the interaction surfaces overlap but are not identical. Finally, we note that structure prediction programs indicate that the STRN ERID contains two potential α -helices, whose role in the interaction with ER α remains to be investigated.

STRN was first described as a protein expressed preferentially in brain [54]. Its expression was subsequently found in other tissues such as spleen and lung [43], and in MCF7 (breast), Rad91 (smooth muscle), Eahy926 (endothelial) cell lines [39]. Subcellular location of STRN was reported to include sites at the membrane, in the cytosol and in the peri-nuclear and nuclear region, with greatest abundance in the peri-nuclear region [38]. As ER has been previously reported to be localized mainly in the nucleus but also in the cytosol and at the membrane [55], interaction with STRN could take place in several subcellular compartments, and has therefore the potential to affect either the genomic or non-genomic actions of estrogens. However, STR depletion by siRNA in MCF7 did not lead to major differences in expression of an artificial ERE3-containing reporter vector or of endogenous ER α target genes (data not shown).

Of interest, caveolin-1 was reported to interact with the ABC region of ER α and to increase transactivation of estrogen target genes by promoting its nuclear translocation [56, 57]. In discrepancy, Razandi et al. (2002) have shown that overexpression of caveolin-1 in MCF7 leads to enrichment of ER α in the caveolae and subsequent stimulation by estradiol of MAPK activity [58]. In another report, Razandi et al. (2003) have observed that the EF domain of ER α is sufficient for localization to the plasma membrane in CHO and MCF7 cells [59]. They additionally found that mutation of Ser 522 diminishes ER α EF-caveolin-1 interaction as well as membrane targeting of ER α [59]. Estradiol-induced MAPK activity is also dramatically reduced by the Ser 522A mutation. Because of caveolin-binding properties of STRN, suggesting potential colocalization with ER α at the membrane, siRNA-

targeted depletion of STRN in MCF7 was tested on estradiol-induced MAPK activity. Our results show that decreasing STRN protein levels in MCF7 abrogates E2-induced ERK1/2 phosphorylation. Lu et al. (2004) also concluded that STRN participates in estradiol-stimulated MAPK activity, but their conclusion was based on overexpression of the ER α -DBD rather than on inhibition of STRN expression [39].

MNAR (Modulator of nongenomic activity of ER) was previously identified as a scaffolding protein that mediates ER α -Src kinase complex formation in a hormone and LBD-dependent manner [33]. Src kinase activity appears to be important for estradiol stimulation of MAPK activity. Indeed, MAPK activity under estradiol is diminished in mouse fibroblast Src^{-/-} (Kousteni 2001). MNAR interacts with ER α AF2 via 2 LXXLL motifs [60] and with the SH3 domain of Src [33]. Note in this respect that STRN amino acid sequence contains three PxxP motifs that are putative SH3-binding sites.

Of interest, the *Drosophila* homolog of STRN CKA (Connector of Kinase to AP1), was shown to nucleate the JNKK-JNK-Jun complex and lead to AP1 activity [61]. It is possible that STRN plays a similar function in vertebrates in the ERKK /ERK pathway. Moreover STRN interacts with serine-threonine phosphatase PP2A which was reported to stimulate the MAPK pathway [62]. Therefore, it will be of interest in future studies to determine whether large complexes involving the estrogen receptor, PP2A, STRN and possibly MNAR as well as the Src, Raf-1, MEK and ERK proteins can be formed at the membrane under estradiol stimulation. Nevertheless, because ER α may be recruited through multiple protein-protein interactions, some of which are ligand independent such as binding to calmodulin and

PP2A, the role of the ligand may be to alter the conformation of the complex rather than its formation.

Altogether, our results led to the identification of a new ER α cofactor, STRN, which is a putative MAPK scaffold protein and, through its role in estradiol-induced MAPK activity, may represent a novel therapeutic target for the treatment of estrogen receptor positive breast cancer.

REFERENCES

1. Ylikomi, T., et al., *Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1998. **33**(6): p. 437-66.
2. Sanchez, R., et al., *Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors*. Bioessays, 2002. **24**(3): p. 244-54.
3. Berry, M., D. Metzger, and P. Chambon, *Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen*. Embo J, 1990. **9**(9): p. 2811-8.
4. Danielian, P.S., et al., *Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors*. Embo J, 1992. **11**(3): p. 1025-33.
5. Brzozowski, A.M., et al., *Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 753-8.
6. Shiau, A.K., et al., *The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen*. Cell, 1998. **95**(7): p. 927-37.
7. Halachmi, S., et al., *Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1455-8.
8. Onate, S.A., et al., *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. Science, 1995. **270**(5240): p. 1354-7.
9. Voegel, J.J., et al., *TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors*. Embo J, 1996. **15**(14): p. 3667-75.
10. Hong, H., et al., *GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4948-52.

11. Anzick, S.L., et al., *AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer*. *Science*, 1997. **277**(5328): p. 965-8.
12. Chen, H., et al., *Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300*. *Cell*, 1997. **90**(3): p. 569-80.
13. Takeshita, A., et al., *TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(44): p. 27629-34.
14. Li, H., P.J. Gomes, and J.D. Chen, *RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(16): p. 8479-84.
15. Torchia, J., et al., *The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function*. *Nature*, 1997. **387**(6634): p. 677-84.
16. Suen, C.S., et al., *A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(42): p. 27645-53.
17. Voegel, J.J., et al., *The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways*. *Embo J*, 1998. **17**(2): p. 507-19.
18. Heery, D.M., et al., *A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors*. *Nature*, 1997. **387**(6634): p. 733-6.
19. Webb, P., et al., *Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins*. *Mol Endocrinol*, 1998. **12**(10): p. 1605-18.
20. Xu, L., C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld, *Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function*. *Curr Opin Genet Dev*, 1999. **9**(2): p. 140-7.
21. Chen, D., S.M. Huang, and M.R. Stallcup, *Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(52): p. 40810-6.

22. Chen, D., et al., *Regulation of transcription by a protein methyltransferase*. Science, 1999. **284**(5423): p. 2174-7.
23. Shang, Y., et al., *Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription*. Cell, 2000. **103**(6): p. 843-52.
24. Metivier, R., et al., *Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter*. Cell, 2003. **115**(6): p. 751-63.
25. Rachez, C., et al., *Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex*. Nature, 1999. **398**(6730): p. 824-8.
26. Kang, Y.K., et al., *The TRAP/Mediator coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2642-7.
27. Fondell, J.D., H. Ge, and R.G. Roeder, *Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8329-33.
28. Levin, E.R., *Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(8): p. 1951-9.
29. Razandi, M., et al., *Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2701-12.
30. Marquez, D.C. and R.J. Pietras, *Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells*. Oncogene, 2001. **20**(39): p. 5420-30.
31. Castoria, G., et al., *Non-transcriptional action of oestradiol and progesterin triggers DNA synthesis*. Embo J, 1999. **18**(9): p. 2500-10.
32. Song, R.X., et al., *Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 116-27.
33. Wong, C.W., et al., *Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14783-8.

34. Castets, F., et al., *A novel calmodulin-binding protein, belonging to the WD-repeat family, is localized in dendrites of a subset of CNS neurons.* J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 1051-62.
35. Bartoli, M., A. Monneron, and D. Ladant, *Interaction of calmodulin with striatin, a WD-repeat protein present in neuronal dendritic spines.* J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22248-53.
36. Gaillard, S., et al., *Striatin, a calmodulin-dependent scaffolding protein, directly binds caveolin-1.* FEBS Lett, 2001. **508**(1): p. 49-52.
37. Moreno, C.S., et al., *WD40 repeat proteins striatin and S/G(2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A.* J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5257-63.
38. Moreno, C.S., W.S. Lane, and D.C. Pallas, *A mammalian homolog of yeast MOB1 is both a member and a putative substrate of striatin family-protein phosphatase 2A complexes.* J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 24253-60.
39. Lu, Q., et al., *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, 2004. **101**(49): p. 17126-31.
40. Bourdeau, V., et al., *Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse.* Mol Endocrinol, 2004. **18**(6): p. 1411-27.
41. Dignam, J.D., R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder, *Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.* Nucleic Acids Res, 1983. **11**(5): p. 1475-89.
42. Pike, A.C., et al., *Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen.* Structure (Camb), 2001. **9**(2): p. 145-53.
43. Castets, F., et al., *Zinedin, SG2NA, and striatin are calmodulin-binding, WD repeat proteins principally expressed in the brain.* J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19970-7.
44. Endoh, H., et al., *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, 1999. **19**(8): p. 5363-72.
45. Henttu, P.M., E. Kalkhoven, and M.G. Parker, *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, 1997. **17**(4): p. 1832-9.
 46. Mak, H.Y., et al., *Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3895-903.
 47. Garcia Pedrero, J.M., et al., *Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(5): p. 947-60.
 48. Biswas, D.K., et al., *Calmodulin is essential for estrogen receptor interaction with its motif and activation of responsive promoter*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33817-24.
 49. Li, Z., J.L. Joyal, and D.B. Sacks, *Calmodulin enhances the stability of the estrogen receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17354-60.
 50. Lu, Q., et al., *Regulation of estrogen receptor alpha-mediated transcription by a direct interaction with protein phosphatase 2A*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4639-45.
 51. Lee, J.E., et al., *DRIP150 coactivation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells is independent of LXXLL motifs*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 8819-30.
 52. Shao, W., S. Halachmi, and M. Brown, *ERAP140, a conserved tissue-specific nuclear receptor coactivator*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3358-72.
 53. Huang, N., et al., *Two distinct nuclear receptor interaction domains in NSD1, a novel SET protein that exhibits characteristics of both corepressors and coactivators*. Embo J, 1998. **17**(12): p. 3398-412.
 54. Moqrich, A., et al., *Cloning of human striatin cDNA (STRN), gene mapping to 2p22-p21, and preferential expression in brain*. Genomics, 1998. **51**(1): p. 136-9.
 55. Levin, E.R., *Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors*. J Appl Physiol, 2001. **91**(4): p. 1860-7.
 56. Schlegel, A., et al., *Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear*

- translocation and activation of ERalpha*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33551-6.
57. Schlegel, A., et al., *Ligand-independent activation of oestrogen receptor alpha by caveolin-1*. Biochem J, 2001. **359**(Pt 1): p. 203-10.
 58. Razandi, M., et al., *ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 100-15.
 59. Razandi, M., et al., *Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(5): p. 1633-46.
 60. Barletta, F., et al., *Characterization of the interactions of estrogen receptor and MNAR in the activation of cSrc*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(5): p. 1096-108.
 61. Chen, H.W., et al., *CKA, a novel multidomain protein, regulates the JUN N-terminal kinase signal transduction pathway in Drosophila*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(6): p. 1792-803.
 62. Adams, D.G., et al., *Positive Regulation of Raf1-MEK1/2-ERK1/2 Signaling by Protein Serine/Threonine Phosphatase 2A Holoenzymes*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42644-54.
-

LEGENDES

Figure 1 : Striatin interacts with the EF region of ER α in a hormone-dependent manner.

A. Schematic representation of ER α . Positions of the domain boundaries are indicated. The DNA binding (DBD) and Ligand binding (LBD) domains and the AF1 and AF2 activation functions are underlined. Helix H12 in the ER LBD, which corresponds to AF2-core, is also identified.

B. GST-pulldown experiments were performed using nuclear extracts from HeLa cells and GST fusion proteins containing the ER α regions AB, EF, or EF deleted from helix H12 (EF Δ H12). Pulldown experiments were performed in the absence or presence of estrogen (E2, 10^{-7} M). After incubation with GST fusion proteins and nuclear extracts, glutathione columns were washed 3 times and eluted using 10 mM reduced glutathione. Proteins bound to the column were separated by PAGE (8% polyacrylamide gel), and revealed by silver staining. Proteins interacting in a hormone-dependent manner are identified with an asterisk.

C. Pulldown experiments were conducted as above using GST-EF and HeLa nuclear extracts in the absence or presence of E2 (10^{-7} M), 4-hydroxytamoxifen (OHT, 10^{-7} M) or ICI182,780 (ICI, 10^{-7} M).

D. Protein bands labeled with asterisks were excised from the gel, digested with trypsin and analyzed by LC-MS-MS. Peptides associated with band 2 are shown and correspond to striatin.

E. Western analysis of proteins from HeLa cell nuclear extracts retained on the Glutathione-GST-EF resin in the absence or presence of E2 (10^{-7} M) was

conducted using monoclonal antibodies against AIB1 (Upstate) and striatin (BD).

Figure 2 : The EF domain of ER α is the main striatin-interacting domain *in vitro*.

A. GST-pulldown assays were performed with total extracts from MCF7 cells using GST-AB, -C, or -EF fusions. Retained protein were boiled, submitted to SDS-PAGE and revealed by western-blot using a rabbit polyclonal anti-striatin (Upstate) or a monoclonal anti- β -actin (Sigma) antibody.

B. GST pulldown experiments were conducted using GST fusion proteins containing the ER α AB, C or EF regions. STRN and the p160 coactivator TIF2.1 proteins were *in vitro* translated and radiolabeled with S³⁵ methionine. Pulldown assays were performed in the absence or presence of estradiol (E2, 100nM). The receptor-interacting TIF2.1 domain of the p160 coactivator TIF2, which interacts with the EF domain of ER α in the presence of E2, was used as a positive control.

C, D. Functionality of the bacterially-expressed GST-C was tested in a GST pulldown assay using *in vitro* translated ER α (C) or in EMSA using a consensus ERE DNA probe (D).

E. Functionality of the GST-AB fusion was tested in a pulldown assay using the *in vitro*-translated AF1 specific coactivator p68.

F. The striatin and TIF2.1 binding surface on ER α partially overlap. Interaction of *in vitro* translated Striatin or TIF2.1 with helix 3 was further probed using GST-EF fusions of ER α point mutants T347A, I352T, H356R, N359S, and K362Q.

Figure 3: Mapping of the estrogen receptor interacting domain in striatin.**A. Functional domains present in wt striatin and deletion mutant derivatives.**

Striatin contains, from N-ter to C-ter, a caveolin-binding, a coiled-coil region, a calmodulin-binding domain, a putative NR interacting motif (VxxLL) and a putative PP2A A/C heterodimer binding domain. Finally, a WD-repeat domain is present in the C-terminal half of the protein. Deletion mutants used in this study are shown.

B. The STRN ER-interacting domain does not overlap with the caveolin-binding domain, the coiled-coil, the calmodulin-binding or the WD-repeat domain. GST pulldown assays were performed using GST, GST-AB and GST-EF with or without E2 (100 nM), ICI182,780 (100 nM). Wt striatin or deletion mutants Δ CC (deletion of the caveolin binding and coiled-coil domains), Δ CCC (additional deletion of the calmodulin-binding domain), Δ C,WD (deletion of the caveolin-binding and the WD domain), Δ CC,WD (Δ CC mutant carrying a deletion of the WD domain), Δ CCC,WD (Δ CCC mutant carrying a deletion of the WD domain) were *in vitro* translated. TIF2.1 was used as a positive control.

C. Functionality of the calmodulin-binding domain was verified in a calmodulin-binding assay. *In vitro* translated Δ CC and Δ CCC STRN mutants were incubated with calmodulin-sepharose in the absence or presence of 2 mM Ca^{2+} , and bound proteins were separated by SDS-PAGE.

Figure 4: The STRN-ERID interacts with the EF region of ER α in a hormone-dependent manner that does not necessitate the VRALL and the putative PP2A interacting domain motifs.

GST-STRN(ERID) and mutants deleted from the VRALL motif (Δ VRALL) or from the putative PP2A interacting domain (Δ PP2A) were incubated with *in vitro* translated wt ER α or with mutants CDEF (deletion of the AB region), ER Δ H12 (deletion of helix H12) and ER(K302-303A) in the absence or presence of estradiol (E2, 100 nM).

Figure 5: Striatin and ER α interact *in vivo*.

A. Striatin and ER α co-immunoprecipitate in HeLa cells. HeLa cells were electroporated with ER α expression vector pSG5-HEG0 or with the empty parental vector pSG5. Cells were stimulated with or without E2 (10 nM) for 24 h and nuclear protein extracts (N.E.) were prepared. Endogenous Striatin was immunoprecipitated with an anti-striatin antibody (BD) and precipitated proteins were revealed with anti-Striatin (BD) or anti-ER α (B10) antibodies.

B. Endogenous striatin and ER α co-immunoprecipitate in MCF7 cells. MCF7 were stimulated for 2 h with E2 (10 nM) and whole cell extracts (WCE) were done. IP were performed using anti-ER α (HC20) or rabbit IgG as a negative control, and proteins were revealed with anti-striatin (UBI) or anti-ER α (F3A6) antibodies.

C. Immunoprecipitation from MCF7 cells using an anti-STRN (BD) or mouse IgG (Sigma), followed by western analysis of bound proteins using anti-STRN (UBI) or anti-ER α (B10).

Figure 6: Striatin depletion in MCF7 prevents non-genomic activation of MAPK by estradiol.

A-B. Individual duplexes or pools of siRNAs specific for striatin decrease its expression at the mRNA (**A**) and the protein levels (**B**). MCF7 cells were transfected with 100 pmole of each individual duplex (1 to 4) or 100 pmole of a pool of the four duplexes for 60 h using the DharmaFect1 transfection reagent. Pooled siRNA (100 pmole) for GAPDH were used as a negative control. STRN, GAPDH and β -actin mRNA expression were determined by RT-PCR. Proteins were extracted using TRIzol and STR and β -actin expression were monitored by western-blot assay using anti-striatin (UBI) or anti- β -actin (Sigma) antibodies.

C. Zinedin expression is not affected by transfection of STRN-specific siRNA pools (50 or 100 pmoles) in MCF7 cells. Note that SG2NA was not detected in our conditions.


D. Striatin depletion prevents rapid MAPK activation by estradiol. STRN-specific siRNA duplex 4 or an off-target siRNA directed against luciferase (100 pmoles) was transfected in MCF7. Medium was changed at 60 h post-transfection and replaced by serum-free medium. After serum deprivation for 2 h, cells were stimulated with or without E2 (10 nM) for 30 min. Stimulation was ended by adding TRIzol and proteins were extracted as described in the Material and Methods section. Western blot assays were conducted using anti-phosphoERK1/2, total ERK1/2 (Cell Signaling), STRN (UBI) or β -actin (Sigma) antibodies.

FOONOTES

Supported by operating grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to SM (MT-13147; IC1-70246). SM holds the CIBC Breast Cancer Research Chair at Université de Montréal, and is a Senior Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). WR and GM were supported by fellowships from the Montreal Center for Experimental Therapeutics in Cancer–CIHR training program. WR was also supported by fellowships from the Faculté des Etudes Supérieures de l'Université de Montréal (FES).

Person to receive reprint requests: Sylvie Mader, Département de Biochimie, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

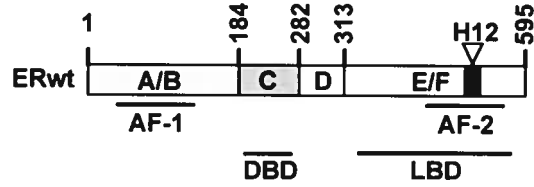
Tel: 514 343 6111 ext 15173; Fax: 514 343 2210; email:



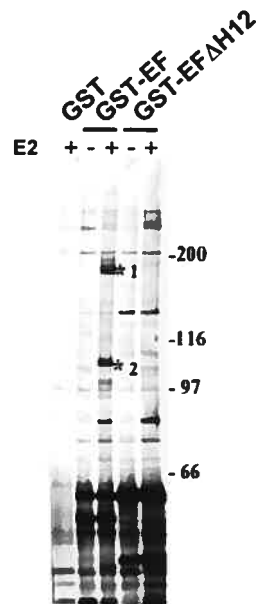
ACKNOWLEDGMENTS

We thank Samuel Chagnon and Zhi Li for technical assistance as well as Pr. Pierre Chambon for anti-ER α antibodies.

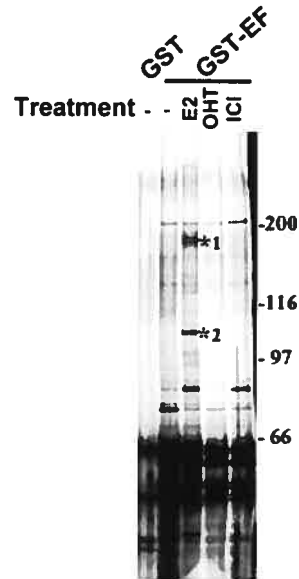
A



B



C



D

MS/MS peptides

1 AIB1 11 peptides

SRC1 1 peptide

2 STRN 11 peptides

KGLGPLAEAAAAGDAAAAGAAR,

RVISHPTLPISITAHEDR,

KSELTDSASVLDNFK,

KGYTSIFNMETQQR,

KKSTSLDVEPIYTFR,

KGYTSIFNM*ETQQR,

KSTSLDVEPIYTFR,

KSVIDTSTIVRK,

KSVIDTSTIVR,

RIWNLESK,

KMWNLQK

E

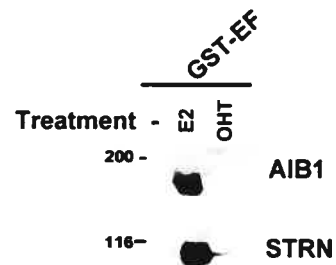


Figure 1 : Striatin interacts with the EF region of ER α in a hormone-dependent manner

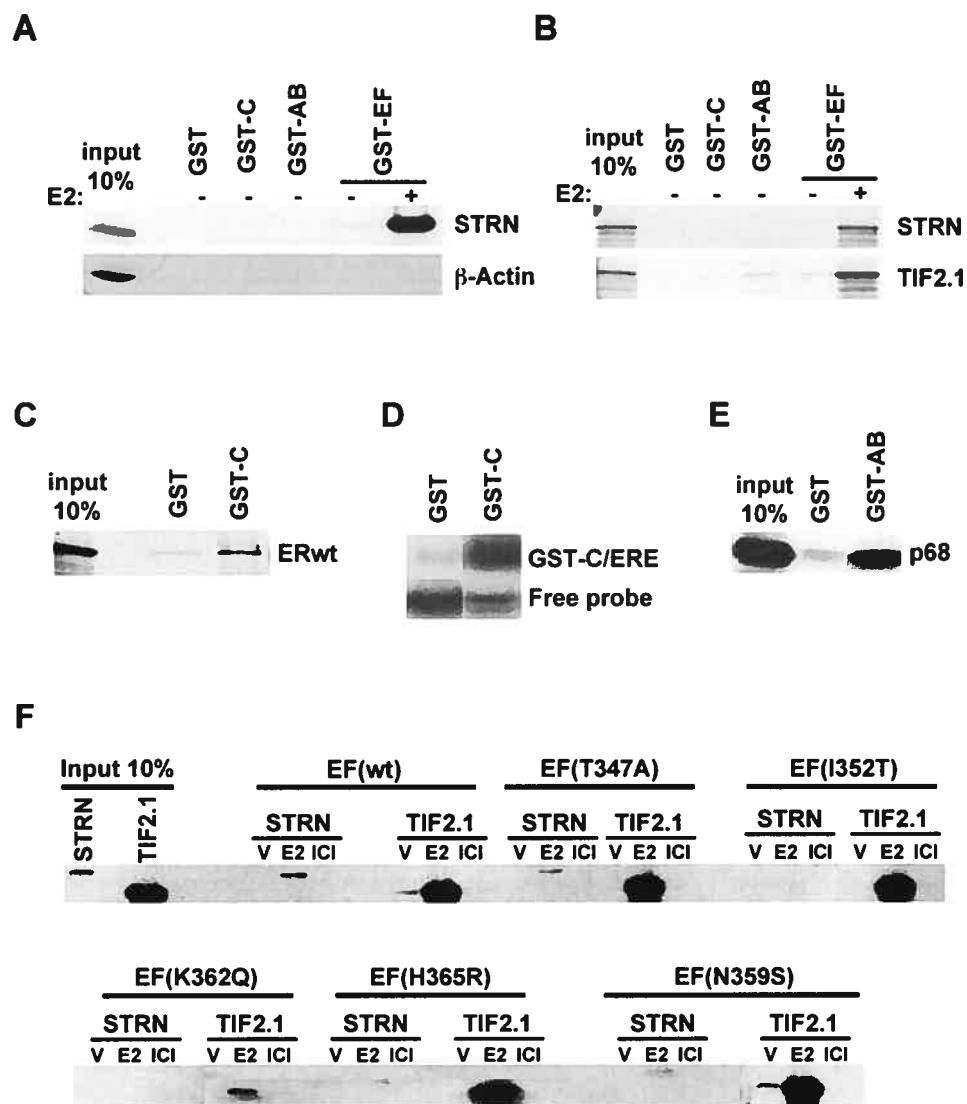


Figure 2 : The EF domain of ER α is the main striatin-interacting domain *in vitro*.

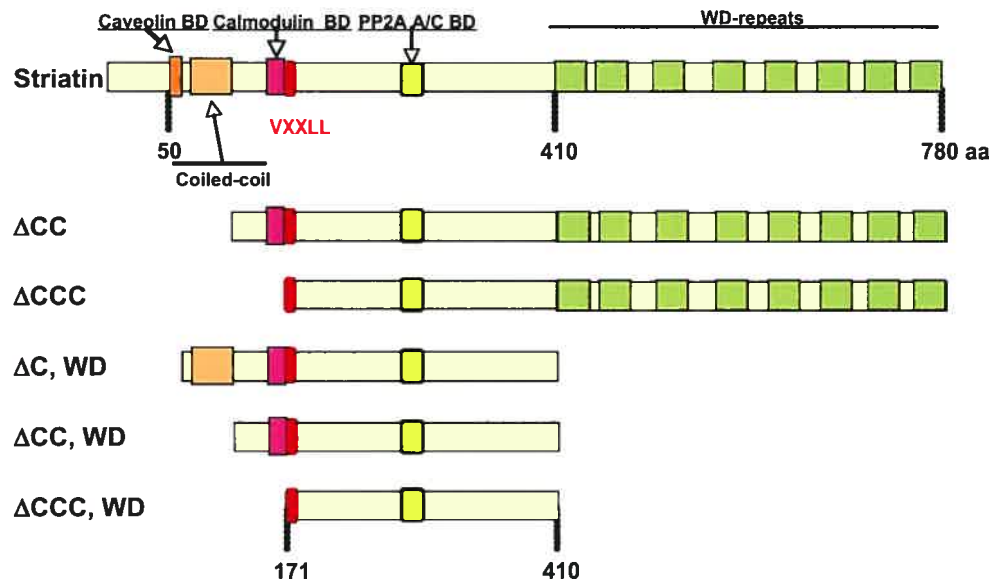


Figure 3A: Mapping of the estrogen receptor interacting domain in striatin

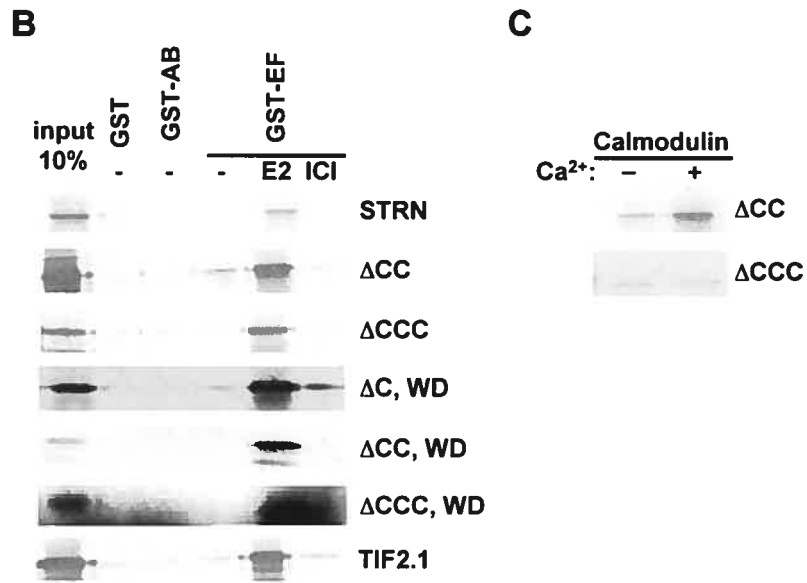


Figure 3B, C: Mapping of the estrogen receptor interacting domain in striatin

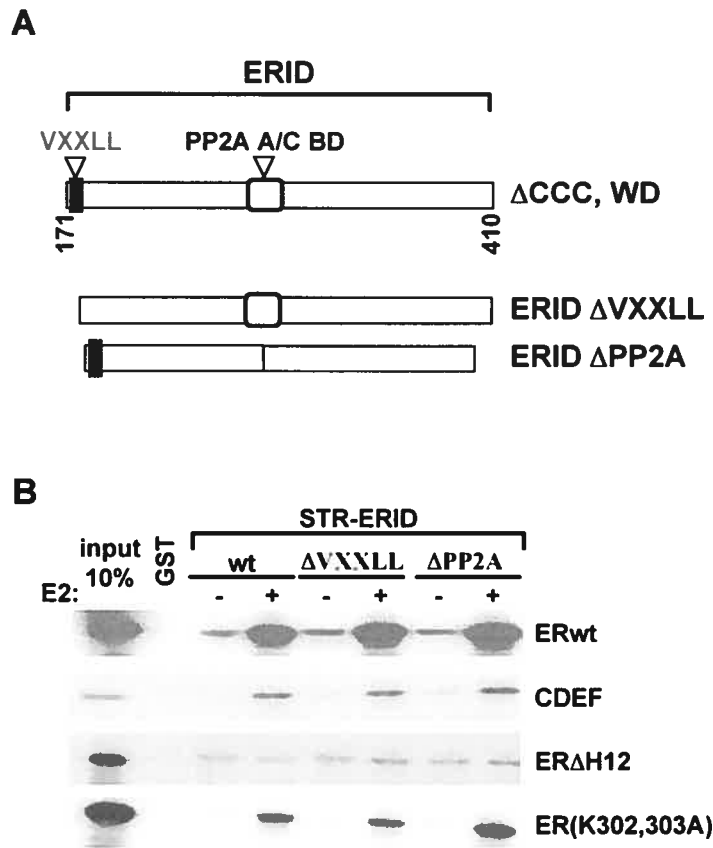


Figure 4: The STRN-ERID interacts with the EF region of ER α in a hormone-dependent manner that does not necessitate the VRALL and the putative PP2A interacting domain motifs

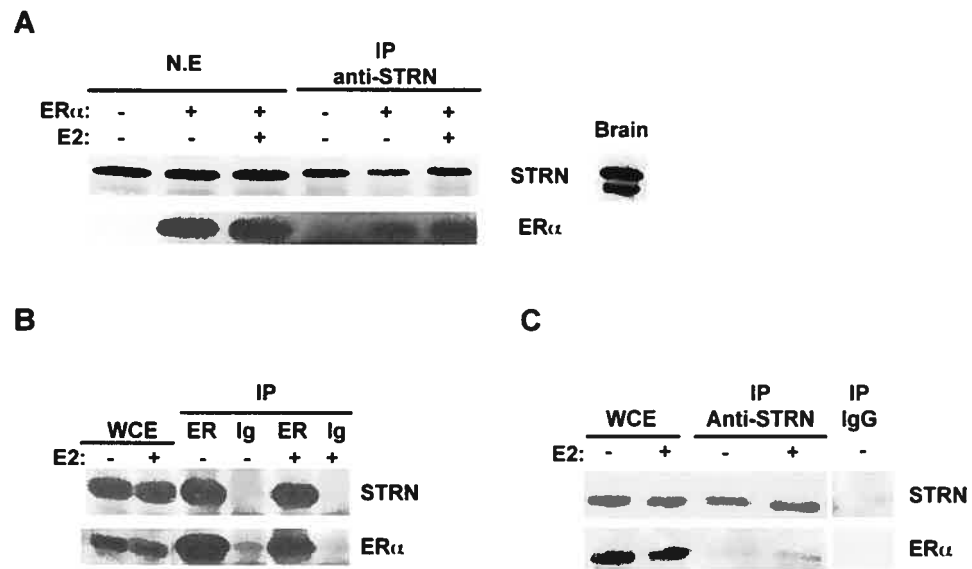


Figure 5: Striatin and ER α interact *in vivo*.

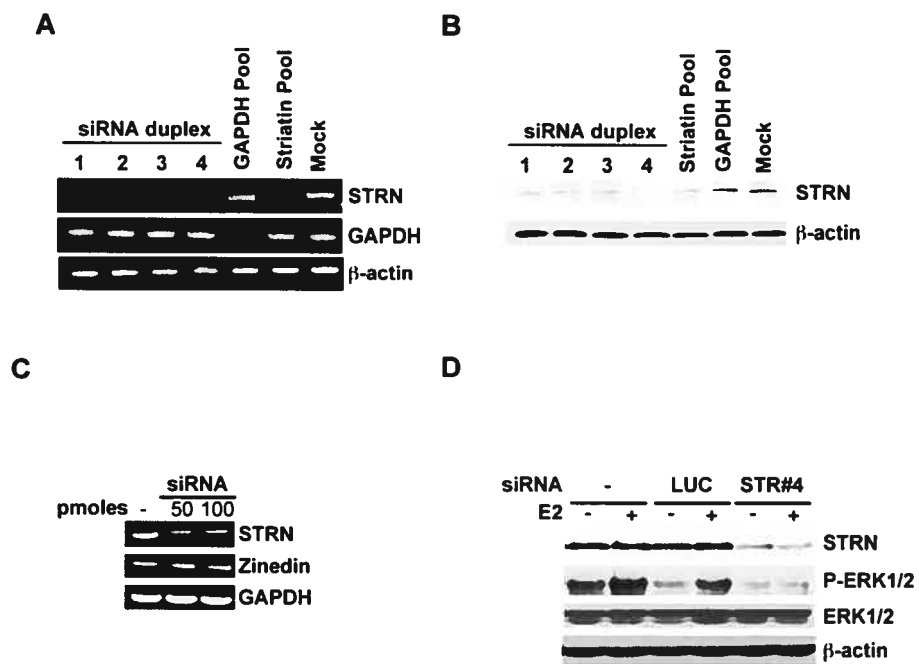


Figure 6: Striatin depletion in MCF7 prevents non-genomic activation of MAPK by estradiol.

DISCUSSION

L'étude des récepteurs des œstrogènes a permis non seulement de mieux comprendre leurs mécanismes de régulation de l'expression des gènes, mais aussi de découvrir d'autres modes d'action et niveaux de régulation pouvant jouer un rôle dans les fonctions physiologiques normales et pathologiques des œstrogènes. Une étude plus poussée des mécanismes d'action des HDACi pourrait ainsi permettre de mieux comprendre les mécanismes potentiels d'une perte de l'expression du ER α lors de la tumorigénèse, et de déterminer si les HDACi représentent un traitement thérapeutique d'intérêt pour les traitements du cancer du sein. De plus, la caractérisation du rôle du complexe striatin-ER α dans la signalisation par les œstrogènes et celle de la fonction physiologique générale de striatin permettra de déterminer le rôle potentiel de cette protéine dans la stimulation de la croissance des cellules mammaires par les œstrogènes et comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement du cancer du sein.

1. MÉCANISMES DE LA RÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE ER α PAR LES HDACI

Ayant pour but de clarifier l'effet des HDACi, notamment TSA et NaBu sur l'activité transcriptionnelle de ER, nous avons utilisé des cellules endométriales humaines Ishikawa qui expriment de façon endogène ER α et β . Nous avons constaté que TSA et NaBu inhibent la transcription dépendante de ER que ce soit au niveau d'un promoteur minimal artificiel épisomal ou d'un gène cible endogène, *ALPPL2*. Nous avons démontré de plus que l'action antiœstrogénique de TSA et NaBu repose sur l'inhibition transcriptionnelle de l'expression d'ER α . La propriété d'inhibition de la transcription de TSA et NaBu est un mécanisme spécifique au gène *ESR1* car nous avons mis en évidence que TSA et NaBu ne répriment pas l'expression du GR ou de gènes de ménage.

En ce qui concerne les mécanismes de cette répression de l'expression du ER α , nous avons démontré que la diminution rapide de l'expression d'ER α est au moins en partie un effet direct de ces composés, puisque cette répression est aussi observée en présence d'inhibiteurs de la traduction comme la

cycloheximide, la puromycine et l'anisomycine. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Reid *et al.* dans les cellules MCF7 [220], mais sont compatibles avec ceux décrits dans ces mêmes cellules dans d'autres études [222, 223]. La répression se produit au niveau transcriptionnel car elle est inhibée par un traitement à l'actinomycine D et correspond à une inhibition du recrutement de l'ARN polymérase II sur les régions promotrices A,B,C dans les cellules Ishikawa (données non montrées). En outre, cet effet ne se cantonne pas à un seul type cellulaire car l'activité de A,B,C et du promoteur F situé à -115 kb, est aussi diminuée dans les cellules MCF7, suggérant un mécanisme d'inhibition commun pouvant s'étendre sur une région relativement longue d'ADN génomique. Enfin, le pouvoir inhibiteur de TSA et NaBu sur l'expression de A,B,C dans les cellules Ishikawa corrèle avec l'induction d'une conformation fermée de la chromatine : la preuve en est l'hypercétylation des histones H3 et H4 induite à 6 H de traitement. Nos résultats aboutissent donc à un paradoxe : les HDACi induisent une hyperacétylation globale des histones (observable pendant 16 h quand 300 nM de TSA est utilisée, article 1, fig. 2C) qui devrait s'observer au niveau des promoteurs d'ER α . Or, nous constatons le contraire. Ces résultats pourraient cependant s'expliquer par une action des HDACi sur un substrat autre que les histones elles-mêmes, conduisant à l'inactivation d'un activateur transcriptionnel ou à l'activation d'un inhibiteur transcriptionnel.

1.1 RÉPRESSION DE L'EXPRESSION D'ER α PAR INHIBITION D'UN ACTIVATEUR TRANSCRIPTIONNEL

Une hypothèse permettant d'expliquer l'inhibition de l'expression d'ER α dans les cellules Ishikawa pourrait être la diminution de l'interaction d'un facteur de transcription avec son élément de réponse ou de son activité. Bien qu'il soit possible que le facteur de transcription responsable ne soit pas encore identifié, nous pouvons discuter de l'effet potentiel des HDACi sur l'activité des facteurs de transcription connus pour interagir avec les promoteurs A-B-C, soient les facteurs AP-1, FOXO3a, AP-2 γ et E2F [183-185, 224]. Au préalable, il serait judicieux d'utiliser la région A,B,C comme promoteur rapporteur et de comparer

son activité transcriptionnelle dans les cellules MCF7 ou Ishikawa en présence de HDACi.

Jun, composante du complexe AP1, est la cible d'une acétylation inhibitrice au niveau d'un résidu lysine de son DBD. Ceci serait catalysé par l'activité HAT de p300 en présence de l'oncogène viral E1A entraînant la diminution de l'expression du gène de la *COLLAGENASE* [225]. Il est possible que le traitement avec TSA ou NaBu, augmente la concentration en Jun acétylé et inhibe ainsi l'expression d'ER α . Pour vérifier cette hypothèse, la présence de Jun sur la région promotrice à -3 kb sera d'abord confirmée *in vivo* par immunoprécipitation de chromatine. La perte de la liaison de Jun et sa modification par acétylation suite à un traitement par des HDACi dans les cellules Ishikawa ou MCF7 devront ensuite être démontrées.

ER α ne semble pas être le seul gène contrôlé par AP1 qui connaît une régulation négative par TSA. La transcription du gène de la cyclooxygénase *COX-2* est inhibé en présence de TSA et SAHA. La raison en est l'inhibition de l'expression de *C-JUN* par la perte de la formation du complexe d'initiation de la transcription au niveau de son promoteur [226]. Les auteurs de cette étude démontrent également que *CYCLIN-D1* et *COLLAGENASE*, deux cibles d'AP1 sont inhibées en présence de TSA. Ceci étant, ce mécanisme d'inhibition transcriptionnelle semble *a priori* incompatible avec nos résultats où la traduction protéique ne serait pas requise.

En ce qui concerne les autres facteurs plusieurs mécanismes pourraient conduire à l'abolition de leur recrutement sur la région promotrice A,B,C. En effet, l'acétylation des facteurs FOXO est un mécanisme de régulation de leur activité. La fonction d'activation de la transcription de FOXO4 est diminuée par l'acétylation induite par p300 [227]. De plus, FOXO1 est la cible d'une acétylation par CBP qui inhiberait son affinité pour son élément de réponse au niveau des promoteurs cibles [228] et d'une acétylation par p300 qui inhiberait ses fonctions d'activation [229]. Cependant, la désacétylation des membres de la famille FOXO a été attribuée aux HDAC de type III ou sirtuines (insensibles à NaBu et TSA) [230]. Il reste possible que les HDAC de type I et II aient aussi un rôle à jouer dans la désacétylation de FOXO3a. Leur inhibition par TSA et ou NaBu augmenterait donc l'acétylation de FOXO3a et inhiberait l'expression

d'ER α . L'impact des HDACi sur le degré d'interaction de FOXO3a avec la région promotrice A,B,C *in vivo* serait donc à déterminer par immunoprécipitation de la chromatine, et leur effet sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3a pourrait être déterminé grâce à un vecteur rapporteur pour Gal4-FOXO3a.

Il a été aussi démontré dans les cellules MCF7 ER⁺ qu'un complexe formé du répresseur Rb (Retinoblastoma), de E2F4 et 5, de HDAC1, de l'histone méthyle-transférase SUV39H1 et de p300 se trouvait au niveau du promoteur A qui contient deux sites de liaison potentiels du facteur E2F [224]. Si aucune acétylation de E2F4/5 n'a été mise en évidence [231], il a été rapporté que TSA entraîne la dégradation du co-intégrateur p300 après un traitement relativement long (16 H) dans les cellules HeLa [232]. A noter, p300 interagit aussi avec de nombreux facteurs de transcription dont AP1 et FOXO3a [230, 233]. Il faut cependant noter que nous voyons dès 6 H une diminution importante de l'expression d'ER α dans les cellules Ishikawa. Il serait donc nécessaire de faire des cinétiques de dégradation de p300 dans les cellules Ishikawa et MCF7, et de détecter en parallèle la perte de son association avec la région promotrice A,B,C. Finalement, il demeure possible que le recrutement d'une HDAC au niveau des régions promotrices d'ESR1 participe à l'activation transcriptionnelle de manière directe. Dans ce sens, il a été répertorié que les complexes protéiques SWI/SNF et NURD, impliqués dans la mobilité des nucléosomes, coprécipitent avec HDAC2 et seraient impliqués tant dans l'activation que dans la répression transcriptionnelle [234, 235]. En outre, il a été rapporté que certains facteurs de transcription requièrent une activité HDAC : STAT1 et STAT2 interagissent avec HDAC1 entraînant la désacétylation de H4 au niveau du promoteur de *IGS54* en réponse à l'interféron. TSA et la dégradation spécifique de HDAC1 inhibent l'induction de *IGS54* qui connaît une hyperacétylation de H4 au niveau de son promoteur [236].

1.2. INHIBITION DE L'EXPRESSION ET RECRUTEMENT D'UN COMPLEXE RÉPRESSEUR

1.2.1 Recrutement de facteurs de répression

Nos résultats démontrent une hypoacétylation du promoteur après 6 H de traitement. En revanche, il est possible qu'une hyperacétylation transitoire ait lieu dans des temps plus courts, induite possiblement par les facteurs de transcription en présence; par exemple, AP-1 qui a la capacité de recruter les HAT CBP/p300 [233]. Une cinétique d'acétylation du promoteur analysée par immunoprécipitation de la chromatine permettrait de vérifier une telle hypothèse. Une décondensation chromatinienne même aiguë du promoteur pourrait favoriser l'accès à un ou plusieurs répresseurs. Il a été de plus rapporté qu'en parallèle de la voie classique de répression dépendante des HDAC, il existe des voies alternatives indépendantes de celles-ci.

La protéine Rb est impliquée dans la régulation négative de la prolifération cellulaire en recrutant les HDAC I et II sur le facteur de transcription E2F, responsable entre autres de l'expression de l'ADN polymérase α [237]. Fait à souligner, Siddiqui *et al.* ont mis en évidence que si l'inhibition de l'expression de TS (thymidilate synthase) induite par Rb est contrecarrée par TSA, il n'en est rien de l'inhibition de la cycline A [238]. Les auteurs démontrent de façon élégante que la transfection d'un dominant négatif de Brg1, composant du complexe SWI/SNF restaure l'expression de cycline A indiquant qu'un mouvement des nucléosomes est impliqué dans la répression. Ainsi, l'expression d'ER α , potentiellement modulée par un complexe Rb/E2F4-5 [224], pourrait connaître un mécanisme similaire.

Enfin signalons qu'une étude récente de Meloni *et al.* relate que Rb est capable de recruter le corépresseur CtBP (COOH terminal binding protein) qui à son tour inhibe l'activité HAT de CBP [239]. En outre, Koipally *et al.* (réf) ont mis en évidence que dans le cas de la corépression induite par Ikaros et Rb, CtBP pouvait également interagir avec TBP (TATA-binding protein) et TFIIB, deux composants de la machinerie transcriptionnelle de base. Ceci serait impliqué dans l'inhibition de l'expression indépendante des HDAC. Rappelons que nos résultats

démontrent une diminution de recrutement de l'ARN polymérase II (6 H de traitement avec TSA; résultats non montrés) compatible avec les différentes hypothèses avancées.

1.2.2. Méthylation du promoteur d'ER α

L'inhibition de l'expression d'ER α dans les cellules ER $^+$ semble être corrélée à une méthylation des îlots CpG. Aussi le traitement de ces cellules avec un inhibiteur des DNMT (DNA méthyle-transférases) restaure-t-il, même partiellement l'expression d'ER α . En effet, un gain d'expression est observée quand des HDACi sont utilisés en cotraitement. Ceci est sans doute dû à la présence sur le promoteur A des DNMT1&3b, des protéines MBD1&2 et MeCP2 impliqués dans la reconnaissance des îlots méthylés, et de HDAC1 [240]. La répression par le biais de DNMT1 et MeCP2 passe par le recrutement des HDAC, expliquant l'effet synergique des deux types d'inhibiteur [241-243]. Puis, il a été mis en évidence que l'ablation de DNMT1 par siRNA permet la réexpression d'ER α dans les cellules MDA-MB-231 [244]. Enfin le traitement des cellules MCF7 par l'acide valproïque entraîne un recrutement sur le promoteur A de MeCP2, signe potentiel d'une méthylation du promoteur [220].

Une analyse de la méthylation des îlots CpG de la région promotrice A, B,C dans les cellules Ishikawa en réponse à TSA ou NaBu serait profitable afin de déterminer le mécanisme de répression qui devrait être indépendant des HDAC de type I et II. Aussi, une interaction entre les MBD/MeCP2 et les HDAC de type III n'a-t-elle jamais été rapportée et pourrait expliquer une déacétylation de la région promotrice A,B,C en présence de TSA et NaBu. En outre, Reid *et al.* ont observé que l'addition du sirtinol, inhibiteur des sirtuines, prévient dans un premier temps l'inhibition induite par TSA bien qu'étant inhibiteur à lui seul quand utilisé plus longuement [220]. Ces résultats indiquent cependant que toutes les classes de HDAC sont requises pour l'expression d'ER α .

1.3. IDENTIFICATION DE(S) PROTÉINE(S) HDACs JOUANT UN RÔLE DANS L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DU ER α .

L'inhibition de l'expression d'ER α par les HDACi démontre la nécessité d'une ou plusieurs HDAC de type I ou II dans la transcription du gène ESR1. Nous avons montré par RT-PCR semi quantitative que les ARNm des HDAC1-10 étaient exprimés dans les cellules Ishikawa indiquant dix cibles potentielles. Les différents inhibiteurs de HDAC présentent une certaine sélectivité. Ainsi, NaBu n'inhibe pas HDAC6 et l'acide valproïque semble moins efficace sur les HDAC6 et 10 [245, 246]. De plus, l'acide valproïque régule négativement l'expression d'ER α dans les cellules mammaires MCF7 et ZR75 [220], indiquant conjointement à nos résultats que HDAC6 et 10 sembleraient moins requis. Une approche par siRNA devrait nous permettre d'identifier la ou les HDAC principales impliquées. Il est à noter que HDAC1 a été retrouvé, quoique faiblement, sur le promoteur A d'ER α dans les cellules MCF7 [240].

2. UTILISATION DES HDACI COMME TRAITEMENT POTENTIEL DANS LE CANCER DU SEIN

Deux tiers des tumeurs expriment ER α et sont dépendants des oestrogènes pour leur prolifération. Très tôt, il a été constaté que l'ovariectomie réduisait la croissance des tumeurs mammaires et représentait alors avec la résection chirurgicale le seul traitement disponible. Le clonage de ER α et la caractérisation de ses multiples fonctions, dans la physiopathologie de l'appareil reproducteur femelle et particulièrement des glandes mammaires, ont permis d'ouvrir la voie des thérapies anti-hormonales.

Ainsi le tamoxifène ou son métabolite actif le 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) est la molécule la plus employé dans le traitement des tumeurs mammaires. Non seulement le 4-OHT entre en compétition avec E2 pour la liaison au LBD, il entraîne également un changement de conformation de ce dernier, inhibant la liaison des coactivateurs de type p160 au niveau d'AF-2 [247].

Des essais cliniques sont en cours afin de valider les HDACi comme traitements anti-tumoraux. Ainsi l'acide valproïque, qui est utilisée depuis plus de vingt ans dans le traitement de l'épilepsie, est actuellement testée. De nombreux autres HDACi en essais semblent être prometteurs dans le traitement des tumeurs solides ou des leucémies résistants aux thérapies courantes [248].

Les HDACi induisent la différenciation, l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des cellules humaines transformées en culture et inhibent la croissance des tumeurs exogreffes dans les souris athymiques [246]. De plus, TSA et l'acide valproïque bloquent l'angiogénèse *in vivo*.

L'utilisation des HDACi pourrait être une bonne alternative dans le traitement des tumeurs mammaires exprimant ER α . En effet, l'inhibition de l'expression d'ER α au niveau transcriptionnel serait une alternative. Dans ce sens, il a été rapporté que la déplétion des cellules MCF7 en ER α par siRNA inhibe leur prolifération[218]. De plus, la résistance au 4-OHT, impliquant l'apparition de mutant de ER α activant constitutivement ER α ou lui permettant d'être stimulé positivement par le 4-OHT, pourrait être contournée par abolition de l'expression du protagoniste ER α [247]. Enfin, il a été rapporté que les aromatasases permettant de convertir les androgènes en E2 au niveaux des tumeurs mammaires (post-ménopause), peuvent être inhibée par les HDACi dans des lignées cellulaires [249]. Ceci permettrait un double verrouillage de l'activité de ER α en bloquant le ligand et le récepteur. Enfin, signalons que les HDACi entraînent la dégradation de cycline-D1 surexprimé dans près de 50% des tumeurs et régulée dans son expression positivement par ER α [218].

3. STRIATIN UN FACTEUR DE PROGRESSION DES TUMEURS MAMMAIRES DEPENDANTES DES OESTROGENES

L'implication de ER α dans la stimulation de la croissance des tumeurs mammaires sous l'effet de E2 est un fait établi. Afin de mieux comprendre la tumorigénèse induite par ER α , une kyrielle de cofacteurs a été mise à jour. Dans ce sens, nous avons entrepris de procéder à un criblage de cofacteurs potentiels recrutés au niveau du LBD d'ER α en présence d'E2. Une approche par GST-pulldown a été choisie car cette technique quoique *in vitro* est relativement simple et permet l'isolement de complexes protéiques. Le complexe DRIP/TRAP a été identifié de cette manière corétention protéique utilisant le LBD de VDR, TR et ER α / β [129, 250, 251].

Ainsi en utilisant des extraits nucléaires de cellules HeLa, nous avons identifié striatin (STRN) qui interagit avec le LBD de ER α en présence de E2 et non des antioestrogènes 4-OHT et ICI182,780. La région AF2 de ER α est nécessaire, la délétion de l'hélice H12 abolissant l'interaction tant de STRN que d'AIB1 un coactivateur de type p160.

STRN a été décrite comme une sous-unité B de la protéine phosphatase PP2A spécifique des résidus sérine et thréonine [252]. STRN favoriserait à la seule déphosphorylation préférentielle de Mob1 [253]. De façon intéressante, STRN présente toutes les caractéristiques d'une protéine adaptatrice (Article 2, Fig. 3A) : un domaine de liaison de la cavéoline, un domaine coiled-coil, un domaine de liaison de la calmoduline et un domaine WD-repeat. Elle appartient à une famille de trois membres qui comprend SG2NA et Zinedin dont l'organisation des domaines fonctionnels est semblable [254]. Nous avons testé différents mutants de délétion de STR et démontré qu'aucun des domaines énoncés ci-haut ne modifie son interaction avec le LBD d'ER α en présence de E2. De plus ni la délétion d'un motif VXXLL (pouvant jouer le rôle d'un motif LXXLL), ni la délétion du domaine hypothétique de recrutement de PP2A

n'abolit l'interaction indiquant que STRN lie ER par un motif inconnu et ou par l'intermédiaire d'un autre facteur.

Enfin, nous avons utilisé une stratégie par siRNA afin de diminuer spécifiquement le contenu cellulaire en STRN et de déterminer la fonction d'une telle interaction. Ainsi, l'ablation de STRN n'a pas d'effet sur la transactivation d'ER α sur des gènes cibles endogènes dans les cellules MCF7. La distribution membranaire, périnucléaire et quelque peu nucléaire de STR et ses caractéristiques de molécules adaptatrice, nous ont laissé penser que celle-ci pouvait avoir un rôle à jouer dans les voies non génomiques activées par ER α . En effet, la diminution de l'expression de la protéine STR abolit l'activation de ERK1/2 en présence d'E2. L'activation de ERK1/2 par E2 dans les cellules MCF7, conduit à la prolifération cellulaire. Aussi la caractérisation du complexe STR-ER α et l'étude de l'implication de STRN dans les voies de signalisations oestrogéniques permettront de clarifier son rôle dans la croissance des cellules tumorales mammaires.

3.1. CARACTÉRISATION DU COMPLEXE STRN-ER α

Nous avons démontré une interaction *in vitro* entre le domaine central de STRN et la région EF d'ER α . Celle-ci est stimulée par E2 et nécessite la présence de l'hélice H12, déterminant majeur de la fonction AF2. Il est important de noter que le caractère direct ou indirect de l'interaction ne peut pas être déterminé à partir de nos résultats. En effet, il n'est pas exclu que des protéines de réticulocytes de lapin, utilisés lors de la traduction *in vitro* de STRN et ER α puissent être des intermédiaires dans l'interaction. De plus, nous avons détecté la protéine STRN dans ces mêmes réticulocytes, suggérant que ses cofacteurs sont présents et pourraient moduler et ou favoriser l'interaction ER α -STRN (résultats non montrés).

Un point à clarifier est sans doute l'indépendance vis-à-vis de l'hormone en ce qui concerne la formation du complexe STRN-ER α *in vivo*. Plusieurs hypothèses sont à explorer : i) les conditions expérimentales (lyse, immunoprécipitation) employées ne nous permettent pas de mettre en évidence la dépendance

hormonale; ii) STRN interagit avec ER dans un même complexe par l'intermédiaire de différentes protéines qui contactent ER α en absence et en présence d'hormone.

Rappelons que STRN interagit avec la cavéoline-1 [255]. Il a été aussi mentionné qu'ER α localise à la membrane dans les caveolae et interagit avec la caveoline-1 même si deux régions d'interaction ABC et E ont été proposées [78, 256, 257]. Enfin, il a été observé par d'Acconcia *et al.* que l'E2 inhibe l'interaction entre caveoline-1 et ER α [80]. En résumé, il serait possible STR soit une protéine adaptatrice au sein d'un complexe au minimum ternaire entre ER α , caveoline-1 et un facteur X constitutivement lié à ER α . STRN interagirait de façon ping-pong entre cavéoline-1 et ce facteur X, l'E2 faisant office d'interrupteur d'interaction avec la cavéoline-1. En outre, il a été rapporté que STR et SG2NA, autre membre de la famille, coimmunoprécipitent et participerait à des complexes communs [253]. Aussi, le facteur X pourrait être SG2NA qui a la capacité de lier la calmoduline [252]. ER α interagit constitutivement avec la calmoduline [258-260]. Cependant, nos résultats semblent indiquer que le domaine de liaison de la calmoduline de STRN n'est pas nécessaire dans l'interaction avec ER α . SG2NA pourrait pallier ce défaut. En outre, l'interaction de STRN avec la caveoline-1 et la calmoduline est exclusive [255].

Une immunoprécipitation d'ER α à partir de cellules MCF7 déplétées de STRN par siRNA suivie d'analyse de type Western de cavéoline, calmoduline et SG2NA devraient nous renseigner sur la fonction de protéine d'échafaudage de STRN.

3.2. STRN PARTICIPE-T-IL À LA PROLIFÉRATION DES CELLULES MAMMAIRES ER α ⁺

De nombreuses études relatent l'implication des voies non génomiques dans la prolifération cellulaire induite par E2. Ainsi Castoria *et al.* ont démontré la participation d'un complexe entre la kinase Src et ER α dans la prolifération des cellules MCF7 [84]. En outre, Marquez et Pietras ont montré que l'administration d'un anticorps anti-ER α à des souris athymiques bloque la

croissance des tumeurs induites par l'injection sous-cutanée de cellules MCF7 [261]. *In vitro*, l'anticorps (extracellulaire) abolit l'activation de ERK1/2 et la prolifération des cellules MCF7 induite par E2. De plus, l'expression dans les cellules MCF7 d'un mutant de ER α (S522A) dont l'interaction avec la cavéoline-1 et sa localisation membranaire sont diminuée, interfère avec la fonction d'ER α . L'activation par E2 de ERK1/2 est inhibée, ainsi que l'expression de la cycline-D1 et la progression du cycle cellulaire de G1 en S [78]. Cycline-D1, surexprimé dans de nombreuses tumeurs, a d'importantes fonction dont l'inhibition de l'interaction de Rb avec E2F qui permet l'expression de gènes impliqués dans la division cellulaire, notamment l'ADN polymérase [262].

En raison de la participation de STR dans l'activation des MAPK par E2, nous développons dans le laboratoire des cellules MCF7 transfectées de façon stable avec un plasmide exprimant un shRNA inducible par la tétracycline (short hairpin RNA) dont la séquence est la même que le duplex 4 siRNA utilisé dans notre étude. Ceci devrait nous renseigner sur les effets de STRN non seulement dans la progression du cycle cellulaire en présence de E2 mais aussi dans la régulation de l'expression des gènes. Ceci sera analysé par Q-PCR (quantitative PCR) sur les nombreuses cibles de ER α que nous avons identifiées [54], mais aussi par biopuce. En effet, il a été rapporté que le promoteur du gène de la cycline D1 serait activé par l'interaction d'ER α avec un élément Sp1 [263] ou par le biais de c-Jun au niveau d'un site AP1 [264]. Ce dernier serait utile à l'expression de cycline-D1 induite par E2 et requerrait les MAPK [265]. En définitive, les biopuces seraient utiles dans l'identification gènes dont l'expression intègre les voies génomiques et non génomiques de E2.

Enfin, l'injection de telles cellules à des souris athymiques pourrait nous indiquer si STRN confère un avantage sélectif à la croissance des tumeurs *in vivo*. Si tel est le cas, la caractérisation fine du complexe ER α -STRN pourrait favoriser le design d'inhibiteur spécifique (siRNA, compétition peptidique de l'interaction).

CONCLUSION

Les voies de signalisation des oestrogènes sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques, notamment au niveau des glandes mammaires et du tractus génital féminin. L'action des oestrogènes passe par le biais du récepteur des oestrogènes, un facteur de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires. Nous avons dans une première partie mis en évidence les effets des inhibiteurs de désacétylases (HDACi) sur la régulation de l'expression génique de ER α qui est intimement reliée à dynamique chromatinienne. Nos résultats démontrent que les HDACi répriment l'expression génique sous le contrôle de ER α dans les cellules endométriales Ishikawa. La raison en est l'inhibition de l'expression du protagoniste ER α dont les promoteurs sont transcriptionnellement réprimés. Dans une deuxième étude, nous avons identifié un nouveau cofacteur de ER α , Striatin (STRN), une molécule adaptatrice. Nos résultats mettent en évidence que STRN est impliquée dans l'activation des voies non génomiques cytosoliques par l'oestradiole, en particulier la stimulation des MAPK.

Le cancer du sein est un enjeu majeur de santé publique. Les tumeurs mammaires expriment ER α dans près de 60% des cas et dépendent en majorité de l'oestradiol pour leur croissance. L'inhibition d'ER α est donc un point important en thérapie. Nos résultats apportent deux voies alternatives aux traitements classiques. En effet, l'inhibition de l'expression de ER α par les HDACi pourrait conduire à l'inhibition des voies génomiques et non génomiques de l'oestradiol.; ces dernières pouvant être éventuellement ciblées au niveau du complexe STR-ER α .

RÉFÉRENCES

1. Tata, J.R., *One hundred years of hormones*. EMBO Rep, 2005. **6**(6): p. 490-6.
2. Chambon, P., *The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(6): p. 1418-28.
3. Hollenberg, S.M., et al., *Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. Nature, 1985. **318**(6047): p. 635-41.
4. Walter, P., et al., *Cloning of the human estrogen receptor cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(23): p. 7889-93.
5. Wehling, M., *Specific, nongenomic actions of steroid hormones*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 365-93.
6. Havelock, J.C., W.E. Rainey, and B.R. Carr, *Ovarian granulosa cell lines*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **228**(1-2): p. 67-78.
7. Clarke, R., *Introduction and overview: sex steroids in the mammary gland*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. **5**(3): p. 245-50.
8. Simpson, E.R., *Sources of estrogen and their importance*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **86**(3-5): p. 225-30.
9. Curtis, S.H. and K.S. Korach, *Steroid receptor knockout models: phenotypes and responses illustrate interactions between receptor signaling pathways in vivo*. Adv Pharmacol, 2000. **47**: p. 357-80.
10. Lubahn, D.B., et al., *Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11162-6.
11. Fisher, C.R., et al., *Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6965-70.
12. Daniel, C.W., G.B. Silberstein, and P. Strickland, *Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography*. Cancer Res, 1987. **47**(22): p. 6052-7.
13. Silberstein, G.B., et al., *Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens*. Endocrinology, 1994. **134**(1): p. 84-90.
14. Porter, J.C., *Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity*. J Invest Dermatol, 1974. **63**(1): p. 85-92.
15. Warner, M.R., *Effect of perinatal oestrogen on the pretreatment required for mouse mammary lobular formation in vitro*. J Endocrinol, 1978. **77**(1): p. 1-10.
16. Frost, H.M., *On the estrogen-bone relationship and postmenopausal bone loss: A new model*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(9): p. 1473-7.
17. Kameda, T., et al., *Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts*. J Exp Med, 1997. **186**(4): p. 489-95.
18. Termine, J.D. and M. Wong, *Post-menopausal women and osteoporosis: available choices for maintenance of skeletal health*. Maturitas, 1998. **30**(3): p. 241-5.
19. Kousteni, S., et al., *Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity*. Cell, 2001. **104**(5): p. 719-30.

20. Tomkinson, A., et al., *The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(8): p. 1243-50.
21. Tomkinson, A., et al., *The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(9): p. 3128-35.
22. Guzzo, J.A., *Selective estrogen receptor modulators--a new age of estrogens in cardiovascular disease?* Clin Cardiol, 2000. **23**(1): p. 15-7.
23. Ogita, H., K. Node, and M. Kitakaze, *The role of estrogen and estrogen-related drugs in cardiovascular diseases*. Curr Drug Metab, 2003. **4**(6): p. 497-504.
24. Williams, J.K. and I. Suparto, *Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: lessons from a monkey model of postmenopausal women*. Ilar J, 2004. **45**(2): p. 139-46.
25. McHugh, N.A., et al., *Ischemia- and reperfusion-induced ventricular arrhythmias in dogs: effects of estrogen*. Am J Physiol, 1995. **268**(6 Pt 2): p. H2569-73.
26. Node, K., et al., *Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels*. Circulation, 1997. **96**(6): p. 1953-63.
27. Farhat, M.Y., et al., *Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats*. Br J Pharmacol, 1993. **110**(2): p. 719-23.
28. Douglas, P.S., et al., *Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(4): p. 1118-25.
29. Paganini-Hill, A. and V.W. Henderson, *Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease*. Arch Intern Med, 1996. **156**(19): p. 2213-7.
30. Currie, L.J., et al., *Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease*. Arch Neurol, 2004. **61**(6): p. 886-8.
31. Garcia-Segura, L.M., I. Azcoitia, and L.L. DonCarlos, *Neuroprotection by estradiol*. Prog Neurobiol, 2001. **63**(1): p. 29-60.
32. Wise, P.M., *Estrogens: protective or risk factors in brain function?* Prog Neurobiol, 2003. **69**(3): p. 181-91.
33. Amantea, D., et al., *From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens*. Pharmacol Res, 2005. **52**(2): p. 119-32.
34. Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, *Rules for making human tumor cells*. N Engl J Med, 2002. **347**(20): p. 1593-603.
35. Cavalieri, E.L., et al., *Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10937-42.
36. Russo, J. and I.H. Russo, *Genotoxicity of steroidal estrogens*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(5): p. 211-4.
37. Tsai, M.J. and B.W. O'Malley, *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 451-86.
38. Ylikomi, T., et al., *Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1998. **33**(6): p. 437-66.

39. Shang, Y., et al., *Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription*. Cell, 2000. **103**(6): p. 843-52.
40. Xu, L., C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld, *Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(2): p. 140-7.
41. Robyr, D., A.P. Wolffe, and W. Wahli, *Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(3): p. 329-47.
42. Robyr, D. and P. Wolffe, *Hormone action and chromatin remodelling*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(2): p. 113-24.
43. Kuiper, G.G., et al., *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5925-30.
44. Mosselman, S., J. Polman, and R. Dijkema, *ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. FEBS Lett, 1996. **392**(1): p. 49-53.
45. Enmark, E., et al., *Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4258-65.
46. Kuiper, G.G., et al., *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 863-70.
47. Pettersson, K., et al., *Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(10): p. 1486-96.
48. Kregel, J.H., et al., *Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15677-82.
49. Koehler, K.F., et al., *Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 465-78.
50. Sanchez, R., et al., *Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors*. Bioessays, 2002. **24**(3): p. 244-54.
51. Inoue, S., et al., *Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11117-21.
52. Watanabe, T., et al., *Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 442-9.
53. Ikeda, K., et al., *Promoter analysis and chromosomal mapping of human EBAG9 gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(2): p. 654-60.
54. Bourdeau, V., et al., *Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(6): p. 1411-27.
55. Kamalakaran, S., S.K. Radhakrishnan, and W.T. Beck, *Identification of estrogen-responsive genes using a genome-wide analysis of promoter elements for transcription factor binding sites*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21491-7.
56. Jin, V.X., et al., *Identifying estrogen receptor alpha target genes using integrated computational genomics and chromatin immunoprecipitation microarray*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(22): p. 6627-35.

57. Carroll, J.S., et al., *Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1*. Cell, 2005. **122**(1): p. 33-43.
58. Laganier, J., et al., *From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(33): p. 11651-6.
59. Porter, W., et al., *Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(11): p. 1569-80.
60. Safe, S., *Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions*. Vitam Horm, 2001. **62**: p. 231-52.
61. Saville, B., et al., *Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5379-87.
62. Stoner, M., et al., *Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins*. Oncogene, 2004. **23**(5): p. 1052-63.
63. Gaub, M.P., et al., *Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1267-76.
64. Umayahara, Y., et al., *Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer*. J Biol Chem, 1994. **269**(23): p. 16433-42.
65. Uht, R.M., et al., *Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element*. Endocrinology, 1997. **138**(7): p. 2900-8.
66. Cheung, E., et al., *Altered pharmacology and distinct coactivator usage for estrogen receptor-dependent transcription through activating protein-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 559-64.
67. DeNardo, D.G., et al., *Global gene expression analysis of estrogen receptor transcription factor cross talk in breast cancer: identification of estrogen-induced/activator protein-1-dependent genes*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(2): p. 362-78.
68. Galien, R. and T. Garcia, *Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(12): p. 2424-9.
69. Stein, B. and M.X. Yang, *Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(9): p. 4971-9.
70. Ghisletti, S., et al., *17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 2957-68.
71. Watson, C.S., et al., *Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens*. Steroids, 2005. **70**(5-7): p. 364-71.
72. Segars, J.H. and P.H. Driggers, *Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(8): p. 349-54.

73. Pappas, T.C., B. Gametchu, and C.S. Watson, *Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding*. *Faseb J*, 1995. **9**(5): p. 404-10.
74. Norfleet, A.M., et al., *Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry*. *Endocrinology*, 1999. **140**(8): p. 3805-14.
75. Razandi, M., et al., *Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(2): p. 307-19.
76. Chambliss, K.L. and P.W. Shaul, *Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae*. *Steroids*, 2002. **67**(6): p. 413-9.
77. Razandi, M., et al., *Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers*. *Mol Endocrinol*, 2004. **18**(12): p. 2854-65.
78. Razandi, M., et al., *Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(5): p. 1633-46.
79. Song, R.X., et al., *Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation*. *Mol Endocrinol*, 2002. **16**(1): p. 116-27.
80. Acconcia, F., et al., *Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(1): p. 231-7.
81. Coleman, K.M. and C.L. Smith, *Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors*. *Front Biosci*, 2001. **6**: p. D1379-91.
82. Bjornstrom, L. and M. Sjoberg, *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(4): p. 833-42.
83. Kolch, W., *Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(11): p. 827-37.
84. Castoria, G., et al., *Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis*. *Embo J*, 1999. **18**(9): p. 2500-10.
85. Harrington, W.R., et al., *Estrogen Dendrimer Conjugates that Preferentially Activate Extranuclear, Non-Genomic versus Genomic Pathways of Estrogen Action*. *Mol Endocrinol*, 2005.
86. Migliaccio, A., et al., *Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation*. *Embo J*, 2000. **19**(20): p. 5406-17.
87. Migliaccio, A., et al., *Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells*. *Embo J*, 1996. **15**(6): p. 1292-300.
88. Wong, C.W., et al., *Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with *Src*/*Erk* phosphorylation cascade*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(23): p. 14783-8.
89. Barletta, F., et al., *Characterization of the interactions of estrogen receptor and MNAR in the activation of *cSrc**. *Mol Endocrinol*, 2004. **18**(5): p. 1096-108.

90. Song, R.X., et al., *The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2076-81.
91. Razandi, M., et al., *Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors.* J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2701-12.
92. Filardo, E.J., et al., *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, 2000. **14**(10): p. 1649-60.
93. Chambliss, K.L., et al., *Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae.* Circ Res, 2000. **87**(11): p. E44-52.
94. Goetz, R.M., et al., *Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2788-93.
95. Russell, K.S., et al., *Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release.* J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 5026-30.
96. Haynes, M.P., et al., *Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells.* Circ Res, 2000. **87**(8): p. 677-82.
97. Simoncini, T., et al., *Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase.* Nature, 2000. **407**(6803): p. 538-41.
98. Carmeci, C., et al., *Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer.* Genomics, 1997. **45**(3): p. 607-17.
99. Filardo, E.J. and P. Thomas, *GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release.* Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(8): p. 362-7.
100. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling.* Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
101. Thomas, P., et al., *Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells.* Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 624-632.
102. Berry, M., D. Metzger, and P. Chambon, *Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen.* Embo J, 1990. **9**(9): p. 2811-8.
103. Allan, G.F., et al., *Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation.* J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19513-20.
104. Barsalou, A., et al., *Estrogen response elements can mediate agonist activity of anti-estrogens in human endometrial Ishikawa cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 17138-46.
105. Shiau, A.K., et al., *The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen.* Cell, 1998. **95**(7): p. 927-37.

106. Brzozowski, A.M., et al., *Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 753-8.
107. Pike, A.C., et al., *Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen*. Structure (Camb), 2001. **9**(2): p. 145-53.
108. Onate, S.A., et al., *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. Science, 1995. **270**(5240): p. 1354-7.
109. Voegel, J.J., et al., *TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors*. Embo J, 1996. **15**(14): p. 3667-75.
110. Hong, H., et al., *GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4948-52.
111. Li, H., P.J. Gomes, and J.D. Chen, *RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8479-84.
112. Chen, H., et al., *Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300*. Cell, 1997. **90**(3): p. 569-80.
113. Torchia, J., et al., *The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 677-84.
114. Anzick, S.L., et al., *AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer*. Science, 1997. **277**(5328): p. 965-8.
115. Takeshita, A., et al., *TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27629-34.
116. Heery, D.M., et al., *A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 733-6.
117. Voegel, J.J., et al., *The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways*. Embo J, 1998. **17**(2): p. 507-19.
118. Spencer, T.E., et al., *Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase*. Nature, 1997. **389**(6647): p. 194-8.
119. Smith, C.L. and B.W. O'Malley, *Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators*. Endocr Rev, 2004. **25**(1): p. 45-71.
120. Chen, D., et al., *Regulation of transcription by a protein methyltransferase*. Science, 1999. **284**(5423): p. 2174-7.
121. Cho, H., et al., *A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5355-63.
122. Chen, D., S.M. Huang, and M.R. Stallcup, *Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 40810-6.
123. Kim, J.H., H. Li, and M.R. Stallcup, *CoCoA, a nuclear receptor coactivator which acts through an N-terminal activation domain of p160 coactivators*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1537-49.
124. Klochender-Yeivin, A., C. Muchardt, and M. Yaniv, *SWI/SNF chromatin remodeling and cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 73-9.

125. Ichinose, H., et al., *Ligand-dependent interaction between the estrogen receptor and the human homologues of SWI2/SNF2*. *Gene*, 1997. **188**(1): p. 95-100.
126. Inoue, H., et al., *Largest subunits of the human SWI/SNF chromatin-remodeling complex promote transcriptional activation by steroid hormone receptors*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(44): p. 41674-85.
127. Belandia, B., et al., *Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes*. *Embo J*, 2002. **21**(15): p. 4094-103.
128. Xu, W., et al., *A methylation-mediator complex in hormone signaling*. *Genes Dev*, 2004. **18**(2): p. 144-56.
129. Kang, Y.K., et al., *The TRAP/Mediator coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(5): p. 2642-7.
130. Rachez, C. and L.P. Freedman, *Mediator complexes and transcription*. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. **13**(3): p. 274-80.
131. Metivier, R., et al., *A dynamic structural model for estrogen receptor-alpha activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains*. *Mol Cell*, 2002. **10**(5): p. 1019-32.
132. Webb, P., et al., *Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins*. *Mol Endocrinol*, 1998. **12**(10): p. 1605-18.
133. Onate, S.A., et al., *The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(20): p. 12101-8.
134. Lanz, R.B., et al., *A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex*. *Cell*, 1999. **97**(1): p. 17-27.
135. Zhao, X., et al., *Regulation of nuclear receptor activity by a pseudouridine synthase through posttranscriptional modification of steroid receptor RNA activator*. *Mol Cell*, 2004. **15**(4): p. 549-58.
136. Endoh, H., et al., *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*, 1999. **19**(8): p. 5363-72.
137. Watanabe, M., et al., *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*, 2001. **20**(6): p. 1341-52.
138. Trowbridge, J.M., I. Rogatsky, and M.J. Garabedian, *Regulation of estrogen receptor transcriptional enhancement by the cyclin A/Cdk2 complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(19): p. 10132-7.
139. Rogatsky, I., J.M. Trowbridge, and M.J. Garabedian, *Potential of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(32): p. 22296-302.
140. Joel, P.B., A.M. Traish, and D.A. Lannigan, *Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(21): p. 13317-23.

141. Le Goff, P., et al., *Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity.* J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 4458-66.
142. Chen, D., et al., *Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7.* Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 127-37.
143. Rochette-Egly, C., et al., *Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIIH and phosphorylation by CDK7.* Cell, 1997. **90**(1): p. 97-107.
144. Chen, D., et al., *Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera.* Oncogene, 2002. **21**(32): p. 4921-31.
145. Lee, H. and W. Bai, *Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(16): p. 5835-45.
146. Ignar-Trowbridge, D.M., et al., *Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element.* Mol Endocrinol, 1993. **7**(8): p. 992-8.
147. Ignar-Trowbridge, D.M., et al., *Diethylstilbestrol stimulates persistent phosphatidylinositol lipid turnover by an estrogen receptor-mediated mechanism in immature mouse uterus.* Endocrinology, 1991. **129**(5): p. 2423-30.
148. El-Tanani, M.K. and C.D. Green, *Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor.* Mol Endocrinol, 1997. **11**(7): p. 928-37.
149. Patrone, C., et al., *Divergent pathways regulate ligand-independent activation of ER alpha in SK-N-BE neuroblastoma and COS-1 renal carcinoma cells.* Mol Endocrinol, 1998. **12**(6): p. 835-41.
150. Patrone, C., et al., *Cross-coupling between insulin and estrogen receptor in human neuroblastoma cells.* Mol Endocrinol, 1996. **10**(5): p. 499-507.
151. Karas, R.H., et al., *Growth factor activation of the estrogen receptor in vascular cells occurs via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway.* J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2851-61.
152. Ignar-Trowbridge, D.M., et al., *Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4658-62.
153. Ignar-Trowbridge, D.M., et al., *Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling systems.* Environ Health Perspect, 1995. **103 Suppl 7**: p. 35-8.
154. Ignar-Trowbridge, D.M., et al., *Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol.* Endocrinology, 1996. **137**(5): p. 1735-44.
155. Ince, B.A., M.M. Montano, and B.S. Katzenellenbogen, *Activation of transcriptionally inactive human estrogen receptors by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and ligands including antiestrogens.* Mol Endocrinol, 1994. **8**(10): p. 1397-406.
156. Power, R.F., et al., *Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors.* Science, 1991. **254**(5038): p. 1636-9.

157. Zwijsen, R.M., et al., *CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1*. Cell, 1997. **88**(3): p. 405-15.
158. Neuman, E., et al., *Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(9): p. 5338-47.
159. Lavinsky, R.M., et al., *Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2920-5.
160. Aronica, S.M. and B.S. Katzenellenbogen, *Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(6): p. 743-52.
161. Ma, Z.Q., et al., *Insulin-like growth factors activate estrogen receptor to control the growth and differentiation of the human neuroblastoma cell line SK-ER3*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(7): p. 910-8.
162. Newton, C.J., et al., *The unliganded estrogen receptor (ER) transduces growth factor signals*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1994. **48**(5-6): p. 481-6.
163. Pietras, R.J., et al., *HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells*. Oncogene, 1995. **10**(12): p. 2435-46.
164. Norris, J.D., et al., *Enhancement of estrogen receptor transcriptional activity by the coactivator GRIP-1 highlights the role of activation function 2 in determining estrogen receptor pharmacology*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6679-88.
165. Kato, S., et al., *Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase*. Science, 1995. **270**(5241): p. 1491-4.
166. Kato, S., *Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways*. Breast Cancer, 2001. **8**(1): p. 3-9.
167. Bunone, G., et al., *Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation*. Embo J, 1996. **15**(9): p. 2174-83.
168. Lu, Q., et al., *Regulation of estrogen receptor alpha-mediated transcription by a direct interaction with protein phosphatase 2A*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4639-45.
169. Smith, C.L., *Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways*. Biol Reprod, 1998. **58**(3): p. 627-32.
170. Shang, Y. and M. Brown, *Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2465-8.
171. Jepsen, K. and M.G. Rosenfeld, *Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 4): p. 689-98.
172. Fernandes, I., et al., *Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms*. Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 139-50.
173. Treuter, E., et al., *A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(6): p. 864-81.
174. Delage-Mourroux, R., et al., *Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of*

- estrogen receptor transcriptional activity by REA.* J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35848-56.
175. Kos, M., et al., *Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region.* Mol Endocrinol, 2001. **15**(12): p. 2057-63.
 176. Reid, G., et al., *Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation.* Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(5): p. 821-31.
 177. Grandien, K.F., et al., *Localization of DNase I hypersensitive sites in the human oestrogen receptor gene correlates with the transcriptional activity of two differentially used promoters.* J Mol Endocrinol, 1993. **10**(3): p. 269-77.
 178. Grandien, K., *Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue-specific, estrogen receptor-mRNA isoform.* Mol Cell Endocrinol, 1996. **116**(2): p. 207-12.
 179. Denger, S., et al., *ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins.* Mol Endocrinol, 2001. **15**(12): p. 2064-77.
 180. Flouriot, G., et al., *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, 2000. **19**(17): p. 4688-700.
 181. Metivier, R., et al., *Transcriptional complexes engaged by apo-estrogen receptor-alpha isoforms have divergent outcomes.* Embo J, 2004. **23**(18): p. 3653-66.
 182. Piccart, M.J., et al., *Evolution towards hormone independence of the MXT mouse mammary tumor is associated with a gradual change in its estrogen receptor molecular polymorphism.* Cancer Biochem Biophys, 1998. **16**(1-2): p. 169-82.
 183. Tang, Z., I. Treilleux, and M. Brown, *A transcriptional enhancer required for the differential expression of the human estrogen receptor in breast cancers.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1274-80.
 184. deConinck, E.C., L.A. McPherson, and R.J. Weigel, *Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 2191-6.
 185. Guo, S. and G.E. Sonenshein, *Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(19): p. 8681-90.
 186. Kenealy, M.R., et al., *The 3'untranslated region of the human estrogen receptor gene post-transcriptionally reduces mRNA levels.* Biochem Soc Trans, 1996. **24**(1): p. 107S.
 187. Wilson, T. and R. Treisman, *Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences.* Nature, 1988. **336**(6197): p. 396-9.
 188. Jones, T.R. and M.D. Cole, *Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of the 3' untranslated sequences.* Mol Cell Biol, 1987. **7**(12): p. 4513-21.
 189. Kenealy, M.R., et al., *The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor alpha gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover.* Endocrinology, 2000. **141**(8): p. 2805-13.

190. Robertson, J.A., et al., *Estradiol up-regulates estrogen receptor messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma (Ishikawa) cells by stabilizing the message*. J Mol Endocrinol, 2002. **29**(1): p. 125-35.
191. Keen, J.C., et al., *Protein phosphatase 2A regulates estrogen receptor alpha (ER) expression through modulation of ER mRNA stability*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29519-24.
192. Pinzone, J.J., et al., *Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(11): p. 4605-12.
193. Ottaviano, Y.L., et al., *Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells*. Cancer Res, 1994. **54**(10): p. 2552-5.
194. Lapidus, R.G., S.J. Nass, and N.E. Davidson, *The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1998. **3**(1): p. 85-94.
195. El-Osta, A., *DNMT cooperativity--the developing links between methylation, chromatin structure and cancer*. Bioessays, 2003. **25**(11): p. 1071-84.
196. Ferguson, A.T., et al., *Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression*. Cancer Res, 1995. **55**(11): p. 2279-83.
197. Mei, S., A.D. Ho, and U. Mahlknecht, *Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer (Review)*. Int J Oncol, 2004. **25**(6): p. 1509-19.
198. Khochbin, S., et al., *Functional significance of histone deacetylase diversity*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(2): p. 162-6.
199. Grozinger, C.M., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber, *Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 4868-73.
200. Imai, S., et al., *Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 795-800.
201. Zhou, X., et al., *Identification of a transcriptional repressor related to the noncatalytic domain of histone deacetylases 4 and 5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1056-61.
202. Tsuji, N., et al., *A new antifungal antibiotic, trichostatin*. J Antibiot (Tokyo), 1976. **29**(1): p. 1-6.
203. Richon, V.M., et al., *A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3003-7.
204. Itazaki, H., et al., *Isolation and structural elucidation of new cyclotrapeptides, trapoxins A and B, having detransformation activities as antitumor agents*. J Antibiot (Tokyo), 1990. **43**(12): p. 1524-32.
205. Yoshida, M., et al., *Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy*. Cancer Chemother Pharmacol, 2001. **48 Suppl 1**: p. S20-6.
206. Kelly, W.K., O.A. O'Connor, and P.A. Marks, *Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials*. Expert Opin Investig Drugs, 2002. **11**(12): p. 1695-713.

207. Van Lint, C., S. Emiliani, and E. Verdin, *The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation*. *Gene Expr*, 1996. **5**(4-5): p. 245-53.
208. Mariadason, J.M., G.A. Corner, and L.H. Augenlicht, *Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(16): p. 4561-72.
209. Chambers, A.E., et al., *Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells*. *Eur J Cancer*, 2003. **39**(8): p. 1165-75.
210. Yang, X., et al., *Transcriptional activation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition*. *Cancer Res*, 2000. **60**(24): p. 6890-4.
211. Yang, X., et al., *Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(19): p. 7025-9.
212. Chen, Z., et al., *Methylation of CpG island is not a ubiquitous mechanism for the loss of oestrogen receptor in breast cancer cells*. *Br J Cancer*, 1998. **77**(2): p. 181-5.
213. Ruh, M.F., et al., *The effects of histone acetylation on estrogen responsiveness in MCF-7 cells*. *Endocrine*, 1999. **11**(2): p. 157-64.
214. Mao, C. and D.J. Shapiro, *A histone deacetylase inhibitor potentiates estrogen receptor activation of a stably integrated vitellogenin promoter in HepG2 cells*. *Endocrinology*, 2000. **141**(7): p. 2361-9.
215. Kawai, H., et al., *Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha*. *Int J Cancer*, 2003. **107**(3): p. 353-8.
216. Jang, E.R., et al., *The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor alpha-negative breast cancer cells to tamoxifen*. *Oncogene*, 2004. **23**(9): p. 1724-36.
217. Graziani, G., et al., *Valproic acid increases the stimulatory effect of estrogens on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells*. *Endocrinology*, 2003. **144**(7): p. 2822-8.
218. Alao, J.P., et al., *Histone deacetylase inhibitor trichostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation of cyclin D1 in human breast carcinoma cell lines*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(23): p. 8094-104.
219. Margueron, R., et al., *Histone deacetylase inhibition and estrogen receptor alpha levels modulate the transcriptional activity of partial antiestrogens*. *J Mol Endocrinol*, 2004. **32**(2): p. 583-94.
220. Reid, G., et al., *Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A*. *Oncogene*, 2005. **24**(31): p. 4894-907.
221. Wang, C., et al., *Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(21): p. 18375-83.
222. Duong, V., et al., *ERalpha and ERbeta expression and transcriptional activity are differentially regulated by HDAC inhibitors*. *Oncogene*, 2005.

223. deFazio, A., et al., *Effect of sodium butyrate on estrogen receptor and epidermal growth factor receptor gene expression in human breast cancer cell lines*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 18008-12.
224. Macaluso, M., et al., *pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-p300 and pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-DNMT1 multimolecular complexes mediate the transcription of estrogen receptor-alpha in breast cancer*. Oncogene, 2003. **22**(23): p. 3511-7.
225. Vries, R.G., et al., *A specific lysine in c-Jun is required for transcriptional repression by E1A and is acetylated by p300*. Embo J, 2001. **20**(21): p. 6095-103.
226. Yamaguchi, K., et al., *Histone deacetylase inhibitors suppress the induction of c-Jun and its target genes including COX-2*. J Biol Chem, 2005. **280**(38): p. 32569-77.
227. Kobayashi, Y., et al., *SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress*. Int J Mol Med, 2005. **16**(2): p. 237-43.
228. Matsuzaki, H., et al., *Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(32): p. 11278-83.
229. Perrot, V. and M.M. Rechler, *The coactivator p300 directly acetylates the forkhead transcription factor Foxo1 and stimulates Foxo1-induced transcription*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(9): p. 2283-98.
230. Vogt, P.K., H. Jiang, and M. Aoki, *Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins*. Cell Cycle, 2005. **4**(7): p. 908-13.
231. Marzio, G., et al., *E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10887-92.
232. Li, Q., et al., *Attenuation of glucocorticoid signaling through targeted degradation of p300 via the 26S proteasome pathway*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(12): p. 2819-27.
233. Goldman, P.S., V.K. Tran, and R.H. Goodman, *The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation*. Recent Prog Horm Res, 1997. **52**: p. 103-19; discussion 119-20.
234. Sif, S., et al., *Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes*. Genes Dev, 2001. **15**(5): p. 603-18.
235. Xue, Y., et al., *NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities*. Mol Cell, 1998. **2**(6): p. 851-61.
236. Nusinzon, I. and C.M. Horvath, *Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 14742-7.
237. Pearson, B.E., H.P. Nasheuer, and T.S. Wang, *Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(4): p. 2081-95.
238. Siddiqui, H., et al., *Histone deacetylation of RB-responsive promoters: requisite for specific gene repression but dispensable for cell cycle inhibition*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7719-31.
239. Meloni, A.R., et al., *A mechanism of COOH-terminal binding protein-mediated repression*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(10): p. 575-83.

240. Sharma, D., et al., *Release of methyl CpG binding proteins and histone deacetylase 1 from the Estrogen receptor alpha (ER) promoter upon reactivation in ER-negative human breast cancer cells.* Mol Endocrinol, 2005. **19**(7): p. 1740-51.
241. Fuks, F., et al., *DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity.* Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 88-91.
242. Nan, X., et al., *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.* Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.
243. Jones, P.L., et al., *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.* Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 187-91.
244. Yan, L., et al., *Specific inhibition of DNMT1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptor-alpha (ER) in ER-negative human breast cancer cell lines.* Cancer Biol Ther, 2003. **2**(5): p. 552-6.
245. Gurvich, N., et al., *Association of valproate-induced teratogenesis with histone deacetylase inhibition in vivo.* Faseb J, 2005. **19**(9): p. 1166-8.
246. Dokmanovic, M. and P.A. Marks, *Prospects: histone deacetylase inhibitors.* J Cell Biochem, 2005. **96**(2): p. 293-304.
247. Jordan, V.C., *Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer.* Cancer Cell, 2004. **5**(3): p. 207-13.
248. Drummond, D.C., et al., *Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 495-528.
249. Deb, S., et al., *A novel role of sodium butyrate in cancer-associated aromatase promoters I.3 and II by disrupting a transcriptional complex in breast adipose fibroblasts.* J Biol Chem, 2005.
250. Rachez, C., et al., *Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex.* Nature, 1999. **398**(6730): p. 824-8.
251. Fondell, J.D., H. Ge, and R.G. Roeder, *Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8329-33.
252. Moreno, C.S., et al., *WD40 repeat proteins striatin and S/G(2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A.* J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5257-63.
253. Moreno, C.S., W.S. Lane, and D.C. Pallas, *A mammalian homolog of yeast MOB1 is both a member and a putative substrate of striatin family-protein phosphatase 2A complexes.* J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 24253-60.
254. Castets, F., et al., *Zinedin, SG2NA, and striatin are calmodulin-binding, WD repeat proteins principally expressed in the brain.* J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19970-7.
255. Gaillard, S., et al., *Striatin, a calmodulin-dependent scaffolding protein, directly binds caveolin-1.* FEBS Lett, 2001. **508**(1): p. 49-52.
256. Schlegel, A., et al., *Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha.* J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33551-6.

257. Razandi, M., et al., *ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 100-15.
258. Li, Z., J.L. Joyal, and D.B. Sacks, *Calmodulin enhances the stability of the estrogen receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17354-60.
259. Garcia Pedrero, J.M., et al., *Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(5): p. 947-60.
260. Biswas, D.K., et al., *Calmodulin is essential for estrogen receptor interaction with its motif and activation of responsive promoter*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33817-24.
261. Marquez, D.C. and R.J. Pietras, *Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells*. Oncogene, 2001. **20**(39): p. 5420-30.
262. Sherr, C.J., *Mammalian G1 cyclins*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1059-65.
263. Castro-Rivera, E., I. Samudio, and S. Safe, *Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 30853-61.
264. Sabbah, M., et al., *Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11217-22.
265. Marino, M., et al., *Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(10): p. 3720-9.

ANNEXE 1

Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors

Rocio Sanchez,¹ Denis Nguyen,¹ Walter Rocha,¹ John H. White,^{2,3} and Sylvie Mader^{1,3*}

Summary

The sequencing of the human genome has opened the way for using bioinformatics to identify sets of genes controlled by specific regulatory signals. Here, we review the unexpected diversity of DNA response elements mediating transcriptional regulation by estrogen receptors (ERs), which control the broad physiological effects of estrogens. Consensus palindromic estrogen response elements are found in only a few known estrogen target genes, whereas most responsive genes contain only low-affinity half palindromes, which may also control regulation by other nuclear receptors. ERs can also regulate gene expression in the absence of direct interaction with DNA, via protein–protein interactions with other transcription factors or by modulating the activity of upstream signaling components, thereby significantly expanding the repertoire of estrogen-responsive genes. These diverse mechanisms of action must be taken into account in screening for potential estrogen-responsive sequences in the genome or in regulatory regions of target genes identified by expression profiling. *BioEssays* 24:244–254, 2002. © 2002 Wiley Periodicals, Inc. DOI 10.1002/bies.10066

Introduction

Estrogens are important for the development and function of the reproductive system, are key regulators of bone

metabolism and may have cardioprotective effects. They also modulate function of the central nervous system, and control sexual behavior.^(1–3) The bulk of estrogen signaling is controlled by estrogen receptors (ERs) α and β ,^(4,5) which are members of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors,⁽⁶⁾ although some rapid estrogenic effects may be mediated via distinct membrane receptors.⁽⁷⁾

It was initially thought that all steroid receptors were cytoplasmic in the absence of hormone. However, it is now clear that unliganded ERs are located mainly in the nucleus.⁽⁸⁾ The classic model of estrogen receptor action is that binding of estrogen releases receptors from inactive complexes containing heat-shock proteins and immunophilins,⁽⁹⁾ and induces dimerization and direct sequence-specific binding to regulatory regions of target genes (Fig. 1). Chromatin immunoprecipitation studies have confirmed that association of ER α with promoters of target genes is induced by estradiol.^(10,11) DNA-bound ERs modulate target gene expression by interacting with a series of factors known as coactivators, such as the p160 coactivators and CREB-binding protein (CBP). ER–coactivator complexes can modulate chromatin structure and facilitate access of the transcriptional machinery to DNA.^(12,13)

In addition to the above well-defined pathway, other mechanisms of estrogen action have been characterized more recently in which ERs regulate gene transcription through protein–protein interactions with other classes of transcription factors, or with components of other signaling cascades. This results in so-called “cross-talk” between distinct signaling pathways, adding to the complexity of transcriptional regulation by estrogen receptors.

In the first section of this article, we will briefly describe the molecular mechanisms underlying the selective interaction between ERs and specific DNA elements. We will also review the unexpected diversity of ER-binding sites and discuss the current limitations of ER target site identification by bioinformatics. In the second section, we will provide examples of alternative signaling pathways in which the ER does not bind directly to DNA, and describe their importance in the physiology of estrogen signaling.

¹Département de Biochimie, Université de Montréal.

²Department of Physiology, McGill University, Montreal.

³Department of Medicine, McGill University, Montreal.

Funding agencies: The Canadian Institutes of Health Research, the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and The Fonds de Recherche en Santé du Québec.

*Correspondence to: Sylvie Mader, Département de Biochimie, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre Ville, Montréal QC H3C 3J7. E-mail: [REDACTED]

Abbreviations: AF, activation function; AP-1, activating protein 1; DBD, DNA-binding domain; ER, estrogen receptor; ERE, estrogen response element; GR, glucocorticoid receptor; LBD, ligand-binding domain; MAP kinase, mitogen activated protein kinase; RAR, retinoic acid receptor.

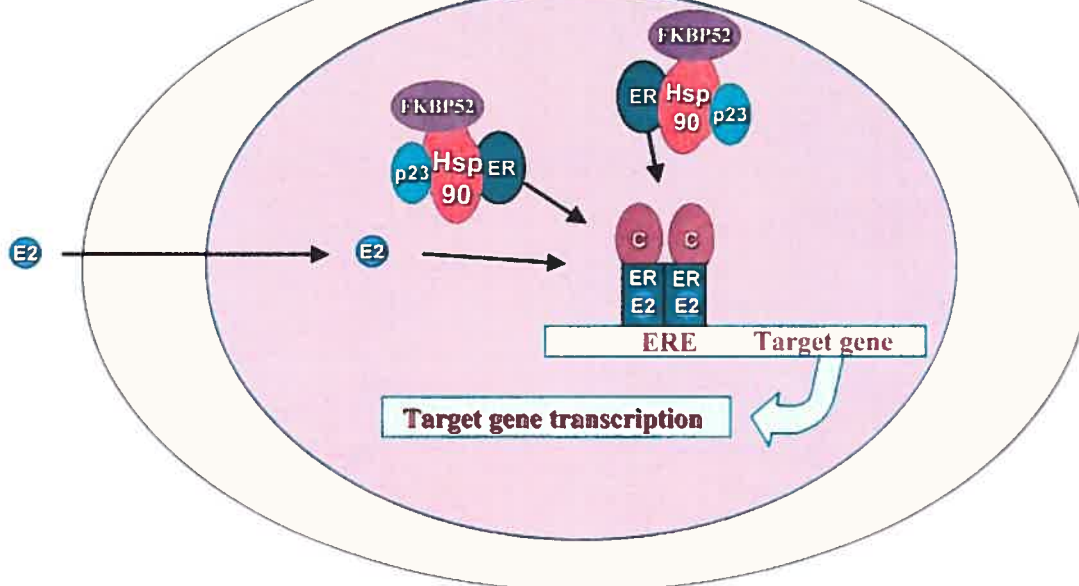


Figure 1. Classical model of estrogen action. In the absence of hormone, nuclear estrogen receptors (ER) are monomers associated with inactive multiprotein complexes comprising heat-shock proteins and immunophilins. Binding of estrogen leads to dissociation from heat-shock proteins and ER dimerization through surfaces located in the ligand-binding and DNA-binding domains. Dimerization is essential for stable DNA binding by ERs to DNA response elements (EREs). Ligand binding also induces a conformational change in the ligand-binding domain, which creates a hydrophobic surface recognized by coactivators (C). Coactivators in turn induce changes in chromatin structure in target promoters and facilitate recruitment of components of the transcriptional machinery.

Regulation of gene expression by direct binding of ERs to DNA: diversity of response element sequences

Structural organization of estrogen receptors and regulation of transcription

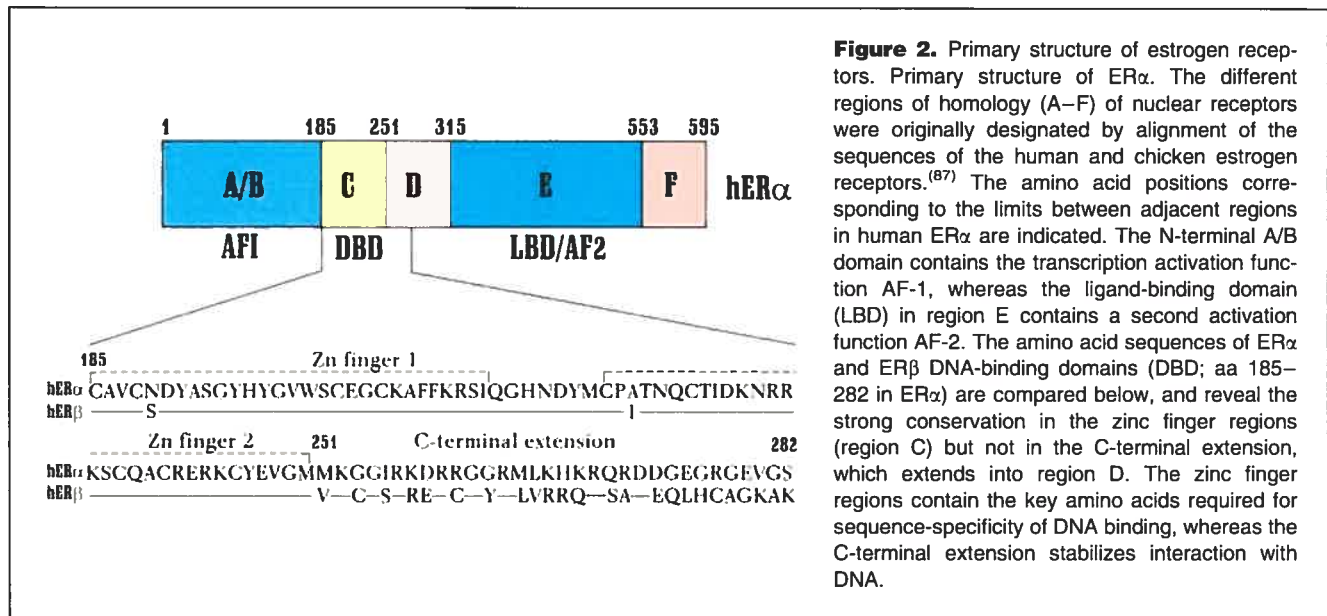
Comparison of the primary structures of human and chicken ER α has revealed homology regions A-F, which are conserved to varying degrees among all nuclear receptors.⁽¹⁴⁾ The highly conserved region C (Fig. 2) contains two Cys4 zinc fingers, and is responsible for sequence-specific recognition of DNA response elements. While the zinc finger region corresponds to the core DNA-binding domain, DNA-binding affinity is increased by C-terminal sequences rich in basic amino acids (the C-terminal extension, Fig. 2).⁽¹⁵⁾ The ligand-binding domain corresponds to the less-conserved region E. The lower homology reflects the diverse structures of ligands bound by nuclear receptors. Region E also contains a strong dimerization interface, and a well-conserved transcriptional activation domain (activation function 2, AF-2). AF-2 undergoes striking conformational changes in the presence of different ligands, and creates a hydrophobic surface recognized by coactivators in its agonist-bound

conformation. The activation function (AF-1) maps to the poorly conserved N-terminal A/B region (Ref. 6 and references therein), which in ERs functions in a promoter- and cell-specific manner.

The zinc finger regions of human ER α and ER β are 97% conserved, although the sequences diverge somewhat in the C-terminal extension of the DNA-binding domain (Fig. 2). Their A/B and E/F regions are less homologous, (15.5% and 59.1%, respectively, Ref. 16). This suggests that the two receptors bind a largely overlapping set of response elements, but may differ in their ligand-binding and transcriptional activation properties.⁽¹⁷⁾

High-affinity binding of ERs to palindromes of PuGGTCA motifs

Comparison of the promoter sequences of estrogen responsive genes led to the identification of the consensus estrogen response element (ERE), a palindrome of PuGGTCA motifs separated by 3 bp (Table 1). These elements are bound by ER dimers, with one receptor interacting with each PuGGTCA motif. Both the sequence and the spatial organization of the motifs are important for the affinity and the specificity of ER



binding. Most symmetric substitutions in the PuGGTCA motifs of the consensus ERE abolish ER binding in vitro. In particular, the motifs PuGAACA and PuGITCA, found in response elements for glucocorticoid and retinoic acid receptors, respectively, are not recognized by ERs. However, binding at reduced levels was observed to PuGGGCA and PuGGTcG palindromes (our unpublished results). Note that ER α and ER β bind palindromic elements with similar specificities, which is not surprising in view of their highly conserved zinc finger domains (Fig. 2; Ref. 16).

Crystallographic analyses of the ER α and GR DNA-binding domains bound to consensus response elements have revealed the molecular determinants controlling the sequence specificity of receptor–DNA interactions.⁽¹⁸⁾ The two zinc fingers fold into a single structural unit (Fig. 3) that is positioned onto DNA by a series of interactions with phosphate groups. Specific base contacts are established by residues located in the C-terminal part of the first zinc finger, which folds into the DNA-binding helix. Two of the invariant bases in the estrogen and glucocorticoid response elements are contacted by

Table 1. Palindromic EREs

Consensus Gene	5' PuGGTCANNNTGACCPy 3' Response element	Position	References
x Vit A2	5' GTCAGGTCACAGTGACCTGAT 3'	–335 to –315	Cell, 1986, 46:1053
h EFP	5' TCAGGGTCATGGTGACCTGA 3'	3' UTR	P.N.A.S., 1993, 90:11117
h EBAG9	5' TCCGGGTCAGGGTGACCTCTG 3'	–64 to –44	B.B.R.C., 2000, 273:654
rab UT	5' GCCAGGTCACCATGcCCTCGG 3'	–268 to –248	Mol. Endocrinol., 1990, 4:604
h FXII	5' AGGAGGgCAGCTTGACCcATC 3'	–50 to –30	B.B.A., 1993, 1172:197
h pS2	5' GCAAGGTCACGGTGcCCc 3'	–409 to –389	P.N.A.S., 1989, 86:1218
h Cath D	5' GCTGGGcCgGGCTGACCCCGC 3'	–273 to –253	Mol. Endocrinol., 1994, 8:693
c Vit II	5' TCCIGGTCAGCGTGACCgGAG 3'	–631 to –611	Nucl. Acid. Res., 1984, 12:1117
h OT	5' ACgCgGTgACCTTGACCCCGG 3'	–168 to –148	J. Biol. Chem., 1990, 265:6098
h MIS	5' CTGAGGTCACAGgGACCaGGA 3'	–1776 to –1756	J. Reprod. Fertil., 1990, 88:695
h Lactoferrin	5' CACAGGTCaAGGcGAIcTTCA 3'	–358 to –338	Mol. Endocrinol., 1992, 6:1969
r CKB	5' CCAAGGTCAGAAcCCTGGG 3'	–560 to –540	Mol. Endocrinol., 1990, 4:1000
h c-Fos	5' GAGccGcCAGCGTGACCCCGG 3'	–1216 to –1196	Nucl. Acid. Res., 1990, 18:5097
h TGF alpha	5' AGGAGGTgACGGTgCCCGCT 3'	–253 to –233	Mol. Endocrinol., 1991, 5:1955
h TGF alpha	5' GGGGGGTCAGCTgtCCCGG 3'	–219 to –199	Mol. Endocrinol., 1991, 5:1955

x Vit A2, *Xenopus* Vitellogenin A2; h EFP, human EFP; h EBAG9, human EBAG9; rab UT, rabbit Uteroglobulin; h FXII, human Factor XII; h pS2, human pS2; h Cath D, human Cathepsin D; c Vit II, chicken Vitellogenin II; h OT, human Oxytocin; h MIS, human Müllerian Inhibiting Substance; h Lactoferrin, human Lactoferrin; r CKB, rat Creatine Kinase B; h c-Fos, human c-Fos; h TGF alpha, human TGF alpha.

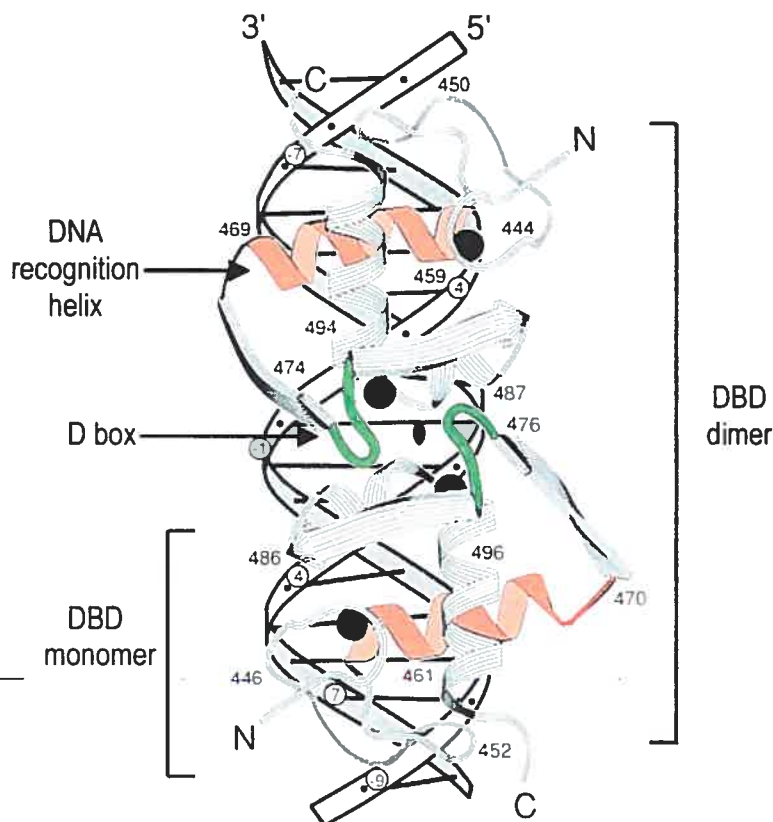


Figure 3. Complex between the ER α DNA-binding domain and a consensus ERE. Each ER α DBD binds one of the two PuGGTCA motifs in the palindromic ERE, establishing specific contacts with these motifs via the DNA recognition helix. The two monomers are on the same face of the DNA double helix and interact through the D box region (reprinted by permission of Nature 352:497–505, copyright 1991, Macmillan Magazines, Ltd.).

residues that are conserved in ERs and GR (K28 and R33, Fig. 4). The discriminating bases are contacted by amino acids that differ between the ERs and GR (V29 in GR contacts the second T in the TGITCPy motif, while E25 in ER interacts with the first C in TGACCPy and with the A; see Fig. 4). An invariant amino acid (K32) binds the consecutive GT bases in PuGGTCA in the ER α , but does not participate in contacts in the GR. The crystallographic data thus explains observations that swapping of three amino acids, known as the P box (Glu, Gly, Ala in ER α and Gly, Ser, Val in GR), was sufficient to exchange the response element specificities of the two receptors.^(19–21) Non-steroid nuclear receptors contain P boxes similar to those of the ERs, which is consistent with the fact that they all recognize PuGGTCA or related motifs in various configurations.⁽¹⁸⁾

The high specificity of ERs for palindromes with 3 bp spacers results from the presence of the D box (Figs. 3,4), a loop in the second zinc finger that creates a dimerization interface between two monomers and stabilizes binding. Direct repeats of PuGGTCA motifs, which are bound by ERs with reduced

affinity,⁽²²⁾ are preferentially recognized by nuclear receptors that form heterodimers with the retinoid X receptors (RXRs), such as the retinoic acid receptors (RARs), the thyroid hormone receptors (TRs), the vitamin D receptor (VDR), and the peroxisome proliferator activated receptors (PPARs).^(6,18,23) RARs, TRs, and PPARs bind to palindromic EREs with lower affinities than to their optimal binding sites. Replacement of the D box region of RARs by that of ER α generates retinoid receptors that can bind to palindromic EREs with high affinity, while the converse operation abolishes ER binding to palindromes.⁽¹⁵⁾ Thus, although the homology between DNA-binding domains of different nuclear receptors generates some overlap in response element recognition, nuclear receptors have evolved to bind specifically high-affinity DNA elements with different sequences or spatial arrangements. The degree of specificity generated by binding of ER dimers to palindromes of PuGGTCA motifs is very high, as consensus estrogen response elements (PuGGTCANNNTGACCPy) are expected to be found about every 4 million base pairs in random DNA sequences.

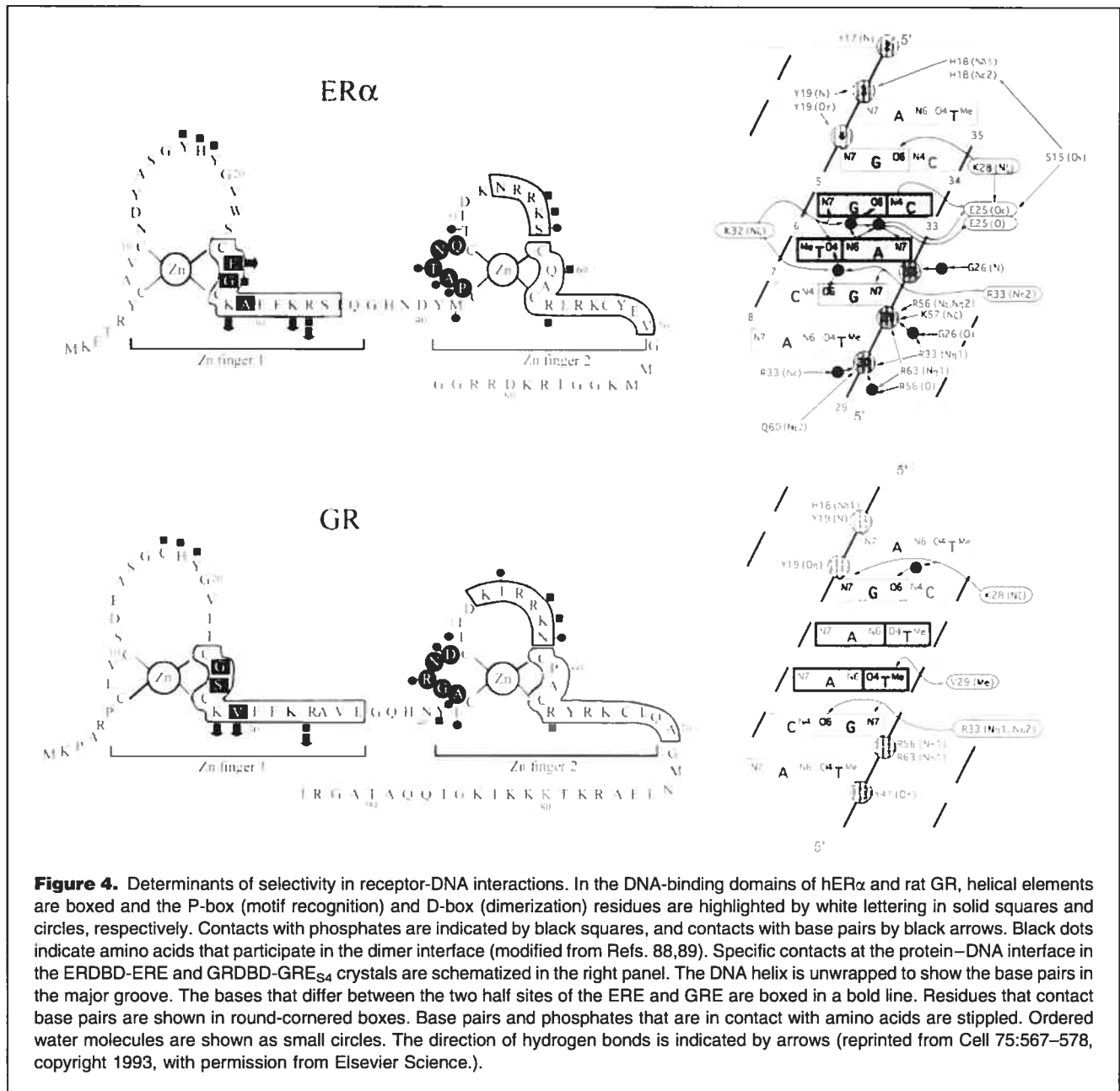


Figure 4. Determinants of selectivity in receptor-DNA interactions. In the DNA-binding domains of hER α and rat GR, helical elements are boxed and the P-box (motif recognition) and D-box (dimerization) residues are highlighted by white lettering in solid squares and circles, respectively. Contacts with phosphates are indicated by black squares, and contacts with base pairs by black arrows. Black dots indicate amino acids that participate in the dimer interface (modified from Refs. 88,89). Specific contacts at the protein-DNA interface in the ERDBD-ERE and GRDBD-GRE_{S4} crystals are schematized in the right panel. The DNA helix is unwrapped to show the base pairs in the major groove. The bases that differ between the two half sites of the ERE and GRE are boxed in a bold line. Residues that contact base pairs are shown in round-cornered boxes. Base pairs and phosphates that are in contact with amino acids are stippled. Ordered water molecules are shown as small circles. The direction of hydrogen bonds is indicated by arrows (reprinted from Cell 75:567-578, copyright 1993, with permission from Elsevier Science.).

Deviations from the consensus palindromic sequence lower the affinity and specificity of receptor-response element interaction

Although a few promoters of estrogen target genes contain EREs that match the consensus sequence (*Xenopus* Vitellogenin A2, human EFP, human EBAG9), most elements identified to date are not perfectly palindromic (Table 1). Deviations from the consensus in one half-site reduce ER-binding affinity in vitro.⁽²⁴⁾ It is interesting to note that the pS2 and the cathepsin D promoters, which both contain a T to C mutation in the PuGGTCA motif, were reported to function poorly in

endometrial carcinoma Ishikawa cells, but efficiently in breast carcinoma MCF7 cells.⁽²⁵⁾ Thus, deviations from the consensus responsive element may affect the tissue specificity of target gene activation by estrogens.

Binding of estrogen receptors was also observed to response elements that contain direct repeats of PuGGTCA motifs, albeit with lower affinity than to palindromic response elements. ER-binding sequences composed of multiple PuGGTCA direct repeats were identified in a human CpG library. One of these elements was shown to be located upstream of an estrogen responsive gene, and functioned as an ERE when

inserted upstream of basal promoter sequences.⁽²⁶⁾ The lower affinity of ERs for PuGGTCA direct repeats arises in part from disruption of D box dimerization due to reorientation of one of the DNA-binding domains of the receptor dimer. Thus, while the isolated ER α DNA-binding domain binds to palindromic EREs as a dimer, no such binding is observed to PuGGTCA direct repeats.⁽²²⁾ These studies point to the importance of the strong dimerization interface in receptor ligand-binding domains in stabilizing ER binding to direct repeats. While loss of D box function reduces affinity for PuGGTCA direct repeats, it also explains the capacity of ER dimers to recognize direct repeats with variable spacing.^(22,26) The recognition by ERs of PuGGTCA motifs in a variety of configurations extends the potential for cross-talk with other receptors.

Although binding of ERs to single PuGGTCA motifs is much weaker than that to palindromic EREs or to direct repeats, it is noteworthy that in a genetic selection in yeast for EREs using degenerate oligonucleotides, only one of the elements selected was a consensus ERE and a few contained direct repeats, whereas the majority of sequences contained only one PuGGTCA half-site. While the non-consensus sequences bound ERs with reduced affinity, they functioned as response elements in reporter gene assays.⁽²⁷⁾ This suggests that the number of sites that can mediate estrogenic regulation may be much larger than expected from the initial identification of consensus estrogen response elements, as PuGGTCA motifs occur on average every 2048 bases in random DNA sequence.

Multimerization of sequences with weak affinity generates functional response elements

Cooperativity between multiple estrogen response elements can strongly increase transcriptional activation mediated by ERs,⁽²⁸⁾ and can contribute to the creation of strong composite enhancers from several weak binding sites. For instance, multimerization of direct repeats leads to a synergistic effect on estrogen-dependent transactivation of synthetic promoters.⁽²²⁾ Cooperativity between weak binding sites spread throughout the regulatory sequences of estrogen responsive genes has also been observed. The chicken

ovalbumin promoter contains several widely spaced half-EREs, which function weakly in isolation but cooperate for estrogen receptor binding and transactivation.⁽²⁹⁾ Similarly, stimulation of the prothymosin α gene by estrogen requires two widely spaced half-palindromic EREs.⁽³⁰⁾

Multimers of PuGGTCA sites may represent common response elements for nuclear receptors with P boxes homologous to that of ER, such as RARs, RXRs, TRs, VDRs, PPARs, or orphan receptors.⁽³¹⁾ However, several factors may increase the selectivity of these sites for specific nuclear receptors. Flanking sequences may restrict the recognition of individual PuGGTCA motifs to specific receptors (see below), and other transcription factors bound to the promoters may also cooperate in a selective manner with specific nuclear receptors.

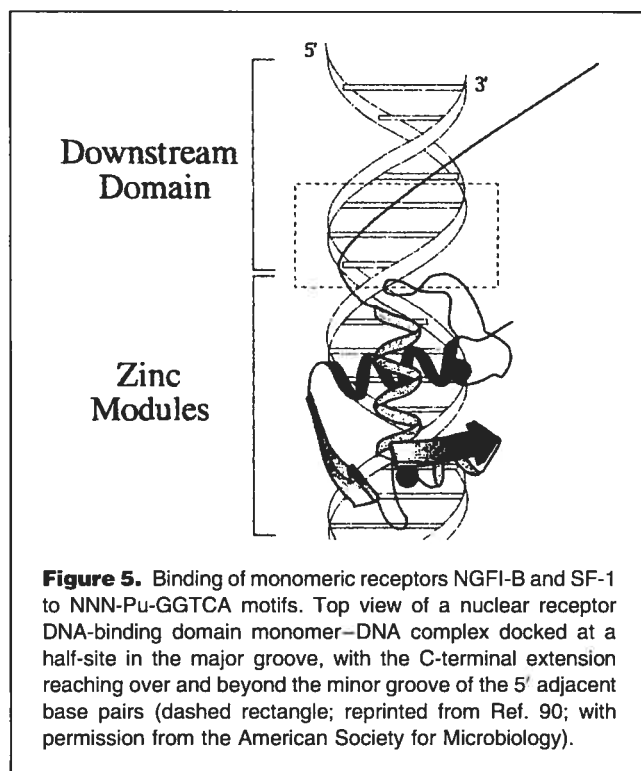
Potential role of sequences flanking PuGGTCA motifs in increasing the specificity of nuclear receptor action

In a yeast genetic selection for estrogen receptor-binding sites (see above), the consensus for half-palindromic elements identified was GGTCAMV, where M is A or C, and V is not T.⁽²⁷⁾ Whether or not the two bases downstream of the PuGGTCA motifs can modulate the affinity and specificity of nuclear receptor binding requires further examination. However, a role of bases upstream of PuGGTCA motifs has been demonstrated for several nuclear receptors that bind either as monomers or as dimers to their target elements (see Table 2). Amino acid sequences located downstream of the second zinc finger of these receptors (the A box/GRIP box) are responsible for recognition of the base pairs upstream of the PuGGTCA motif via contacts with the DNA backbone and in the minor groove (Fig. 5; see Ref. 18 for a review). It is noteworthy that homodimers of ER α but not ER β , can bind to the response element TCAPuGGTCA recognized by the orphan receptor SF1, and that mutations in the TCA motif abolish binding.⁽³²⁾ Although the zinc finger regions of ER α and ER β are highly conserved, the C-terminal extensions of the DNA-binding domains are more divergent, and a region homologous to the GRIP box of SF1 (RGGR) is present in the C-terminal

Table 2. Sequence and specificity of extended recognition motifs

Receptor	Sequence	Receptor form	References
NGFI-B	5' WAAPuGGTCA 3'	M	Mol. Cell. Biol., 1993, 13:5794
SF1	5' TCAPuGGTCA 3'	M	Mol. Cell. Biol., 1993, 13:5794
ERR α , ER α	5' TCAPuGGTCA 3'	D	EMBO J., 1999, 18:4270
TR α 1	5' TAPuGGTCA 3'	M	J. Biol. Chem., 1993, 268:19392
RevErb, ROR α	5' WWAWNTPuGGTCA 3'	M	Mol. Cell. Biol., 1995, 15:2517
PPAR/RXR	5' AWCTPuGGTCANPuGGTCA 3'	HD	J. Biol. Chem., 1998, 273:27988

Pu, purine; W, A, or T; N, any nucleotide; M, monomer; D, dimer; HD, heterodimer.



extension of ER α but not ER β (Fig. 2). Thus flanking sequences could play an important role in increasing the affinity of weak PuGGTCA response elements for ERs, and in determining the specificity of these motifs for nuclear receptors.

Composite response elements containing PuGGTCA and Sp1 motifs

In addition to the above-described ER-binding sites, regulatory regions of an increasingly large number of estrogen responsive target genes were found to contain individual PuGGTCA motifs associated with GC boxes (GGGGCGG-GG) or GT/CACCC boxes (GGTGTGGGG), binding sites for the transcription factor Sp1 (Table 3). Both the distance and

relative orientation of the half-ERE and Sp1 motifs are variable, and there is flexibility in the sequence of the half-ERE motifs (Table 3). Several studies have documented the importance of both the half-ERE and the Sp1 site for estrogen response. For example, reporter plasmids where mutations were introduced in either the Sp1 or the half-ERE part of composite motifs found in the cathepsin D promoter (different from the imperfect ERE in Table 1) or in the RAR α promoter were no longer inducible by estrogen.^(33,34) Cooperativity with Sp1 was also observed with promoters containing palindromic estrogen response elements, such as the vitellogenin A1 and the rabbit uteroglobin promoter (Table 1).^(35,36) The ERE in the rat creatine kinase B gene (Table 1) is also flanked by two GC boxes, including one 20 bp downstream of the perfect PuGGTCA half of the palindrome (Table 3).

Accumulating evidence suggests, however, that in some instances ERs may function cooperatively with Sp1 activity even in the absence of ERE. Deletion of the PuGGTCA motif in the promoter of the hsp27 gene (Table 3) did not affect its responsiveness to estrogen.⁽³⁷⁾ Sp1 sites in the promoters of the c-fos, bcl-2, adenosine deaminase, IGFBP4, thymidylate synthase, E2F1 and RAGE genes were found to be sufficient for induction by estrogen. However, the effects of estrogen on Sp1 activity depended on the cell line and the type of ER expressed. On the one hand, in HeLa cells, there was no activation of Sp1 by estrogen when ER α was expressed, and a slight repression with ER β . On the other hand, Sp1 sites were sufficient for stimulation by ER α , but not ER β in MCF7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells.^(38,39) Since overexpression of ERs in ER-positive MCF7 cells was necessary to observe these effects, the role of adjacent ER-binding sites may be to facilitate direct contacts between endogenous ERs and Sp1 on the same promoter. Promoters that do not contain EREs may still be regulated if ER content is high enough or if ER recruitment is facilitated by cofactors already present on the promoter.

The mechanisms of cooperativity between ER and Sp1 are not fully understood. Sp1 physically associates with both ER α and ER β in gel electrophoretic mobility shift assays, resulting

Table 3. Half-ERE/SP1 sites

Gene	Response element	Position	References
r CKB	5' <u>AGGTCA</u> (N) ₂₀ <u>GGCGGG</u> 3'	-557 to -526	Mol. Endocrinol., 1992, 6:231
h c-myc	5' <u>AGGCA</u> (N) ₁₆ <u>GGCGGG</u> 3'	+74 to +102	Oncogene, 1992, 7:1587
h HSP27	5' <u>GGGCGG</u> (N) ₆ <u>GGGTCA</u> 3'	-104 to -84	Mol. Endocrinol., 1997, 11:1569
h PR	5' <u>TGACC</u> ₂ (N) ₁₃ <u>CCGCC</u> 3'	+571 to +595	Mol. Endocrinol., 2000, 14:972
h RAR α	5' <u>IGGTGA</u> (N) ₁₀ <u>GGCGGG</u> 3'	-83 to -68	Cancer Res., 1995, 55:4999
h Cath D	5' <u>CCCGCC</u> (N) ₂₃ <u>TGcCCC</u> 3'	-199 to -165	J. Biol. Chem., 1994, 269:15912

r CKB, rat Creatine Kinase B; h c-myc, human c-myc; h HSP27, human Heat-Shock Protein 27; h PR, human Progesterone Receptor; h RAR α , human RAR α ; h Cath D, human Cathepsin D.

in a 2- to 3-fold increase in binding of Sp1 to its DNA site. However, mere physical association is not sufficient for synergism, as ER β associates with and increases Sp1 binding to DNA *in vitro*, but does not activate Sp1-dependent transcription in the presence of estradiol. The AF1 region of ER α , which is only weakly homologous to that of ER β , was found to be important for activation of Sp1, suggesting that coactivators recruited by this region play a role in synergism with Sp1.⁽³⁸⁾ The Sp1 family of transcription factors also includes Sp2, Sp3, and Sp4, which share a similar structural organization, but differ in their transcriptional activation properties,⁽⁴⁰⁾ and may have different synergistic properties with estrogen receptors. Interaction between ER α and Sp3 appeared to repress rather than activate the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene in HEC1A cells via a GC box.⁽⁴¹⁾ It is not known whether other Sp1 family members (Sp2, Sp4, and more distantly related BTEB1 and BTEB2) interact also functionally with ERs.

It should also be noted that PuGGTCA–Sp1 composite elements may function as response elements for other classes of nuclear receptors. The orphan receptor TR4 activated, whereas EAR2 and EAR3/COUP-TFI repressed expression of the human luteinizing hormone receptor gene through an imperfect PuGGTCA direct repeat located 50 bp upstream of an Sp1 site.⁽⁴²⁾ PuGGTCA–Sp1 composite elements may serve as complex modules of transcriptional regulation in which response to different signaling pathways is determined by the identity of sequences flanking the PuGGTCA motif, and by expression levels of different nuclear receptors and Sp1 family members.

Identification of estrogen response elements in the human genome

The recent completion of human genome sequencing will greatly facilitate identification of estrogen response elements in the regulatory sequences of target genes. Given the variety of responsive sequences recognized by ERs, however, a combined approach of gene expression profiling and regulatory region sequence analysis will likely prove more fruitful than attempting to mine the human genome alone. The emergence of high-throughput gene expression screening technologies based on cDNA or oligonucleotide arrays has facilitated the rapid identification of large numbers of genes under control of specific regulatory signals. These approaches are particularly well suited for analysis of estrogen-responsive genes, or those controlled by other nuclear receptors, as in many cases hormone-bound receptors directly control target gene expression. Response sequences bound directly by ERs are expected to contain at least one consensus half-site, whether the responsive region is palindromic, contains direct repeats, or is a composite element. Further knowledge of the effects of base substitutions in PuGGTCA half-sites on ER binding would help in assessing the affinity of putative elements for receptors. Affinity of ERs for elements *in vitro* does not necessarily

correlate with the degree of estrogen responsiveness *in vivo*, however, as interaction with other transcription factors may stabilize binding and promote transcription. It should also be noted that many genes have multiple promoters and differential splicing, giving rise to mRNAs with distinct 5' ends. Sequences on DNA chips are often based on oligo(dT)-primed expressed sequence tags that are biased to the 3' untranslated regions of genes, and provide no information about promoter regions contributing to regulated expression. In many instances, it will be necessary to characterize the 5' ends of regulated mRNAs prior to promoter sequence analysis. In addition, access to genomic sequences may facilitate the identification of response elements located downstream of the transcription initiation site, including those in intronic sequences.

Regulation of transcription by estrogen receptors in the absence of DNA binding

Estrogen receptor-dependent modulation of transcription factor activity in the absence of direct DNA binding

Regulation of gene expression by ERs in the absence of direct DNA binding is not limited to the above-described ER–Sp1 interactions. Another intensively investigated example of this type of regulation is that involving AP-1, which is composed of heterodimers of the Jun/Fos family of transcription factors. ER-dependent activation of the chicken ovalbumin, human IGF-1 or human collagenase promoters is mediated by AP-1-binding sites and can be observed with ER mutants lacking the DNA-binding region.⁽⁴³⁾ Interaction of ERs with AP-1 may contribute to the mitogenic effects of estrogen, and to the tissue-specific effects of selective estrogen receptor modulators.⁽⁴⁴⁾ Structure/function studies have shown that interactions between ERs and AP-1 components are complex, involving both ER activation function-dependent and independent mechanisms of AP-1 activation, depending on the receptor (α or β) and on the ligand.⁽⁴⁴⁾

ERs have also been found to repress transcription factor function in the absence of DNA binding. For example, repression of erythropoiesis by estrogen may involve estrogen-dependent inhibition of the transcriptional activity of GATA-1 via protein–protein interactions.⁽⁴⁵⁾ Repression of IL-6 expression by ERs in osteoblasts and bone marrow stromal cells, which may explain in part the protective effects of circulating estrogen on bone density,⁽⁴⁶⁾ involves interaction with DNA-bound NF- κ B,^(47,48) and with NF-IL6 and C/EBP transcription factors.^(48,49) Note that other steroid receptors can also repress NF- κ B activity via mechanisms that are cell-, promoter-, and isoform-specific.^(50–55)

Regions C to F of ERs are required for NF- κ B repression, but DNA binding is not involved.^(48–56) Repression is reciprocal, as NF- κ B also inhibits steroid receptor

activity.^(48,53) Direct interaction involving regions C-D of ERs and the Rel homology domain of NF- κ B seems important for repression,⁽⁴⁹⁾ and may result in inhibition of NF- κ B binding.^(49,57) Additional mechanisms of repression are likely, as repression of NF- κ B activity was also observed in the absence of inhibition of NF- κ B binding to DNA.^(58,59) The p160 and CBP coactivators, which are also recruited by NF- κ B,⁽⁶⁰⁾ may be titrated or inactivated in a multimeric complex by liganded steroid receptors.^(59,61,62) Inhibition of I- κ B degradation by estrogen has also been observed in some cell types.⁽⁶³⁾

Modulation of gene expression via non-genomic actions of estrogens

A number of studies have provided evidence that estrogens can modulate protein function via non-genomic effects, i.e. mechanisms that are too rapid to be accounted for by changes in gene expression. Although membrane receptors distinct from the ERs may be involved in these effects,^(2,7) the implication of a subpopulation of receptors ER α and ER β located at the cellular membrane^(64–66) in the rapid regulation of intracellular signaling through protein–protein interactions is now well documented. ER α regulates MAP kinase activity in breast cancer cells by interacting with the SH2 domain of Src,⁽⁶⁷⁾ an effect associated with induction of cell proliferation.⁽⁶⁸⁾ ER β acts by a similar mechanism in LNCaP prostate cancer cells.⁽⁶⁹⁾ Modulation of MAP kinase activity by estrogens has also been described in bone cells, correlating with inhibition of apoptosis, and could be dissociated from transcriptional regulation using synthetic ligands.^(66,70)

Other reported non-genomic effects of estradiol include actions on neuronal excitability, intracellular calcium concentrations, cyclic AMP synthesis and phosphoinositide turnover.^(2,71–76) Recently, ER α was shown to interact with the p85 α regulatory subunit of the PI3 kinase, increasing the activity of this kinase in vascular endothelial cells and leading to the activation of protein kinase B/Akt and endothelial nitric oxide synthase.^(77,78) This regulatory pathway may mediate cardiovascular protective effects of estrogens, and appears to be specific to ER α and not ER β .⁽⁷⁸⁾

Although described as non-genomic effects, these mechanisms of action of estradiol also contribute to the complexity of the changes in gene expression induced by estrogens. For instance, it has been suggested that regulation of immediate early genes *egr-1* and *c-fos* by estrogen in breast carcinoma MCF7 cells is mediated by their serum response elements via non-genomic activation of the raf-MAP kinase signaling pathways.^(79,80) Function of numerous transcription factors, including AP-1, is regulated by phosphorylation. Therefore, the modulation of kinase activities by ERs is likely to finely modulate gene expression depending on the combination of transcription factors bound to a given promoter. It is also important to note that ERs themselves are targets

of phosphorylation by MAP kinases and Akt,^(81,82) and that transcriptional activation properties of ERs are modulated by phosphorylation.^(83–86) Thus, non-genomic and genomic actions of estrogens may be intimately linked via cross-regulatory loops.

Concluding remarks

The 16 years of studies since the cloning of the ER α cDNA have revealed that estrogen receptors control gene expression directly or indirectly by an unexpected variety of mechanisms. Identification of palindromic sequences that conform closely to consensus EREs is an indicator of an estrogen-responsive regulatory region, although deviations from the consensus have widely varying effects on estrogen responsiveness. However, as the above-described studies indicate, estrogen receptors also control target gene transcription through a range of other protein–DNA and protein–protein interactions. A large number of target genes likely contain EREs composed of multiple non-palindromic ERE half-sites, or composite elements combining half-sites with Sp1 elements. In addition, ligand-bound estrogen receptors directly or indirectly modulate the function of a growing list of transcription factors that control expression of genes important for the physiological actions of estrogens. This remarkable diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors probably also applies to other transcription factors, and underlies the fact that current algorithms for identification of transcription factor binding sites will only detect a fraction of potential target genes in the human genome.

Acknowledgments

The authors apologize for not citing numerous references pertinent to the topics reviewed because of space limitations.

References

1. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Rev* 1999;20:358–417.
2. McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Rev* 1999;20:279–307.
3. Jordan VC. Estrogen, selective estrogen receptor modulation, and coronary heart disease: something or nothing. *J Natl Canc Inst* 2001;93:2–4.
4. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert J-M, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression, and homology to v-erbA. *Nature* 1986;83:835–839.
5. Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5925–5930.
6. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor family: the second decade. *Cell* 1995;83:835–839.
7. Watson CS, Gametchu B. Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;220:9–19.
8. Gasc J-M, Baulieu E-E. Steroid hormone receptors: intracellular distribution. *Biology of the Cell* 1986;56:1–6.
9. Ylikomi T, Wurtz J, Syväla H, Passinen S, Pekki A, Haverinen M, Blauer M, Tuohimaa P, Gronemeyer H. Reappraisal of the role of heat shock

- proteins as regulators of steroid receptor activity. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology* 1998;33:437–466.
10. Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 1999;98:675–686.
 11. Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 2000;103:843–852.
 12. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:140–147.
 13. Robyr D, Wolffe A, Wahli W. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol* 2000;14:329–346.
 14. Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert J-M, Chambon P. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* 1986;5:891–897.
 15. Mader S, Chambon P, White JH. Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acid Res* 1993;21:1125–1132.
 16. Gustafsson J-A. Estrogen receptor β —a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 1999;163:379–383.
 17. Barkhem T, Carlsson B, Nilsson S, Enmark E, Gustafsson J-A, Nilsson S. Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 1998;54:105–112.
 18. Khorasanizadeh S, Rastinejad F. Nuclear receptor interactions in DNA response elements. *Trends BioChem Sci* 2001;26:384–390.
 19. Mader S, Kumar V, de Verneuil H, Chambon P. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid responsive elements. *Nature* 1989;338:271–274.
 20. Umesono K, Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989;57:1139–1146.
 21. Danielsen M, Hinck L, Ringold GM. Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell* 1989;57:1131–1138.
 22. Aumais JP, Lee HS, DeGannes C, Horsford J, White JH. Function of directly repeated half-sites as response elements for steroid hormone receptors. *J Biol Chem* 1996;271:12568–12577.
 23. Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine Rev* 1994;15:391–407.
 24. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2905–2919.
 25. Miralles F, Gaudelet C, Cavailles V, Rochefort H, Augereau P. Insensitivity of cathepsin D gene to estradiol in endometrial cells is determined by the sequence of its estrogen response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:711–718.
 26. Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima K, Muramatsu M. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 1998;18:442–449.
 27. Dana SL, Hoener PA, Wheeler DA, Lawrence CB, McDonnell DP. Novel estrogen response elements identified by genetic selection in yeast are differentially responsive to estrogens and antiestrogens in mammalian cells. *Mol Endocrinol* 1994;8:1193–1207.
 28. Ponglikitmongkol M, White JH, Chambon P. Synergistic action of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J* 1990;9:2221–2231.
 29. Kato S, Tora L, Yamauchi J, Masushige S, Bellard M, Chambon P. A far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically. *Cell* 1992;68:731–742.
 30. Martini PG, Katzenellenbogen BS. Regulation of prothymosin alpha gene expression by estrogen in estrogen receptor-containing breast cancer cells via upstream half-palindromic estrogen response element motifs. *Endocrinol* 2001;142:3493–3501.
 31. Kato S, Sasaki H, Suzawa M, Masushige S, Tora L, Chambon P, Gronemeyer H. Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements at as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 1995;15:5858–5867.
 32. Vanacker J-M, Petterson K, Gustafsson J-A, Laudet V. Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related (ERRs) and estrogen receptor (ER) α , but not ER β . *EMBO J* 1999;18:4270–4279.
 33. Krishnan V, Wang X, Safe S. Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1994;269:15912–15917.
 34. Rishi AK, Shao Z-M, Baumann RG, Li X-S, Sheikh S, Kimura S. Estradiol regulation of the human retinoic acid receptor α gene in human breast carcinoma cells is mediated via an imperfect half-palindromic estrogen response element and Sp1 motifs. *Cancer Res* 1995;55:4999–5006.
 35. Batistuzzo de Medeiros SR, Krey G, Hiji AK, Wahli W. Functional interactions between the estrogen receptor and the transcription activator Sp1 regulate the estrogen-dependent transcriptional activity of the vitellogenin A1 promoter. *J Biol Chem* 1997;272:18250–18260.
 36. Scholz A, Truss M, Beato M. Hormone-induced recruitment of Sp1 mediates estrogen activation of the rabbit uteroglobin gene in endometrial epithelium. *J Biol Chem* 1998;273:4360–4366.
 37. Porter W, Saville B, Hovik D, Safe S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1997;11:1569–1580.
 38. Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson J-A. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (α/β)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem* 2000;275:5379–5387.
 39. Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm* 2001;62:231–252.
 40. Hagen G, Dennig J, Preiss A, Beato M, Suske G. Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem* 1995;270:24989–24994.
 41. Stoner M, Wang F, Wormke M, Nguyen T, Samudio I, Vyhidal C, Finkenzeller G, Marme D, Safe S. Inhibition of vascular endothelial growth factor expression in HEC1A endometrial cancer cells through interactions of estrogen receptor α and Sp3 proteins. *J Biol Chem* 2000;275:22769–22779.
 42. Zhang Y, Dufau ML. Nuclear orphan receptors regulate transcription of the gene for the human luteinizing hormone receptor. *J Biol Chem* 2000;275:2763–2770.
 43. Gaub MP, Bellard M, Sheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* 1990;63:1267–1276.
 44. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiao AK, Uht RM, Webb P. Estrogen receptor pathways and AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;74:311–317.
 45. Blobel GA, Sieff CA, Orkin SH. Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 1995;15:3147–3153.
 46. Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TS. Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Rev* 1994;15:275–300.
 47. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 1992;257:88–91.
 48. Galien R, Evans H, Garcia T. Involvement of the CCAAT/enhancer-binding protein and nuclear factor- κ B binding sites in interleukin-6 promoter activation by estrogens. *Mol Endocrinol* 1996;10:713–722.
 49. Ray P, Ghosh SH, Zhang DK, Ray A. Repression of interleukin-6 gene expression by 17 β -estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF- κ B by the estrogen receptor. *FEBS Lett* 1997;409:79–85.
 50. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:752–756.
 51. Kalkhoven E, Wissink S, van der Saag P, van der Burg B. Negative interaction between the RelA (p65) subunit of NF- κ B and the progesterone receptor. *J Biol Chem* 1996;271:6217–6224.
 52. Palvimo JJ, Reinikainen P, Ikonen T, Kalli PJ, Moilanen A, Janne OE. Mutual transcriptional interference between RelA and androgen receptor. *J Biol Chem* 1996;271:24151–24156.
 53. McKay LI, Cidlowski JA. Cross-talk between nuclear factor- κ B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* 1998;12:45–56.
 54. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson J-A, van der Saag P. Negative

- cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1995;9:401–412.
55. Cerillo G, Rees A, Manchanda N, Reilly C, Brogan I, White A, Needman M. The oestrogen receptor regulates NF- κ B and AP-1 activity in a cell-specific manner. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;67:79–88.
 56. Valentine JE, Kalkhoven E, White R, Hoare S, Parker MG. Mutations in the estrogen receptor ligand binding domain discriminate between hormone-dependent transactivation and transrepression. *J Biol Chem* 2000;275:25322–25329.
 57. Galien R, Garcia T. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF- κ B site. *Nucl Acids Res* 1997;25:2424–2429.
 58. Kurebayashi S, Miyashita Y, Hirose T, Kasayama S, Akira S, Kishimoto T. Characterization of mechanisms of interleukin-6 gene expression by estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;60:11–17.
 59. Harnish DC, Scicchitano MS, Adelman SJ, Lyttle CR, Karathanasis SK. The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor- κ B in HepG2 cells. *Endocrinol* 2000;141:3403–3411.
 60. Sheppard K-A, Rose DW, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, Thanos D, Rosenfeld MG, Glass CK, Collins T. Transcriptional activation by NF- κ B requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol* 1999;19:6367–6378.
 61. Aarnisalo P, Palvimo JJ, Jänne OE. CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2122–2127.
 62. Werbach S, Nojek I, Lanz R, Costas MA. RAC-3 is a NF- κ B coactivator. *FEBS Lett* 2000;485:195–199.
 63. Sun WH, Keller ET, Stebler BS, Erschler WB. Estrogen inhibits phorbol ester-induced I κ B α transcription and protein degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:691–695.
 64. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 1999;13:307–319.
 65. Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 1995;9:404–410.
 66. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. Non-genotoxic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104:719–730.
 67. Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 1996;15:1292–1300.
 68. Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, Auricchio F. Non-transcriptional action of oestradiol and progesterin triggers DNA synthesis. *EMBO J* 1999;18:2500–2510.
 69. Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Amtrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor β -Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 1999;18:5406–5417.
 70. Endoh H, Sasaki H, Maruyama K, Takeyama K, Waga I, Shimizu T, Kato S, Kawashima H. Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:99–102.
 71. Batra S. Effect of estrogen and progesterone treatment on calcium uptake by the myotetrium and smooth muscle of the lower urinary tract. *Eur J Pharmacol* 1986;127:37–42.
 72. Grove RL, Korach KS. Estrogen stimulation of phosphatidylinositol metabolism in mouse uterine tissue. *Endocrinol* 1987;121:1083–1088.
 73. Freter CE, Lippman ME, Cheville A, Zinn S, Gelmann EP. Alterations in phosphoinositide metabolism associated with 17 β -estradiol and growth factor treatment of MCF-7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1988;2:159–166.
 74. Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL. A new, non-genomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinol* 1992;131:1305–1312.
 75. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8517–8521.
 76. Ignar Trowbridge DN, Hughes AR, Putney JW, McLachlan JA, Korach KS. Diethylstilbestrol stimulates persistent phosphatidylinositol lipid turnover by an estrogen receptor-mediated mechanisms in immature mouse uterus. *Endocrinol* 1991;129:2423–2430.
 77. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-OH kinase. *Nature* 2000;407:538–541.
 78. Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:3459–3467.
 79. Pratt CMA, Satkunaratnam A, Novosad DM. Estrogen activates raf-1 kinase and induces expression of Egr-1 in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 1998;189:119–125.
 80. Duan R, Xie W, Burghardt RC, Safe S. Estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1. *J Biol Chem* 2001;276:11590–11598.
 81. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995;270:1491–1494.
 82. Bunone G, Briand PA, Mitschek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 1996;15:2174–2183.
 83. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor α . *J Biol Chem* 2001;276:9817–9824.
 84. Ali S, Metzger D, Bornert J-M, Chambon P. Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the estrogen receptor A/B region. *EMBO J* 1993;12:1153–1160.
 85. Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem* 1994;269:4458–4466.
 86. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguère V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor β through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular Cell* 1999;3:513–519.
 87. Green S, Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* 1988;4:309–314.
 88. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 1991;352:497–505.
 89. Schwabe JWR, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 1993;75:567–578.
 90. Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J. The orphan receptor NGF1-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor DNA interaction. *Mol Cell Biol* 1993;13:5794–5804.