

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare**

**Dottorato di Ricerca in Patologia e  
Fisiopatologia molecolare**

**XXIII CICLO  
2007-2010**

**Migrazione indotta da androgeno in fibroblasti murini NIH3T3: il ruolo  
dell'associazione di AR (recettore dell'androgeno)/Filamina A**

**Coordinatore:  
Chiar.mo Prof.  
Vittorio Enrico Avvedimento**

**Tutor:  
Chiar.mo Prof.  
Antimo Migliaccio**

**Candidata:  
Dott.ssa GIRALDI TIZIANA**

....."It's times like these you learn to live again  
it's times like these you give and give again  
it's times like these you learn to love again  
it's times like these time and time again"....

Foo Fighters

....."When you try your best but you don't succeed  
when you get what you want but not what you need  
when you feel so tired but you can't sleep stuck in  
reverse...lights will guide you home and ignite your  
bones".....

Coldplay

## **INDICE**

<b>Abstract</b>	<b>p.5</b>
<b>1. Introduzione</b>	<b>p.6</b>
<b>1.1. Azioni genomiche e non genomiche degli ormoni steroidei</b>	<b>p. 10</b>
<b>1.2. Il ruolo delle integrine</b>	<b>p.14</b>
<b>1.3 Filamina</b>	<b>p.19</b>
<b>1.4 Il ruolo di FAK</b>	<b>p.25</b>
<b>1.5 FAK e signaling</b>	<b>p.28</b>
<b>1.6 La famiglia delle Rho GTPasi</b>	<b>p.31</b>
<b>1.7 La migrazione cellulare</b>	<b>p.34</b>
<b>1.8 Bersagli intracellulari della famiglia delle Rho GTPasi</b>	<b>p.42</b>
<b>2. Scopo della tesi</b>	<b>p.44</b>
<b>3. Risultati</b>	<b>p.47</b>
<b>3.1 L'androgeno sintetico R1881 induce la migrazione cellulare in fibroblasti murini NIH3T3</b>	<b>p.47</b>
<b>3.2 L'androgeno incrementa le adesioni focali e determina l'attivazione di FAK e paxillina in fibroblasti NIH3T3</b>	<b>p.51</b>
<b>3.3 Il ruolo di Rac1 nella migrazione indotta da androgeno in fibroblasti NIH3T3</b>	<b>p.57</b>
<b>3.4 L'androgeno induce la formazione del complesso AR/Filamina A/integrina <math>\beta</math>1 in cellule NIH3T3</b>	<b>p.60</b>
<b>3.5 Il complesso AR/FlnA e l'attivazione di rac1 sono richiesti per la migrazione cellulare dipendente da androgeno</b>	<b>p.65</b>
<b>4. Discussione</b>	<b>p.68</b>
<b>5. Materiali e Metodi</b>	<b>p.71</b>

<b>5.1</b>	<b>Colture cellulari e saggi di transattivazione</b>	<b>p.71</b>
<b>5.2</b>	<b>Costrutti</b>	<b>p.72</b>
<b>5.3</b>	<b>Wound healing assay</b>	<b>p.72</b>
<b>5.4</b>	<b>Transwell assay</b>	<b>p.72</b>
<b>5.5</b>	<b>Immunofluorescenza e microscopia confocale</b>	<b>p.73</b>
<b>5.6</b>	<b>Riarrangiamenti citoscheletrici</b>	<b>p.74</b>
<b>5.7</b>	<b>Preparazione di lisati cellulari, siRNA e immunoprecipitazione</b>	<b>p.74</b>
<b>5.8</b>	<b>Elettroforesi e immunoblotting</b>	<b>p.75</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>p.77</b>
<b>7.</b>	<b>Abbreviazioni</b>	<b>p.82</b>
<b>8.</b>	<b>Ringraziamenti</b>	<b>p.84</b>
<b>9.</b>	<b>Elenco delle pubblicazioni</b>	<b>p.85</b>
<b>10.</b>	<b>Lavori</b>	<b>p.86</b>



**TITLE:**

**ANDROGEN-INDUCED MIGRATION IN NIH3T3 MOUSE FIBROBLASTS:  
ROLE OF AR (ANDROGEN RECEPTOR) ASSOCIATION WITH FILAMIN A**

**ABSTRACT:**

Androgen stimulation triggers rapid activation of various signaling effectors in target cells (Migliaccio et al. 2000; Castoria et al. 2003). This occurs through a direct interaction of classical steroid receptors with proto-oncogenic tyrosine kinase (Src), the p85-regulatory subunit of Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and other signaling components. Activation of these pathways fosters cell cycle, prevents apoptosis and leads to cytoskeleton changes in reproductive as well as non reproductive cells.

The role of signaling activation in steroid action has been corroborated by findings showing that mouse embryo NIH3T3 fibroblasts express very low amount of classical androgen receptor (AR) which does not activate gene transcription. This receptor, through rapid and extra nuclear action, triggers migration upon stimulation with physiological concentrations (10nM) of the non aromatizable androgen, R1881 (Castoria et al. 2003).

By combining different approaches, it was observed that filamin A (FlnA) has an important role in androgen-stimulated migration.

In NIH3T3 cells, 10 nM R1881 rapidly induces interaction of AR with filamin A at cytoskeleton. AR/FlnA complex recruits and activates integrin beta1. Androgen assembled AR/FlnA/integrin beta1 complex activates both Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) and focal adhesion kinase (FAK), which independently of each other coordinate cytoskeletal changes and cell motility of fibroblasts.

Collected data indicate that AR/FlnA interaction in the extra-nuclear compartment of target cells plays a master role for the access of androgen to the signalling leading to cell migration. Such an interaction may impact human organ development as well as cancer progression and may offer new hints to gain a more tailored therapy of androgen-dependent human cancers.

**Key words:** *androgens, migration, AR/ filamin A complex*

## **Introduzione**

In ogni organismo vivente la migrazione cellulare assume un ruolo centrale sia nei processi fisiologici che in quelli patologici. L'importanza della migrazione inizia sin dallo sviluppo embrionale, durante la quale le cellule, migrando, determinano la formazione di organi e tessuti.

Tale fenomeno possiede una peculiare importanza nei processi di infiammazione e rigenerazione: i leucociti, infatti, migrano verso le zone in cui si manifesta un'infezione per esplicare le loro funzioni immunologiche; le cellule endoteliali, durante il processo di angiogenesi (Gobin and West, 2002), migrano nei tessuti circostanti per formare nuovi vasi sanguigni; mentre i fibroblasti e le cellule epiteliali si dirigono nelle aree cutanee danneggiate, per rigenerare i tessuti e riparare le ferite della pelle (Friedl and Brocker, 2000). Ancora, nelle metastasi, le cellule tumorali si staccano dalla iniziale massa tumorale migrando verso l'ambiente circostante, al fine di espandersi il più possibile (Raeber et al. 2005; Friedl and Wolf, 2003).

La migrazione richiede, però, il coordinamento tra diversi processi della cellula che comprendono l'adesione, il traffico di membrane, e la riorganizzazione del citoscheletro.

Per muoversi direzionalmente, le cellule percepiscono gradienti chimici di sostanze mitogeniche e regolano, nel tempo e nello spazio, la funzione dei propri recettori di adesione.

L'adesione cellulare consente l'aggregazione tra le cellule o tra le cellule e la matrice extracellulare, coinvolgendo numerosi recettori transmembranari che si connettono, attraverso le proteine giunzionali, al citoscheletro. Infatti, il processo di adesione cellulare può sia generare che ricevere informazioni, mediante interazioni molecolari sinergiche e sequenziali regolate dall'aggregazione delle cellule, da cambiamenti conformazionali delle proteine coinvolte in tali processi e dal loro stato fosforilativo (Yamada K.M. and Geiger B., 1997).

Per tale motivo, i componenti dei complessi di adesione cellulare mostrano interazioni e funzioni multiple, mediando sia i processi di adesione cellulare

che i pathways trasduzionali conseguentemente innescati. (Yamada K.M. and Geiger B., 1997).

La dinamica e la struttura di tali meccanismi molecolari sono conservate nel fenotipo cellulare normale, o wild type, della maggior parte dei tipi cellulari, mentre nei fenotipi cellulari tumorali si osserva un'ampia variabilità di questa organizzazione proteica, nonché dei messaggeri trasduzionali ad essa associati.

La crescita di molte cellule tumorali è "ancoraggio indipendente" e spesso tali cellule perdono "l'inibizione da contatto", tipico meccanismo di regolazione negativa della proliferazione nel fenotipo cellulare normale, innescato da una eccessiva adesione cellula-cellula (Ben-Zeev A., 1997). La trasformazione tumorale, infatti, è caratterizzata da alterazioni dell'organizzazione citoscheletrica con conseguente diminuita capacità di adesione e alterata risposta agli stessi processi di adesione.

L'adesione cellulare è, quindi, un processo fondamentale per la formazione ed il mantenimento della struttura dei tessuti e quindi per una loro corretta funzione.

Gli stimoli esterni che controllano la migrazione cellulare sono trasmessi all'interno della cellula grazie alle integrine che legano le proteine della matrice extracellulare (ECM), nonché ai fattori di crescita che legano i recettori sulla superficie cellulare o anche grazie a stimoli come, ad esempio lo stress, che promuove la deformazione del citoscheletro di actina (Mitra SK. et al., 2005).

Numerosi studi hanno mostrato che i contatti tra matrice e cellule, mediati da integrine, forniscono segnali critici (come l'attivazione di proteine con attività tirosin-chinasica e fosfatasica) che regolano la proliferazione cellulare, l'apoptosi e la migrazione.

La migrazione cellulare è un processo coordinato che coinvolge cambiamenti rapidi nei filamenti di actina, grazie all'assemblaggio e al disassemblaggio dei siti di adesione focale.

Gli ancoraggi intracellulari del citoscheletro assicurano che non si verifichino strappi nel sito di connessione fra la cellula e la matrice extracellulare, e permettono alla membrana cellulare di estendersi (spreading), formando

delle protuberanze con strutture spesse e distese (lamellipodi) o cilindriche e sottili (filopodi), responsabili dell'orientamento e della morfologia della cellula durante la migrazione.

Un crescente numero di studi ha dimostrato una diretta cooperazione, nella regolazione dell'adesione e della migrazione cellulare, fra integrine, proteine a esse associate, recettori per fattori di crescita e GTPasi (hydrolyze guanosine triphosphate) monometriche della famiglia Rho (Ras homology gene family) che sono coinvolte nel riarrangiamento del citoscheletro. E' stato dimostrato che in talune condizioni le proteine Rho funzionano in maniera aberrante, determinando così un fenotipo tumorale (Frame MC. et al., 2002).

L'interesse principale della nostra ricerca è l'identificazione e l'analisi delle reti molecolari che servono a coordinare l'attività di protrusione necessaria alla migrazione.

La comprensione di questi meccanismi è fondamentale per mettere a punto metodologie in grado di interferire o modificare situazioni in cui un'alterata funzionalità delle reti molecolari può avere importanti conseguenze nella patologia umana come la formazione di metastasi causate da alterazioni del comportamento migratorio delle cellule tumorali, o le malattie mentali causate dal malfunzionamento dei circuiti neuronali.

Lo scopo di questa tesi è, quindi, la caratterizzazione dei meccanismi molecolari che regolano la motilità indotta dagli androgeni in cellule mesenchimali. La comprensione di tali processi potrebbe rivelarsi utile nell'analisi del ruolo di tali ormoni nei processi di invasività e metastasi.

Gli ormoni steroidei, infatti, stimolano la proliferazione cellulare di particolari tessuti detti ormono-sensibili od ormono-dipendenti, intervenendo nei meccanismi che regolano l'organogenesi, partecipando ai processi di sviluppo e di morfogenesi, e inducendo, in caso di erronea trasmissione del segnale, la trasformazione e la progressione neoplastica. In particolare, questa tesi intende analizzare l'azione dell'androgeno in fibroblasti di topo NIH3T3. I fibroblasti rappresentano la principale popolazione cellulare del compartimento stromale e sono coinvolti nell'interazione stroma-epitelio.

In questo lavoro, si analizza il meccanismo di trasduzione del segnale attraverso cui gli androgeni, modulando l'interazione di proteine specifiche, modificano la struttura citoscheletrica della cellula, nonché la sua capacità di migrare.

Quindi, i fibroblasti NIH3T3 rappresentano un nuovo importante esempio di linea cellulare, nella quale gli androgeni si rivelano capaci di attivare meccanismi di trasduzione del segnale anche in assenza dell'attività trascrizionale del recettore endogeno.

### 1.1 Azioni genomiche e non genomiche degli ormoni steroidei.

Gli ormoni steroidei influenzano diversi processi tra cui la proliferazione cellulare, l'infiammazione, la guarigione delle ferite, il differenziamento cellulare, l'integrità dell'apparato cardiovascolare e l'immunità. Essi, inoltre, controllano le trasformazioni e la progressione neoplastica di tessuti bersaglio.

I recettori steroidei appartengono ad una vasta famiglia di proteine strutturalmente simili ai recettori nucleari che legano ligandi come steroidi, acidi retinoici, vitamina D3 e triiodotironina.

I membri di questa famiglia hanno un dominio strutturale conservato con tre maggiori regioni funzionali: un dominio di transattivazione NH2-terminale (AF1: activation function 1) ligando indipendente, un dominio in posizione centrale che lega il DNA (DBD: DNA binding domain) e un dominio COOH-terminale che lega l'ormone (LBD: ligand binding domain), al cui interno è presente il dominio di transattivazione (AF2: activation function 2) ligando dipendente. Il dominio COOH-terminale contiene, inoltre, una regione cardine che connette il LBD ed il DBD (Parker MG, 1990). La figura 1 schematizza la struttura del recettore degli androgeni.



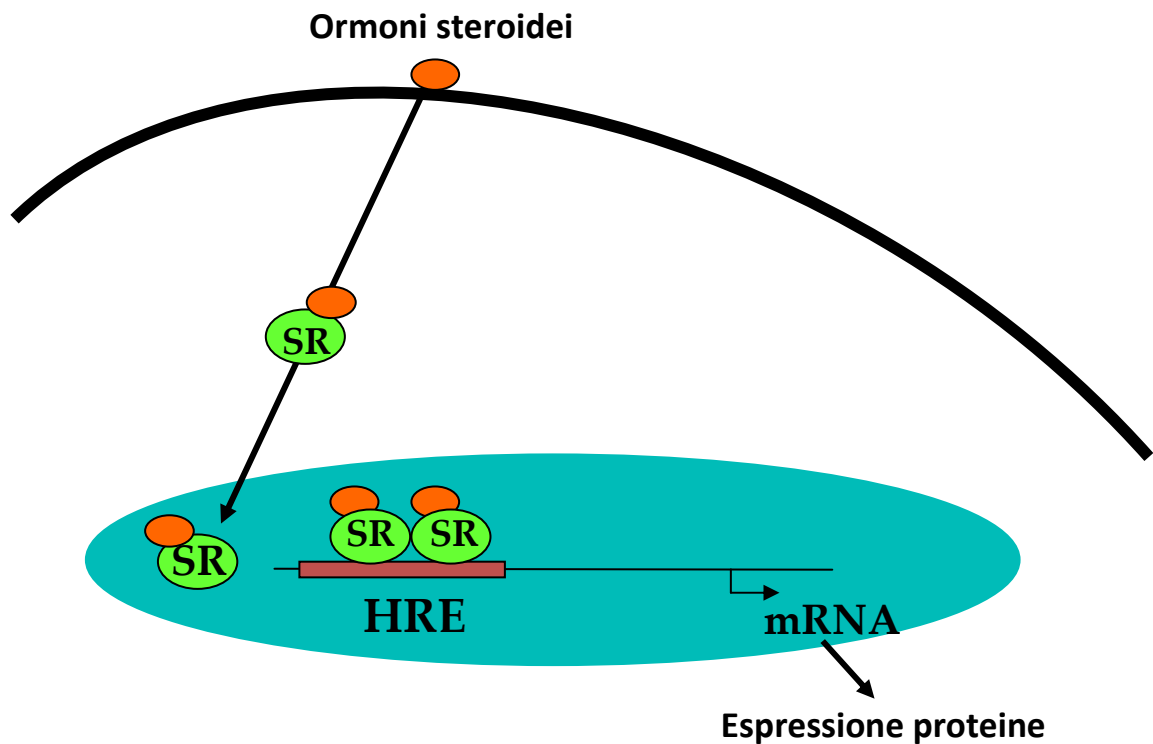
**Fig. 1. Rappresentazione schematica del recettore degli androgeni.**

Comunemente, il modello classico del meccanismo di azione degli ormoni steroidei prevede che essi attraversano per semplice diffusione la membrana plasmatica, si legano ai propri recettori e questi ultimi, attivati dal legame con il proprio ligando, controllano l'espressione di specifici geni (Mangelsdorf et al.,1995). I recettori steroidei appartengono, quindi, ad una classe di fattori trascrizionali, che stimolano la trascrizione genica legandosi a specifiche sequenze di DNA, denominate elementi responsivi agli ormoni "HRE" (hormone responsive elements), situati nella regione promotrice dei geni sensibili.

In seguito al legame con l'ormone, il recettore modifica la sua conformazione e, dopo essere traslocato nel nucleo, dimerizza con altri complessi ormone-

recettore dello stesso tipo. Quando il dimero si lega all'“HRE”, il promotore nelle vicinanze si attiva e inizia la trascrizione di nuovi geni. In tal modo gli steroidi controllerebbero l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare (Chauhan et al., 2004; Blaustein et al., 2004; Deroo et al., 2006).

La figura 2 rappresenta il meccanismo classico d'azione degli ormoni steroidei.



**Fig. 2 Meccanismo classico di azione degli ormoni steroidei.**

Oltre a questo meccanismo classico o “genomico”, è stato recentemente identificato un meccanismo di segnalazione alternativo, “non genomico”, attraverso il quale gli stimoli funzionerebbero nelle cellule bersaglio. Tali effetti, non genomici o rapidi sono responsabili, in diversi sistemi cellulari, del controllo della progressione in ciclo, dei cambiamenti citoscheletrici e della sopravvivenza cellulare.

Alcuni di questi effetti sono mediati dai classici recettori steroidei mentre altri, sembrano essere mediati da recettori non classici. Tali effetti rapidi attivano la tirosina-chinasi proto-oncogenica (Src), l'adenilato ciclasi (AC), le proteine chinasi attivate da mitogeni (MAPKs), la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) e inducono aumenti delle concentrazioni di calcio intracellulare. L'azione di tale via, non genomica, è spesso associata anche a circuiti attivati

da recettori associati alla membrana come GPCRs (G protein-coupled receptor) o canali ionici (Castoria et al., 2008).

Gli studi condotti fino ad oggi hanno dimostrato che esiste una cooperazione tra le vie genomiche e non genomiche e che la loro integrazione ha un'importanza fondamentale in molti processi fisiopatologici (Castoria et al., 2008).

Gli effetti genomici si verificano dopo ore, sono inibiti da inibitori della trascrizione genica e sono mediati da recettori classici, mentre gli effetti non genomici sono evidenziabili in pochi minuti, non sono inibiti da inibitori della trascrizione e sono mediati o da classici recettori steroidei oppure da recettori di membrana (Castoria et al., 2008). Gli effetti rapidi degli ormoni steroidei possono essere raggruppati in due classi:

- effetti mediati da recettori legati alle membrane, diversi dai classici recettori steroidei;

- effetti rapidi, mediati da recettori steroidei classici associati alle membrane o citoplasmatici.

Tra questi effetti vanno annoverati quelli, scritti in questa tesi, sulla migrazione cellulare.



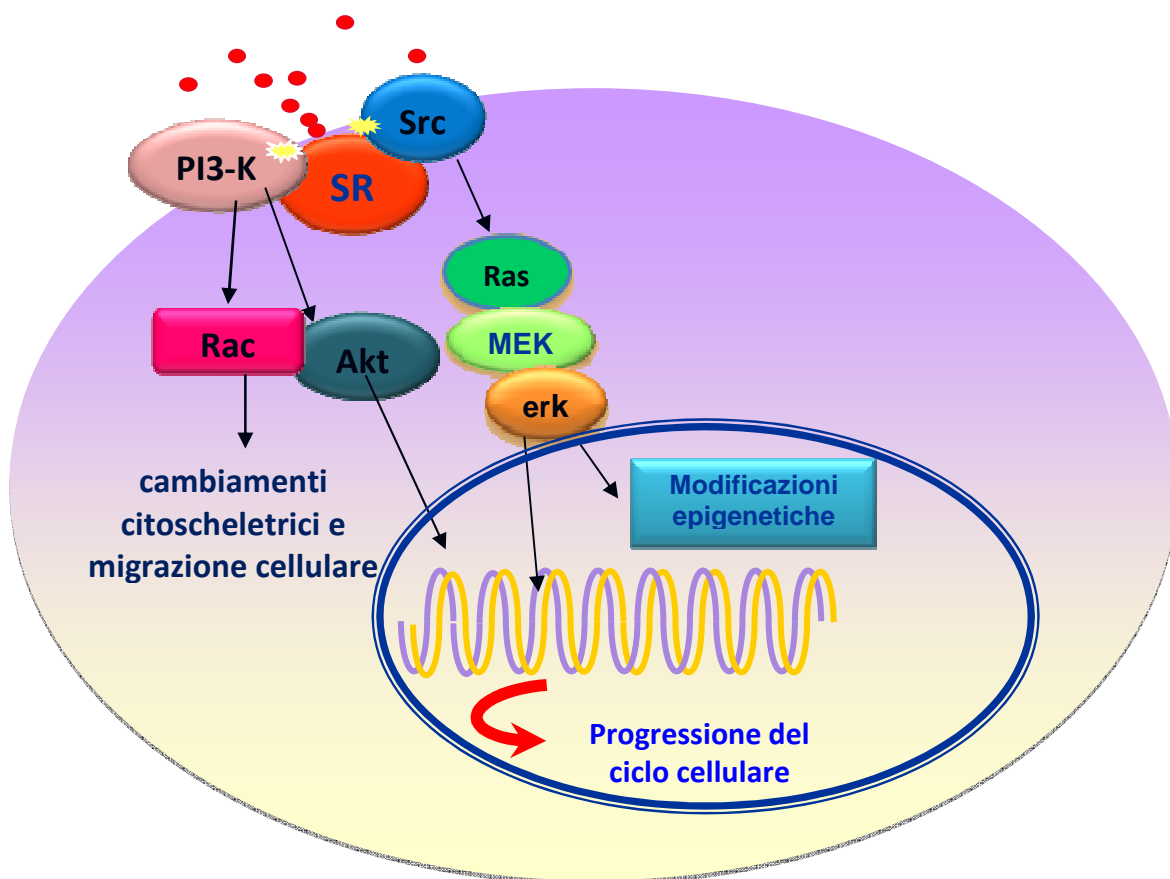


Fig. 3 Meccanismo di azione non genomico degli ormoni steroidei.

## 1.1 Il ruolo delle integrine

Le integrine sono recettori di membrana che permettono il legame della cellula a componenti della matrice extracellulare.

Le integrine sono recettori eterodimerici costituiti dall'associazione non-covalente di una subunità  $\alpha$  e una  $\beta$ , entrambe composte da una porzione globulare extracellulare, un segmento transmembrana e una breve coda intra-citoplasmatica.

Nell'uomo esistono 19 tipi di subunità  $\alpha$  e 8 tipi di subunità  $\beta$  che eterodimerizzando formano 25 differenti recettori integrinici distinti per specificità e affinità di legame.

La subunità  $\alpha$  presenta quattro segmenti con una sequenza amminoacidica ripetuta, responsabili dell'interazione con cationi bivalenti essenziali per la funzione del recettore.

La subunità  $\beta$  è caratterizzata, invece, dalla presenza di quattro segmenti ricchi in cisteina che stabilizzano l'esteso "loop" extracellulare aminoterminale. Le due subunità associandosi, costituiscono una tasca in corrispondenza della quale avviene il riconoscimento e il legame delle molecole specifiche per ciascuna integrina. Il sito di riconoscimento per le integrine è costituito da tre aminoacidi (arginina-glicina-acido aspartico o RGD) (Van der Flier A. and Sonnenberg, 2001).

Le integrine sono spesso descritte come "colla della vita", a significare che la maggiore funzione di questi recettori è quella di preservare la giusta struttura dei tessuti attraverso l'organizzazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare.

E' stata dimostrata la loro capacità di trasdurre, selettivamente e in maniera modulabile, segnali all'interno e all'esterno della cellula in un'ampia varietà di tipi cellulari, anche in sinergismo con altri sistemi recettoriali.

Esse sono quindi versatili molecole che giocano un ruolo chiave in vari processi cellulari, sia durante lo sviluppo sia nell'organismo adulto: adesione e migrazione cellulare, crescita e divisione cellulare, sopravvivenza, apoptosi e differenziamento cellulare, sostegno al sistema immunitario, ecc.

Sono qui elencate alcune delle integrine rilevabili nei vertebrati.

Nome	Sinonimi	Distribuzione	Legami
$\alpha 1\beta 1$		Numerosi tessuti	Collagene, laminine
$\alpha 2\beta 1$		Numerosi tessuti	Collagene, laminine
$\alpha 4\beta 1$	VLA-4	Cellule ematopoietiche	Fibronectina, Vascular cell Adhesion Molecule 1(VCAM-1)
$\alpha 5\beta 1$		Fibroblasti	Fibronectina
$\alpha L\beta 2$	LFA-1	Linfociti T	Intercellular Adhesion molecule, ICAM1-2
$\alpha M\beta 2$	Mac-1, CR3	Monociti	Proteine siero, ICAM-1
$\alpha IIb\beta 3$		Trombociti	Proteine, siero, fibronectina
$\alpha 6\beta 4$		Cellule epiteliali	Laminina

Le integrine partecipano alla trasduzione dei segnale "da fuori a dentro" (out-in) e "da dentro a fuori" (in-out) la cellula (Giancotti et al. 1999).

Il meccanismo "in-out" è importante, ad esempio, per il reclutamento dei leucociti durante la risposta infiammatoria. In condizioni basali, le integrine sono in una conformazione inattiva e mantengono i leucociti in una condizione di non-adesività. L'attivazione dei leucociti da parte di mediatori chemiotattici locali derivati dall'endotelio, genera dei segnali all'interno dei leucociti con modificazioni conformazionali degli eterodimeri integrinici. Tali modificazioni aumentano l'affinità delle integrine per i ligandi per le molecole di adesione intercellulare endoteliali (ICAM) ed accentuano l'adesività dei leucociti all'endotelio.

Il meccanismo di segnalazione "out-in" inizia con il legame di un ligando ad una integrina a livello della superficie cellulare con conseguente generazione di segnali biochimici all'interno della cellula. I secondi messaggeri attivati dalle code citoplasmatiche delle integrine comprendono le proteine G e le tirosin-chinasi che a loro volta esercitano una induzione della contrazione del citoscheletro e la regolazione dell'espressione genica.

Esistono, quindi, due vie di segnali mediate dalle integrine: la prima è una via diretta in cui queste molecole, in seguito all'interazione con i componenti della matrice extracellulare, attivano una serie di segnali intracellulari; la seconda, invece, è una via indiretta in quanto le integrine modulano ad esempio segnali mitogeni di vari fattori di crescita o sono coinvolte nel processo dell'apoptosi (Harburger DS and Calderwood, 2009).

Prese nel loro insieme, le funzioni delle integrine di mediare una stabile adesione con la matrice extracellulare e con altre cellule, nonché di partecipare all'assemblaggio della matrice extracellulare, di controllare la migrazione e la cascata di trasmissione dei segnali, possono spiegare il ruolo vitale che questi recettori esplicano nello sviluppo e nel funzionamento regolare di vari tessuti. Per contro, l'assenza o il malfunzionamento delle integrine è associato con uno sviluppo aberrante dei tessuti e delle loro funzioni, risultando in definitiva nell'instaurarsi e protrarsi di molte malattie quali le patologie trombotiche, la formazione e progressione di metastasi tumorali, l'angiogenesi tumorale, i danni vascolari della aterosclerosi, l'osteoporosi e le diverse patologie infiammatorie e autoimmuni.

La meccanica delle connessioni tra la matrice extracellulare e quella intracellulare è raggiunta attraverso una numerosa serie di legami deboli (non covalenti) e indiretti, tramite proteine "armatura" (talina, paxillina, alpha-actinina ecc.), che si connettono o disconnettono in maniera rapida (una specie di effetto velcro). Le cellule sono quindi tra loro connesse attraverso una matrice che comunica con loro attraverso attivi legami deboli secondo una geometria di tensegrità che varia costantemente in base all'attività della cellula, del corpo, e alla condizione della matrice stessa (Liu S. et al., 2000).

I segnali integrinici e l'assemblaggio del citoscheletro sono intimamente connessi. Mentre i domini extracellulari delle due subunità integriniche legano i componenti della matrice extracellulare determinando il "clustering" delle integrine sulla superficie della membrana, i domini citoplasmatici, che non hanno un'attività enzimatica intrinseca, agiscono legandosi con proteine citoplasmatiche, formando così da ambo i lati della membrana cellulare grandi complessi proteici costituiti da proteine della matrice extracellulare, integrine e molecole citoscheletriche note come "placche di adesione" o "adesioni focali".

L'interazione tra le integrine e gli elementi del citoscheletro conduce alla formazione di giunzioni specializzate note appunto come adesioni focali.

Queste strutture contengono oltre all'actina anche altre molecole che possono formare ponti molecolari con varie strutture della membrana e del citoscheletro ( $\alpha$ -actinina, inculina, talina, paxillina, tensina, zyxina) e sistemi di trasduzione (c-crk).

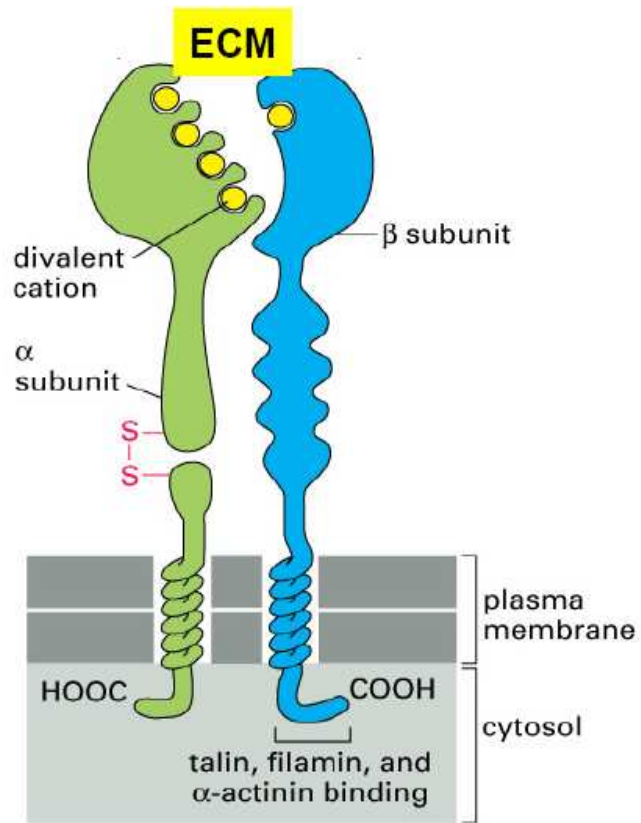
Le placche di adesione hanno un ruolo di primaria importanza nella regolazione della struttura del citoscheletro cellulare. Prima che il loro coinvolgimento nella trasduzione dei segnali diventi predominante, la principale funzione di queste formazioni è quella di collegare la cellula al suo substrato attraverso le integrine che, mediante tali strutture, si associano al citoscheletro actinico.

Integrine e recettori convenzionali di segnale possono inoltre cooperare per stimolare vari tipi di risposta cellulare. Cellule in coltura, per esempio, non crescono né proliferano in risposta ad un fattore di crescita extracellulare in mancanza di un ancoraggio di tipo integrinico alle molecole della matrice extracellulare.

Per alcuni tipi di cellule, tra cui quelle epiteliali, le cellule endoteliali e le miocellule, persino la sopravvivenza dipende da un sistema segnale legato alle integrine: quando queste cellule perdono il contatto con la matrice extracellulare esse si avviano al processo di morte cellulare programmata o apoptosi.

Questa dipendenza dall'ancoraggio alla matrice extracellulare per la sopravvivenza e la proliferazione può essere di aiuto per assicurare che le

cellule sopravvivano e proliferino solo nel loro ambiente adatto, e ciò anche per contrastare la migrazione di eventuali cellule neoplastiche.



**Fig. 4** Interazione del recettore dimerico dell'integrina con le proteine dell'ECM.

### 1.3 Filamina

Dopo l'attacco di una tipica integrina al suo ligando nella matrice, la coda citoplasmatica della subunità beta prende contatto col citoscheletro, legandosi a molte proteine di ancoraggio intracellulari, fra cui la talina,  $\alpha$ -chinina e la filamina (FLN), che si collegano ai filamenti di actina.

L'actina svolge un ruolo importante nella formazione e nel mantenimento dei contatti della cellula con la matrice extracellulare.

La prima proteina non muscolare studiata capace di legare l'actina è stata la filamina.

Essa è una proteina che organizza i filamenti di actina, per formare strutture dinamiche tridimensionali, in rete o in stress fibers (Popowicz et al., 2006) in particolare nelle regioni corticali delle cellule, che conferiscono al citosol una consistenza simile a gel.

Le reti gelificate costituiscono una specie di impalcatura della maggior parte della periferia cellulare. La rigidità di tale struttura è data dalla filamina che partecipa alla costituzione di questa maglia di filamenti di actina, favorendone la viscosità elevata. Nei processi di formazione dei filopodi, invece, questo gel diventa più liquido per la presenza della gelsolina, una proteina che, in presenza di Calcio ( $Ca^{++}$ ) e di adenosina trifosfato (ATP), interrompe i filamenti di actina e, formando un cappuccio sulla loro estremità positiva, ne impedisce l'allungamento. Perciò, la filamina serve da ponte tra due microfilamenti che si intersecano, formando reti tridimensionali.

Nei mammiferi sono presenti tre isoforme di FLN: a, b e c (Van der Flier & Sonnenberg, 2001), con omologia di sequenza del 70%, ad eccezione dei due anelli flessibili, detti "hinge domain" (H1;H2) che hanno solo il 45% di omologia (Van der Flier et al., 2000). Inoltre la FLNc contiene 81 amminoacidi nella ripetizione 20 che non sono presenti nelle isoforme a e b.

Mentre il gene FLNa mappa sul cromosoma X, i geni FLNb e FLNc sono localizzati su due cromosomi autosomici: FLNb in 3p14.3 e FLNc in 7q32-35.

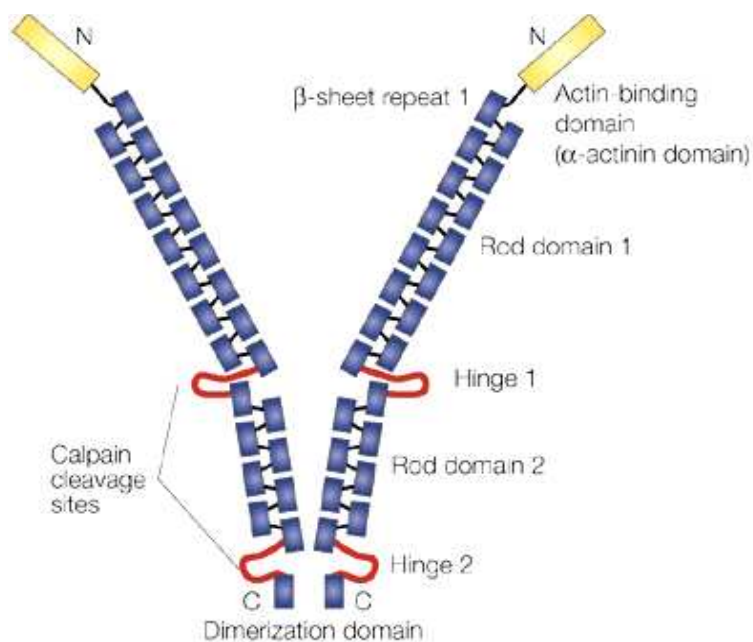
Le proteine FLNa e FLNb sono espresse in modo ubiquitario, anche se i livelli di espressione dell'isoforma b sono diversi in ogni tessuto e pressoché nulli nei linfociti T (Calderwood et al., 2001). La FLNc invece si trova solo nei muscoli scheletrico e cardiaco (Van der Flier et al., 2000).

I dimeri di FLN possono organizzare l'actina in reti ortogonali (cross-linkando i filamenti) oppure in fasci paralleli: questi due diversi tipi di organizzazione sono dovuti al rapporto tra le molecole di actina e quelle di FLN e alla flessibilità molecolare dell'isoforma di FLN; un alto rapporto FLN/actina promuove la formazione di fasci paralleli, mentre il contrario promuove la formazione di reti ortogonali (Van der Flier & Sonnenberg, 2001); la FLNc che manca delle regioni ad anello H1 e H2 risulta meno flessibile e forma fibre actiniche più rigide.

La filamina si presenta come un dimero, di cui ogni catena polipeptidica pesa 280 kDa ciascuna; consiste in un dominio N-terminale che lega l'actina, di 24 domini ripetuti rod-like, interrotti da due anelli di 30 amminoacidi ciascuno che le conferiscono flessibilità (H1 e H2: Hinge domain), e un dominio C-terminale responsabile della dimerizzazione (Stossel et al., 2001). La porzione carbossi-terminale della proteina contiene il sito di omodimerizzazione e i siti di legame con diverse proteine intracellulari tra cui le integrine beta1 e beta2, il fattore tissutale e la presinilina 1 (Gorlin et al. 1990; Van der Flier et al., 2001).

Il dominio che lega l'actina (ABD: actin binding domain) è composto da due domini omologhi alla calponina (CHD1;CHD2: Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1,2) e assomiglia ai domini di altre proteine che legano l'actina, come la  $\beta$ -spectrina, l' $\alpha$ -actinina, la calponina e la distrofina, e permette alla FLN di legarsi ai filamenti di actina; i domini rod-like sono costituiti da foglietti  $\beta$  anti-paralleli che assomigliano ai domini delle immunoglobuline, e sembrano funzionare da interfaccia per le interazioni proteina-proteina; infatti la FLN, oltre l'actina, lega più di 30 diverse proteine (Feng & Walsh, 2004).





**Fig. 5 Struttura della Filamina A umana**

Poiché molte delle proteine a cui si associa la FLN sono recettori di membrana, è stato proposto che la FLN funzioni come una sorta di impalcatura che connette e coordina vari processi cellulari alle dinamiche dell'actina citoscheletrica.

Il legame di FLNa con molteplici recettori di membrana e con l'actina permette la formazione di links cruciali per la trasduzione del segnale al citoscheletro, con rilevanti conseguenze funzionali in fenomeni biologici quali la migrazione neuronale, l'angiogenesi e la coagulazione (Fox et al., 1998).

Le proteine FLNa e FLNb colocalizzano all'interno dei precursori neuronali e per tale motivo è stata ipotizzata l'eterodimerizzazione di queste due isoforme (Sheen et al., 2002). E' stato dimostrato che gli omologhi di FLNa sono coinvolti nella regolazione della stabilità cellulare, nella protrusione e nella motilità attraverso vari sistemi biologici.

La FLN promuove la formazione di reti actiniche, in particolare nelle regioni corticali delle cellule, che conferiscono al citosol una consistenza simile a gel. La connessione che si stabilisce tra questi e l'actina, attraverso molecole adattatrici come la FLN, ancorando i recettori all'actina corticale o alle fibre da stress, conferisce stabilità meccanica alla membrana cellulare, oltre a mantenere le connessioni tra cellule e tra cellula e matrice. Le FLN, collegando tra loro recettori di superficie, tipo le  $\beta$ -integrine (Loo et al., 1998;

Deryk et al, 1998), la rete di actina e le componenti del segnale intracellulare, potrebbero costituire l'impalcatura di complessi di signaling e facilitare l'attivazione dei processi cellulari locali, in particolare quelli che coinvolgono la polimerizzazione dell'actina (Stossel et al., 2001).

La regolazione delle interazioni tra FLN, actina e proteine trans-membrana non è conosciuta. È stato però riportato che l'occupazione di un recettore da parte del suo ligando influenza l'associazione della FLN con i recettori transmembrana: ad esempio, quando il recettore Fc-gamma 1 (FcγR I) lega una immunoglobulina, diminuisce la sua interazione con la FLNa. Questo può far ipotizzare che il recettore in assenza di ligando sia connesso al citoscheletro corticale actinico tramite la FLN, quindi l'interazione col suo ligando lo libererebbe dall'ancora e questo determinerebbe la riorganizzazione del citoscheletro.

Nell'organizzazione dei filamenti di actina, in rete o in fibre parallele, la filamina funge da "scaffold" per differenti tipi di proteine, quali recettori transmembrana, chinasi e GTPasi monomeriche (Ueda et al., 1992), permettendo l'interazione delle stesse con l'actina.

È stato dimostrato che la filamina A interagisce con le piccole GTPasi, tra cui Ras homolog gene family, member A (RhoA), Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac), cell division control protein 42 homolog (Cdc42) e Ras-related protein (RalA), oltre che qualcuno dei cofattori che sono implicati nella regolazione dell'assemblaggio dell'actina (Bishop & Hall, 2000). Ral lega la FLNa in modo GTP-dipendente, mentre Cdc42, RhoA e Rac1 costitutivamente.

Queste interazioni avvengono all'interno della regione carbossi-terminale della FLNa, che si contrappone alla membrana plasmatica attraverso il legame con la coda citoplasmatica delle integrine (Zhou et al., 2009).

È probabile che interagendo direttamente con il signaling delle proteine Rho, le FLN possano organizzare i filamenti di actina in configurazioni tridimensionali utili alla cellula (Stossel et al., 2001).

Nonostante le molte evidenze sperimentali che legano la FLN al signaling cellulare, non è stato ancora chiarito come il segnale abbia effetto sulla FLN. Parecchie serina-treonina chinasi fosforilano la FLN, come ad esempio la

proteina chinasi A (PKA) e la proteina chinasi C (PKC). Anche la proteina tirosina chinasi specifica per i linfociti (Lck) fosforila la FLN (Pal Sharma & Goldmann, 2004), forse per regolare la sua associazione con i recettori di superficie oppure con i lipidi di membrana o per regolare il legame crociato dei filamenti di actina in reti (Goldmann, 2001); il legame con Lck potrebbe quindi avere effetti sul posizionamento della chinasi in specifiche aree del foglietto intra-citoplasmatico della membrana.

Di recente, è stato valutato anche il ruolo che la filamina possiede nell'adesione e migrazione cellulare. Infatti, studi su modelli murini deficienti nella filamina hanno sottolineato l'importanza di questa proteina nella migrazione cellulare (Stossel et al., 2001).

Un modello sulla funzione di FLNa postula che nei neuroni senza FLNa manchi una parte del motore che ne determina la migrazione e che quindi questi neuroni rimangano bloccati nella zona ventricolare. Un modello alternativo propone invece che FLNa funzioni precocemente durante lo sviluppo corticale come un componente dello switch che è necessario per un neurone per diventare competente per poi migrare dalla zona ventricolare alla corteccia. In questo ultimo modello la FLNa funge ancora da legame tra il network di actina e la matrice cellulare ma mantiene un contatto statico tra un neurone fermo nella regione ventricolare e una cellula della glia radiale vicina.

E' stato, inoltre, osservato che le mutazioni nei geni FLN (a e b) causano una vasta gamma di malformazioni dello sviluppo del cervello, ossa, scheletro e del cuore, presumibilmente a causa di difetti gravi nella migrazione delle cellule embrionali come pure all'incapacità della filamina nell'interagire con altre proteine (Feng and Walsh, 2004).

Di recente sono stati analizzati diversi ruoli svolti dalla filamina. Ad esempio, è stato dimostrato che in fibroblasti murini 3T3, la filamina e la vimentina regolano l'attivazione e l'espressione dell'integrina beta1 durante lo spreading cellulare. Tale modulazione sarebbe mediata da una fosforilazione della vimentina da parte di PKC (Kim et al., 2010).

Ancora, recentemente, nel carcinoma prostatico umano, la localizzazione citoplasmatica della FLNa è stata correlata con fenotipo metastatico e resistente agli ormoni (Bedolla et al., 2009).

Questa osservazione suggerisce che la localizzazione intracellulare di FLNa regola l'invasività e la sensibilità ormonale nei tumori alla prostata. Infatti, la FLNa e frammenti di FLNa interagiscono direttamente con il recettore dell'androgeno (AR) e queste interazioni sono state correlate con la traslocazione nucleare (Ozanne et al., 2000) e con l'attività trascrizionale (Loy et al., 2003) di AR.

La FLNa recluta anche la serine/treonina proteina chinasi (PAK-1), un effettore a valle di Rac1 e Cdc42 (Vadlamudi et al. 2002).

La rapida attivazione da estradiolo di questa chinasi è richiesta per la forma e la polarità delle cellule del cancro alla mammella (Mazumdar & Kumar, 2003). Inoltre, l'attivazione non genomica di PAK-1 da estradiolo è responsabile per il feedback negativo dell'asse riproduttivo in vivo (Zhao et al., 2009).

In sintesi, FLNa interseca l'azione degli steroidi a diversi livelli e in diversi compartimenti cellulari attraverso l'ancoraggio di recettori steroidi (per esempio AR) o effettori di segnalazione (GTPasi e le loro molecole a valle) che mediano gli effetti rapidi degli steroidi.

## 1.4 Il ruolo di FAK

Il raggruppamento delle integrine a livello dei contatti focali attiva una tirosina chinasi, FAK (focal adhesion kinase), che a sua volta fosforila numerosi bersagli intracellulari che controllano diversi fenomeni biologici.

Poiché l'adesione delle cellule trasformate ai vasi è una tappa indispensabile per la formazione delle metastasi, FAK sta suscitando sempre maggiore interesse come potenziale bersaglio di interventi terapeutici per rivelare il potenziale metastatico.

FAK è una proteina tirosino-chinasica in grado di agire sinergicamente con i pathways intracellulari che regolano la migrazione, la proliferazione ed il differenziamento cellulare (Hanks, S. K. and Polte 1997; Zhao, et al 1998).

Essa e' una proteina di 125 KDa, strutturalmente è costituita all'estremità N-terminale da un dominio FERM (erythrocyte band 4.1-ezrin-radixin-moesin homology), seguito da un dominio chinamico, da un dominio FAT (focal adhesion targeting domain) al C-terminale (Parsons et al., 2003) che assolve al ruolo di targeting delle adesioni focali e da tre regioni ricche in prolina (PRR1,2,3: rat ventral prostatic proline-rich polypeptides 1,2,3).

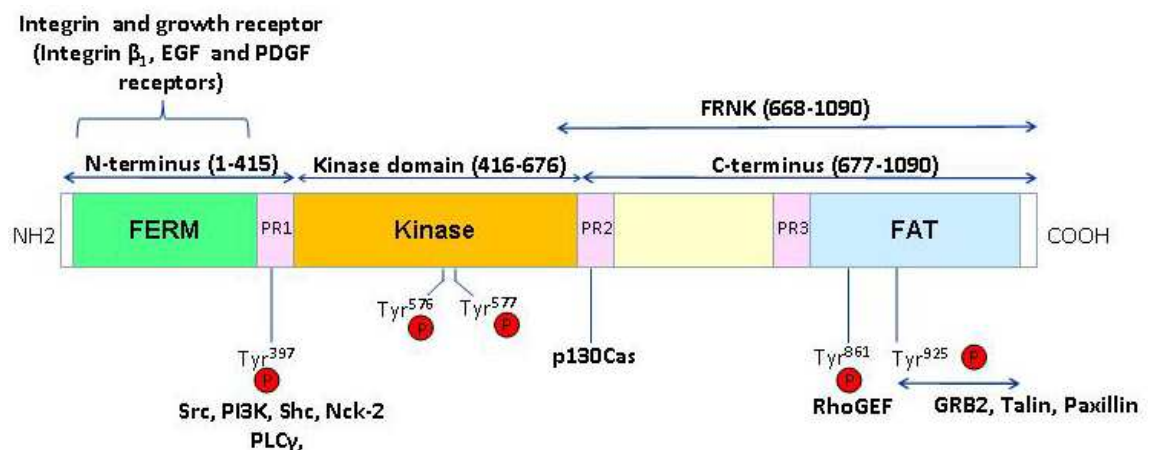


Fig. 6 Rappresentazione strutturale di FAK .

Attraverso il dominio FERM, la proteina interagisce con recettori ad attività tirosino-chinasica e con proteine adattatrici che ne favoriscono l'attivazione di FAK in dipendenza dalle integrine.

Il dominio FAT presenta una struttura raggruppata che forma 4 eliche contenenti siti di interazione con diverse proteine associate all'integrina, come la talina e la paxillina (Parsons et al., 2000; Parsons et al., 2003). Le regioni ricche in residui di prolina, presenti sia nel dominio N-terminale (PRR1) che in quello C-terminale (PRR2 e PRR3), rappresentano siti di reclutamento per proteine contenenti domini di omologia a Src (SH3), come Trio, p130Cas, GRAF (GTPase-activating protein for Rho associated with adhesion kinase), ASAP1 (ARF GTPase activating protein), talina e paxillina, che svolge un ruolo particolarmente importante.

La paxillina è stata individuata per la prima volta quale substrato di p60<sup>Src</sup> durante esperimenti rivolti ad individuare tutte le molecole associate a quest'ultima molecola; successivamente è stata caratterizzata come una proteina delle placche di adesione, espressa in diversi tipi cellulari, poco presente nelle piastrine e nei diversi tipi di cellule del sistema nervoso centrale, ma abbondante nelle cellule epiteliali.

La paxillina è una proteina adattatrice di 68 KDa che contiene diversi domini di interazione: quattro doppi domini, a dita di zinco, (LIM: cysteine-rich double zinc fingers) che sono importanti per l'interazione della paxillina stessa con i contatti focali (Deakin et al., 2008), un sito ricco in prolina per il legame con il dominio SH3 e cinque regioni con motivi LD ricche in leucina nel dominio N-terminale.

Grazie a tali regioni, la paxillina si inserisce nella porzione idrofobica di FAK costituita dal dominio FAT. Inoltre, essa lega direttamente il dominio citoplasmatico del recettore delle integrine, funzionando da "docking partner" di FAK nella formazione delle adesioni focali (Brown MC and Turner, 2004).

La paxillina può essere fosforilata da diverse chinasi a livello dei residui di tirosina, serina e treonina. Le principali molecole che estrinsecano questa azione sono p125<sup>FAK</sup>, p60<sup>Src</sup> e il complesso p210<sup>BCR/ABL</sup>. La sua fosforilazione è coinvolta nella regolazione della formazione delle placche di adesione e, quindi, dell'adesione cellulare, nonché sembra essere cruciale per la trasduzione dei segnali integrinici.

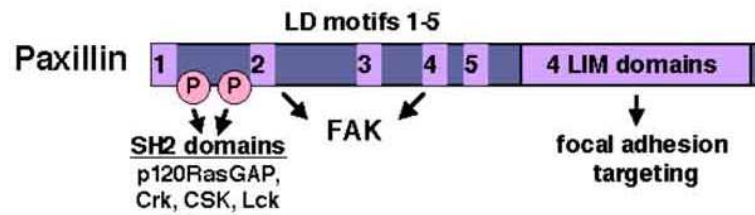


Fig. 7 Rappresentazione schematica della paxillina.

In seguito al legame con la paxillina, le due regioni ricche in prolina, presenti al dominio C-terminale di FAK, sono riconosciute dal dominio SH3 contenuto in diverse proteine. In tal modo vengono reclutate Cas nonché i due regolatori GRAF e ASAP1. Il legame di GRAF e/o di ASAP a FAK potrebbe servire a collegare la segnalazione del complesso focale con la regolazione di proteine GAP (GTPase activating proteins), coinvolte nella riorganizzazione del citoscheletro (Turner CE, 2000)

## 1.5 FAK e signaling

FAK è una proteina tirosino-chinasica che interviene nella organizzazione delle adesioni focali e che viene reclutata nel meccanismo di trasduzione del segnale a seguito dell'attivazione dei recettori integrinici, e di fattori di crescita.

L'attivazione di FAK è determinata dalla fosforilazione su vari residui di tirosina. I siti di fosforilazione in tirosina noti sono: le tirosine 397 e 407 al dominio N-terminale, le 576 e 577 all'interno del dominio di attivazione chinasica e le 861 e 925 all'interno del dominio C-terminale. La tirosina in posizione 397 si autofosforila in seguito al reclutamento di FAK a livello delle adesioni focali (Hamadi et al., 2005).

E' stato visto che in seguito alla associazione delle integrine, FAK si autofosforila e recluta, nelle adesioni focali, proteine chinasiche appartenenti alla famiglia Src: questa tappa è necessaria per la mobilità cellulare integrina-mediata (Zhou D. et al., 2000).

Alcune proteine come PI3-K, fosfolipasi C  $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), il complesso tra il fattore Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)-SOS, la famiglia delle Src chinasi e il soppressore della segnalazione delle citochine (SOCS), possono legare, mediante domini SH2 questa tirosina fosforilata (Chen HC et al., 1996). Quando si ha l'interazione tra FAK e Src, quest'ultima fosforila le tirosine 576 e 577 di FAK, necessarie per una completa attivazione dell'enzima. I residui amminoacidici che fiancheggiano la tirosina 397 (pTyr-Ala-Glu-Ile) aumentano l'affinità del legame che si instaura tra il dominio SH2 (Src Homology 2 domain) di Src e FAK (Brown et al., 1996). In questa a questa interazione, Src fosforila FAK anche in tirosina 925 e in tirosina 861.

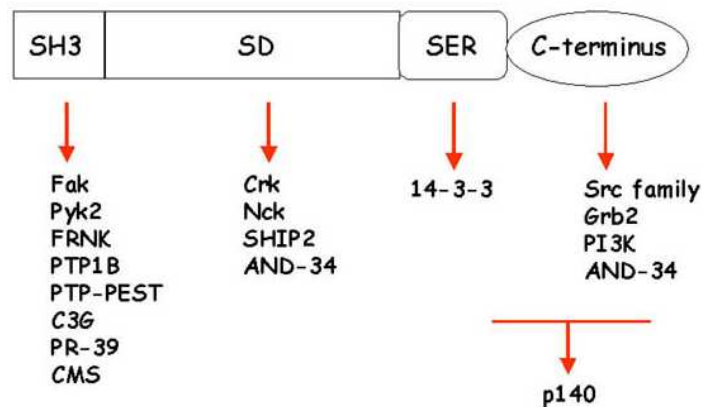
Il pathway attivato dal complesso di adesione focale Src/FAK è il principale responsabile della regolazione dell'adesività e dell'invasività in numerosi sistemi cellulari epiteliali in vivo e in vitro, integrando i segnali generati dai fattori di crescita e dalle integrine.

La fosforilazione in tirosina 861 favorisce il reclutamento di p130Cas grazie ai domini SH3 e SH2. La proteina p130 Cas, dopo l'interazione con FAK, viene fosforilata in tirosina e così diventa il substrato della proteina Crk, che induce l'attivazione di Rac, promuovendo la formazione dei lamellipodi, l'aumento



dei ruffles di membrana, la motilità cellulare o anche l' invasività (Schlaepfer DD and Mitra, 2004).

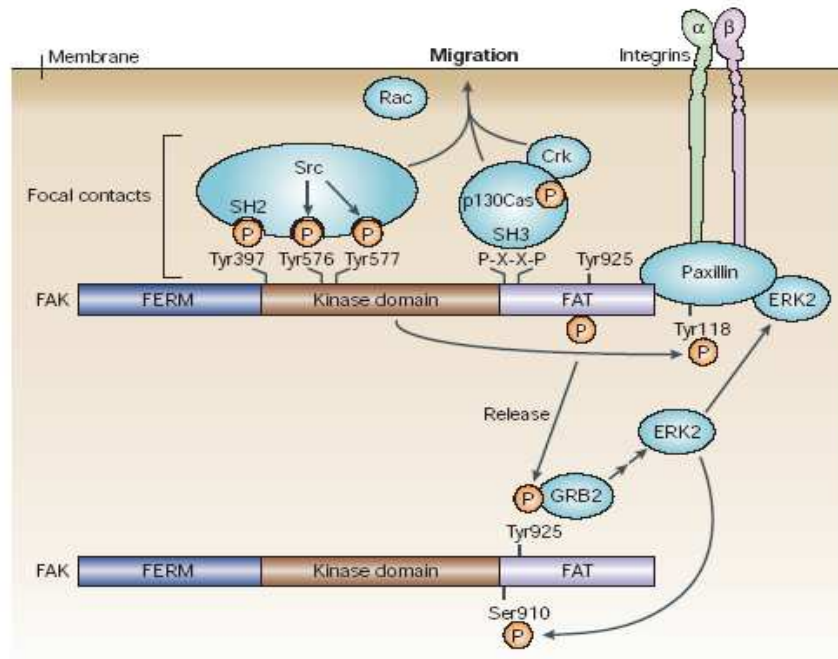
La fosforilazione in tirosina 925, invece, determina il reclutamento del complesso Grb2-Sos, con conseguente attivazione di Ras e della cascata di segnalazione mediata da ERK2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 2). L'attivazione di ERK2 promuove la fosforilazione di FAK sulla Ser 910, che determina una diminuzione del legame della paxillina a FAK e la seguente liberazione di FAK a livello delle adesioni focali.



**Fig. 8** Rappresentazione schematica di p130Cas con i suoi domini.

Il complesso FAK-Src fosforila anche la paxillina sui residui di Tyr 31 e Tyr 118, promuovendone il legame con ERK2. Questo potrebbe facilitare il legame di FAK alla paxillina e potenziarne l'attivazione (Webb et al., 2004).

La fig.9 mostra il ciclo regolatorio, in cui l'attivazione del complesso FAK-Src e di ERK2 promuovono il rilascio di FAK dai contatti focali. ERK2 a sua volta, fosforilando la paxillina, può di nuovo facilitarne il legame a FAK e ristabilire così l'attività della chinasi delle adesioni focali.



**Fig. 9 Il complesso FAK-Src regola l'assemblaggio dei contatti focali ed il loro turnover.**

## 1.6 La famiglia delle Rho GTPasi

La capacità delle cellule di migrare e invadere tessuti circostanti caratterizza una grande varietà di eventi normali o patologici come lo sviluppo embrionale, la guarigione dalle ferite nonché la formazione di metastasi durante la progressione tumorale.

Uno dei fenomeni più rilevanti associati alla motilità cellulare guarda il riarrangiamento delle strutture citoscheletriche.

A livello molecolare, tale fenomeno sembra essere in gran parte guidato dal reclutamento di piccole proteine monomeriche ad attività GTPasica, membri della famiglia delle RhoGTPasi. Questa famiglia comprende 22 sequenze geniche, codificanti per almeno 25 proteine diverse, le quali, in base al livello di similitudine della sequenza nucleotidica, della struttura tridimensionale e della funzione, vengono classificate in sei sottofamiglie distinte: Rac, RhoA, Cdc42, TC10 e TCL, Rnd, Rho BTB e Miro.

Analogamente a quanto noto da tempo per la proteina Ras, le proteine Rho sono "interruttori" molecolari, il cui stato funzionale cicla periodicamente da uno stato "inattivo", legante guanosina difosfato (GDP), ed uno stato "attivo", caratterizzato dal legame con guanosina trifosfato (GTP). Nella forma attiva, le proteine Rho sono in grado di legare un'ampia gamma di effettori o di molecole target, regolando in questo modo svariate attività cellulari.

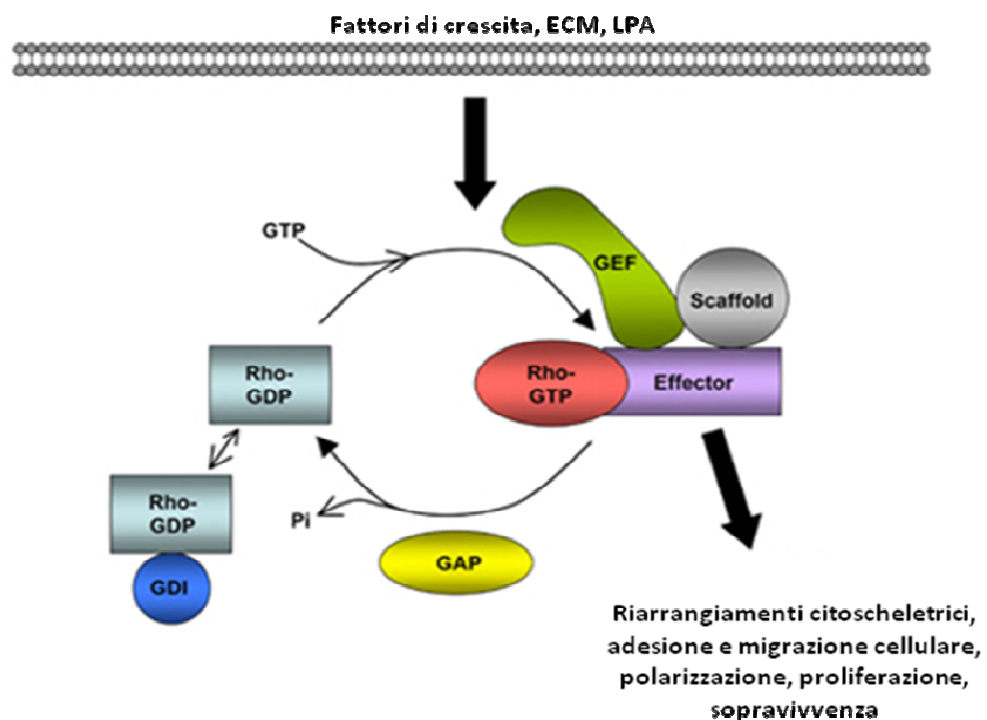
L'attivazione delle RhoGTPasi dipende dall'azione di particolari proteine note come guanine nucleotide exchange factors (GEFs), le quali sono a loro volta attivate da specifiche chinasi recettore-dipendenti.

Il ripristino dello stato funzionale "inattivo" delle RhoGTPasi è invece affidato alle proteine GAPs, le quali accelerano l'attività GTPasica intrinseca alle proteine Rho stesse, permettendo così l'idrolisi del legame fosforico e la conversione di GTP in GDP (Mackay DJ and Hall, 1998).

In situazioni in cui si renda necessario il mantenimento delle RhoGTPasi in uno stato inattivo, entra in gioco un altro gruppo di proteine, le cosiddette GDP dissociation inhibitors (GDIs), che agiscono sequestrando o stabilizzando le proteine nella conformazione legante GDP (Cancelas JA et al. 2006).

E' stato inoltre dimostrato che l'attivazione delle Rho GTPasi e' il fattore chiave per l'integrazione biomolecolare di stimoli provenienti dalla attivazione di recettori ad attivita' tirosino-chinasica, di recettori per chemochine e molecole d'adesione.

I recettori di membrana attivano le Rho GTPasi attraverso vie di segnalazione basate sull'uso combinatoriale di categorie di mediatori del segnale: chinasi, adattatori, fattori di scambio.



**Fig. 10 Meccanismo d'azione delle Rho GTPasi.**

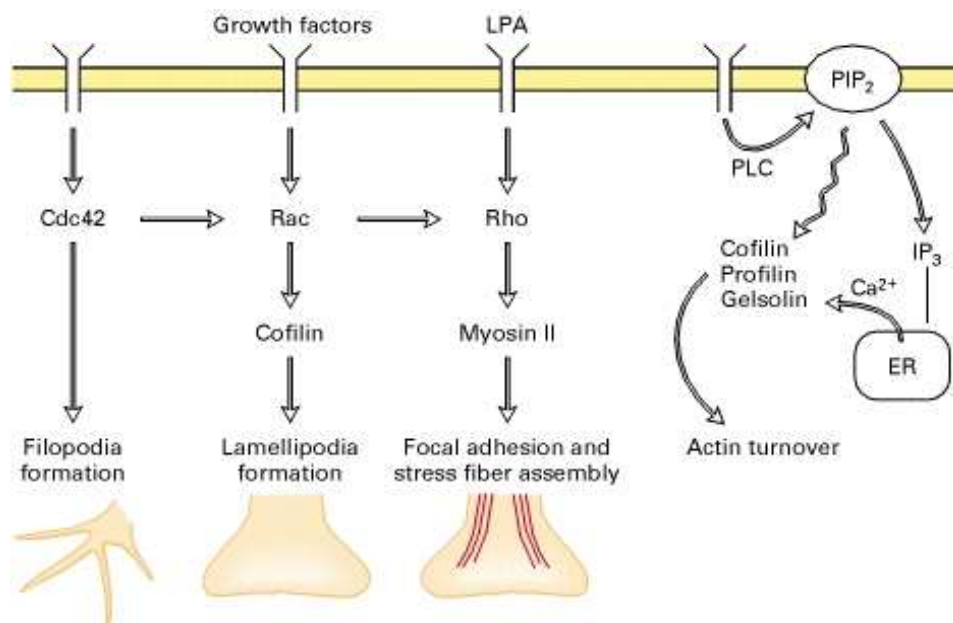
I membri, al momento meglio noti, della famiglia delle Rho GTPasi sono Rac1, RhoA e Cdc42, la cui attivita' è stata studiata soprattutto in leucociti e fibroblasti (Nobes CD et al. 1995; 1995).

In queste cellule e' stato dimostrato che l'attivazione di Rho induce polimerizzazione di filamenti di actina e miosina, ovvero Rho stimola la contrattilità e induce la riorganizzazione dell'actina contribuendo alla formazione delle "stress fibers" (Hall et al., 2000).

Rac, invece, induce l'estensione dei lamellipodi, coinvolgendo la polimerizzazione dell'actina alla periferia della cellula e determina la formazione di ruffles di membrana.

Cdc42 determina, invece, l'estensione dei filopodi attiva la polimerizzazione e la formazione di fasci di actina.

Queste tre proteine sono organizzate gerarchicamente in maniera che l'attivazione di Cdc42 induce l'attivazione di Rac, che a sua volta attiva Rho.



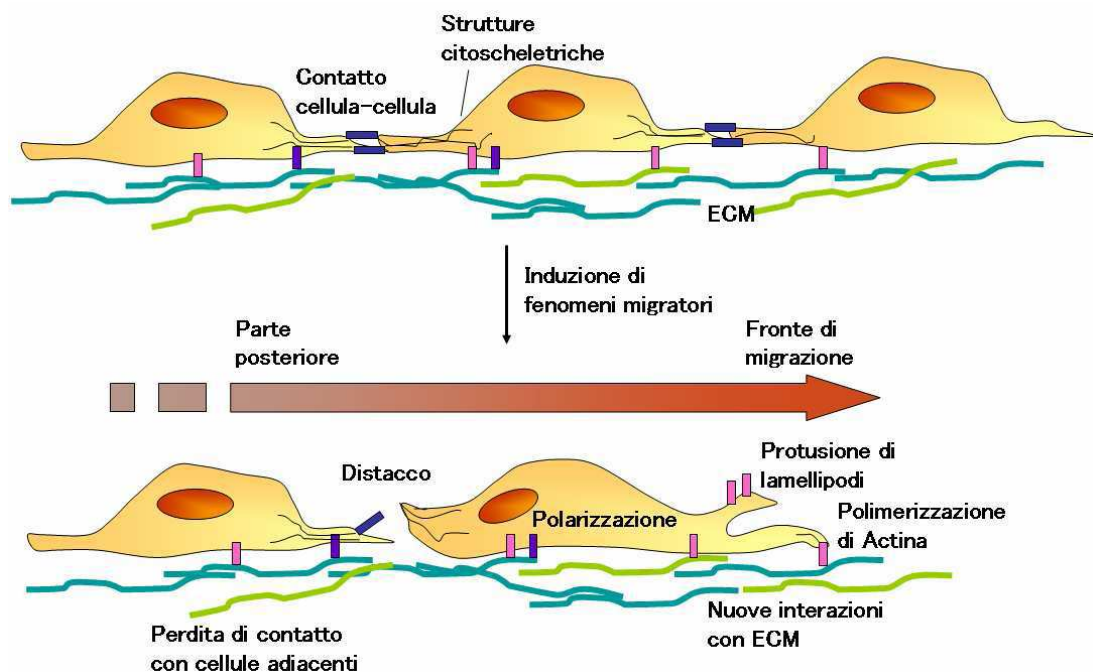
**Fig. 11 Ruolo delle proteine appartenenti alla famiglia Rho nella riorganizzazione citoscheletrica.**

## 1.7 La migrazione cellulare

La migrazione cellulare può essere descritta come un processo ciclico ed estremamente dinamico, che richiede il perfetto coordinamento di numerose e complesse attività cellulari.

Dal punto di vista concettuale, una cellula migrante può essere descritta come un'entità altamente polarizzata, con attività e strutture molecolari spazialmente segregate. Questa distribuzione funzionale asimmetrica consente di distinguere un fronte di migrazione e una porzione cellulare posteriore.

Affinché una migrazione regolata e direzionale abbia luogo, le attività di queste due porzioni, pur se separate spazialmente, devono essere estremamente coordinate.



**Fig. 12** Schema rappresentativo delle interazioni dinamiche che caratterizzano la migrazione direzionale di una cellula aderente ad un substrato.

Il processo di migrazione direzionale prende inizio con la risposta della cellula ad uno stimolo chemiotattico, proveniente dal microambiente circostante, che induce la polarizzazione delle strutture cellulari e la conseguente estensione di una protusione citoplasmatica (guidata dal riarrangiamento dei filamenti di actina) nella direzione del movimento.

La successiva formazione di complessi di adesione, permette al fronte cellulare protrudente di interagire con il substrato circostante. Tali interazioni adesive servono, in parte, come punti di trazione per la migrazione, ma agiscono anche come segnali regolatori della intera dinamica cellulare.

Successivamente si assiste alla contrazione del corpo cellulare e alla rottura delle interazioni adesive della estremità posteriore rispetto all'asse del movimento, che a questo punto si retrae, completando il ciclo di attività associate al movimento direzionale. E' tuttavia importante sottolineare che le informazioni relative a questo modello sono state in gran parte ottenute studiando il comportamento, in vitro, di cellule migranti in un ambiente bidimensionale. Una comprensione approfondita della migrazione cellulare in vivo non può tuttavia prescindere dallo studio di cellule in movimento all'interno di spazi tridimensionali, cosa che si sta tentando di fare attraverso lo sviluppo di modelli sperimentali di migrazione in tre dimensioni, che consentano di monitorarne i riarrangiamenti morfologici e molecolari in condizioni analoghe a quelle fisiologiche.

Il punto chiave dei meccanismi di migrazione risiede nell'innescò della polarizzazione delle strutture sub-cellulari.

Un'ampia gamma di molecole presenti nel microambiente extracellulare è stata in particolare descritta come capace di dare inizio e promuovere i processi di polarizzazione e migrazione cellulare.

A seconda delle molecole stimolatorie, si distinguono tre tipi fondamentali di risposta migratoria:

- Chemochinesi: risposta cellulare a molecole in grado di indurre un fenotipo migratorio adirezionale, attraverso un incremento/diminuzione della velocità e frequenza dei movimenti cellulari, oppure mediante un aumento/decremento della frequenza o entità di movimenti rotatori.
- Chemiotassi: processo di migrazione direzionale, guidato da gradienti di sostanze chemio-attrattive/-repulsive all'interno di un determinato microambiente extracellulare.

- Aptotassi: processo di migrazione direzionale secondo un gradiente di molecole di adesione o di molecole chemio-attrattive/-repulsive legate ad un substrato. Gradienti adesivi di questo tipo si trovano normalmente all'interno della matrice extracellulare.

Le molecole in grado di indurre tali risposte migratorie sono state studiate in particolare nei leucociti, il cui pattern di migrazione verso i focolai flogistici rappresenta tuttora il miglior modello, seppur approssimativo, delle dinamiche di migrazione delle cellule staminali emopoietiche da, e verso, il microambiente midollare.

E' possibile, quindi, schematizzare il processo di migrazione in diverse tappe: la polarizzazione della cellula; l'estensione dei lamellipodi; la formazione di nuovi contatti focali; la contrazione del corpo cellulare e il distacco della coda della cellula.

Le cellule sono caratterizzate da una sostanziale polarità antero-posteriore che morfologicamente si manifesta con un ampio lamellipodio anteriore e spesso con un altro posteriore, retrattile, chiamato uropodio.

In termini molecolari, la direzione della migrazione implica che venga stabilita e mantenuta un'asimmetria spaziale e temporale tra l'estremità anteriore e posteriore della cellula migrante delle componenti molecolari correlate ad adesione e migrazione. Questa distribuzione asimmetrica, o polarizzazione, è ampiamente conservata filogeneticamente dalle amebe ai mammiferi (Van Haastert and Devreotes, 2004) e sembra essere mediata da segnali provenienti dai recettori per le chemochine e per le integrine. Le proteine localizzate nella regione anteriore sono PI3K, l'actina, WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), la cofilina, ARP2/3 (actin-related protein), Rac e Cdc42, mentre quelle localizzate nella regione posteriore sono la fosfatasi dei lipidi (PTEN: phosphatase and tensin homology deleted on chromosome 10), la miosina II, Rho e la calpaina. L'attivazione localizzata di PI3-K ed i bassi livelli di PTEN, nella regione anteriore della cellula, inducono un rapido accumulo di fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (PIP<sub>3</sub>) al fronte che avanza e tale accumulo asimmetrico di PIP<sub>3</sub> attiva Rac. Tale attivazione avviene attraverso la formazione del legame tra il dominio PH (pleckstrin



homology) di Rac-GEF e PIP<sub>3</sub>. È possibile, comunque, che Rac possa essere attivata indipendentemente da PI3K.

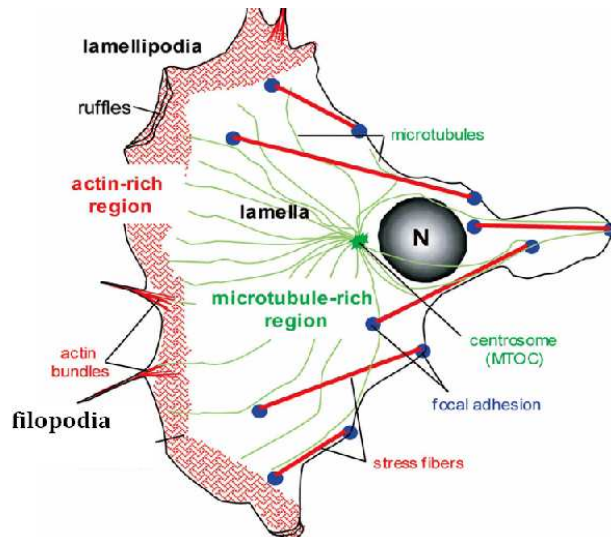
In tal modo essa agirebbe a monte di PI3K (Keely et al., 1997; Inabe et al., 2002) legando la subunità regolatrice p85 $\alpha$  (Bokoch et al., 1996) e creando così un meccanismo a feedback positivo, in cui Rac attiva ed è attivata da PI3K (Weiner et al., 2002; Srinivasan et al., 2003).

Le cellule migrano estendendo le protrusioni in corrispondenza del fronte di avanzamento. Tali protrusioni possono essere ampie come i lamellipodi o allungate come i filopodi.

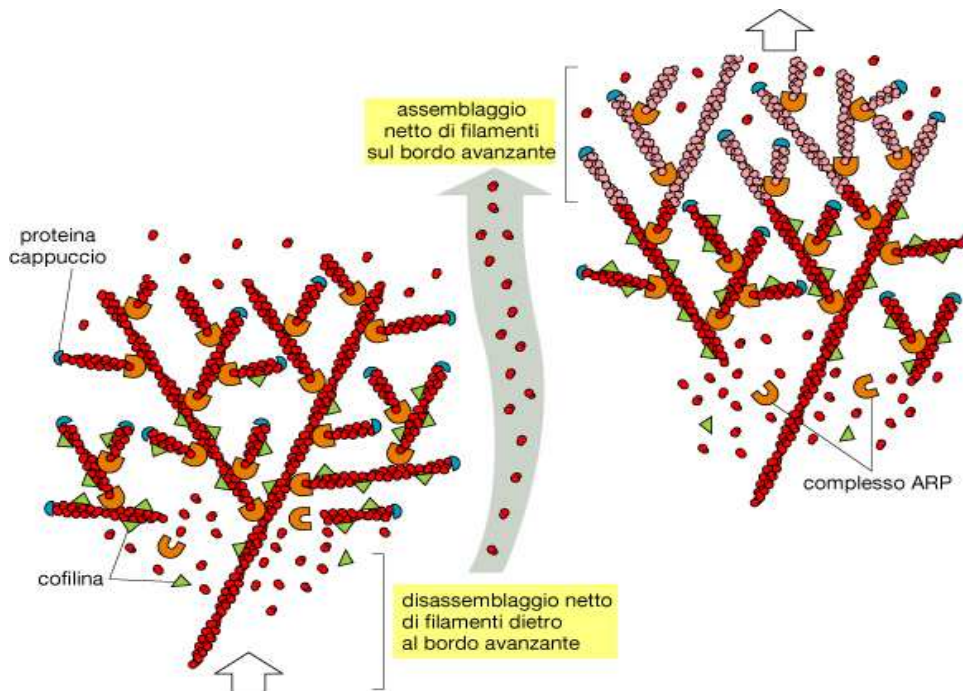
I filopodi sono strutture monodimensionali che si presentano come proiezioni appuntite della membrana plasmatica. Essi si estendono dal fronte di avanzamento della cellule migranti e contengono filamenti di actina che formano legami incrociati con proteine leganti l'actina quali la fimbrina formando fasci. I filopodi formano adesioni focali con il substrato, collegandolo alla superficie cellulare. Una cellula migra lungo una superficie estendendo filopodi all'altezza del fronte di avanzamento. Essi si legano al substrato anteriormente alla via di migrazione, e in seguito la contrazione delle fibre di stress fa retrarre la parte posteriore della cellula che quindi si muove in avanti. Per chiudere una ferita nei vertebrati, i fattori di crescita si legano a recettori di membrana dotati di attività tirosino-chinasica e stimolano la formazione di filopodi nei fibroblasti in modo da indirizzare la divisione dei fibroblasti e chiudere la ferita.

I lamellipodi sono proiezioni ampie, presenti sul bordo di una cellula mobile. Essi sono strutture bidimensionali e contengono molti fasci di actina con numerosissimi rami collaterali. I fasci di actina sono collegati da legami ortogonali, la maggior parte dei quali si trova su un piano parallelo al substrato solido.

Durante la nucleazione dei filamenti di actina verso la membrana plasmatica si forma una rete bidimensionale che si estende per tutto il lamellipodio. La rete nel suo insieme subisce un continuo rimodellamento, assemblandosi anteriormente e disassemblandosi posteriormente (Pollard et al., 2003).



**Fig. 13** Rappresentazione dei filopodi e lamellipodi.



**Fig. 14** Modello per la protrusione della rete di actina all'estremità guida di una cellula in movimento. Sono illustrati due momenti del processo di avanzamento dei lamellipodi. Le strutture assemblate in un secondo momento sono mostrate in colore più chiaro. La nucleazione è mediata dal complesso ARP al fronte. I filamenti di actina appena nucleati sono attaccati ai lati di filamenti preesistenti in gran parte ad angolo di 70°. I filamenti si allungano spingendo la membrana plasmatica in avanti. All'equilibrio, le estremità dei filamenti neosintetizzati diventano incappucciate, mentre i filamenti più vecchi vanno incontro a depolimerizzazione da parte della cofilina. Questo ciclo provoca una separazione spaziale fra assemblaggio netto di filamenti al fronte e disassemblaggio netto di filamenti posteriormente. In tal modo la rete di actina può muoversi nel suo insieme in avanti.

Ovviamente, affinché la cellula possa muoversi è necessario che porti il suo corpo in avanti. Per fare ciò si rende necessaria la formazione di nuovi contatti focali attraverso cui la cellula esercita trazione sul substrato. Man mano che la cellula si muove, nuovi contatti focali vengono formati e quelli vecchi, nella parte posteriore della cellula, vengono disassemblati.

I contatti focali sono stabiliti dall'interazione tra filamenti di actina e matrice extracellulare.

In questi siti le fibre da stress terminano in corrispondenza della membrana plasmatica, dove si localizzano le integrine, gruppi di proteine di adesione transmembrana.

Le integrine funzionano da sistemi di adesione, tra la matrice extracellulare ed il citoscheletro, e da trasduttori del segnale, attivando una serie di proteine regolatorie e strutturali facenti parte dei contatti focali (Liu et al., 2000). I contatti focali, in questo modo, oltre a servire da ancore per le cellule possono anche trasmettere segnali dalla matrice extracellulare all'interno della cellula (outside-in) e viceversa (inside-out).

L'assemblaggio ed il successivo disassemblaggio delle adesioni focali sono determinati dalla dinamica associazione di proteine che si legano alla chinasi in maniera spazio-tempo regolata.

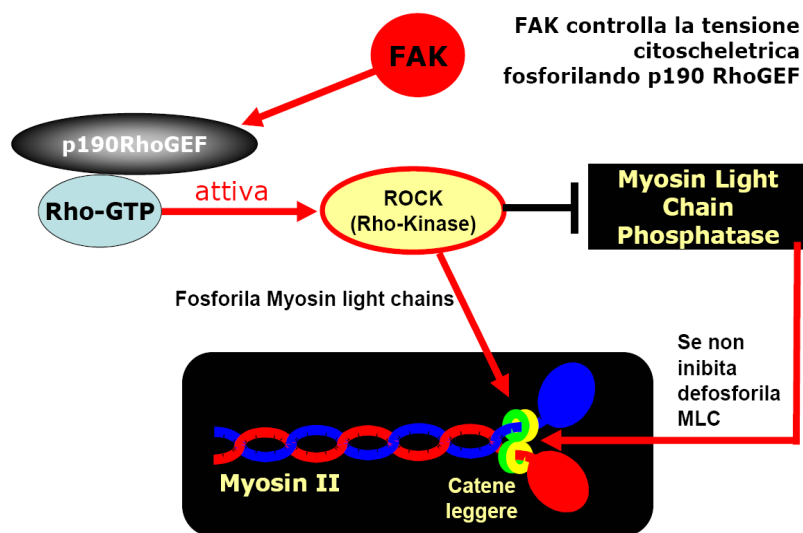
Dopo la formazione dei lamellipodi, la formazione di nuovi contatti focali è un processo regolato inizialmente da Rac e successivamente da Rho. Il turnover dei complessi focali e la contrazione del corpo cellulare è determinato dalla modulazione dell'attività delle due GTPasi.

Dopo che le cellule hanno fatto presa sul substrato, segue la contrazione del corpo cellulare. La contrazione del corpo cellulare dipende dalla contrazione dell'actino-miosina che è a sua volta regolata da Rho. Rho attiva la chinasi Rho (ROCK) che fosforila la catena leggera della miosina (MLC) nonché la fosfatasi che defosforila MLC (Amano et al., 2000).

La fosforilazione della catena leggera della miosina attiva la miosina II, determinando l'aumento della contrazione delle stress fibers all'interno della cellula, e la trasmissione della conseguente tensione ai siti di adesione.

In una cellula in movimento, il distacco della regione posteriore può coinvolgere due tipi di meccanismi: uno che determina la riduzione della formazione di siti di contatto, l'altro che provvede alla loro dissoluzione.

La fosforilazione operata da FAK su GRAF determina l'inibizione di Rho GTPasi provocando riarrangiamenti dell'actina citoscheletrica con conseguente disassemblaggio dei siti di contatto focale e riduzione della loro successiva formazione. Una proteolisi selettiva (ad opera della proteasi calpaina) delle molecole coinvolte nei siti di contatto ne determina la loro dissoluzione (Dourdin et al., 2001; Franco et al., 2004).



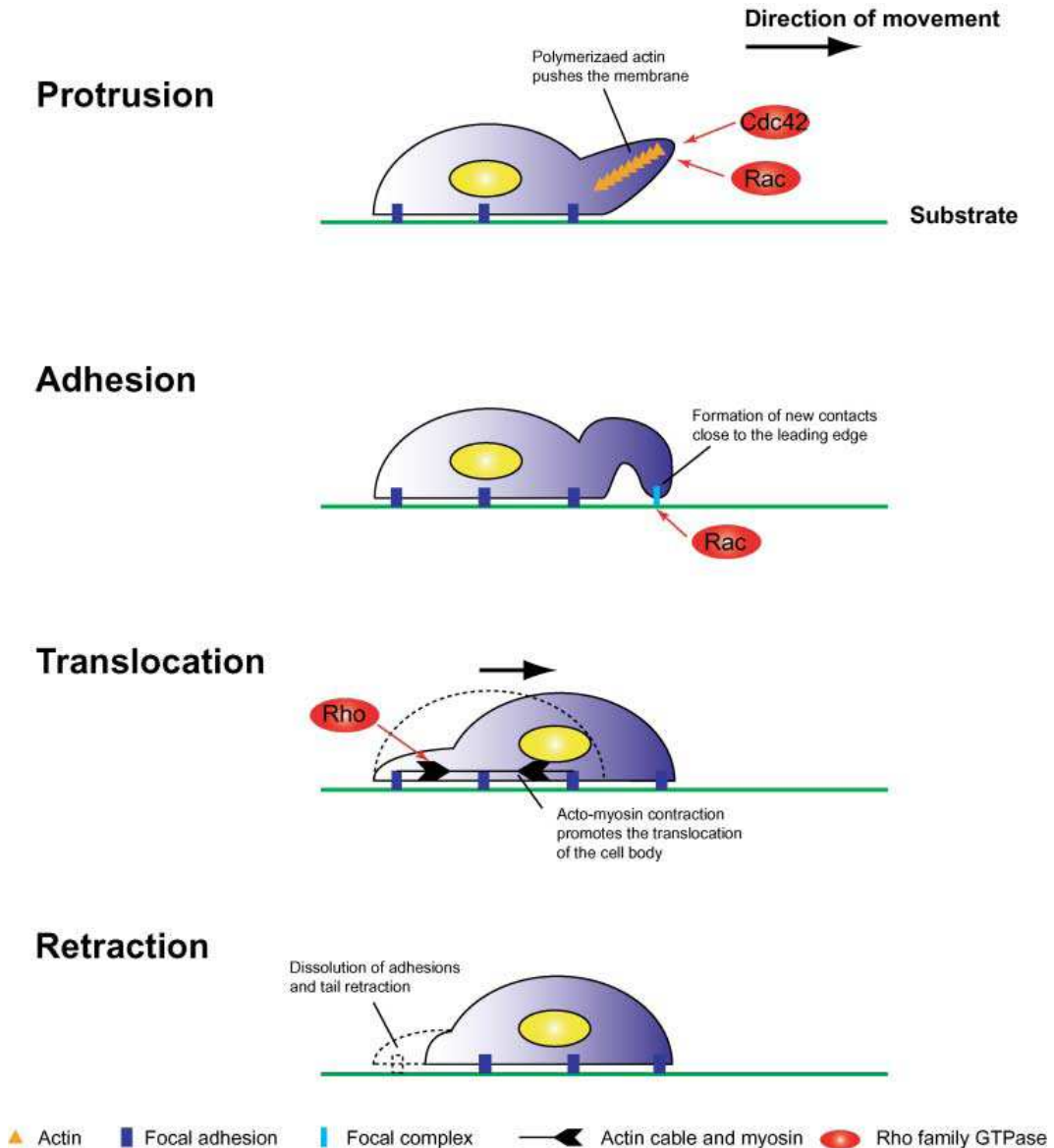
**Fig. 15** La proteina Rho induce la contrazione del corpo cellulare.

Quindi, l'adesione delle cellule, seguita dalla contrazione del citoscheletro, determina una tensione sul substrato che si converte in trazione quando si ha il rilascio dei punti di contatto focale. Durante il processo di migrazione, la trazione esercitata sul substrato determina l'avanzamento della cellula.

Riassumendo, la locomozione di una cellula avviene in tre fasi principali:

- 1) **Protrusione:** la cellula si polarizza e le strutture di actina si spingono in avanti.
- 2) **Attacco:** il citoscheletro di actina nella parte anteriore della cellula si connette al substrato. Nuovi contatti focali sono formati anteriormente e quelli vecchi sono disassemblati nella parte posteriore della cellula man mano che striscia in avanti.

3) Trazione: la massa del citoplasma restante viene tirata in avanti per contrazione delle stress fibers.



**Fig. 16. Illustrazione schematica delle tappe coinvolte nella migrazione cellulare (Yamakazi et al. 2005, Cancer Sci.).**

La migrazione cellulare è costituito dai seguenti quattro processi successivi. Protrusione: quando le cellule sono polarizzate da stimoli extracellulari e nella sua regione anteriore la cellula estende i lamellipodi.; Adesione: durante questa estensione cellulare prendono origine nuovi siti di attacco col substrato la matrice extracellulare e la membrana plasmatica in maniera integrina-dipendente Traslocazione: il nucleo e il corpo cellulare sono traslocati in avanti in seguito alla contrazione delle fibre da stress. Retrazione: la coda della cellula si distacca dal substrato e si retrae.

### **1.8 Bersagli intracellulari della famiglia delle Rho GTPasi.**

Tra i targets intracellulari delle proteine Cdc42 e Rac vanno considerati WASP e una famiglia di proteine WAVE (WASP-family verprolin-homologous protein family protein).

L'effetto finale in ambedue i casi è quello di attivare il complesso Arp 2/3 che induce la polimerizzazione dell'actina.

Infatti, Arp2/3 crea una giunzione ad Y sui filamenti esistenti di actina creando nuove ramificazioni. WASP si lega ad Arp2/3 e, cambiandone la conformazione, la attiva. Così, Arp2/3 si lega di lato ai filamenti di actina nucleando nuovi filamenti dentro i lamellipodi.

Inoltre, tale complesso non solo media la polimerizzazione dei microfilamenti di actina (MF), ma legandosi a MF preesistenti promuove la formazione di nuovi rami collaterali trasformando la regione della cellula in gel.

Rac e Cdc42, inoltre, attivando PAK e la chinasi LIM (LIMK), fosforilano la cofilina ed inibiscono in tal modo la depolimerizzazione dell'actina (Stanyon et al., 1999).

La cofilina taglia i filamenti di actina e in alcune condizioni intracellulari, il taglio promuove la depolimerizzazione dei vecchi filamenti (distacco di ADP-actina dalle terminazioni).

Per questo motivo viene chiamata fattore depolimerizzante dell'actina. La cofilina è attiva in forma defosforilata; la sua fosforilazione da parte della LIMK aumenta l'accumulo di F-actina.

La cofilina promuovendo la dissociazione dai filamenti di actina-ADP accorcia così i lamellipodi. Rac, attivando PAK, determina anche la formazione dei complessi focali e il reclutamento di vescicole.

Infine, Rac mediante la via del fosfatidilinositide 4-fosfato 5 chinasi (PIP5-chinasi), induce la formazione di fosfatidilinositolo bifosfati (PtdIns (4,5)P<sub>2</sub>), determinando la depolimerizzazione dei filamenti di actina.

Rho attivata, attiva ROCK che inibisce la MLC fosfatasi e fosforila la catena leggera della miosina II, proteina motrice presente nella muscolatura liscia delle cellule.

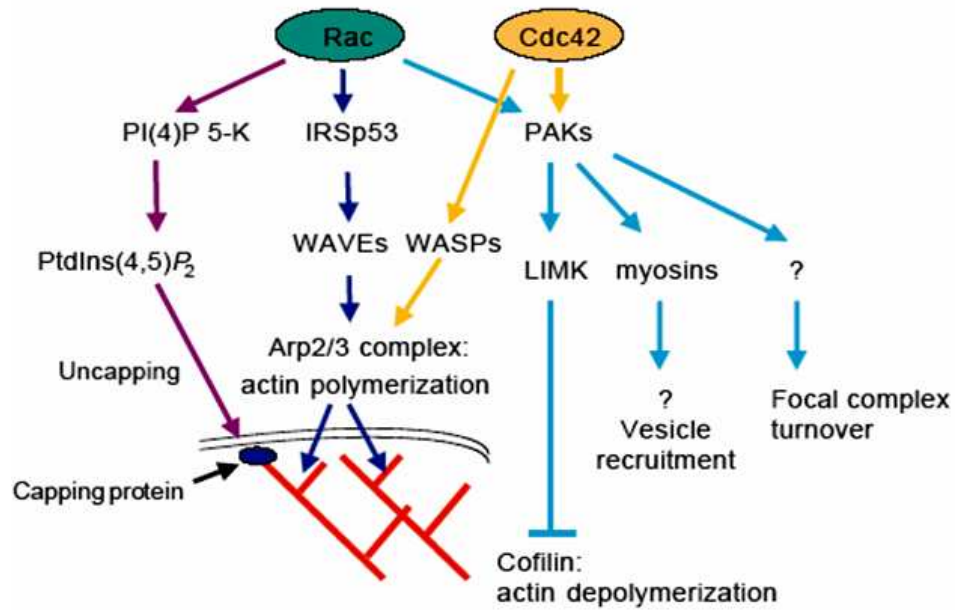


Fig. 17 Meccanismo d'azione di Rac e cross-talk tra Rac e Cdc42.

La miosina II fosforilata è attiva ed induce l'assemblaggio di filamenti actina/miosina, con aumento della attività contrattile della miosina nella cellula. Attraverso l'attivazione di ROCK, inoltre, Rho fosforila la LIMK che inibisce la depolimerizzazione actinica mediata dalla cofilina.

Rho, inoltre, regola l'attività di PI(4)P5-K, inducendo l'incremento dei livelli di PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> e l'incappucciamento delle proteine (Ridley, 2001).

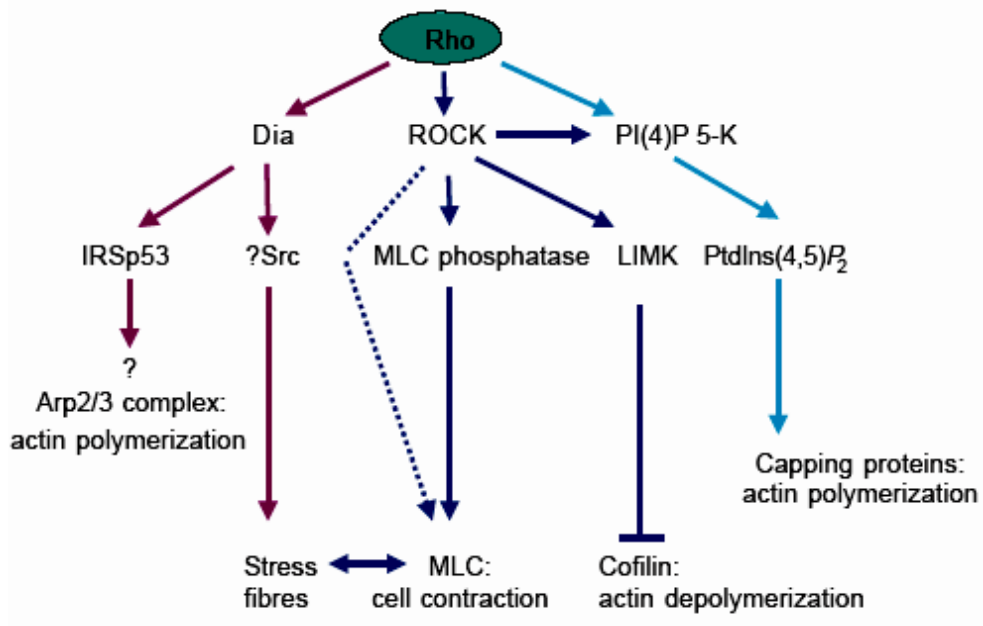


Fig. 18 Meccanismo d'azione di Rho.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Gli ormoni steroidei sono coinvolti in diversi processi biologici, quali la proliferazione cellulare, il differenziamento, la morfogenesi ed intervengono nella trasformazione e nella progressione neoplastica.

Sebbene le risposte cellulari agli steroidi siano state per lungo tempo attribuite alla capacità dei recettori steroidei di attivare meccanismi trascrizionali, numerose evidenze indicano che essi attivano meccanismi rapidi, definiti non genomici.

Infatti, tali ormoni, sono in grado di regolare la trascrizione genica, legandosi a sequenze specifiche di DNA nelle cellule bersaglio; però, sono capaci, d'altro canto, di attivare vie di segnalazione rapide, extranucleari in cellule riproduttive e non riproduttive.

Gli effetti rapidi indotti dagli steroidi regolano vari fenomeni quali la progressione del ciclo cellulare, i cambiamenti citoscheletrici, la motilità e la sopravvivenza cellulare (Castoria et al., 2008).

Lo scopo di questa tesi è quello di analizzare gli effetti degli androgeni in un sistema cellulare, come quello dei fibroblasti, che non è considerato un bersaglio tipico di questi ormoni.

Esperimenti condotti, nel laboratorio nel quale sono stati realizzati gli esperimenti presentati in questa tesi, hanno dimostrato che concentrazioni fisiologiche (10nM) di androgeno sintetico non aromatizzabile (R1881) attivano le GTPasi monomeriche della famiglia Rho, in fibroblasti murini NIH3T3, inducendo cambiamenti citoscheletrici che precedono la migrazione cellulare.

Questi effetti sono mediati dal classico recettore degli androgeni, presente in queste cellule a livelli bassissimi, e localizzato quasi esclusivamente nel compartimento extra-nucleare.

Tali eventi, pertanto, sembrano essere il risultato dell'attivazione di meccanismi non trascrizionali attivati dagli androgeni nel compartimento extra-nucleare di tali cellule. Lo studio di questo progetto è stato focalizzato sul meccanismo molecolare mediante il quale gli androgeni attivano le



proteine coinvolte nella formazione dei contatti focali (CF) e nel controllo della migrazione cellulare.

In particolare, è stata analizzata l'azione di proteine con attività tirosino-chinasica, localizzate nei siti di contatto focale. Infatti, molte proteine tirosino-chinasiche (PTKs) sono implicate nei sistemi di trasduzione delle integrine, associandosi, ad esempio tramite interazioni con complessi molecolari citoscheletrici indotti dal cross-linking delle integrine.

E' noto che l'attivazione della chinasi FAK determina la fosforilazione in tirosina di altre molecole e contribuire così a propagare il segnale intracellulare indotto dalle integrine.

Conoscere, quindi, il ruolo delle adesioni focali ed in particolare della proteina FAK nonché delle integrine apre ampie prospettive sia nell'ambito della comprensione del comportamento biologico che nell'ambito di possibili implicazioni terapeutiche.

Pertanto, l'analisi di fenomeni legati all'adesione cellulare e al clustering delle integrine risulta importante per valutare la capacità delle cellule di migrare, e quindi di invadere i tessuti adiacenti.

A tale scopo, questa tesi si propone di analizzare l'azione dell'androgeno R1881 in diversi contesti biologici quali l'adesione e la migrazione cellulare in fibroblasti murini NIH3T3.

Si è partiti dal verificare e dall'analizzare la presenza e la localizzazione del recettore dell'androgeno in tali cellule nonché la sua capacità di attivare la trascrizione in maniera ligando-dipendente.

In seguito, sono state studiate le risposte biologiche indotte dall'ormone in tale linea cellulare. In particolare, è stato osservato che il trattamento con concentrazioni ottimali (10nM) di R1881 induceva una riorganizzazione del citoscheletro dei fibroblasti murini 3T3, con conseguente fenomeno del membrane ruffling.

E' noto che i collegamenti tra il citoscheletro e la matrice extracellulare sono mediate dalle integrine, che a loro volta determinano la formazione dei contatti focali.

Per questo motivo, e' stato analizzato il meccanismo attraverso cui gli ormoni regolano questo fenomeno, ponendo il focus su proteine che interagiscono

con elementi del citoscheletro e su proteine coinvolte nella formazione delle adesioni focali.

Oltretutto, essendo le modificazioni citoscheletriche un segno distintivo di una fase migratoria, si è analizzato il ruolo dell'androgeno sulla capacità di migrazione di fibroblasti NIH3T3.

I dati ottenuti descrivono, quindi, il meccanismo molecolare attraverso il quale gli androgeni sono in grado di controllare la migrazione e l'invasività cellulare.

La combinazione di vari approcci sperimentali (immunoprecipitazioni, immunofluorescenza, dosaggi di chinasi, silenziamento di proteine, pull-down assay) ha consentito di dimostrare che concentrazioni fisiologiche (10nM) di androgeno sintetico R1881 inducono, nel compartimento nucleare, la formazione del complesso AR/filamina A.

Tale complesso recluta ed attiva FAK e la paxillina. Il trattamento delle cellule con l'antiandrogeno Casodex blocca la formazione del complesso AR/filaminaA/integrina  $\beta_1$  ed inibisce la fosforilazione di FAK e della paxillina indicando, in tal modo, che il classico recettore degli androgeni media l'attivazione di questo meccanismo.

Inoltre, è stato analizzato il ruolo di Rac1 che è coinvolto nella migrazione cellulare e nei riarrangiamenti citoscheletrici.

L'androgeno determina l'attivazione di Rac1 e la conseguente formazione del membrane ruffling in fibroblasti murini 3T3.

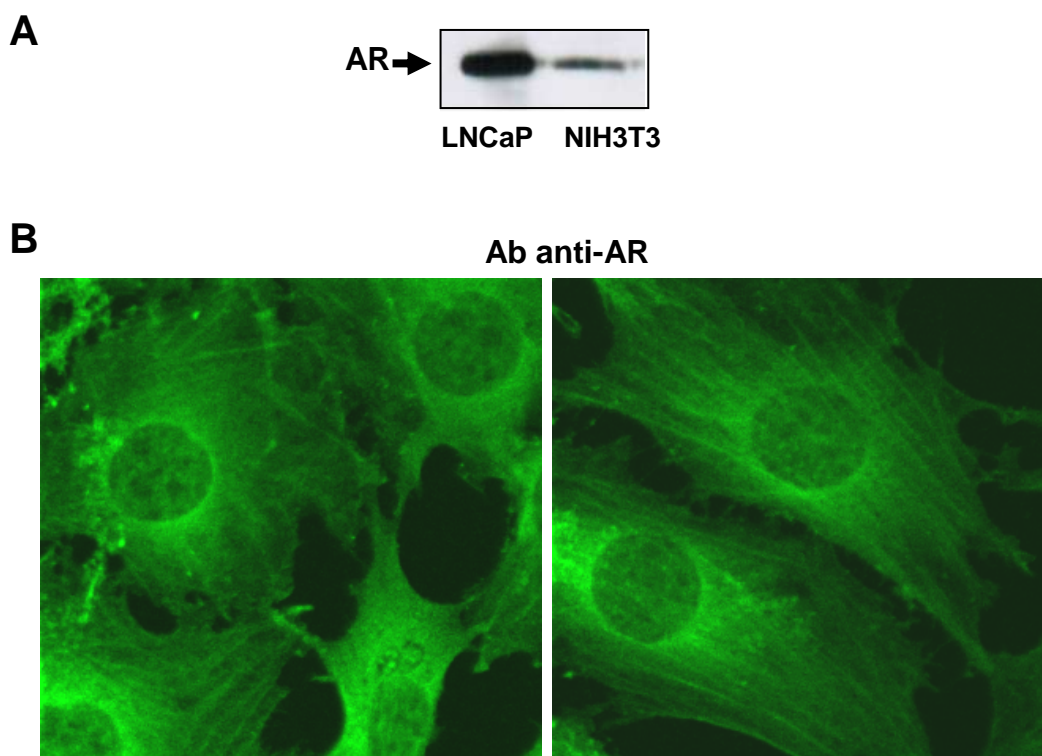
Tecniche di "wound healing assay" ed immunofluorescenza, condotte utilizzando un inibitore specifico di Rac1, EHT1864 (Shutes et al., 2007), hanno dimostrato che tale inibitore inibisce i riarrangiamenti citoscheletrici, nonché la migrazione cellulare di cellule NIH3T3 indotti dal trattamento con androgeno.

Pertanto, questo lavoro intende mostrare per la prima volta come l'interazione AR/FlnA sia la chiave di accesso per la migrazione cellulare mediata da androgeno in fibroblasti murini 3T3.

### 3. RISULTATI

#### 3.1. L'androgeno sintetico R1881 induce la migrazione cellulare in fibroblasti murini NIH3T3.

Il punto di partenza del progetto è stato quello di verificare l'espressione del recettore degli androgeni in cellule NIH3T3. Ciò è stato analizzato, mediante Western Blot, utilizzando un anticorpo (C-19) diretto contro il dominio C-terminale di AR. L'analisi dei lisati cellulari mostra una proteina che migra con peso molecolare di circa 110 KDa ed è riconosciuta dall'anticorpo anti-AR (Fig.1 A). Si nota, inoltre, che AR, nei fibroblasti NIH3T3, è espresso a livelli bassissimi, stimato circa il 7% di quello presente nelle LNCaP.



**Fig. 1: Localizzazione di AR endogeno in NIH3T3.**

A) Lisati di cellule LNCaP e NIH3T3 erano immunoblottati con anticorpi specifici diretti contro il dominio C-terminale di AR. B) Cellule quiescenti NIH3T3 piastrate su vetrini per immunofluorescenza, venivano non trattate o trattate per 30' con 10 nM R1881. Le cellule erano permeabilizzate come descritto in Materiali e Metodi. AR era visualizzato mediante immunofluorescenza utilizzando l'anticorpo C-19 (Santa Cruz). L'anticorpo anti-AR nelle cellule rivela una localizzazione extranucleare della proteina anche dopo trattamento con l'androgeno sintetico R1881.

Mediante esperimenti di immunofluorescenza, veniva valutata la localizzazione del recettore degli androgeni nei fibroblasti NIH3T3. I fibroblasti NIH3T3 venivano distribuiti su vetrini e, dopo essere stati resi quiescenti, erano stimolati in presenza o in assenza di 10nM R1881.

Il trattamento con ormone tratteneva AR permanentemente nel compartimento extra-nucleare. Questa localizzazione, pertanto, è indipendente dalla stimolazione con il ligando (Fig.1B).

Successivamente, per poter valutare gli effetti dell'androgeno sintetico R1881 sulla migrazione cellulare, NIH3T3 quiescenti venivano sottoposti a "wound scratch assay".

Il movimento delle cellule nell'area della ferita era controllato per 24h mediante microscopio in contrasto di fase e le immagini ottenute sono presentate in figura 2A.

Esse mostrano che, in cellule non stimolate, la ferita non viene chiusa; mentre in presenza di 10 nM R1881, le cellule sono capaci di invadere l'area della ferita pressochè totalmente durante le prime 24h di stimolazione ormonale. Tale risposta è inibita dalla aggiunta dell'anti-androgeno Casodex (Cx), dimostrando che tale fenomeno è dipendente dal ligando (R1881) utilizzato.

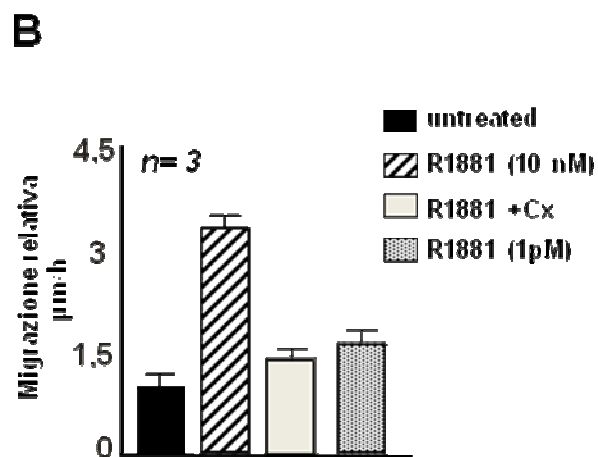
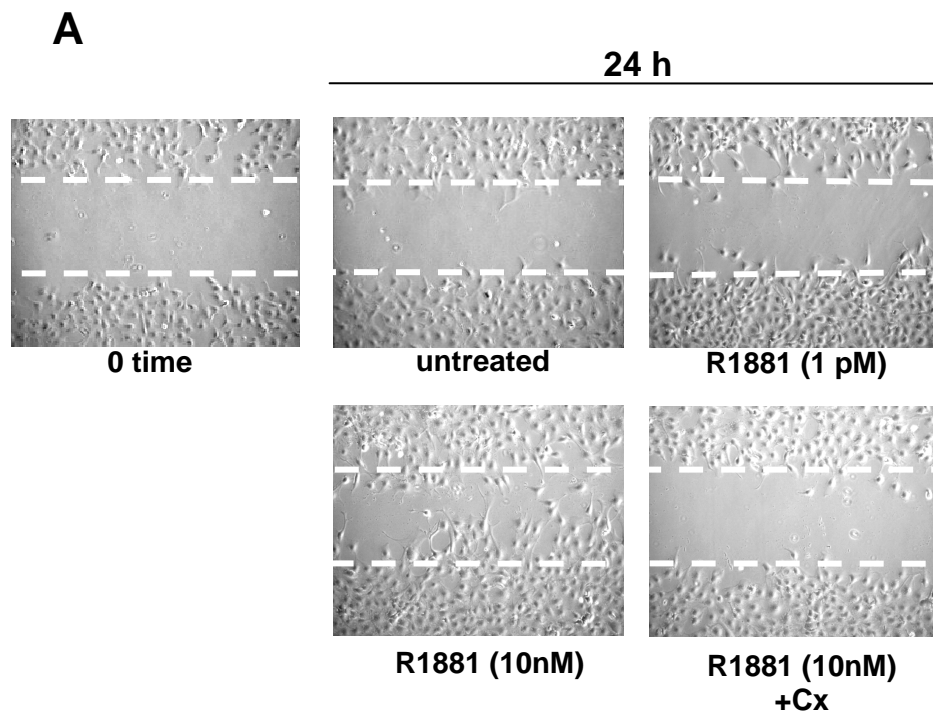
Diversamente, in presenza di basse concentrazioni di ormone (1pM R1881), solo poche cellule invadono l'area della ferita, dimostrando che il fenomeno prima osservato è dipendente dalla concentrazione di ligando utilizzato.

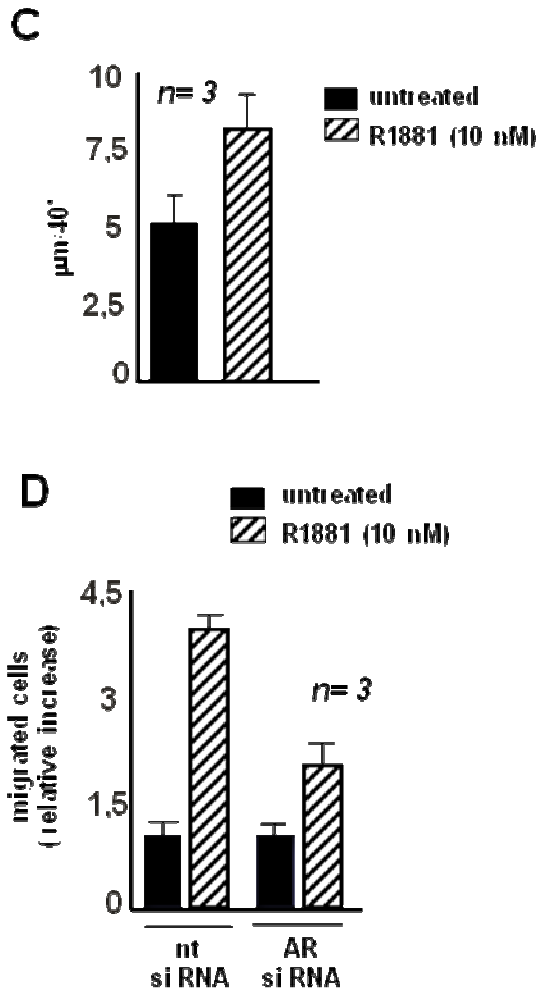
Sono stati, poi, utilizzati dosaggi transwell per analizzare l'effetto degli androgeni sulla migrazione cellulare. I dati, in figura 2B, evidenziano che la stimolazione con 10nM R1881 incrementava di 3 volte il numero di cellule migranti. Dati simili sono stati ottenuti utilizzando anche il diidrotestosterone (DHT). Contrariamente, il trattamento con 1pM R1881 aveva un debole o quasi nullo effetto sulla migrazione relativa di fibroblasti NIH3T3. L'aggiunta dell'antagonista Casodex inibiva l'effetto dell'androgeno sulla motilità cellulare anche ad alte concentrazioni (10nM).

Infine, fibroblasti NIH3T3 erano seguiti per 24h con microscopia time-lapse e la migrazione era quantificata e valutata registrando i percorsi seguiti da ogni cellula.

La fig. 2C mostra che, in cellule NIH3T3, la stimolazione con 10nM R1881 aumenta la velocità media delle stesse da 5 a 8  $\mu\text{m}/40\text{min}$ . Quest'incremento può essere considerato significativo. Inoltre, il ruolo di AR era consolidato da esperimenti mostrati in fig.2D in cui si osserva che il silenziamento del recettore dell'androgeno in cellule NIH3T3 stimulate con 10nM R1881 mediante la tecnica dell'interferenza siRNA (small interfering RNA), inibiva in maniera significativa il numero delle cellule migranti.

Da tali dati emergeva, quindi, l'azione specifica dell'androgeno sintetico R1881, utilizzato a concentrazioni sub-ottimali, sulla migrazione di cellule NIH3T3.





**Fig.2 La stimolazione di fibroblasti NIH3T3 con 10nM R1881 induce la migrazione cellulare.**

A) Cellule NIH3T3 quiescenti venivano seminate su vetrini ad una confluenza dell'80%. Dopo aver eseguito la ferita con la punta sterile di un puntale da pipetta, le cellule erano trattate o non trattate con 10nM R1881 in presenza o in assenza di Casodex. L'area della ferita era visualizzata con microscopio in contrasto di fase e le immagini erano catturate utilizzando una telecamera DC480 (Leica). Le immagini mostrano le cellule non trattate e le cellule dopo 24 h dalla stimolazione ormonale in assenza o presenza dell'antiandrogeno Casodex.

B) Il saggio di migrazione su filtri transwell ricoperti da collagene era effettuato in presenza o assenza dei composti indicati in figura. Il Casodex era aggiunto in eccesso di 1000 volte rispetto al ligando. Le cellule migranti erano colorate con Hoechst e contate mediante microscopio a fluorescenza. I risultati sono espressi come migrazione relativa rispetto al controllo (cellule non trattate) ed *n* rappresenta il numero degli esperimenti effettuati.

C) Cellule NIH3T3 quiescenti venivano trattate o non trattate con 10nM R1881 in presenza o in assenza di Casodex. Le cellule venivano monitorate per 24h, e le immagini venivano acquisite ogni 10 min utilizzando il sistema Zeiss Cell Observer. La velocità media è calcolata usando la media della lunghezza degli spostamenti delle cellule ogni 40 min. Per ogni cellula, la linearità è calcolata come rapporto tra lo spostamento netto e la lunghezza del percorso.

D) Cellule NIH3T3 venivano trasfettate con siRNA di controllo (nt) o con AR siRNA come descritto in Materiali e Metodi. Dopo la trasfezione, le cellule erano rese quiescenti, venivano sottoposte a saggio di migrazione su filtri transwell, come descritto in fig.2B., e venivano trattate o non trattate con 10nM R1881.

### **3.2. L' androgeno incrementa le adesioni focali e determina l'attivazione di FAK e paxillina in fibroblasti NIH3T3.**

Cambiamenti nell'organizzazione dell'actina citoscheletrica e delle proteine localizzate a livello dei contatti focali sono elementi distintivi di una cellula migrante.

Le proteine fosforilate in tirosina sono maggiormente localizzate nei siti di contatto focale e tra queste vi è la paxillina che è nota per essere coinvolta nei processi di adesione e motilità cellulare (Deakin et al., 2008).

Mediante esperimenti di immunofluorescenza, è stato analizzato l'effetto dell'androgeno sull'actina e sulla distribuzione delle fosfo-tirosine nei fibroblasti NIH3T3.

La fig. 3A mostra che la stimolazione di fibroblasti NIH3T3 con 10nM R1881 determina la formazione di protusioni e "ruffles" citoscheletrici (in rosso). Contestualmente, gli spots di P-Tyr (verde) corrispondenti alle proteine fosforilate in tirosina appaiono maggiormente localizzate alla periferia cellulare. Quindi, si può concludere che la stimolazione con 10nM androgeno determina una riorganizzazione dei siti di contatto focale in cellule NIH3T3.

Poiché è stato osservato che la fosforilazione di FAK e della paxillina è coinvolta sia nel processo di adesione che di migrazione cellulare (Mitra et al., 2005 e Deakin e Turner, 2008), sono stati condotti esperimenti volti ad investigare il ruolo di queste proteine in cellule NIH3T3.

E' noto che la fosforilazione sulla Tyr 397 di FAK è cruciale per promuovere il turn-over delle adesioni focali. Pertanto, al fine di comprendere il ruolo degli androgeni nella migrazione cellulare sono stati effettuati, in cellule NIH3T3, esperimenti di immunoprecipitazione utilizzando anticorpi anti-fosfotirosina.

Fibroblasti NIH3T3 resi quiescenti venivano stimolati o non stimolati per i tempi indicati con 10nM R1881. I lisati cellulari erano immunoprecipitati con anticorpi anti P-Tyr e gli immuno-complessi erano analizzati mediante immunoblot o con anticorpi anti P-FAK (Tyr 397) o con anticorpi anti-P-paxillina (Tyr 118). La figura 3B mostra che l'androgeno (10nM) induceva un incremento della fosforilazione della Tyr 397 di FAK e della Tyr 118 della paxillina. L'effetto era massimo dopo 5' di stimolazione e si riduce dopo 30' di

trattamento con R1881. I livelli, invece, delle proteine totali, sia di FAK che della paxillina, non mostravano variazioni in presenza dell'ormone.

L'effetto indotto dall' R1881 è specifico in quanto, ancora una volta, era abolito in presenza dell'anti-androgeno Casodex.

Inoltre, né in presenza di progesterone né di estradiolo, si osservavano modificazioni nella fosforilazione in tirosina di FAK o della paxillina (dati non mostrati).

Le stesse cellule rese quiescenti erano stimolate, per i tempi indicati in Fig. 3C, con 10 nM R1881 o con 1pM R1881 ed i lisati cellulari erano immunoprecipitati o con anticorpi anti-FAK o con anticorpi di controllo (dati non mostrati). Gli immuno-complessi erano analizzati mediante immunoblot con anticorpi anti-P-FAK (Tyr 397), P-Paxillina e FAK totale. In presenza di 1pM R1881, che è capace di dare solo un debole effetto sulla migrazione cellulare (vedi Fig.2A), si rilevava solo un lieve incremento della fosforilazione in Tyr397 di FAK e della fosforilazione in Tyr118 della paxillina. Diversamente, si osservava un incremento della fosforilazione della Tyr 397 di FAK dopo 5 minuti dalla stimolazione con 10nM R1881 (Fig. 3C).

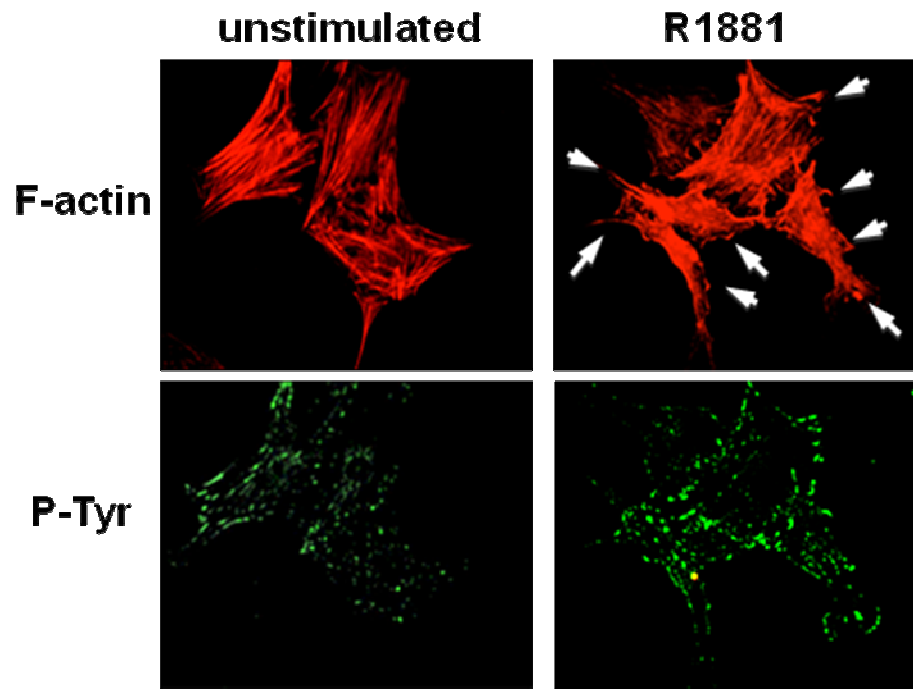
Tale effetto era mediato dal classico recettore dell'androgeno, poichè l'anti-androgeno Casodex abolisce l'attivazione di FAK indotta dall' androgeno (10nM) (Fig. 3C).

Quindi, solo concentrazioni fisiologiche di ormone sono in grado di dare un netto aumento della fosforilazione di FAK e Paxillina.

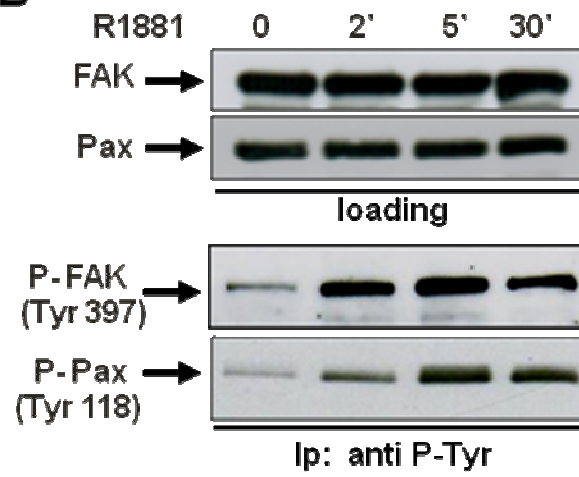
Nell'insieme gli esperimenti mostrano che la stimolazione di cellule NIH3T3 con 10nM R1881 determina l'attivazione di FAK nel residuo di Tyr-397, e la fosforilazione della paxillina nel residuo di tirosina 118.

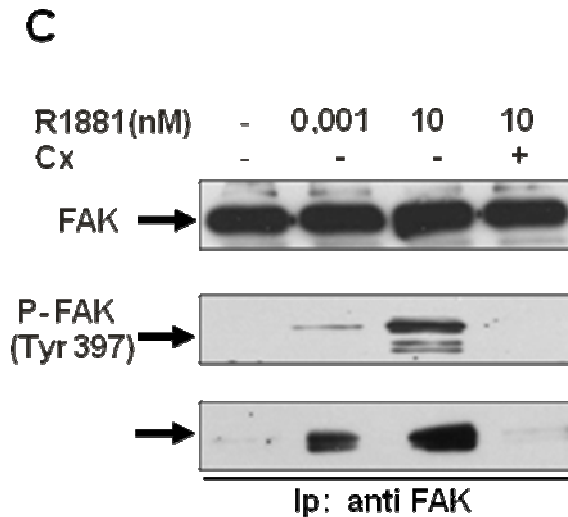


**A**



**B**





**Fig. 3 10nM R1881 incrementa le adesioni focali e attiva FAK e paxillina**

A) Cellule NIH3T3 quiescenti venivano piastrate su vetrini per immunofluorescenza e trattate o non trattate per 20' con R1881 (10 nM). Le cellule erano sottoposte a colorazione per rivelare mediante microscopia in fluorescenza l'actina citoscheletrica (F-actina), le proteine fosforilate in tirosina (P-tyr). In particolare, erano osservate la F-actina (rosso) e la ridistribuzione delle P-Tyr (verde).

B) Cellule NIH3T3 erano trattate o non trattate con 10 nM R1881 per i tempi indicati. I lisati cellulare erano immunoprecipitati con anticorpi anti-P-Tyr e blottati utilizzando gli anticorpi diretti contro le proteine indicate.

C) Cellule NIH3T3 erano trattate o non trattate con 10 nM R1881 e con 1pM R1881 per i tempi indicati. Il Casodex era aggiunto in eccesso di 1000 volte. I lisati cellulari erano immunoprecipitati o con anticorpi di controllo (ctrl) o con anticorpi anti-FAK. Le proteine degli immunocomplessi erano analizzate mediante Western Blot, utilizzando gli anticorpi diretti contro le proteine indicate in figura.

A questo punto, per meglio identificare il ruolo di FAK, erano utilizzati fibroblasti che o iper-esprimevano la proteina FAK (FAK+/+) o che ne erano completamente privi (FAK-/-).

Esperimenti di immuno-blotting hanno messo in evidenza che in fibroblasti FAK-/- erano presenti bassi livelli del recettore dell'androgeno (Fig. 4A).

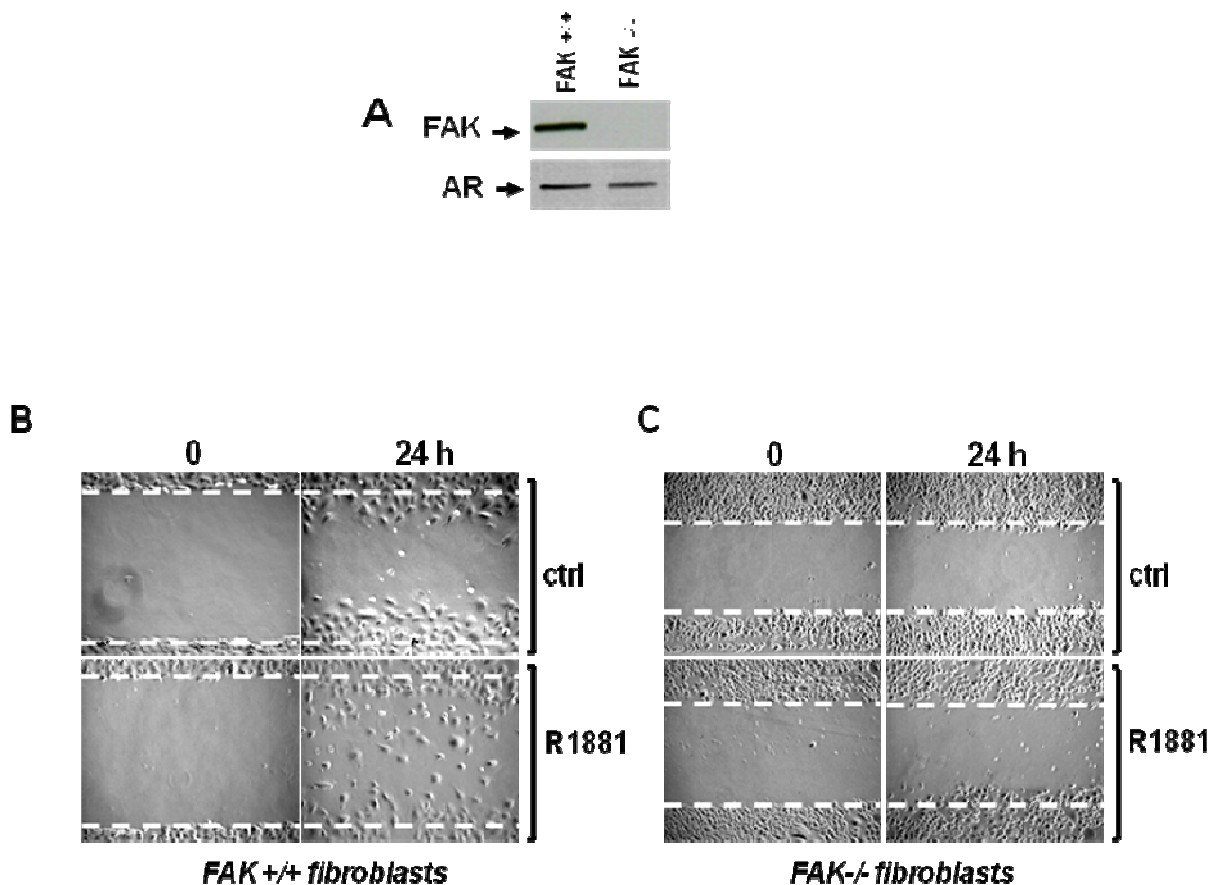
Per valutare gli effetti dell'androgeno sulla migrazione cellulare, fibroblasti FAK+/+ e FAK-/- erano resi quiescenti ed erano sottoposti a "wound scratch assay".

La capacità delle cellule di migrare nell'area della ferita era seguito per 24h mediante microscopio in contrasto di fase e le immagini ottenute sono

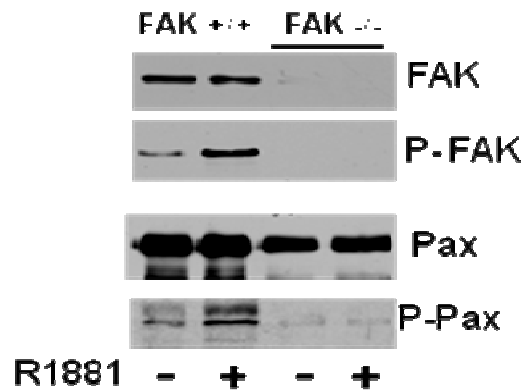
presentate nella figura 4B. Esse mostrano che, in cellule FAK +/+ o FAK -/- non stimulate, non si ottiene la chiusura della ferita, mentre in presenza di 10 nM R1881, soltanto le cellule FAK positive sono capaci di invadere l'area della ferita durante le prime 24 h di stimolazione ormonale (Fig. 4B e C).

Contestualmente, il trattamento di fibroblasti FAK+/+ con 10 nM R1881 induceva un incremento della fosforilazione in tirosina di FAK e della paxillina. Al contrario, nei fibroblasti FAK-/-, privi di capacità migratoria, l'androgeno non è capace di determinare fosforilazione in tirosina né della paxillina né di FAK (Fig. 4D pannello in basso).

Questi dati definiscono chiaramente il ruolo di FAK nella migrazione di fibroblasti indotta da androgeno, ed in particolare evidenziano che questa chinasi, in cellule stimulate con concentrazioni fisiologiche di androgeno, controlla la fosforilazione in tirosina della paxillina.



D



**Fig. 4 L'androgeno induce l'attivazione di FAK e paxillina in fibroblasti FAK+/+.**

A) Pannello superiore: Lisati di FAK+/+ e FAK-/- erano analizzati per immunoblotting con anticorpi specifici diretti contro FAK totale e il dominio C-terminale di AR. Pannello inferiore: cellule FAK+/+ e FAK-/- erano trattate e non trattate con 10nM R1881 ed erano immunoblottati per FAK e paxillina totale e per P-FAK e P-paxillina.

B e C) Cellule FAK+/+ (in fig. 4B) e FAK-/- (in fig. 4C) erano rese quiescenti e venivano piastrate su vetrini per immunofluorescenza. Dopo aver eseguito la ferita con la punta sterile di un "tip", le cellule erano trattate o non trattate per 24h con R1881 (10 nM). L'area della ferita era visualizzata con microscopio in contrasto di fase e le immagini erano catturate utilizzando una telecamera DC480 (Leica). Le immagini mostrano le cellule non trattate e le cellule dopo 24 h dalla stimolazione ormonale.

D) Cellule FAK+/+ e -/- erano resi quiescenti e stimolati e non stimolati per 5' con 10nM R1881. I lisati erano immunoblottati con anticorpo specifici diretti contro FAK, P-FAK, paxillina e P-Paxillina.

### **3.3. Il ruolo di Rac1 nella migrazione indotta da androgeno in fibroblasti NIH3T3.**

Dati precedenti hanno dimostrato che la stimolazione con 10nM R1881 induce la rapida attivazione di Rac1 nei fibroblasti NIH3T3 (Castoria et al. 2003).

Poiché le modificazioni del citoscheletro sono un presupposto fondamentale affinché la cellula possa migrare, è stato valutato il ruolo di Rac1 nella migrazione indotta da androgeno in cellule NIH3T3.

Vari meccanismi regolano i tempi e l'attivazione delle proteine della famiglia Rho. Tra queste, l'attivazione FAK-dipendente svolge sicuramente un ruolo preminente (Ridley et al. 2003).

A tale scopo, è stato condotto un pull down assay al fine di verificare l'attivazione di Rac in cellule FAK+/+ e FAK-/- .

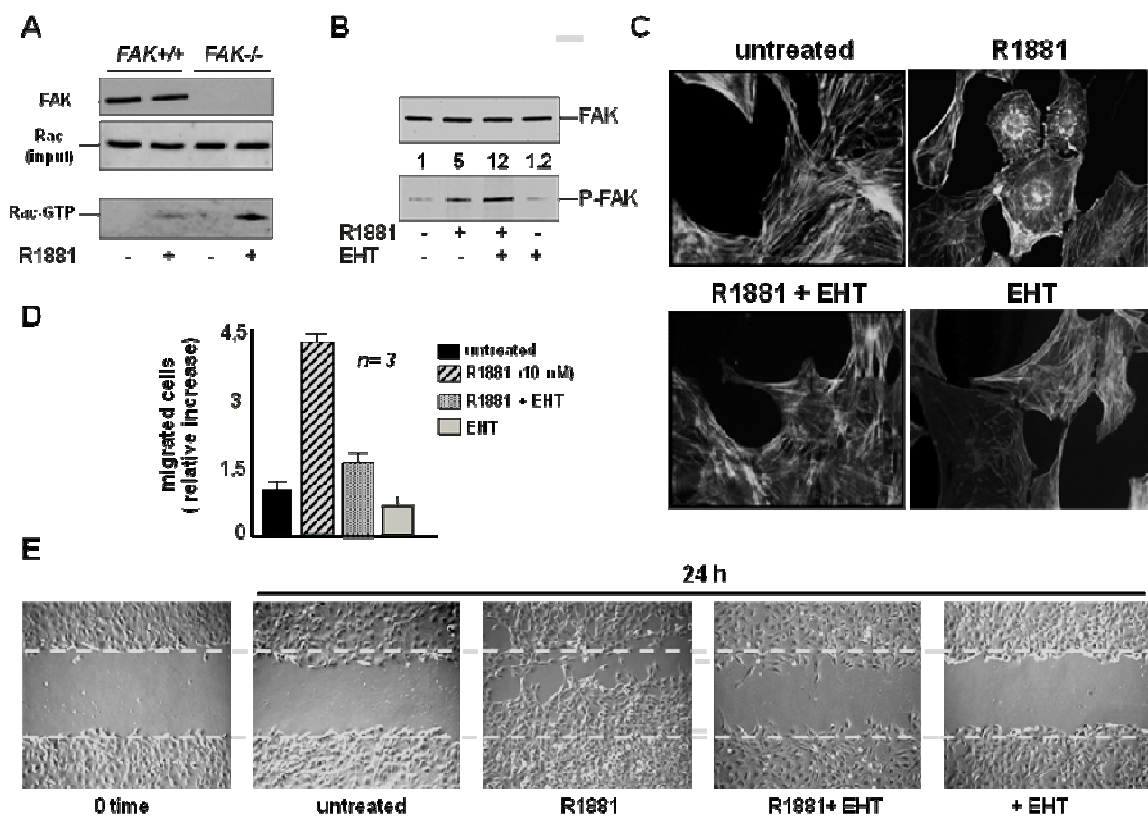
La fig. 5A mostra che, sebbene i livelli totali di Rac1 siano pressochè equivalenti in entrambe le linee cellulari, la stimolazione con 10nM R1881 induce una più evidente attivazione di Rac1 in cellule FAK-/- piuttosto che in cellule FAK+/+ . Ciò esclude la possibilità che l'attivazione di Rac, da parte dell'androgeno, possa richiedere la presenza della proteina FAK.

In fig. 5B è possibile osservare come il trattamento con androgeno (10nM) aumenta significativamente l'auto-fosforilazione di FAK, rilevata mediante immunoblot con anticorpi anti P-tirosina, e quindi la sua attivazione. Quest'effetto è ancora più evidente in presenza dell'inibitore di Rac1, ovvero l'EHT1846, mentre l'EHT1846 da solo non modifica il livello basale di fosforilazione di FAK. Quindi, questi risultati indicano chiaramente che l'attivazione di FAK non dipende da Rac in cellule NIH3T3 stimulate con androgeni.

Infine, è stato analizzato il coinvolgimento di Rac1 sia sul fenomeno della migrazione che sul citoscheletro.

La fig. 5C mostra ed analizza l'effetto della stimolazione con androgeno sulla organizzazione dell'actina citoscheletrica in fibroblasti NIH3T3. Si osserva che il trattamento con 10nM R1881 è capace di modificare l'organizzazione del citoscheletro e indurre la formazione del ruffling di membrana. In presenza dell'inibitore di Rac1, EHT1846, si osserva una sostanziale

riduzione del membrane ruffling indotta da androgeno. Inoltre, il trattamento con EHT1846 inibisce la migrazione cellulare indotta da androgeno sia nel transwell assay (Fig. 5D) che nel wound-scratch assay (Fig. 5E). Risultati simili sono stati ottenuti in fibroblasti FAK+/+ (dati non mostrati). I dati presentati dimostrano, quindi, che la stimolazione con 10nM R1881 induce l'attivazione di Rac1 nei fibroblasti e che questa proteina è essenziale per la migrazione cellulare e per le modificazioni citoscheletriche indotte dall'ormone.



**Fig. 5 L'attivazione di Rac1 è coinvolto nei cambiamenti citoscheletrici e nella migrazione cellulare.**

A) Cellule FAK+/+ e FAK-/- erano rese quiescenti e trattate o non con 10nM R1881. I lisati proteici erano sottoposti a "pull-down assay" e le proteine eluite dalla resina erano rivelate mediante anticorpi anti-Rac1.

B) Cellule FAK-/- venivano stimulate o non stimulate con 10nM R1881 in presenza o in assenza dell'inibitore EHT1846, e immunoblottate per FAK totale e per P-FAK. C) Cellule NIH3T3 quiescenti venivano piastrate su vetrini per immunofluorescenza e trattate o non trattate per 20' con R1881 (10 nM) in presenza o in assenza dell'inibitore EHT1846. I riarrangiamenti citoscheletrici venivano osservati mediante microscopia a fluorescenza utilizzando falloidina coniugata a Texas red. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti. D) Fibroblasti NIH3T3 venivano sottoposti a saggio di migrazione

su filtri transwell in presenza o assenza dei composti indicati in figura. Le cellule migranti erano colorate con Hoechst e contate mediante microscopio a fluorescenza. I risultati sono espressi come migrazione relativa rispetto al controllo (cellule non trattate) ed  $n$  rappresenta il numero degli esperimenti effettuati. E) Cellule NIH3T3 quiescenti venivano piastrate su vetrini ad una confluenza dell'80%. Dopo aver eseguito la ferita con la punta sterile di un puntale da pipetta, le cellule erano trattate o non trattate con 10nM R1881 in presenza o in assenza di EHT1846. L'area della ferita era visualizzata con microscopio in contrasto di fase e le immagini erano catturate utilizzando una telecamera DC480 (Leica). Le immagini mostrano le cellule non trattate e le cellule dopo 24 h dalla stimolazione ormonale in assenza o presenza dell'inibitore EHT1846.

### **3.4. L'androgeno induce la formazione del complesso AR/filamina A/integrina $\beta_1$ in cellule NIH3T3.**

Nello studio della migrazione cellulare, si è cercato di trovare una proteina che fungesse da collegamento tra AR, i contatti focali e l'attivazione di proteine citoscheletriche.

Sulla base di studi che descrivono un'interazione tra la filamina A e AR (Loy et al., 2003), abbiamo ipotizzato che proprio la filamina A, proteina che lega l'actina, potesse fungere da "linker" in questo circuito. Infatti, è ben noto il ruolo della FlnA nella motilità cellulare, nonché nell'interazione tra AR e FlnA in vari tipi cellulari (Ozanne et al. 2000). Inoltre, è stato dimostrato che la FlnA interagisce direttamente con il dominio citoplasmatico dell'integrina  $\beta_1$  (Loo et al., 1998; Deryk et al., 1998) e media i processi actino-dipendenti (Stossel et al., 2001).

Poiché la microscopia confocale non rivelava alcuna co-localizzazione tra AR e FAK, si è ricercata una possibile interazione tra FlnA, AR e integrina  $\beta_1$ .

A tale scopo, fibroblasti NIH3T3 resi quiescenti erano stimolati per 5 minuti con R1881 in presenza o in assenza dell'anti-androgeno Casodex. Le cellule erano sottoposte ad immunofluorescenza e la localizzazione di AR e della filamina A veniva analizzata mediante microscopio confocale. La figura 6A mostra che la stimolazione dei fibroblasti con 10nM R1881 induce una rapida co-localizzazione di AR con la filamina A sui filamenti intermedi del citoscheletro cellulare. Immagini di controllo (ctr) catturate dalle cellule colorate solo con l'anticorpo secondario FITC-coniugato, dimostrano che la colorazione di AR è specifica.

Il trattamento, invece, con concentrazioni sub-ottimali di androgeno (1pM) (dati non mostrati) non stimolava il reclutamento di AR alla filamina A comparabile con quanto osservato a 10nM R1881; l'aggiunta del Casodex aboliva l'associazione indotta dal trattamento di 10nM R1881, dimostrando che tale co-localizzazione era determinata dalla concentrazione del ligando utilizzato.

In figura 6B è rappresentato la ratio tra la co-localizzazione di AR con la filamina A in presenza di 10nM R1881.



Inoltre, i corrispondenti lisati cellulari ottenuti da fibroblasti stimolati con R1881 (10nM o 1pM) in presenza o assenza Casodex, erano immunoprecipitati per la FlnA e gli immunocomplessi erano ibridati su filtro con anticorpi anti- filamina A, anti-integrina beta1 e anti-AR. La figura 6C mostra che nei fibroblasti trattati con 10nM R1881, l'androgeno induce il reclutamento di AR e dell'integrina beta1 alla filamina A. L'aggiunta dell'anti-androgeno Casodex alle cellule stimolate con 10nM R1881, riduceva drasticamente la quantità di AR reclutato dalla filamina A.

Invece, sebbene la stimolazione con 1pM R1881 incrementava l'associazione dell'integrina beta 1 alla filamina A, non si osservava però un reclutamento di AR al complesso, comparabile a quanto osservato per il trattamento con 10nM R1881 (dati non mostrati).

Tali esperimenti dimostrano che concentrazioni fisiologiche (10nM) di androgeno R1881 stabilizzano l'interazione di AR con la filamina A.

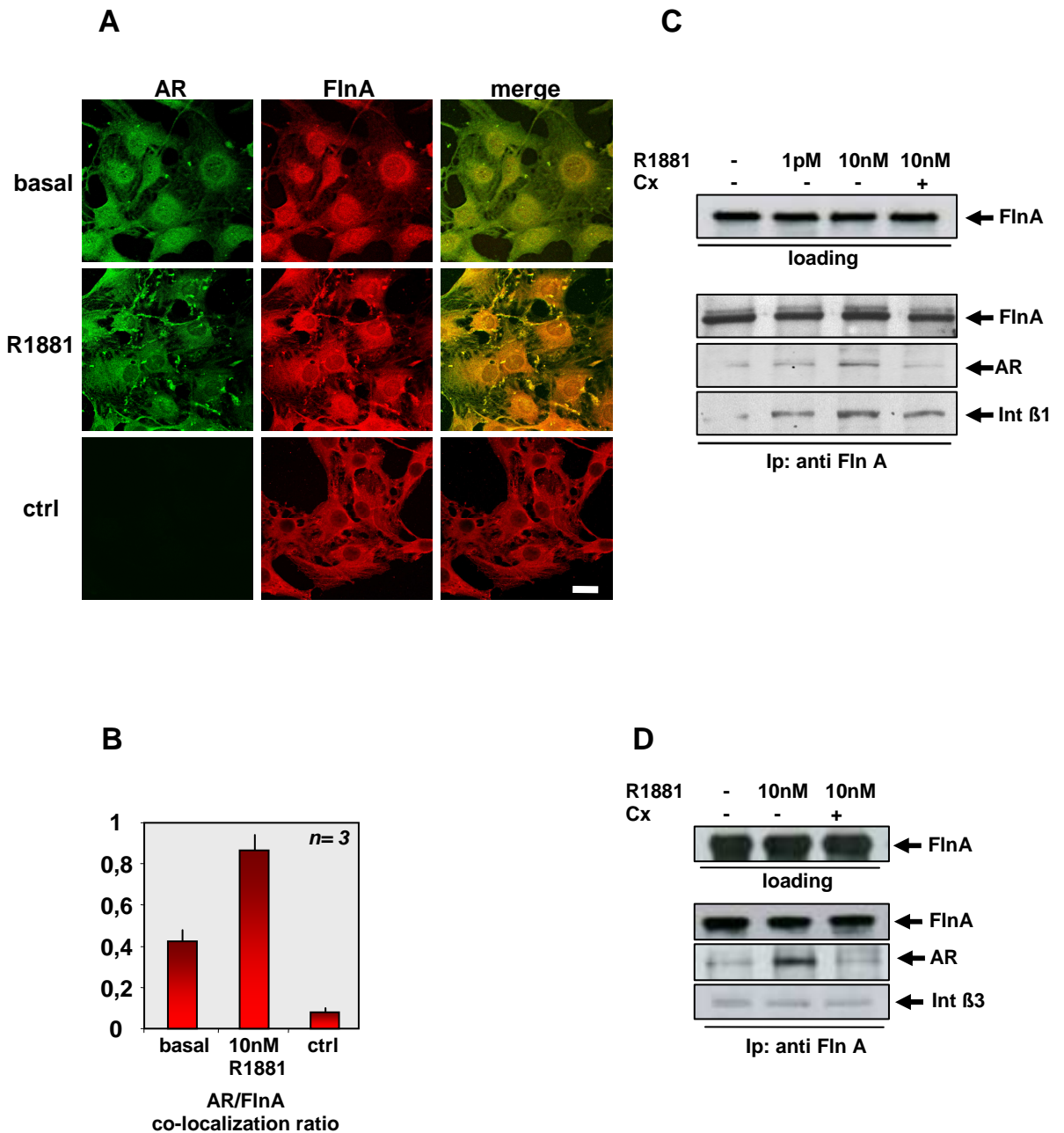
Infine, giacchè è stato descritto che l'integrina beta3 interagisce con la filamina A, è stato valutato il ruolo di questa proteina nella formazione del complesso con AR indotto da 10nM androgeno.

La Fig. 6D mostra che la stimolazione di cellule NIH3T3 con 10 nM R1881 aumenta notevolmente associazione di AR con Fln A, ma non riesce a reclutare significativamente l'integrina beta3 a questo complesso. Indipendentemente dalle condizioni sperimentali, infatti, è stata rilevata una quantità molto modesta di integrina beta3 co-immunoprecipitata. Comunque, anche in questo caso, l'aggiunta del Casodex inibisce l'associazione indotta di AR con Fln A in presenza di 10 nM R1881.

Inoltre, immunoprecipitando FAK e silenziando l'integrina  $\beta_1$  mediante siRNA in NIH3T3 come mostrato in figura 6E, non si osservavano gli effetti determinati dalla stimolazione con 10nM androgeno e infatti, non era rilevabile nessun aumento della fosforilazione di FAK in Tyr 397 e della paxillina in Tyr 118. Invece, in cellule trasfettate con RNA controllo "non-targeting", si osservava una debole co-immunoprecipitazione dell'integrina  $\beta_1$  con FAK in condizioni basali. Tale associazione risultava fortemente stimolata dal trattamento con gli androgeni (Fig. 6E).

La figura 6F mostra, invece, un esperimento nel quale FAK era immunoprecipitato in cellule in cui la filamina A era silenziata. I risultati mostrano che l'androgeno era incapace di indurre la fosforilazione di FAK e della paxillina nelle cellule che non esprimevano la filamina A. Tuttavia, la quantità di FAK co-immunoprecipitata in assenza di ormone nelle cellule silenziate, era sensibilmente più elevata che nelle cellule trasfettate con RNA "non-targeting". Analogamente, la quantità di P-FAK, osservata in condizioni basali nelle cellule con la filamina silenziata, è più alta che nelle cellule esprimenti la filamina anche se non vi era stimolazione da parte dell'ormone. In conclusione, si può affermare che la filamina A è necessaria per l'azione dell'androgeno sulla associazione e fosforilazione di FAK.

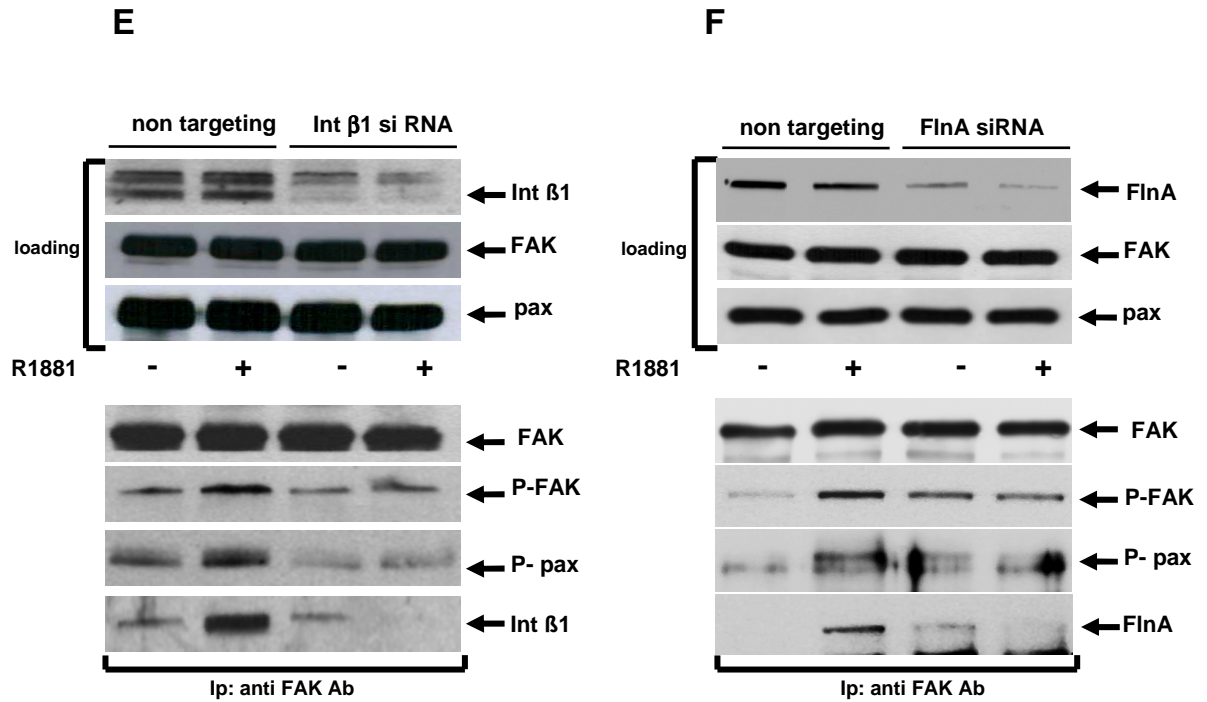
Questi risultati dimostrano, perciò, che gli androgeni (10nM) sono responsabili della formazione di un complesso extra-nucleare tra AR/FlnA/integrina beta1. Tale complesso è inoltre richiesto per l'attivazione di FAK e per la fosforilazione in tirosina della paxillina.



**Fig. 6 R1881 induce l'assemblaggio del complesso AR/filamina A/ integrina $\beta_1$ .**

A) Cellule NIH3T3 quiescenti venivano piastrate su vetrini per immunofluorescenza e trattate o non trattate per 5 min con R1881 (10 nM) in presenza o in assenza di Casodex. Le cellule erano sottoposte a colorazione per rivelare mediante microscopia in fluorescenza la colorazione della FlnA (in rosso) e di AR (verde). Il merge è mostrato in giallo.

B) Rappresentazione grafica del rapporto della co-localizzazione AR/FlnA. C-D) Lisati cellulari di fibroblasti NIH3T3, stimolati o non stimolati con i composti indicati, erano immunoblottati con anticorpi diretti contro le proteine indicate. L'antiandrogeno Casodex veniva aggiunto in eccesso di 1000 volte (sinistra) o di 10000 (destra). I lisati cellulari erano immunoprecipitati con anticorpi anti-filamina A e le proteine nell'immunocomplesso erano rivelate mediante anticorpi diretti contro le proteine indicate in figura.



E-F) Cellule NIH3T3 venivano trasfettate con siRNA di controllo (nt) o con integrina  $\beta_1$  siRNA (fig. 6E) o con FlnA siRNA (fig. 6F), come descritto in Materiali e Metodi. Dopo la trasfezione, le cellule erano rese quiescenti e trattate o non trattate per 5 minuti con 10nM R1881. Le figure mostrano Western blot dei corrispondenti lisati cellulari blottati con anticorpi descritti in figura. I lisati cellulari erano immunoprecipitati con anticorpi anti FAK e le proteine degli immunocomplessi erano analizzate mediante Western blot, utilizzando anticorpi diretti contro le proteine indicate nelle figure.

### **3.5. Il complesso AR/FlnA e l'attivazione di Rac1 sono richiesti per la migrazione cellulare dipendente da androgeno.**

Per valutare il ruolo del complesso AR/FlnA nel processo di migrazione cellulare indotto da androgeni, in cellule NIH3T3, è stato effettuato il silenziamento sia della filamina A che dell'integrina beta1, ed era analizzata l'attivazione di Rac1.

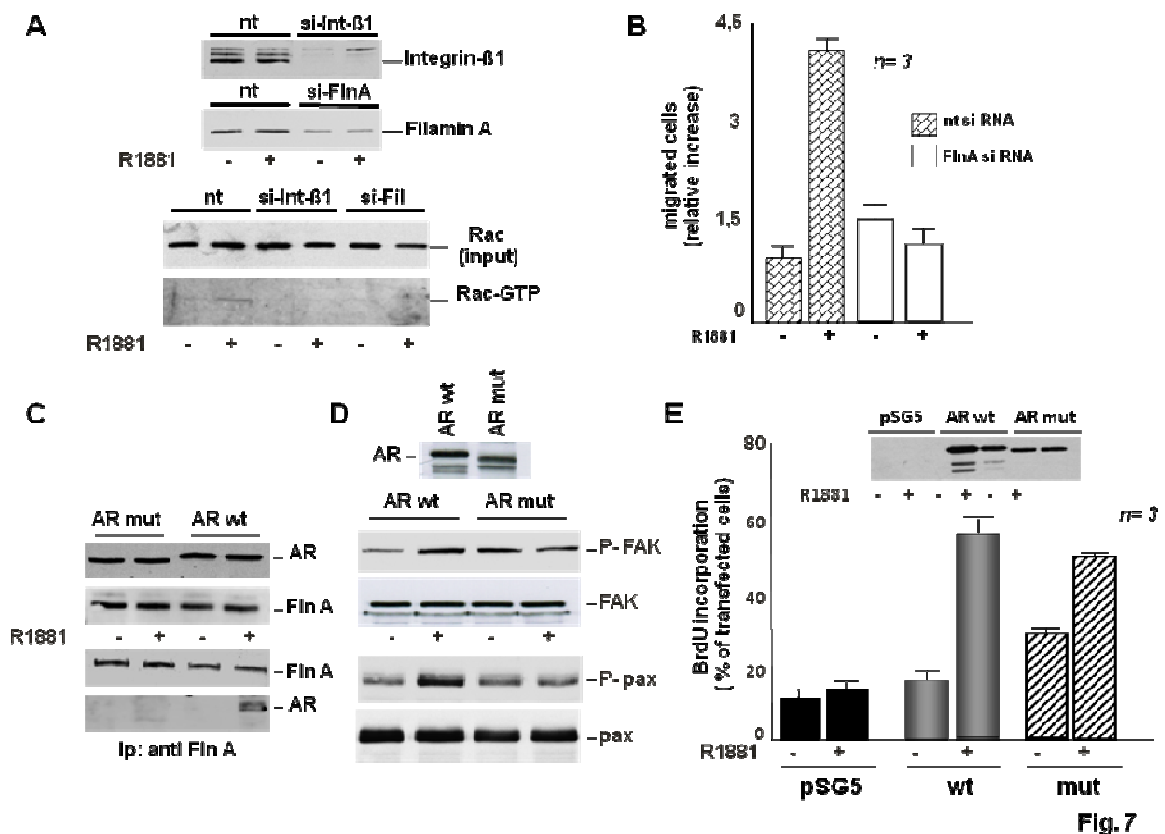
L'esperimento in figura 7A mostra il silenziamento dell'integrina beta1 e della filamina A mediante siRNA (pannello superiore). Un esperimento di "pull down assay" (pannello inferiore), evidenzia che l'androgeno (10nM) non è capace di indurre l'attivazione di Rac1 né in cellule silenziate per l'integrina beta1 né in quelle silenziate per la filamina A.

Inoltre, in figura 7B, si osserva che il silenziamento della filamina A abolisce l'acquisizione del fenotipo migratorio indotto dall'androgeno in fibroblasti NIH3T3. Nelle cellule trasfettate con RNA controllo, "non-targeting", invece, la stimolazione con 10nM R1881 incrementa notevolmente la capacità di queste cellule di migrare.

Infine, per valutare se le azioni che vedevano coinvolto AR fossero specifiche, veniva trasfettato in cellule COS-7, un recettore dell'androgeno, privo del dominio responsabile dell'interazione di AR con la filamina A (Loy et al., 2003). La figura 7C mostra che, indipendentemente dal ligando, il recettore mutato AR delta 622-670 iperespresso in cellule COS-7, che sono AR-negative, non interagisce con la filamina A. Invece, la stimolazione con 10 nM R1881 di cellule COS-7 esprimenti AR wilde type (wt) induce la formazione di un complesso AR/filamina A. Utilizzando le stesse condizioni sperimentali, in figura 7D, è mostrato come in presenza di 10nM R1881, in cellule NIH3T3 trasfettate con AR mutato, non venga indotta la fosforilazione in tirosina di FAK, e della paxillina, contrariamente a quanto accade per le cellule in cui è stato trasfettato AR wt.

Accertata l'inabilità del recettore mutato di interagire con la filamina A, si passava a valutare se AR mutato fosse però in grado di mediare la sintesi di DNA dopo trattamento ormonale. A tale scopo, in cellule MDA-MB231 che non esprimono AR, era trasfettato sia il recettore wt che quello mutato, oltre al PSG5 usato come controllo dell'esperimento. La figura 7E mostra

l'incorporazione di bromodeossiridina (BrdU) da parte delle cellule MDA-MB231 trasfettate con i composti indicati, e trattate o non trattate con 10nM R1881. Si può osservare che entrambi i recettori dell'androgeno, mutato e wt, sono ugualmente in grado di mediare l'entrata in fase S, in presenza di ormone. Quindi, le figure 6 e 7 evidenziano nell'insieme che il complesso AR/FlnA regola sia l'attivazione di FAK che di Rac come la migrazione in fibroblasti NIH3T3.



**Fig. 7 ARwt/FlnA è necessario per l'attivazione di Rac.**

A) Cellule NIH3T3 venivano trasfettate con siRNA di controllo (nt=non targeting) o con integrina  $\beta_1$  siRNA, o con FlnA siRNA, come descritto in Materiali e Metodi. Dopo la trasfezione, le cellule erano rese quiescenti e trattate o non trattate per 5 minuti con 10nM R1881. Il pannello superiore mostra il Western blot dei corrispondenti lisati cellulari blottati con anticorpo anti-integrina  $\beta_1$  o con FlnA. Nel pannello inferiore, i lisati proteici erano sottoposti a "pull-down assay" e le proteine eluite dalla resina erano rivelate mediante anticorpi anti-Rac1. B) Fibroblasti NIH3T3 trasfettati con siRNA controllo o con FlnA siRNA, erano stimolati o non stimolati con 10nM R1881, e sottoposti a saggio di migrazione su filtri transwell ricoperti da collagene. Le cellule migranti erano colorate con Hoechst e contate mediante microscopio a fluorescenza. I risultati sono espressi come migrazione relativa rispetto al controllo (cellule non trattate) ed *n* rappresenta il numero degli esperimenti effettuati. C e D) Cellule Cos-7 erano trasfettate con AR wt o con AR mutato, resi quiescenti e trattate o non trattate per 5' con 10nM R1881. I lisati erano immunoprecipitati o con anticorpi anti-FlnA (Fig. 7C). Le proteine degli immunocomplessi erano analizzate mediante Western Blot, utilizzando anticorpi diretti contro le proteine indicate in figura 7C. In fig. 7D i

lisati cellulari venivano immunoblottati per le proteine indicate. E) Cellule MDA-MB231, AR negative, venivano piastrate su vetrini per immunofluorescenza, trasfettate con dna controllo (PSG5), AR wt e AR mutate, rese quiescenti e stimolate o non stimolate con 10nM R1881 per 18h. Veniva, poi, valutata l'incorporazione della bromodeossiuridina (BrdU) mediante colorazione con texas red. I lisati cellulari erano poi immunoblottati per AR (pannello superiore fig. 7E).

#### **4. DISCUSSIONE**

In questa tesi è stato dimostrato che, in fibroblasti murini NIH3T3, gli androgeni attivano meccanismi, non genomici, di trasduzione del segnale che sono responsabili del processo di migrazione cellulare.

E' stata innanzitutto dimostrata, mediante Western blot di lisati cellulari, la presenza, fino ad ora piuttosto discussa, del recettore dell'androgeno in questa linea cellulare.

Sono stati effettuati esperimenti di immunofluorescenza attraverso i quali è stato osservato che tale recettore risiede prevalentemente nel compartimento extra-nucleare di tali cellule e che la sua localizzazione è indipendente dalla stimolazione con ligando (10nM R1881).

Per poter valutare gli effetti dell'androgeno sintetico R1881 sulla migrazione cellulare, sono stati condotti esperimenti di wound healing e transwell assay. In tali esperimenti è stato dimostrato che la stimolazione con concentrazioni fisiologiche (10nM) di ormone ha un notevole effetto sulla migrazione di cellule NIH3T3 e che tale processo è sicuramente mediato da AR, in quanto l'anti-androgeno Casodex inibisce tale processo.

Poiché è noto che la migrazione cellulare richiede l'attivazione delle piccole proteine leganti il GTP, questo fenomeno è stato investigato focalizzando l'attenzione sui membri della famiglia Rho, che è nota per essere coinvolta nei riarrangiamenti citoscheletrici e nella motilità cellulare.

Per tale motivo, l'attenzione si è soffermata su una delle proteine della famiglia Rho, ovvero Rac1, che interviene sia nella migrazione cellulare che nelle modificazioni del citoscheletro.

I risultati degli esperimenti hanno identificato Rac1 come un nuovo effettore attivato dagli ormoni steroidei, in quanto responsabile del riassetto dell'actina, della formazione di "membrane ruffling" e della migrazione cellulare osservati in tali cellule in presenza di 10nM R1881. Inoltre, essendo importante, nella motilità cellulare, la comunicazione tra citoscheletro e adesione cellulare, si è analizzato l'effetto che produceva il trattamento con androgeno sulle adesioni focali.



La stimolazione ormonale, infatti, oltre ad indurre il riassetto dei filamenti di actina, determina anche una redistribuzione della paxillina e delle proteine fosforilate in tirosina alla periferia cellulare.

Per analizzare il meccanismo molecolare mediante il quale gli androgeni attivano le proteine coinvolte nella formazione dei contatti focali e nella migrazione cellulare, sono stati condotti esperimenti di immunoprecipitazione.

Si è preso in considerazione una proteina, la filamina A, in quanto è stato osservato che essa interagisce sia col recettore dell'androgeno che con l'integrina beta1 (Ozanne, 2000), e quindi poteva costituire un elemento di tramite tra AR e le vie di trasduzione dei segnali integrinici, e ne è stato valutato l'eventuale ruolo sulla migrazione indotta da androgeno.

Attraverso esperimenti di immunoprecipitazione si è dimostrato che concentrazioni fisiologiche (10nM) di R1881 inducono l'associazione di AR con la filamina A e l'integrina  $\beta_1$ . Tale complesso recluta ed attiva FAK e la paxillina, che sono coinvolte nella formazione delle adesioni focali. Una volta attivata, FAK fosforila gli scambiatori guaninici attivando così Rac1, la cui attivazione porta a modificazioni citoscheletriche che sono preludio della migrazione cellulare.

La formazione del complesso AR/FlnA/integrina beta1 è essenziale per la migrazione cellulare di fibroblasti NIH3T3, perché il silenziamento sia della filamina A che dell'integrina beta1 blocca l'attivazione di Rac1, l'attivazione di FAK e la fosforilazione della paxillina, osservate in presenza di ormone.

Inoltre, l'interazione AR/FlnA riveste una importanza fondamentale in quanto un recettore dell'androgeno incapace di legarsi alla filamina A, in seguito a trattamento ormonale, non induce né la fosforilazione di FAK né della paxillina, pur essendo ugualmente capace come il wild type di mediare la sintesi del DNA ormone-dipendente.

Quindi, i dati riportati in questa tesi, vogliono indicare il ruolo cruciale che ha l'androgeno R1881 nell'attivazione di effettori di trasduzione del segnale che sono coinvolti nella migrazione cellulare. Inoltre, tali dati suggeriscono che il recettore degli androgeni, pur essendo presente a livelli bassi nei fibroblasti

NIH3T3, ha una potente azione nell'innescare i processi di motilità cellulare, in presenza di concentrazioni fisiologiche di androgeno.

Quindi, l'androgeno è in grado di indurre la migrazione in cellule NIH3T3 attraverso l'interazione con proteine che sono coinvolte nella riorganizzazione del citoscheletro e nella formazione delle adesioni focali.

Da tutto ciò se ne deduce che in cellule NIH3T3 solo le alte concentrazioni di androgeno (10nM) e non le basse (1pM), che invece stimolano la proliferazione cellulare (Castoria et al. 2003), inducono la migrazione cellulare, aumentano la velocità di movimento e diminuiscono l'adesione cellulare sulla matrice extracellulare (dati non mostrati). La concentrazione di androgeno, quindi, può avere un ruolo chiave nell'attivazione di diversi effettori di segnale e nel determinare i tipi di risposta cellulare.

Pertanto, i fibroblasti NIH3T3 rappresentano un nuovo modello per l'analisi di azioni steroidee puramente non genomiche, in cui la concentrazione fisiologica di ligando modula il tipo di risposta cellulare.

## 5. Materiali e metodi

### 5.1 Colture cellulari, e saggi di trans-attivazione.

Fibroblasti murini NIH3T3 erano coltivati in terreno DMEM (GIBCO) con rosso fenolo. Al terreno erano aggiunti L-Glutammina (GIBCO) (2mM/mL), Streptomicina (GIBCO) (100µg/mL), Penicillina (100U/ml) e 10% siero fetale bovino (FBS); (GIBCO). Le cellule erano cresciute in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> in piastre di petri di plastica da 100mm ed erano incubate a 37°C. Le cellule erano rese quiescenti utilizzando terreno DMEM (GIBCO) senza rosso fenolo con l'aggiunta di Streptomicina (100µg/mL), Penicillina (100U/ml), L-Glutammina (2mM/mL), Insulina (SIGMA I-1882); (5µg/mL), Transferrina (Calbiochem); (5µg/mL) e 0.5% FBS trattato con carbone attivo (charcoal stripped serum, CSS). Il trattamento del siero con il "charcoal" era effettuato allo scopo di rimuovere gli steroidi presenti nel siero.

Cellule di carcinoma della prostata LNCaP erano coltivate in terreno RPMI (GIBCO) con rosso fenolo. Al terreno erano aggiunti L-Glutammina GIBCO) (2mM/mL), Streptomicina (GIBCO) (100µg/mL), Penicillina (100U/ml) e 10% siero fetale bovino (FBS); (GIBCO). Le cellule erano rese quiescenti utilizzando terreno DMEM (GIBCO) senza rosso fenolo con l'aggiunta di Streptomicina (100µg/mL), Penicillina (100U/ml), L-Glutammina (2mM/mL), Insulina (SIGMA I-1882); (5µg/mL), Transferrina (Calbiochem); (5µg/mL) e 0.5% FBS trattato con carbone attivo (charcoal stripped serum, CSS).

Fibroblasti FAK -/- e FAK +/+ (ATCC) venivano coltivati e resi quiescenti come riportato (Castoria et al. 2003). Fibroblasti FAK -/- venivano tenuti per 12 ore in assenza di siero (0,5% FCS).

Cellule Cos-7, MDA-MB231 erano coltivate e rese quiescenti come descritto (Castoria et al., 1999 e 2003; Migliaccio et al, 2000). Cellule Cos-7 ed MDA-MB231 sono state transfettate con 1 µg di ciascun plasmide purificato, utilizzando il reagente Superfect (Qiagen, GmbH). Ventiquattro ore dopo, le cellule trasfettate sono state rese quiescenti. Le cellule sono state trasfettate (Superfect) con 2 µg dei costrutti 3416-pTK-TATA-Luc oppure 3424-pTK-TATA-Luc, in presenza o in assenza di 1 µg del plasmide pSG5-hAR.

Ventiquattro ore dopo la trasfezione, le cellule sono state lasciate non stimolate o stimolate con 10 nM R1881 (Perkin Elmer) per 18 h. L'attività luciferasica è stata misurata da lisati cellulari utilizzando un sistema di dosaggio di luciferasi (Promega) ed i valori sono stati corretti usando l'attività  $\beta$ -galattosidasi (GE Healthcare).

## **5.2 Costrutti.**

Il cDNA che codifica per hAR wild type era costruito in pSG5 (Chang et al., 1988).

Il mutante AR ( $\Delta$  622-670 HAR) è stato inserito nel vettore di espressione psV1 (Loy et al., 2003). Il costrutto 3416 contenente quattro copie del wild-type slp-HRE2 (5'-TGGTCAGccAGTTCT-3') e il costrutto di 3424 (5'-TGGACAGccAGTTCT-3'), sono stati clonati nel sito NheI in pTK-TATA-Luc (Verrijdt et al., 2000).

## **5.3 Wound healing assay**

Per il saggio di wound-healing, cellule NIH3T3 erano piastrate su vetrini all'80% di confluenza e rese quiescenti come sopra indicato. Il giorno seguente con un tip sterile da 10 $\mu$ l veniva creata la ferita e le cellule, per bloccare la proliferazione, erano trattate con 50  $\mu$ M di citosina  $\beta$ -D-arabinofuranoside (Sigma) e poi stimolate con R1881 (10 nM), in presenza o assenza di Casodex (10  $\mu$ M); (Astra Zeneca) e EHT 1864 (20 $\mu$ M); (SIGMA). Quattro ore prima della stimolazione era aggiunto l'inibitore di Rac1 (EHT). Le cellule dell'area della ferita erano osservate con microscopio invertito a contrasto di fase (Leica DC-200) e le immagini venivano acquisite, in assenza di stimolo e dopo 24-48h dalla stimolazione, utilizzando una telecamera DC200 (Leica) collegata al software IMI1000 (Leica).

## **5.4 Trans-well assay**

Per tale saggio venivano utilizzate camere con filtro (membrane di policarbonato con pori da 8 $\mu$ m, Nunc) trattate o non trattate con collagene (Tipo I di coda di ratto at 100mg/ml; BD Biosciences). Tali camere erano inserite in multiwell da 12. Cellule NIH3T3 venivano risospese in 200  $\mu$ l di

DMEM privo di rosso fenolo e contenente BSA (0,5%); esse erano piastrate ( $2 \times 10^4$  cell/well) e mantenute in mezzo completo a 37°C e a 5% CO<sub>2</sub> in assenza o presenza dei composti indicati in figura 2B. Per siRNA di AR e FlnA, cellule NIH3T3 sono state co-trasfettate con siRNA Alexa Fluor 488 per consentire di identificare le cellule transfettate. Dopo 6h le cellule presenti sulla parte superiore della membrana venivano opportunamente rimosse, quelle presenti nella parte inferiore venivano fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti e colorate con Hoechst 33258 per 10 minuti.

I nuclei delle cellule erano quindi contati mediante microscopio a fluorescenza DMBL (Leica), usando un obiettivo a fluorescenza HCPL Fluotar 20 X (Leica). Gli esperimenti erano ripetuti tre volte, in triplicato.

### **5.5 Immunofluorescenza e microscopio confocale**

Le cellule sui vetrini per immunofluorescenza venivano fissate con paraformaldeide al 3% per 20' e permeabilizzate con Triton X-100 0,2% (BIORAD) per 5'.

Il recettore degli androgeni endogeno era visualizzato mediante anticorpo policlonale anti-AR (Ab-2, Neo-Markers) diluito (1:100 in PBS, Phosphate buffered saline). Tale anticorpo era rivelato usando un anticorpo anti-rabbit coniugato a fluoresceina (Jackson Laboratories) diluito (1:200 in PBS con siero bovino 0,2%).

La filamina A era rivelata con un anticorpo policlonale anti-FlnA (AB11074; Abcam) diluito (1:40 in PBS). Tale anticorpo veniva poi visualizzato usando l'anticorpo secondario anti-goat coniugato a Texas Red (Abcam).

Le proteine fosforilate in tirosina erano visualizzate mediante anticorpo monoclonale di topo anti P-Tyr (clone 4G10, Upstate Biotechnology), diluito (1:100 in PBS). Per rivelare l'anticorpo primario era utilizzato l'anticorpo anti-mouse coniugato a fluoresceina isotiocianato (Jackson Laboratories) diluito (1:200 in PBS).

La paxillina era rivelata utilizzando anticorpo anti-paxillina coniugata a fluoresceina isotiocianato, FITC, (clone 349, BD Biosciences) diluito (1:200 in PBS). Per rivelare l'anticorpo primario era utilizzato un anticorpo anti-mouse coniugato a fluoresceina isotiocianato (Calbiochem) diluito (1:200) in PBS. I

vetrini erano successivamente trattati con Hoechst 33258 per 10', invertiti e montati con Mowiol (Calbiochem, CL) su vetrini portaoggetti. I lavaggi tra i vari passaggi venivano eseguiti in PBS (Phosphate buffered saline).

Le immagini venivano osservate mediante microscopio a fluorescenza DMBL Leica (Leica), usando obiettivi HCX PL Fluotar 40x, HCX PL Apo 63x oil, e HCX PL Fluotar 100x oil. Le immagini venivano acquisite utilizzando la camera DC480 (Leica) e il software FW4000 (Leica).

### **5.6 Riarrangiamenti citoscheletrici.**

Per osservare il citoscheletro, cellule NIH3T3 rese quiescenti erano piastrate su vetrini per immunofluorescenza, mantenute per 24 h in DMEM senza rosso fenolo come riportato (Castoria et al., 2003) e stimulate con 10 nM R1881 in assenza o in presenza di EHT 1864 (20µM).

Le cellule venivano fissate, permeabilizzate come sopra descritto e trattate con Falloidina coniugata a Texas Red (Sigma) diluita (1:250 in PBS) per 1,5 h. L'inibitore di Rac 1, EHT 1864 (Sigma; Shutes et al., 2007) era aggiunto 4h prima dalla stimolazione ormonale.

### **5.7 Preparazione di lisati cellulari, siRNA e immunoprecipitazione.**

Per la preparazione dei lisati cellulari, le cellule erano sottoposte a tre lavaggi con PBS (phosphate saline buffer) freddo a pH 7.4 e poi raccolte. Le cellule venivano lisate con un tampone di lisi freddo (Tris HCl 50mM pH 7.4, EDTA 1mM, Triton 1%, NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, EGTA 1mM), cui venivano aggiunti i seguenti inibitori di proteasi: cocktail di inibitore di proteasi 50X (Roche), fenilmetilsufonilfluoride 1mM (SIGMA), Aprotinina 100µg/mL (Sigma), Sodio Ortovanadato 1mM (SIGMA), Sodio Fluoruro (Sigma) 1mM.

I lisati venivano preparati alla concentrazione di 2mg/ml. Essi erano lasciati in agitazione a 4°C per 30', poi centrifugati a 15000 rpm a 4°C per ulteriori 30'.

La concentrazione proteica dei campioni era misurata mediante un kit per il dosaggio proteico prodotto dalla Bio-Rad (Bio-Rad, Ca. USA).

Per effettuare l'immunoprecipitazione di FAK, i lisati venivano incubati con un anticorpo anti-FAK (BD 610087, clone 77).

La FlnA è stata immunoprecipitata usando l'anticorpo policlonale anti-FlnA (Cell Signaling, 4762).

Per l'immunoprecipitazione delle proteine fosforilate in tirosina, i lisati cellulari venivano incubati con un anticorpo monoclonale anti-P-Tyr (Upstate, clone 4G10). Veniva poi aggiunta la proteina A/G plus (pre-equilibrata con il tampone di lisi in rapporto 1:1). L'interazione con la proteina A/G avveniva tramite agitazione blanda a 4°C per 90'.

I campioni erano poi centrifugati a 14000 rpm per 5', ed i "pellets" venivano lavati con 1 mL di tampone di lisi contenente inibitori per 3 volte. Gli immuno-complessi erano, infine, ridotti con Laemmli SDS-PAGE sample buffer.

Per il dosaggio dell'attività di Rac, è stato utilizzato un kit di attivazione di Rac (Upstate Biotechnology) ed è stato effettuato come riportato (Castoria et al. 2003).

Per il silenziamento (siRNA), fibroblasti NIH3T3 erano piastrati ad una confluenza del 50% in terreno senza antibiotici. Il giorno successivo le cellule venivano incubate con mezzo di coltura Optimem (GIBCO).

Il silenziamento dell'integrina  $\beta_1$  veniva effettuato utilizzando un pool di 20-25nt specifico per 4 sequenze target e trasfettando 45pmol di siRNA (Santa Cruz sc-35675) mediante Lipofectamine2000 (Invitrogen). Il silenziamento della FlnA è stato fatto utilizzando un pool di 20-25nt specifico per 3 sequenze target (Santa Cruz).

Le cellule controllo erano trasfettate con siRNA di controllo (Santa Cruz). 24 ore dopo la trasfezione, le cellule erano poste in terreno DMEM contenente 0,5% CSS in assenza di antibiotici per ulteriori 24h. Al termine le cellule erano stimulate o non stimulate per 5' con l'androgeno R1881 10nM e quindi sottoposte a lisi ed immunoprecipitazione come descritto prima.

### **5.8 Elettroforesi e immunoblotting.**

I campioni erano sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide (Acilammide 10%) in condizioni denaturanti (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). La corsa elettroforetica era effettuata a 120 V in un tampone contenente Tris (50mM), Glicina (380mM)

ed SDS (0.1%). L'elettrotrasferimento su filtri di nitrocellulosa (Scheicher e Schuell) era eseguito a 20V per tutta la notte, a temperatura ambiente in un tampone simile a quello utilizzato per l'elettroforesi e contenente metanolo (20% v/v). Per bloccare i siti di legame aspecifici, i filtri di nitrocellulosa erano incubati per 1 h in una soluzione contenente 0.1% Tween-20, 5% latte e BSA(3% o 5%). I filtri erano quindi incubati con i relativi anticorpi per rivelare la presenza di proteine di interesse.

Il recettore dell'androgeno era rivelato utilizzando l'anticorpo rabbit polyclonal anti-AR (N-20 o C19; Santa Cruz) oppure l'anticorpo policlonale anti-AR (Ab-2; Neomarkers).

Le P-Tyr erano rilevate con anticorpi anti-P-Tyr (Upstate). La paxillina (BD Bioscience; clone 349) e la P-Tyr 118 della paxillina erano rivelate con anticorpi specifici (BD Bioscience). P-FAK e FAK erano rivelate con anticorpi appropriati (Cell Signalling).

La filamina A era rivelata utilizzando l'anticorpo policlonale anti-filamina A (Cell Signaling). L'integrina  $\beta 1$  veniva rivelata usando anticorpi policlonali anti integrina  $\beta 1$  (Chemicon International). Rac1 era rivelato con l'anticorpo monoclonale anti-Rac (clone 23A8; UBI).

Le proteine immunoreattive erano incubate con anticorpi secondari specifici ed infine rivelate mediante chemiluminescenza utilizzando un kit appropriato (Amersham, U.K.).



## 6. BIBLIOGRAFIA

**Alberts B, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter**, *Biologia molecolare della cellula*, Zanichelli, 2009

**Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K.** Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res.* 2000 Nov 25;261(1):44-51

**Bedolla RG, Wang Y, Asuncion A, Chamie K, Siddiqui S, Mudryj MM, Prihoda TJ, Siddiqui J, Chinnaiyan AM, Mehra R, de Vere White RW, Ghosh PM.** Nuclear versus cytoplasmic localization of filamin A in prostate cancer: immunohistochemical correlation with metastases. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 1;15(3):788-96.

**Ben-Ze'ev A.** Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Feb;9(1):99-108. Review.

**Bishop AL, Hall A.** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 2000 Jun 1;348 Pt 2:241-55. Review.

**Blaustein Jeffrey D.** Minireview: Neuronal Steroid hormone Receptors: They're Not for Hormones Anymore, Blaustein Jeffrey D., *Endocrinology* 145 (3):1075-1081, 2004

**Bokoch GM, Vlahos CJ, Wang Y, Knaus UG, Traynor-Kaplan AE.** Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J.* 1996 May 1;315 ( Pt 3):775-9.

**Brown MC, Perrotta JA, Turner CE,** Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *1996 Nov;135(4):1109-23.*

**Brown MC, Turner CE** Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev.* 2004 Oct;84(4):1315-39

**Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiosses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA, Ginsberg MH.** Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol.* 2001 Dec;3(12):1060-8.

**Cancelas JA, Jansen M, Williams DA.** The role of chemokine activation of Rac GTPases in hematopoietic stem cell marrow homing, retention, and peripheral mobilization. *Exp Hematol.* 2006 Aug;34(8):976-85. Review.

**Castoria G., M. Lombardi, M.V. Barone, A. Bilancio, M. Di Domenico, D. Bottero, F. Vitale, A. Migliaccio and F. Auricchio,** Androgen-stimulated DNA synthesis and cytoskeletal changes in fibroblasts by a nontranscriptional receptor action. *J. Cell Biol.* 2003 161, 547-556.

**Castoria G, Lombardi M, Migliaccio A, Barone M.V, Di Stasio R, Ciociola A, Bottero D, Yamaguchi H, Appella E, Auricchio F.,** Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *J.Cell Biol.* 2008 Vol. 327-340.

**Chauhan S. , Kunz A., Davis K, Roberts J., Martin G., Demetiou M.C., Sroka T.C., Cress A.E. and Roger L. Miesfeld,** Androgen Control of Cell Proliferation and Cytoskeletal Reorganization in Human Fibrosarcoma Cells. , *The Journal of Biological Chemistry*, 2004 Vol 279, Number 2, 937-944,

**Chen HC, Appeddu PA, Isoda H and Guan JL.,** Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol. Chem.* 1996 271, 26329-26334.

**Deakin NO and Turner CE,** Paxillin comes of age. *J Cell Sci.* 2008 121, 2435-2444.

**Deryk T. Loo, Steven B. Kanner, and Alejandro Aruffo**, Filamin binds to the cytoplasmatic domain of the  $\beta_1$  integrin. The Journal of Biological Chemistry. 1998 Vol 273, No 36. pp 23304-23312.

**Deroo B.J. and Korach K.S.**, Estrogen receptors and human disease, The Journal of Clinical Investigation, 2006 Vol.116 Number 3.

**Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, Greer PA, Arthur JS, Elce JS, Huttenlocher A.**, Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. J Biol Chem. 2001 Dec 21;276(51):48382-8. Epub 2001 Oct 15

**Feng Y and Walsh CA**, The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. Nat. Cell Biol. 2004 6, 1034-1038.

**Fox JW, Lamperti ED, Eksioğlu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA.**, Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. Neuron. 1998 Dec;21(6):1315-25.

**Frame MC, Brunton VG**, Advances in Rho-dependent actin regulation and oncogenic transformation Curr Opin Genet Dev. 2002 Feb;12(1):36-43. Review.

**Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ, Han J, Bennin DA, Critchley DR, Huttenlocher A.**, Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. Nat Cell Biol. 2004 Oct;6(10):977-83.

**Friedl P, Bröcker EB.**, T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations. Dev Immunol. 2000;7(2-4):249-66. Review.

**Friedl P, Wolf K.**, Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat Rev Cancer. 2003 May;3(5):362-74. Review.

**Giancotti FG, Ruoslahti E.**, Integrin signaling. Science 1999 285:1028-1032.

**Gobin AS, West JL.**, Cell migration through defined, synthetic ECM analogs. FASEB J. 2002 May;16(7):751-3. Epub 2002 Mar 26.

**Goldmann WH.**, Phosphorylation of filamin (ABP-280) regulates the binding to the lipid membrane, integrin, and actin. Cell Biol Int. 2001;25(8):805-8.

**Gorlin JB, Yamin R, Egan S, Stewart M, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH.**, Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. J Cell Biol. 1990 Sep;111(3):1089-105.

**Hall A, Nobes CD.** Philo Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2000 Jul 29;355(1399):965-70.

**Hamadi A, Bouali M, Dontenwill M, Stoeckel H, Takeda K, Rondé P.** Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. J Cell Sci. 2005 Oct 1;118(Pt 19):4415-25. Epub 2005 Sep 13.

**Hanks SK, Polte TR**, Signaling through focal adhesion kinase. Bioessays. 1997 Feb;19(2):137-45. Review.

**Harburger DS and Calderwood DA**, Integrin signalling at a glance. J Cell Sci. 2009 122, 159-63.

**Inabe K, Ishiai M, Scharenberg AM, Freshney N, Downward J, Kurosaki T.** Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. J Exp Med. 2002 Jan 21;195(2):189-200

**Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV**, Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature*. 1997 Dec 11;390(6660):632-6.

**Kim H, Nakamura F, Lee W, Shifrin Y, Arora P, McCulloch CA**, Filamin A is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Feb;298(2):C221-36. Epub 2009 Sep 23.

**Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH**, Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*. 2000 Oct;113 (Pt 20):3563-71. Review

**Loo DT, Kanner SB and Aruffo A.**, Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction. *J Biol Chem*. 1998 273, 23304-23312.

**Loy CJ, Sim KS, Yong EL**, Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 100, 4562-4567.

**Mackay DJ, Hall A.**, Rho GTPases. *J Biol Chem*. 1998 Aug 14;273(33):20685-8. Review

**Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon**, The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 1995 835-39

**Mazumdar A, Kumar R.**, Estrogen regulation of Pak1 and FKHR pathways in breast cancer cells. *FEBS Lett*. 2003 Jan 30;535(1-3):6-10.

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

**Mitra SK, Hanson DA and Schlaepfer DD**, Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2005 6, 56-68.

**Nobes CD, Hall A.**, Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*. 1995 Aug;23(3):456-9.

**Nobes CD, Hall A.**, Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995 Apr 7;81(1):53-62.

**Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE and Robson CN**, Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol. Endocrinol*. 2000 14, 1618-1626.

**Pal Sharma C, Goldmann WH.**, Phosphorylation of actin-binding protein (ABP-280; filamin) by tyrosine kinase p56lck modulates actin filament cross-linking. *Cell Biol Int*. 2004 28(12):935-41.

**Parker MG.**, Structure and function of nuclear hormone receptors. *Semin Cancer Biol*. 1990 Feb 1(1):81-7. Review.

**Parsons J.T., Karen H Martin, Jill K Slack, Joan M Taylor and Scott A Weed**, Focal Adhesion Kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement, *Oncogene*, 2000 Vol 19, 5606-5613

**Parsons JT.**, Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*. 2003 Apr 15;116(Pt 8):1409-16.

**Pollard TD, Borisy GG**, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003 Feb 21;112(4):453-65.

**Popowicz GM, Schleicher M, Noegel AA, Holak TA**, Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci.* 2006 Jul;31(7):411-9. Epub 2006 Jun 16

**Raeber GP, Lutolf MP, Hubbell JA**, Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration. *Biophys J.* 2005 Aug;89(2):1374-88. Epub 2005 May 27.

**Ridley AJ**, Rho GTPases and cell migration, *Journal of Cell Science* 2001 114, 2713-2722.

**Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR**, Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003 Dec 5;302(5651):1704-9. Review.

**Schlaepfer DD and Satyajit K Mitra**, Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Current Opinion in Genetics & development* 2004, 14:92-101

**Sheen VL, Feng Y, Graham D, Takafuta T, Shapiro SS, Walsh CA**, Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. *Hum Mol Genet.* 2002 Nov 1;11(23):2845-54.

**Shutes A, Onesto C, Picard V, Leblond B, Schweighoffer F and Der CJ**. Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem.* 2007 282, 35666-35678.

**Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K, Kalman D, Bourne HR**, Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol.* 2003 Feb 3;160(3):375-85. Epub 2003 Jan 27

**Stanyon CA, Bernard O**, LIM-kinase1. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Mar-Apr;31(3-4):389-94. Review

**Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS**, Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001 2,138-145.

**Turner CE**, Paxillin interaction, *J Cell Sci.* 2000 Dec;113 Pt 23:4139-40. Review.

**Ueda M, Oho C, Takisawa H, Ogihara S**, Interaction of the low-molecular-mass, guanine-nucleotide-binding protein with the actin-binding protein and its modulation by the cAMP-dependent protein kinase in bovine platelets. *Eur J Biochem.* 1992 Feb 1 203(3):347-52.

**Yamada KM, Geiger B**, Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Feb;9(1):76-85.

**Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T**, Regulation of cancer cell motility through actin Reorganization. *Cancer Science*, 2005 96: 379-386

**Vadlamudi RK, Li F, Adam L, Nguyen D, Ohta Y, Stossel TP, Kumar R**, Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):681-90.

**Van der Flier A, Sonnenberg A**, Structural and functional aspects of filamins., *Biochim Biophys Acta.* 2001 Apr 23;1538(2-3):99-117. Review.

**Van der Flier A, Sonnenberg A**, Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001 Sep;305(3):285-98.

**Van Haastert PJ, Devreotes PN**, Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Aug;5(8):626-34.

**Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, Claessens F.**

Change of specificity mutations in androgen-selective enhancers. Evidence for a role of differential DNA binding by the androgen receptor. *J Biol Chem.* 2000 Apr 21;275(16):12298-305.

**Zhao Z, Park C, McDevitt MA, Glidewell-Kenney C, Chambon P, Weiss J, Jameson JL, Levine JE.,** p21-Activated kinase mediates rapid estradiol-negative feedback actions in the reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 28;106(17):7221-6. Epub 2009 Apr 9.

**Zhao JH, Reiske H, Guan JL.,** Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J Cell Biol.* 1998 Dec 28;143(7):1997-2008.

**Zhou, A.X., J.H. Hartwig and L.M. Akyürek,** Filamins in cell signaling, transcription and organdevlopment. *Trends Cell Biol.* 2010 **20**: 113-123.

**Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF.** FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 2004 Feb;6(2):154-61. Epub 2004 Jan 25

**Weiner OD, Neilsen PO, Prestwich GD, Kirschner MW, Cantley LC, Bourne HR.** A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat Cell Biol.* 2002 Jul;4(7):509-13.

## 7. ABBREVIAZIONI

**ABD:** actin binding domain (dominio N-terminale che lega l'actina)  
**AC:** adenilato ciclastasi  
**AF1:** activation function 1 (dominio di trans attivazione NH<sub>2</sub>-terminale)  
**AF2:** activation function 2  
**AR:** androgen receptor (recettore dell'androgeno)  
**ARP2/3:** actin related protein  
**ASAP1:** ARF GTPase activating protein  
**ATP:** Adenosina trifosfato  
**BrdU:** 5- Bromo-2'-deoxy-uridine  
**BSA:** bovine serum albumin  
**Ca<sup>++</sup>:** Calcio  
**CHD1; CHD2:** Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1,2 (domini omologhi alla calponina)  
**Cdc42:** Cell division control protein 42 homolog  
**CF:** contatti focali  
**CSS:** charcoal stripped serum  
**CX:** Casodex (anti-androgeno)  
**DBD:** DNA binding domain (dominio di legame al dna)  
**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
**ECM:** matrice extracellulare  
**EHT1846:** inibitore di Rac  
**ERK2:** Extracellular Signal-Regulated Kinase 2  
**FAK:** focal adhesion kinase (chinasi delle adesioni focali)  
**FAT:** focal adhesion target domain  
**FBS:** fetal bovine serum  
**FcγRI:** Fc-gamma receptor 1  
**FERM:** erythrocyte band 4.1-ezrin-radixin-moesin homology)  
**FITC:** Fluorescein isothiocyanate (fluoresceina isotiocianato)  
**FLN:** filamina  
**GAP:** GTPase activating protein  
**GDI:** GDP dissociation inhibitor  
**GDP:** Guanosine diphosphate  
**GEF:** Guanine nucleotide exchange factor  
**GPCR:** G protein coupled receptor (recettori associate alla membrana)  
**GRAF:** GTPase activating protein for Rho associated with adhesion kinase  
**Grb2:** Growth factor receptor-bound protein 2; (fattore di sviluppo ricevitore-limita la proteina 2)  
**GTP:** guanosine triphosphate (guanosina trifosfato)  
**GTPasi:** hydrolyze guanosine triphosphate  
**H1;H2:** hinge domain  
**HRE:** hormone responsive elements (sequenze responsive all'ormone)  
**ICAM:** Intercellular adhesion molecule (molecole di adesione intercellulare)  
**LBD:** ligand binding domain (dominio che lega l'ormone)  
**Lck:** lymphocyte-specific protein tyrosine kinase  
**LIM:** are cysteine-rich double zinc fingers  
**LIMK:** LIM kinase

**MAPK:** Mitogen-activated protein kinase (proteina chinasi attivate da mitogeni)  
**MF:** microfilamenti di actina  
**MLC:** catena leggera della miosina II  
**RGD:** arginine-glycine-aspartate (dominio arginina-glicina-acido aspartico)  
**PAK-1:** Serine/threonine-protein kinase  
**PBS:** Phosphate buffered saline  
**PH:** pleckstrin homology  
**PI3K:** Phosphatidylinositol 3-kinase (fosfatidilinositolo-3-chinasi)  
**PIP2:** Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate (fosfatidilinositolo 3,4 difosfato)  
**PIP3:** Phosphatidylinositol 3-phosphate (fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato)  
**PIP5 chinasi:** fosfatidilinositide 4,5 difosfato chinasi  
**PKA:** protein kinase A  
**PKC:** protein kinase C  
**PLC $\gamma$ :** fosfolipasi C  $\gamma$   
**PRR1-2-3:** rat ventral prostatic proline-rich polypeptides 1-2-3  
**PTEN:** phosphatase and tensin homology deleted on chromosome 10  
**PTKs:** protein tirosino-chinasiche  
**Rac:** Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
**RalA:** Ras-related protein  
**RGD:** Arginina-Glicina-Acido aspartico  
**R1881:** androgeno sintetico non aromatizzabile  
**Rho:** Ras homolog gene family  
**RhoA:** Ras homolog gene family, member A  
**ROCK:** Rho chinasi  
**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
**SH2:** Src Homology 2 domain  
**SH3:** SRC Homology 3 Domain  
**siRNA:** small interfering RNA  
**SOCS:** soppressore della segnalazione delle citochine  
**SR:** steroid receptor  
**Src:** proto-oncogenic tyrosine kinase  
**VCAM:** vascular cell adhesion molecule 1  
**WASP:** Wiskott Aldrich syndrome protein  
**WAVE:** WASP-family verprolin-homologous protein family protein  
**WT:** wilde type

## 8. RINGRAZIAMENTI

*A tutta la mia famiglia, ai miei genitori Francesco e Raffaella, spettatori silenziosi ma sempre in prima fila, perché mi avete lasciata libera di decidere da sola e in qualunque momento e per avermi dato la possibilità di fare ciò che desideravo; a Carmen ed Elisa, sorelle di cuore buono e sincero, perché mi avete sempre consigliato per il meglio. Vi voglio bene.*

*A Bernardo, essenza della mia vita.*

*Mi sei sempre stato accanto e appoggiato in ogni mia scelta.*

*Sei una persona speciale.*

*Insieme a te, saprò superare ogni ostacolo. Grazie di tutto.*

*A Fabio, che mi ha trasmesso la passione per la biologia,...anche se non puoi essere qui, ho mantenuto la promessa che ti feci, sò che mi guardi dall'alto e che sei il mio angelo custode.*

*Alla musica, che ignara e inconsapevole, è stata la mia inseparabile compagna di viaggio, la mia valvola di sfogo e il mio rifugio nei momenti significativi della mia vita.*

*Alla mia consigliera Maria, alla cara Tonia, Marianna, Loredana, Carmela, quando ne avevo bisogno, siete state sempre lì ad ascoltarmi.*

*A tutto il laboratorio (34-35) del dipartimento di Patologia della Seconda Università degli Studi di Napoli: ai docenti Gabriella Castoria, Antimo Migliaccio, e Ferdinando Auricchio per avermi dato la possibilità di lavorare nel loro laboratorio; alla dott.ssa Antonietta De Falco, e al dott. Antonio Bilancio, alle colleghe Pia, Carmela, Flavia e Marzia: in questi tre anni, ognuno di voi, in un modo o nell'altro, mi ha lasciato qualcosa di importante.*

*Al dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare (DBPCM) dell'Università di Napoli "Federico II", al prof. Vittorio Enrico Avvedimento, per avermi dato la l'opportunità di fare questa esperienza.*

*Ai momenti di gioia e di non gioia, grazie per esserci stati.*

*Alla vita, perché è una e vò vissuta al 100%.*

*Grazie a tutti Voi.*



## 9. ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

- 1) Gabriella Castoria, Loredana D'Amato, Alessandra Ciociola, Pia Giovannelli, **Tiziana Girdali**, Leandra Sepe, Giovanni Paoella, Maria Vittoria Barone, Antimo Migliaccio and Ferdinando Auricchio (2010). Androgen-induced cell migration: the role of AR/Filamin A association. PlosOne, *in press*.
- 2) **Tiziana Girdali**, Pia Giovannelli, Marzia Di Donato, Gabriella Castoria, Antimo Migliaccio and Ferdinando Auricchio (2010). Steroid signaling activation and intracellular localization of sex-steroid receptors. Journal of Cell Communication and signaling (JCCS), *in press*. DOI: 10.1007/s12079-010-0103-1
- 3) Pia Giovannelli, Marzia Di Donato, **Tiziana Girdali**, Antimo Migliaccio, Ferdinando Auricchio and Gabriella Castoria (2010). Interaction of steroid receptors with proteins as a target in treatment of breast and prostate cancers, *Frontiers in Bioscience, in press*.

## ***Lavori pubblicati***

# Steroid signaling activation and intracellular localization of sex steroid receptors

Tiziana Girdali · Pia Giovannelli · Marzia Di Donato ·  
Gabriella Castoria · Antimo Migliaccio ·  
Ferdinando Auricchio

Received: 13 April 2010 / Accepted: 13 October 2010  
© The International CCN Society 2010

**Abstract** In addition to stimulating gene transcription, sex steroids trigger rapid, non-genomic responses in the extra-nuclear compartment of target cells. These events take place within seconds or minutes after hormone administration and do not require transcriptional activity of sex steroid receptors. Depending on cell systems, activation of extra-nuclear signaling pathways by sex steroids fosters cell cycle progression, prevents apoptosis, leads to epigenetic modifications and increases cell migration through cytoskeleton changes. These findings have raised the question of intracellular localization of sex steroid receptors mediating these responses. During the past years, increasing evidence has shown that classical sex steroid receptors localized in the extra-nuclear compartment or close to membranes of target cells induce these events. The emerging picture is that a process of bidirectional control between signaling activation and sex steroid receptor localization regulates the outcome of hormonal responses in target cells. This mechanism ensures cell cycle progression in estradiol-treated breast cancer cells, and its derangement might occur in progression of human proliferative diseases. These findings will be reviewed here together with unexpected examples of the relationship between sex steroid receptor localization, signaling activation and biological responses in target cells. We apologize to scientists whose reports are not mentioned or extensively discussed owing to space limitations.

**Keywords** Steroid action · Signaling activation · Sex steroid receptor localization

---

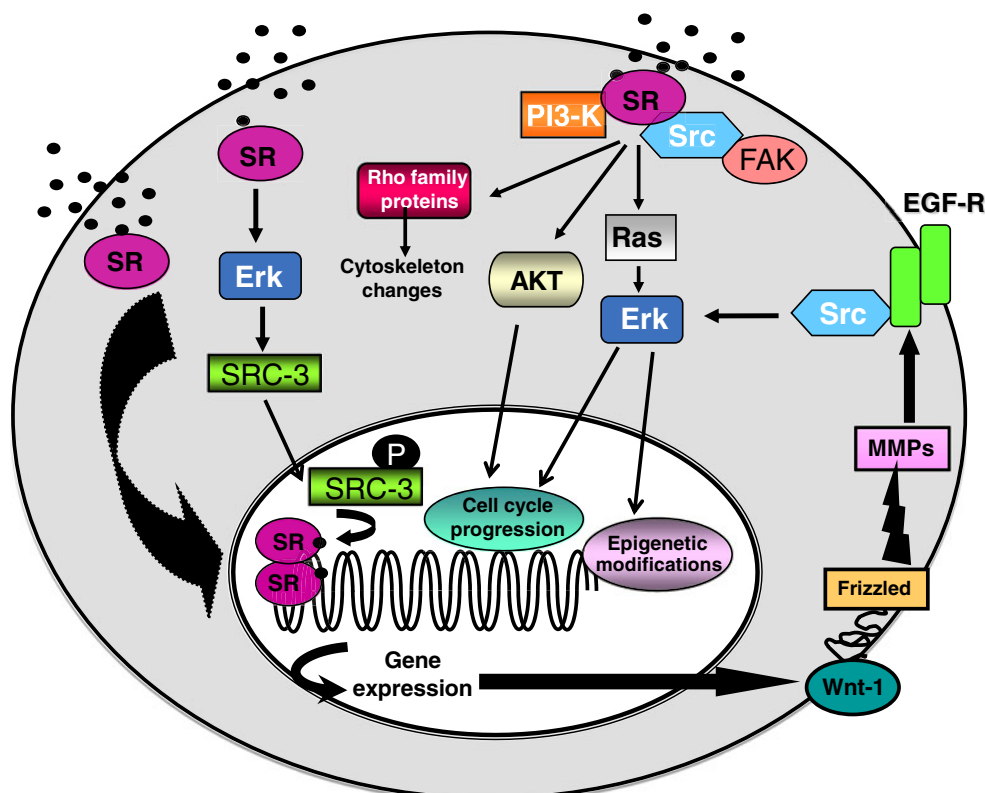
T. Girdali · P. Giovannelli · M. Di Donato · G. Castoria (✉) ·  
A. Migliaccio · F. Auricchio  
Department of General Pathology, II University of Naples,  
Via L. de Crecchio, 7,  
80138, Naples, Italy  
e-mail: gabriella.castoria@unina2.it

## Introduction

Sex steroids control a variety of responses in reproductive tissues, such as breast and prostate, and this activity has so far been attributed to transcriptional, genomic effects exerted by these hormones. According to this model, ligand-activated sex steroid receptors (SRs) translocate into the nucleus where they bind to hormone response element (HRE) and recruit factors required for the assembly of pre-initiation complexes (*reviewed in McKenna and O'Malley 2002*). After a relatively long time (from several minutes to hours or days), modifications of gene expression and protein profile occur. Finally, hormonal effects become evident.

SRs also mediate rapid, non-genomic responses in the extra-nuclear compartment of target cells. These responses are insensitive to RNA or protein synthesis inhibitors and do not require transcriptional activity of sex steroid receptors. Depending on the cell milieu, activation of these pathways produces different effects, such as proliferation, survival, vasorelaxation, migration and differentiation (*reviewed in Castoria et al. 2008*). This dual mechanism (genomic and non-genomic) of sex steroid action does not, however, account for the complexity of steroid-elicited responses in target tissues. Much evidence shows, indeed, that genomic and non-genomic actions of sex-steroids are integrated. Thus, non-genomic action mediated by SRs regulates the downstream genomic effects of sex steroids. Conversely, transcriptional activity of sex steroid receptors controls signaling pathway activation (*reviewed in Migliaccio et al. 2010; Vicent et al. 2010*). Figure 1 depicts the two models of sex steroid action and their possible integration in target cells.

SRs are considered nucleo-cytoplasmic shuttling proteins. Target cells take advantage of this shuttling process, since it



**Fig. 1** Models of sex steroid action in target tissue. The figure depicts a simplified model of genomic and non-genomic actions of sex steroids as well as possible integrations of the two models in target cells. According to the genomic model, sex steroid receptors (SR) translocate into the nuclear compartment, where they directly or indirectly stimulate gene transcription. Classical SR close to cell membranes or localized at caveolae recruit and activate upon ligand binding various signaling effectors, including the tyrosine kinase Src and PI-3-K, which in turn trigger cell proliferation and cytoskeleton changes or lead to epigenetic modifications (non-genomic model).

Rapid activation of extra-cellular-regulated kinase (Erk) mediated by classical SR also controls phosphorylation of the co-activator SRC-3. Once phosphorylated, SRC-3 translocates into the nuclear compartment, where it positively affects the transcriptional activity of SR. These results provide evidence for an early, non-genomic action of SR on SRC-3 that regulates the downstream genomic effects of estradiol (Zheng et al. 2005). In turn, SR action in nuclei induces transcriptional up-regulation of Wnt-1, followed by activation of MMP and trans-activation of EGF-R, which then activates Src-dependent signaling. This event leads to sustained activation of MAPK

contributes to the dynamic regulation of gene transcription and activation of signaling pathways in the extra-nuclear compartment. SR trafficking thus provides a mechanism to control and integrate nuclear and extra-nuclear functions of these receptors in target cells. Therefore, there is now a strong interest in defining links between signaling pathways, SR localization and biological outcome in target cells.

Nuclear import of glucocorticoid receptor (GR) can be triggered by activation of both mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) signaling; the MAPK axis has been also implicated in progesterone receptor (PR) import-export (reviewed in Pemberton and Paschal 2005). Again, in a progression model of prostate cancer, xenografts can switch from androgen-dependent to androgen-independent growth in castrated mice. Notably, during cancer progression, androgen receptor (AR) undergoes androgen-independent nuclear import through a mechanism involving MAPK pathway activation (Zhang et al. 2003). Estradiol activation of PI3-K/Akt (protein kinase

B) pathway regulates estradiol receptor (ER) alpha nuclear export and cell cycle progression in MCF-7 cells (Lombardi et al. 2008). Furthermore, prostate cancer-derived as well as mesenchymal and mesenchymal-transformed cells harbor a classical androgen receptor, which is tethered by filamin A (FlnA) or its fragments to intermediate filaments of cytoskeleton (Ozanne et al. 2000; Castoria et al. 2010). In LNCaP cells, such a distribution enables AR nuclear translocation (Ozanne et al. 2000), while in fibroblasts and human fibrosarcoma cells it ensures activation of the basic machinery leading to cytoskeleton rearrangements and cell migration upon androgen stimulation (Castoria et al. 2010).

These and other findings reviewed in the following sections reveal new facets of sex steroid biology and point to the reciprocal control of rapid hormonal action and intracellular localization of SRs. Such a control mechanism might impact growth and development of target tissues, and its derangement maybe involved in proliferative breast and prostate diseases. This review aims to provide a concise up-

to-date report of the complex network bridging localization of sex steroid receptors with non-genomic action of steroid hormones and biological outcome in target cells.

### Estradiol receptor localization and signaling activation

Cell biology and biochemical approaches have prevalently detected ER alpha in nuclei of target cells (Stenoien et al. 2001). Because of sensitivity limits, these methods only detect the presence of a protein where its steady state concentration is above the detection threshold. Therefore, these findings do not exclude that ER alpha transiently crosses the nuclear envelope to play a role in the cytoplasm or vice versa. Initially, ER alpha shuttling from nuclei to cytoplasm was detected using interspecies heterokaryon assay (Dauvois et al. 1993). Advances in live-cell fluorescence microscopy and use of green fluorescent protein (GFP) have allowed the study of nuclear receptor behavior in live cells in real time (Pemberton and Paschal 2005). Using the GFP approach, it has been observed that ligand binding and protein-protein interactions significantly influence nucleocytoplasmic shuttling of ER (Maruvada et al. 2003).

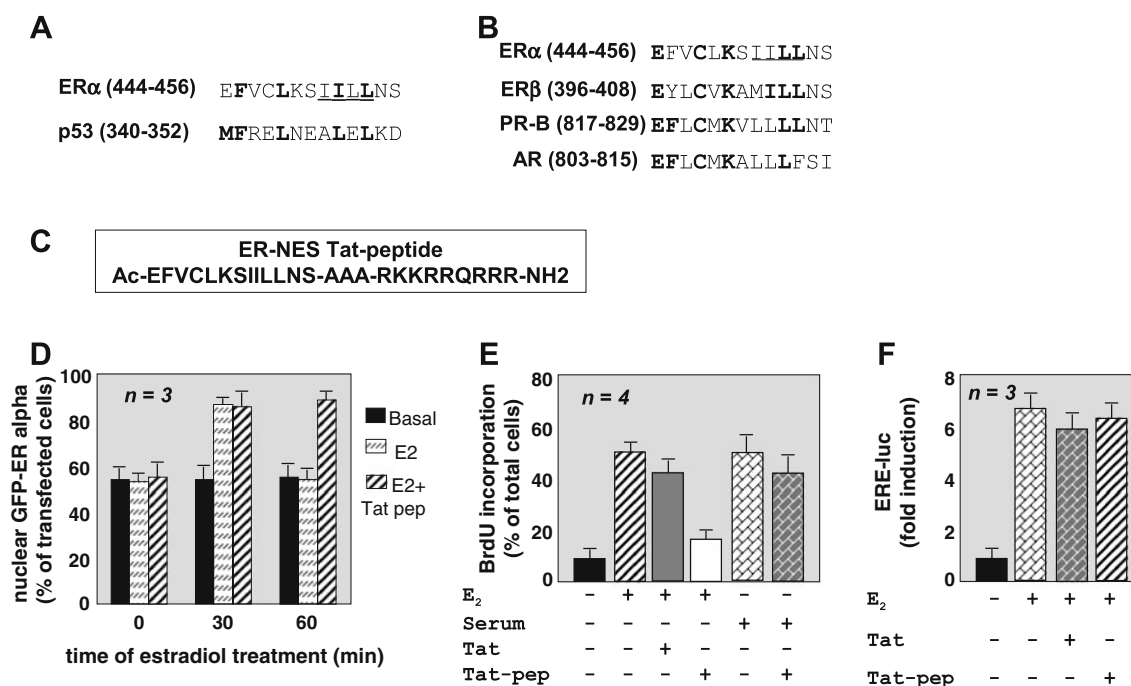
We recently dissected the import–export cycle of ER alpha in breast cancer MCF-7 cells. The nuclear export of ER alpha depends on chromosome region maintenance 1 (CRM1) and is regulated by estradiol activation of the PI3-K/Akt pathway (Lombardi et al. 2008). In a first attempt, the behavior of endogenous ER alpha was analyzed using two different antibodies in an immunofluorescence approach. Subsequently, the estradiol-regulated import–export cycle of ER alpha was dissected by subcloning the full-length receptor in GFP and following the fluorescence in MCF-7 cells unstimulated or stimulated with estradiol. Results from these experiments showed that after fast nuclear translocation, estradiol induces rapid LMB-sensitive ER alpha nuclear export. The entire process occurs during the initial 60 min of hormone treatment (Lombardi et al. 2008). An *in vivo* export assay (Henderson and Eleftheriou 2000) was then used. In this assay, putative nuclear export signals (NES) were identified by their ability to restore export activity of the NES-deficient regulator of expression of viral protein (Rev) 1.4-GFP (Rev mutant) to levels similar to those observed with the wild type pRev-GFP or the Rev 1.4-GFP NES (Rev wt) in which the NES is the canonical export sequence of the Rev protein. Different sequences of ER alpha containing leucine residues were then subcloned into Rev mutant (Lombardi et al. 2008). These constructs were transfected into MCF-7 cells and analyzed for their ability to restore nuclear export of the Rev mutant. Using this assay, we observed that the ER alpha leucine-rich sequence 444–456 induces a nucleo-cytoplasmic redistribution of Rev mutant in MCF-7 cells and that LMB treatment blocks its export activity. These data indicate that the 444–456

sequence is involved in the export of ER alpha through CRM1/exportin binding. By site-directed mutagenesis, two point mutations were introduced in the hydrophobic core of this sequence and by immunofluorescence approach it was verified that the 444–456 sequence actually contains the LMB-sensitive NES of ER alpha (Lombardi et al. 2008).

A thorough ER alpha sequence analysis showed homology between the 444–456 amino acids of ER alpha and the conserved leucine-rich and Rev-like NES of p53 (residues 340–351; Fig. 2a). A comparison of the homologous amino acids across the family of steroid receptors revealed a high level of sequence homology with ER beta, PR-B, and AR (Lombardi et al. 2008 and Fig. 2b). In contrast, we detected a less stringent sequence homology with GR and the mineralocorticoid receptor (MR; Lombardi et al. 2008). This is in agreement with the observation that GR nuclear export is independent of CRM1 (Liu and DeFranco 2000) and that the ligand binding domain of MR contains an LMB-insensitive NES (Saporita et al. 2003).

Based on findings presented in Fig. 2b, a full-length ER alpha NES mutant was prepared by site-directed mutagenesis and subcloned in GFP. Immunofluorescence approach showed that this mutant does not exit nuclei upon 60 min estradiol treatment, confirming that the leucine-rich sequence 444–456 of ER alpha actually contains a functional NES (Lombardi et al. 2008). Interestingly, this mutant also fails to induce estradiol-stimulated DNA synthesis, although it is still able to activate signaling or gene transcription regulated by estradiol (Lombardi et al. 2008). Lastly, a small peptide mimicking the ER alpha NES was conjugated to the Tat sequence derived from Human Immunodeficiency Virus (HIV). This small cationic peptide delivers proteins and drugs into nuclei (Joliot and Prochiantz 2004). The amino acid sequence of ER alpha NES-Tat peptide is shown in Fig. 2c. The Tat-peptide (Tat-pep) specifically sequesters ER alpha in nuclei (Fig. 2d) and interferes in hormone-triggered S-phase entry in MCF-7 cells (Fig. 2e), without affecting ERE-dependent transcriptional activity (Fig. 2f) or nuclear export of p53 and p27, which contain canonical NES (Lombardi et al. 2008). Altogether, our findings show that estradiol-induced nuclear export of ER alpha is controlled by the PI3-K pathway and is coupled with S-phase entry in breast cancer MCF-7 cells (Lombardi et al. 2008).

In search of a link between ER alpha nuclear export, PI3-K activation and cell cycle progression in breast cancer cells, the role of the forkhead (FKHR) transcription factor in these events was verified. Nuclear export of FKHR depends on its phosphorylation by Akt and nuclear FKHR regulates expression of genes involved in cell metabolic state, oxidative stress, aging and cell cycle arrest (*reviewed in* Accili and Arden 2004). Thus, changes in FKHR localization control the balance between cell cycle arrest and proliferation.



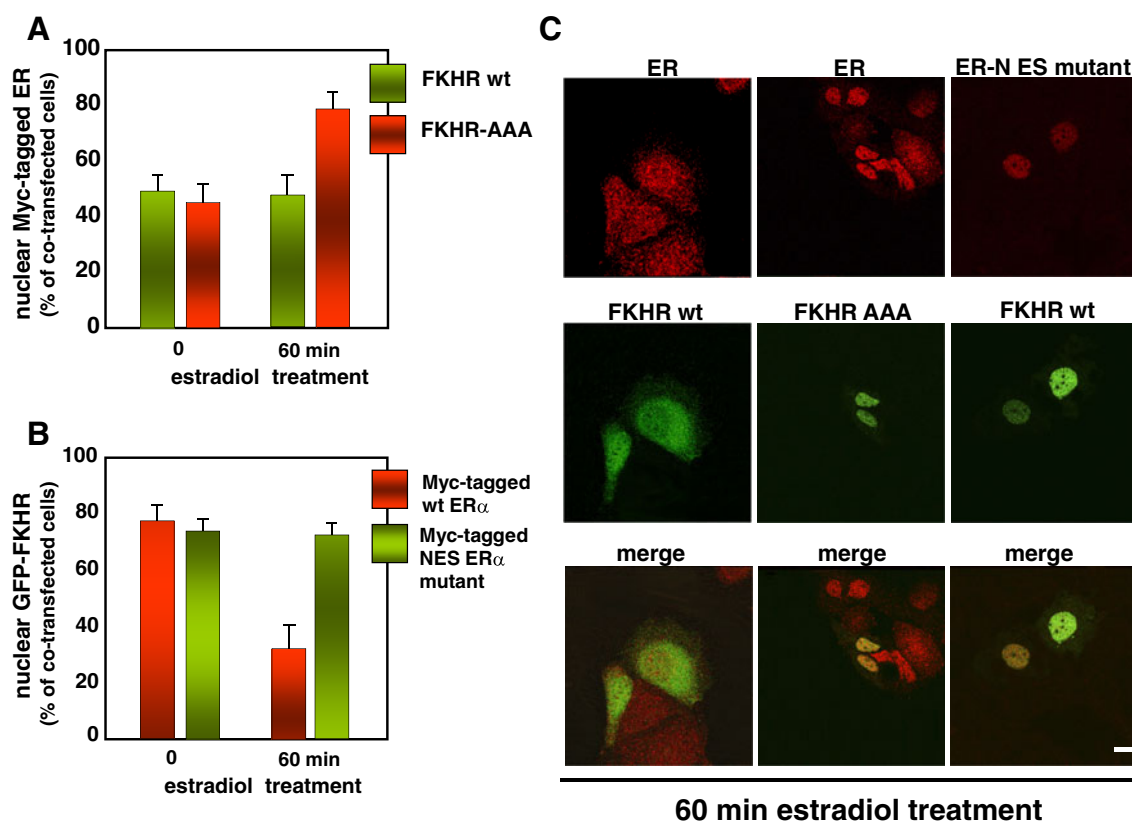
**Fig. 2** Identification of ER alpha NES and biological properties of ER alpha NES peptide in breast cancer cells. Panel A shows the ER alpha NES we mapped within the carboxyl-terminal domain of ER alpha. ER alpha NES sequence homology with the carboxyl-terminal Rev-like NES of p53 is also shown. Panel B shows that ER alpha NES sequence is highly conserved among the members of SR family in A and B, the hydrophobic core of ER alpha NES is underlined. Conserved amino acids are in bold. Panel C shows the amino acid sequence of the ER alpha NES-mimicking peptide. It was linked by a stretch of three alanins to the HIV-derived Tat peptide. Panel D shows

that addition of this peptide (Tat-pep) at 1 micromolar to the cell medium traps GFP-ER in nuclei of 60 min estradiol-treated MCF-7 cells. This peptide (Tat-pep; panel E) also interferes in BrdU incorporation induced by estradiol in quiescent MCF-7 cells whereas it does not affect serum-induced BrdU incorporation in MCF-7 cells. The Tat peptide alone was used as a control at 1 micromolar (Tat; panel E). In F, neither Tat peptide (Tat) nor Tat-NES peptide (Tat-pep) interferes in ERE-luc induction mediated by ER in estradiol-treated MCF-7 cells. In D, E and F, estradiol was used at 10 nM

Hormone-dependent ER alpha/FKHR interaction occurs *in vitro* (Schoor et al. 2001; Zhao et al. 2001) and negatively regulates estrogen-dependent breast cancer growth in cultured cells and tumorigenesis *in vivo* (Zou et al. 2008). Estradiol-activated PI3-K/Akt pathway leads to phosphorylation of the gatekeeper Ser 256 of FKHR, analyzed by Western blot of MCF-7 cell lysates (Lombardi et al. 2008). In addition, overexpression of a triple FKHR mutant (FKHR-AAA) inhibits estradiol-induced S-phase entry in MCF-7 cells (Lombardi et al. 2008). Notably, FKHR-AAA mutant cannot be phosphorylated by Akt and permanently resides in cell nuclei, thereby inducing cell cycle arrest (Nakamura et al. 2000). Confocal microscopy approach in Fig. 3a and c shows that overexpression of FKHR-AAA mutant induces ER alpha nuclear retention in 60 min estradiol-treated MCF-7 cells. In turn, overexpression of ER alpha NES mutant traps wild type FKHR in nuclei of cells challenged for 60 min with estradiol (Fig. 3b and c). From these findings (Lombardi et al. 2008), it can be concluded that estradiol simultaneously regulates ER and FKHR nuclear export. The role of ER alpha in this process is reinforced by siRNA approach showing that ER alpha knockdown induces nuclear

retention of wild type FKHR in estradiol-treated MCF-7 cells (Lombardi et al. 2008). Thus, we inferred that in ER alpha-positive breast cancer cells FKHR moves from nucleus to cytoplasm via a receptor-associated mechanism. Immunoprecipitation experiments corroborated this view, since they showed that estradiol stimulation increases association of wild type FKHR with ER alpha in MCF-7 cells. In the same experimental setting, the FKHR-AAA mutant fails to do so. Thus, FKHR phosphorylation by estradiol is required for its association with receptor, the nuclear exit of FKHR/ER complex and the consequent release of FKHR-mediated cell cycle inhibition (Lombardi et al. 2008). The reason ER alpha/FKHR association is required for nuclear export of the two proteins can at present only be the subject of speculation. It could be proposed that both ER alpha and FKHR each have a weak NES. ER alpha/FKHR complex assembly may increase the affinity of each protein for CRM1/exportin, and association of FKHR with ER alpha might favor FKHR nuclear exit by masking its nuclear localization signal (NLS). A similar mechanism occurs when FKHR exits nuclei in complex with the 14-3-3 protein (Van Der Heide et al. 2004).





**Fig. 3** Estradiol simultaneously induces nuclear export of ER and FKHR in MCF-7 cells. Quiescent MCF-7 were co-transfected along with the indicated constructs and then left unstimulated or stimulated for 60 min with 10 nM estradiol. Graphs in A represent the nuclear score of Myc-tagged ER in MCF-7 cells co-expressing either GFP-FKHR wt (green bars) or the GFP-FKHR-AAA mutant (red bars). Graphs in B represent the nuclear score of GFP-FKHR in MCF-7 cells co-expressing either Myc-tagged ER alpha wt (red bars) or the Myc-tagged ER alpha NES mutant (green bars). Images of confocal

microscopy analysis were captured and are shown in C. They represent the staining of Myc-tagged ER alpha in MCF-7 cells expressing GFP-FKHR wt (left in green), or the GFP-FKHR-AAA mutant (middle in green) and treated for 60 min with 10 nM estradiol. Right panels represent the staining of Myc-tagged ER alpha NES mutant (red) in MCF-7 cells co-expressing GFP-FKHR wt (green) and treated for 60 min with 10 nM estradiol. Merged images are shown at the bottom. Bar, 5  $\mu$ m. For experimental details see also Lombardi et al. 2008 in refs

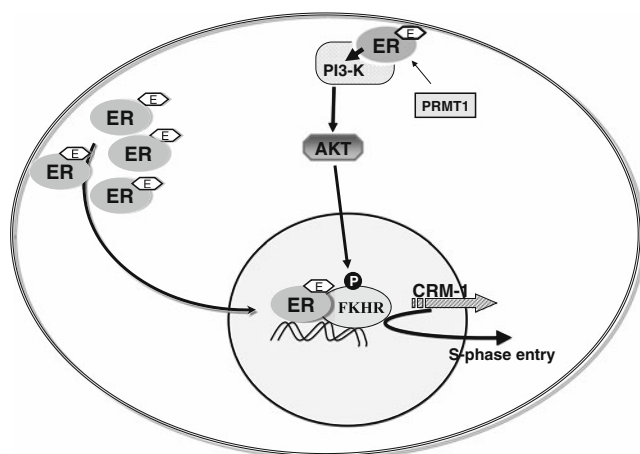
Figure 4 depicts the model of ER alpha/FKHR nuclear export in MCF-7 cells.

Our data reveal a novel link between non-genomic estradiol action and ER alpha export. They also identify a new and unexpected role for ER nuclear export in DNA synthesis. According to the model in Fig. 4, estradiol exerts two integrated actions: one in the extra-nuclear compartment, where it activates the PI3-K/Akt pathway (Castoria et al. 2001); the other in the nucleus, where it forms a complex with FKHR. Both actions (extra-nuclear and nuclear) converge on FKHR nuclear export and the consequent release of DNA synthesis inhibition. These findings offer an additional example of integration between non-genomic and genomic actions of SRs.

Noteworthy, Akt-2 activation by insulin-like growth factor 1 (IGF-1) also controls nuclear retention of ER alpha and FKHR-L1 in breast cancer cells (Morelli et al. 2010). These findings indicate that PI3-K/Akt/FOXO (Forkhead box O1 transcription factors) pathway activation controls

ER localization in breast cancer cells, whatever the extra-cellular stimulus.

Many reports point to the role of membrane-associated ER alpha in signaling activation. Confocal microscopy studies show that estradiol rapidly induces ER alpha membrane translocation and formation of membrane ruffles as well as pseudopodia in breast cancer MCF-7 cells (Song et al. 2002). Similar effects have been observed in human endothelial and breast cancer cells. In these latter cells, estradiol-coupled ER alpha rapidly activates the small Ras-like GTPase member A (Rho A). This results in phosphorylation of the actin-binding protein moesin, with a consequent increase in cytoskeleton changes analyzed by immunofluorescence and cell motility detected by wound scratch assay (Simoncini et al. 2006; Giretti et al. 2008). It has also been reported that estradiol treatment of MCF-7 cells induces recruitment of ER alpha to IGF-1 receptor (IGF1-R). In this way, ER alpha is tethered to the plasma membrane, where it initiates signaling events (Song et al. 2004).



**Fig. 4** Model of ER alpha nuclear export in breast cancer cells. A model of ER alpha nuclear export in breast cancer MCF-7 cells based on experimental evidence from our laboratory is shown. Estradiol-stimulated PI3K/Akt pathway leads to FKHR phosphorylation at Ser 256, thus triggering the associated export of FKHR/ER. Export of FKHR/ER removes the transcriptional repressor activity of FKHR and triggers DNA synthesis (Lombardi et al. 2008). This model is compatible with findings showing that methylation of ER alpha by PRMT1 tethers the receptor in cytoplasm of MCF-7 cells, where it recruits and activates Src, PI3-K and FAK (Le Romancer et al. 2008)

ER alpha has been also detected as monomer in caveolae rafts at cell surface of different cell types. It has been reported that ligand addition promotes receptor dimerization and recruitment of signaling molecules (*reviewed in* Hammes and Levin 2007). Recent data have clarified the molecular mechanism underlying the delivery of ER to caveolae. Accordingly, it has been proposed that the binding of ER alpha to the heat shock protein p27 (Hsp27) promotes receptor palmitoylation and increases the interaction of ER alpha with caveolin-1 at cell membranes. In this location, signaling activation is initiated. The same mechanism has been extended to AR and PR, which share a similar route in initiating signaling activation at plasma membranes in breast and prostate cancer cells (Razandi et al. 2010).

Only few studies have been conducted to analyze ER beta trafficking regulation. The finding that ER beta mediates rapid, non-genomic effects in different cell types (Migliaccio et al. 2000; Kousteni et al. 2001; Chambliss and Shaul 2002; Acconcia et al. 2005) raises the question as to the location of receptor mediating these responses. As proposed for ER alpha, a sub-population of ER beta can be detected within caveolae rafts of endothelial cells, where it mediates release of nitric oxide synthase upon estradiol stimulation (Chambliss and Shaul 2002). Subsequent studies showed that ER beta serves as a palmitoyl acyl transferase (PAT) substrate and that receptor palmitoylation is needed for ER beta localization at plasma membranes as well as for initiation of estradiol-induced rapid actions (Galluzzo et al. 2007). ER beta, however, has been prevalently detected in nuclei of target cells, where it

exhibits fast mobility and highly dynamic distribution in fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis (Damdimpoulos et al. 2008; Picard et al. 2008). Phosphorylation of specific MAPK serine residues (Ser 94 and Ser 124) within the ER beta activation function 1 (AF-1) domain induces clustering of the receptor in inactive nuclear compartment (Picard et al. 2008), again reinforcing the view that signaling pathways control the outcome of target cells by modulating sub-cellular ER localization.

In conclusion, it appears that a feedback loop between signaling activation and ER trafficking ensures biological response in the different compartments of target cells.

### Progesterone receptor localization and signaling activation

PR undergoes continuous nucleo-cytoplasmic shuttling (Guiochon-Mantel et al. 1989) and several putative NESs have been identified in both N-terminal and C-terminal regions of this receptor (Tyagi et al. 1998). However, because of the failure of microinjected NESs to displace PR nuclear export, it was inferred that the identified sequences cannot be considered functional NESs (Tyagi et al. 1998). Figure 2a shows that one of these putative PR-B NESs (PR 816–824 amino acid) exhibits high homology with the functional ER alpha NES. Further, LMB blocks nuclear export and proteasome-dependent degradation of PR in T47D cells (Qiu et al. 2003), thus indicating that CRM1 directly or indirectly mediates PR nuclear export.

Progestin stimulation of T47D cells rapidly activates the proto-oncogene tyrosine-protein kinase (Src)/MAPK pathway (Migliaccio et al. 1998; Boonyaratanakornkit et al. 2001; Ballaré et al. 2003; Vicent et al. 2006). Activation of this pathway controls cell cycle progression (Castoria et al. 1999) and leads to epigenetic modifications in T47D cells (Vicent et al. 2006). Again, progestins activate the PI3-K/Akt/nuclear factor-kappa B cascade to up-regulate cyclin D1 and cell proliferation in human breast cancer cells (Saitoh et al. 2005). Signaling pathway activation by progestins occurs outside of cell nuclei (Boonyaratanakornkit et al. 2007) and PR has been detected at cell membrane in some cell types (Zhu et al. 2003; Karteris et al. 2006). This localization has been attributed to the presence of palmitoylation site/membrane localization signal within the PR sequence (Pedram et al. 2007). As previously discussed, the binding of Hsp27 to PR seems to be required to direct PR to caveolae (Razandi et al. 2010). Again, a small subset of PR has been found associated to endothelial and breast cancer cell membranes, where ligand-bound PR interacts with the G-protein G $\alpha$ 13 to activate RhoA/Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) cascade and cell invasiveness mediated by moesin phosphorylation (Fu et al. 2008 a and b).



As occurs for ER alpha in MCF-7 cells, signaling activation modifies PR location. In breast cancer T47D cells, MAPKs play a dual role in PR sub-cellular trafficking. They enhance nuclear translocation of PR upon epidermal growth factor (EGF) stimulation and mediate PR nuclear export and its consequent degradation upon progestin stimulation of cells. This latter event negatively regulates PR transcriptional activity. Interestingly, both MAPK effects occur through PR Ser 294 phosphorylation. Thus, Ser 294 phosphorylation by MAPK modulates the nuclear import of unliganded PR and allows for LMB-dependent nuclear export of liganded PR (Qiu et al. 2003). Involvement of Ser 294 phosphorylation in PR nuclear export suggests that this phosphorylation either unmask a putative PR NES or facilitates the interaction of PR with proteins associated with the nuclear export process.

The observation that LMB blocks nuclear export of PR (Qiu et al. 2003) is in apparent contrast with previous findings reporting that PR nuclear release also occurs in the presence of LMB and does not depend on Ran-GTP. These findings suggested that CRM1 pathway is not involved in PR nuclear export (Tyagi et al. 1998). It should be noted, however, that the reported differences might be due to different experimental conditions.

Conflicting data have also been reported for nuclear export of GR, which appears to be sensitive (Savory et al. 1999) or insensitive (Liu and DeFranco 2000) to LMB depending on the cell system and experimental setting. These apparent discrepancies strongly suggest that the molecular mechanism regulating PR nuclear export needs to be reviewed using more advanced approaches, such as in vivo nuclear export assay (Henderson and Eleftheriou 2000), site-directed mutagenesis of putative NESs in full-length PR, and protein-protein interaction assay. Nonetheless, it should be considered that PR, as well as other SRs, may exit nuclei through multiple and complex mechanisms that allow the cells to respond appropriately to a wide range of external cues.

Another interesting example of the link between signaling activation, PR localization and biological outcome of cells has been provided by Vallejo and co-workers, showing that progestin stimulation of rat uterine stromal cells simultaneously induces transient activation of MAPKs and PR nuclear translocation along with the activated MAPKs. Such effects lead to proliferation of these cells (Vallejo et al. 2005). Since PR expressed in rat uterine stromal cells is devoid of transcriptional activity, the role of PR nuclear translocation remains to be clarified. Nuclear PR might direct MAPK action inside nuclei to cluster MAPKs in active nuclear compartment, thus driving expression of genes involved in progestin-induced cell cycle.

The existence of a feedback loop between PR and the MAPK axis has been strengthened by findings showing that

in addition to mediating rapid MAPK activation, progestin-bound PR-B induces the sustained activation of MAPKs in T47D breast cancer cells. This latter effect results from PR-mediated transcriptional up-regulation of the secreted wingless-related MMTV integration site 1 (Wnt1), which binds to the seven-transmembrane receptor Frizzled (Fz) and induces the matrix metalloprotease (MMP)-dependent cleavage of epidermal growth factor receptor (EGF-R) ligands. In this way, EGF-R is transactivated and sustained activation of the downstream Src and MAPK effectors follows (Faivre and Lange 2007 and Fig. 1).

In conclusion, it appears from these reports that location of PR acts as a sensor for MAPKs, which in turn play a regulatory role in PR import-export cycle and coupled functions.

### Androgen receptor localization and signaling activation

AR regulatory functions depend on the proper sub-cellular localization of its receptor. AR is also thought to associate with a heat shock protein 90 (Hsp90)-based chaperone complex in the cytoplasm (Prescott and Coetzee 2006) until the binding of cognate ligand induces a conformational change in AR, chaperone dissociation, and subsequent AR nuclear import (Tyagi et al. 2000; Marcelli et al. 2006). Once in the nucleus, AR binds specific androgen-response elements (AREs) and enhances or represses transcription of associated androgen-responsive genes. AR also undergoes nuclear export and this process was found to be insensitive to LMB (Tyagi et al. 2000). The DNA-binding domain (DBD) of AR is sufficient to direct nuclear export of a reporter protein, and point mutations in the DBD of full-length AR reduce AR nuclear export without affecting import (Black et al. 2001). Analysis of AR sequence subsequently identified a canonical and LMB-sensitive NES in the ligand-binding domain (LBD) of AR (Saporita et al. 2003). The mechanism of AR nuclear export, however, still remains elusive.

Multiple signal transduction pathways operate upstream of AR and modulate its functions and localization. It has been previously reported that p38 alpha kinase and Jun-N terminal kinase (JNK) both phosphorylate AR at Ser 650, thereby inducing nuclear export of AR and antagonizing AR-mediated transcription in LNCaP cells (Gioli et al. 2006). Thus, phosphorylation on Ser 650 by stress kinases may generate a signal for AR nuclear export or alternatively may relieve AR nuclear import. Since controversial data concerning the presence of a canonical NES within the AR sequence have been reported (Tyagi et al. 2000; Saporita et al. 2003), the possibility that phosphorylation on Ser 650 alters association of AR with proteins involved in nuclear export cannot be excluded. The DNA-dependent protein

kinase (DNA-PK), a member of the PI3-K family, also modulates AR nuclear export in LNCaP cells (Shank et al. 2008). These and previous findings support the conclusion that multiple pathways direct AR nuclear export.

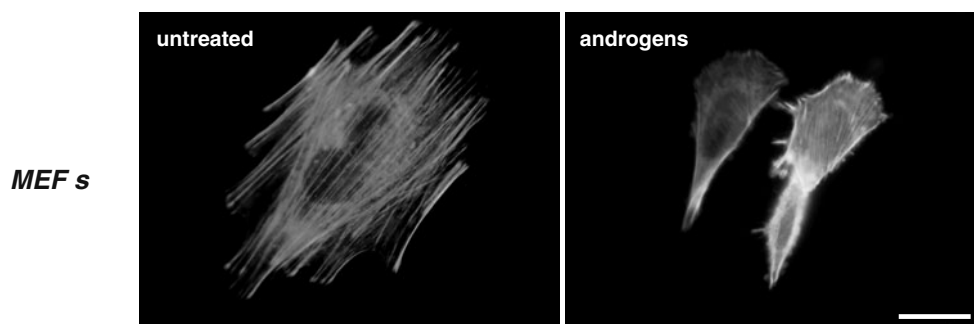
AR interacts with different scaffold proteins. It associates with caveolin 1 in low-density and caveolin-rich membrane fractions, and this association increases receptor-dependent transcriptional activity (Lu et al. 2001). Notably, immunohistochemical staining of patient specimens suggests that caveolin expression may be an independent predictor of prostate cancer progression.

The actin-binding protein, FlnA is a master player in signaling leading to cell migration. FlnA intersects AR action and has been implicated in AR trafficking. In LNCaP cells, AR nuclear translocation observed upon androgen stimulation is mediated by interaction of AR with a proteolytic product of FlnA (Ozanne et al. 2000). Impairment of androgen-induced AR nuclear translocation has been observed in FlnA-null cells and FlnA re-expression restores the normal trafficking of AR in these cells (Ozanne et al. 2000). Thus, it appears that FlnA retains AR in the cytoplasm of resting cells and that nuclear translocation of AR occurs along the calpain product of FlnA. Relevant to these findings is the recent observation that mouse embryo fibroblasts (MEFs) as well as NIH3T3 fibroblasts and human fibrosarcoma HT1080 cells harbor low levels of classical AR, which co-localizes with FlnA at intermediate filaments of cytoskeleton (Castoria et al. 2010). Confocal microscopy analysis and immunoprecipitation approaches reveal that stimulation of these cells with physiological androgen concentration increases AR/FlnA co-localization at intermediate filaments and triggers activation of signaling pathways depending on Rac and focal adhesion kinase (FAK). Activation of these effectors finally leads to cytoskeleton remodeling and cell migration (Castoria et al. 2010). Figure 5 shows cytoskeleton changes and lamellipodia formation induced within a few minutes of androgen treatment in MEFs.

These findings provide new clues that may explain the regulatory role of extra-nuclear AR/FlnA complex in androgen-induced cell motility. In sum, it appears that the AR/FlnA complex controls cell motility when assembled in cytoplasm, while it modifies AR-mediated transcriptional machinery in nuclei. In agreement with this hypothesis, a striking correlation between FlnA cytoplasmic localization and human androgen-independent metastatic prostate cancer has been reported (Bedolla et al. 2009). A major cause of FlnA cytoplasmic retention seems to be failure to be cleaved by calpain due to its failure to be phosphorylated by protein kinase A (PKA; Bedolla et al. 2009). These results offer new opportunities for a better understanding of invasiveness and androgen independence of prostate cancers. Further, they suggest that PKA inhibitors maybe used to restore FlnA nuclear localization in patients with metastatic prostate cancer.

In different cell types extra-nuclear AR mediates rapid activation of signaling effectors, such as Src, PI3-K and MAPK (reviewed in Migliaccio et al. 2010). Thus, the extra-nuclear location of AR dictates these rapid effects, which lead to cell cycle regulation, cell growth in mouse model of prostate cancer, survival and cytoskeleton changes (Peterziel et al. 1999; Migliaccio et al. 2000, 2007; Kousteni et al. 2001; Castoria et al. 2003). These findings support the conclusion that extra-nuclear AR-mediated signaling activation plays a central role in cultured cells as well as in vivo.

In prostate cancer-derived LNCaP cells treated with androgens, extra-nuclear AR leads to Src recruitment and activation. This event occurs through cross talk between AR and ER beta expressed in these cells (Migliaccio et al. 2000). The ternary complex follows direct interaction of a proline-rich motif of AR with the Src Homology 3 (SH3)-Src domain, and a phosphorylated tyrosine of ER beta, most likely the Tyr 443 residue, with the Src Homology 2 (SH2)-Src domain (Migliaccio et al. 2000). This complex strongly activates Src and its dependent network in prostate and breast cancer cells (Migliaccio et al. 2000). AR/ER beta/



**Fig. 5** Androgens trigger cytoskeleton changes in MEFs. Quiescent MEFs on coverslips were left unstimulated or stimulated with 10 nM R1881 for 20 min. F-actin was visualized using Texas Red-phalloidin as reported (Castoria et al. 2003). Images show that androgens induce a

modification in cell shape and the formation of fan-like protrusions and lamellipodia. They are representative of three independent experiments. *Bar*, 5  $\mu$ m.

Src ternary complex is also recruited to EGF-R in EGF-treated LNCaP cells, thus indicating that extra-nuclear steroid receptors transmit their signals even in the absence of steroids (Migliaccio et al. 2005). Notably, extra-nuclear AR partners, such as EGF-R and Src family kinases, are frequently deregulated in prostate cancers (*reviewed in* Fizazi et al. 2010) and increasing evidence from cultured cells and in vivo models points to the role of estradiol and ER in prostate cancerogenesis (*reviewed in* Risbridger et al. 2010). Clinical evidence has also shown that toremifene, a selective estrogen receptor modulator (SERM), exerts beneficial effects in prostate cancer treatment (Price et al. 2006).

Rapid action of androgens has also been linked to a membrane AR (mAR) that rapidly triggers Rac activation and cytoskeleton changes in LNCaP cells (Papakonstanti et al. 2003). These effects are insensitive to three different anti-androgens, suggesting that mAR is quite different from the classical AR expressed in LNCaP cells. It has also been reported that androgen stimulation of LNCaP cells activates Akt-1 and increases AR/Akt-1 interaction in lipid rafts (Cinar et al. 2007). These findings indicate that in cells which have lost the expression of phosphatase and tensin homolog (PTEN), such as LNCaP cells, androgen activation of Akt-dependent pathway requires AR location at lipid rafts, where the receptor recruits and activates kinases other than PI3-K, such as integrin-linked kinases or the raptor-mammalian target of rapamycin (mTOR) complex. Finally, these effectors activate Akt independently of PI3-K.

In summary, AR interacts with several signaling effectors or scaffolds or co-regulators that act in a variety of sub-cellular locations, bridging AR with the signaling machinery, modulating AR nuclear import–export, influencing DNA binding and gene transcription. Further investigation of these interactions may offer a way of assessing new molecules that might improve our knowledge of androgen biology in target tissues.

## Conclusions

Many events regulate sex steroid receptor localization and their derangement is involved in progression of human diseases, mainly proliferative disorders. Methylation of ER alpha by protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1), for instance, is required for MCF-7 cell cycle progression (Le Romancer et al. 2008). This correlates with localization of ER alpha in cytoplasm, where recruitment and activation of Src, PI3-K and FAK occur (Le Romancer et al. 2008). Notably, a subset of human breast cancer specimens displays high levels of cytoplasmic methylated ER alpha (Le Romancer et al. 2008). Expression of a shortened form of the metastatic tumor antigen 1 (MTA1s) traps ER in the cytoplasm and leads to malignant phenotypes by enhancing ER non-genomic functions in hormone-dependent breast

cancer cells (Kumar et al. 2002). Breast and prostate tumors develop resistance to endocrine-based therapeutic treatments as they progress. Remarkably, the majority of resistant breast cancers retain high levels of ER alpha or PR. In addition, AR is expressed throughout prostate cancer progression. In these resistant tumors, the rapid action of extra-nuclear steroid receptors could be activated by extremely low or sub-threshold hormonal concentrations or growth factors. Thus, cytoplasm/membrane localization of sex steroid receptors might impact breast and prostate cancer progression by controlling signal transduction-dependent functions (ie cell cycle progression, anchorage-dependent growth), and SRs recruited to cell membrane may inappropriately trigger gene transcription independently of receptor nuclear localization.

Studies in cultured cells and animals have revealed important details regarding SR non-genomic regulatory complexes and their functional role. It is now appreciated that SRs interact with a plethora of signaling molecules or scaffolds or co-regulators acting in a variety of sub-cellular locations. These proteins link sex steroid receptors with basic signaling or transcriptional machinery and modulate receptor nucleo-cytoplasmic shuttling. Much evidence has shown that signaling pathway activation regulates, albeit at different levels, ER, PR, AR and GR functions by controlling receptor localization in target cells. In this review we have described the main signaling effectors controlling location of SRs and their functions in target cells. Many of these regulatory mechanisms have been discovered to date. Advances in this field may provide new insights into receptor modulation of signaling-dependent cell proliferation, invasiveness and even hormone resistance in breast and prostate cancers. Lastly, the studies so far reported raise the possibility that small molecules affecting the import–export cycle of SRs maybe efficacious in the treatment of human breast and prostate cancers.

**Acknowledgements** This work was supported by grants from Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro.

M. Di Donato is an AIRC fellowship recipient.

We declare that we do not have competing financial interests.

## References

- Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M (2005) Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 16:231–237
- Accili D, Arden KC (2004) FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117:421–426
- Ballaré C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, Auricchio F, Beato M (2003) Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 23:1994–2008

- Bedolla RG, Wang Y, Asuncion A, Chamie K, Siddiqui S, Mudryj MM, Prihoda TJ, Siddiqui J, Chinnaiyan AM, Mehra R, de Vere White RW, Ghosh PM (2009) Nuclear versus cytoplasmic localization of filamin A in prostate cancer: immunohistochemical correlation with metastases. *Clin Cancer Res* 15:788–796
- Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM (2001) DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol* 11:1749–1758
- Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP (2001) Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* 8:269–280
- Boonyaratanakornkit V, McGowan E, Sherman L, Mancini MA, Cheskis BJ, Edwards DP (2007) The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol* 21:359–375
- Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, Auricchio F (1999) Non-transcriptional action of estrogen and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J* 18:2500–2510
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of estradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 20:6050–6059
- Castoria G, Lombardi M, Barone MV, Bilancio A, Di Domenico M, Bottero D, Vitale F, Migliaccio A, Auricchio F (2003) Androgen-stimulated DNA synthesis and cytoskeletal changes in fibroblasts by a nontranscriptional receptor action. *J Cell Biol* 161:547–556
- Castoria G, Migliaccio A, D'Amato L, Di Stasio R, Ciociola A, Lombardi M, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Auricchio F (2008) Integrating signals between cAMP and MAPK pathways in breast cancer. *Front Biosci* 13:1318–1327
- Castoria G, D'Amato L, Ciociola A, Giovannelli P, Giraldi T, Sepe L, Paoletta G, Maria Vittoria Barone MV, Migliaccio A, Auricchio F (2010) Androgen-induced cell migration: role of AR/filamin A association. *PloSOne*, (in press)
- Chambliss KL, Shaul PW (2002) Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 23:665–686
- Cinar B, Mukhopadhyay NK, Meng G, Freeman MR (2007) Phosphoinositide 3-kinase-independent non-genomic signals transit from the androgen receptor to Akt1 in membrane raft microdomains. *J Biol Chem* 282:29584–29593
- Damdipoulos AE, Spyrou G, Gustafsson JA (2008) Ligands differentially modify the nuclear mobility of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 149:339–345
- Dauvois S, White R, Parker MG (1993) The antiestrogen ICI 162780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 106:1377–1388
- Faivre EJ, Lange CA (2007) Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 27:466–480
- Fizazi K, Sternberg CN, Fitzpatrick JM, Watson RW, Tabesh M (2010) Role of targeted therapy in the treatment of advanced prostate cancer. *BJU Int* 105:748–767
- Fu XD, Giretti MS, Baldacci C, Garibaldi S, Flamini M, Sanchez AM, Gadducci A, Genazzani AR, Simoncini T (2008) Extranuclear signaling of progesterone receptor to breast cancer cell movement and invasion through the actin cytoskeleton. *PLoS ONE* 3:e2790
- Galluzzo P, Caiazza F, Moreno S, Marino M (2007) Role of ERbeta palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocr Relat Cancer* 14:153–167
- Gioeli D, Black BE, Gordon V, Spencer A, Kesler CT, Eblen ST, Paschal BM, Weber MJ (2006) Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Mol Endocrinol* 20:503–515
- Giretti MS, Fu XD, De Rosa G, Sarotto I, Baldacci C, Garibaldi S, Mannella P, Biglia N, Sisoni P, Genazzani AR, Simoncini T (2008) Extra-nuclear signalling of estrogen receptor to breast cancer cytoskeletal remodelling, migration and invasion. *PLoS ONE* 3:e2238
- Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Atger M, Perrot-Appanat M, Milgrom E (1989) Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* 57:1147–1154
- Hammes SR, Levin ER (2007) Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 28:726–741
- Henderson BR, Eleftheriou A (2000) A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp Cell Res* 256:213–224
- Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhouse EW, Randeve HS, Thomas P (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol Endocrinol* 20:1519–1534
- 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 (2001) Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104:719–730
- Kumar R, Wang RA, Mazumdar A, Talukder AH, Mandal M, Yang Z, Bagheri-Yarmand R, Sahin A, Hortobagyi G, Adam L, Barnes CJ, Vadlamudi RK (2002) A naturally occurring MTA1 variant sequesters oestrogen receptor-alpha in the cytoplasm. *Nature* 418:654–657
- Joliet A, Prochiantz A (2004) Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 6:189–196
- Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo L (2008) Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 31:212–221
- Liu J, DeFranco DB (2000) Protracted nuclear export of glucocorticoid receptor limits its turnover and does not require the exportin 1/CRM1-directed nuclear export pathway. *Mol Endocrinol* 14:40–51
- Lombardi M, Castoria G, Migliaccio A, Barone MV, Di Stasio R, Ciociola A, Bottero D, Yamaguchi H, Appella E, Auricchio F (2008) Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *J Cell Biol* 182:327–340
- Lu ML, Schneider MC, Zheng Y, Zhang X, Richie JP (2001) Caveolin-1 interacts with androgen receptor. A positive modulator of androgen receptor mediated transactivation. *J Cell Biol* 276:13442–13451
- Marcelli M, Stenoien DL, Szafran AT, Simeoni S, Agoulnik IU, Weigel NL, Moran T, Mikic I, Price JH, Mancini MA (2006) Quantifying effects of ligands on androgen receptor nuclear translocation, intranuclear dynamics, and solubility. *J Cell Biochem* 98:770–788
- Maruvada P, Baumann CT, Hager GL, Yen PM (2003) Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* 278:12425–12432
- McKenna NJ, O'Malley BW (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108:465–474
- Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F (1998) Activation



- of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 17:2008–2018
- Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F (2000) Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 19:5406–5417
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, Nanayakkara M, Lombardi M, de Falco A, Bilancio A, Varricchio L, Ciociola A, Auricchio F (2005) Steroid receptor regulation of EGF signaling through Src in breast and prostate cancer cells: steroid antagonist action. *Cancer Res* 65:10585–10593
- Migliaccio A, Varricchio L, De Falco A, Castoria G, Arra C, Yamaguchi H, Ciociola A, Lombardi M, Di Stasio R, Barbieri A, Baldi A, Barone MV, Appella E, Auricchio F (2007) Inhibition of the SH3 domain-mediated binding of Src to the androgen receptor and its effect on tumor growth. *Oncogene* 26:6619–6629
- Migliaccio A, Castoria G, Auricchio F (2010) Non genomic action of sex steroid hormones. In: Bunce CM, Campbell MJ (eds), *Nuclear Receptors, Proteins and Cell Regulation* vol 8, pp 365–379. doi:10.1007/978-90-481-3303-1\_15. Springer Science and Business Media BV
- Morelli C, Lanzino M, Garofalo C, Maris P, Brunelli E, Casaburi I, Catalano S, Bruno R, Sisci D, Andò S (2010) Akt2 inhibition enables the forkhead transcription factor FoxO3a to have a repressive role in estrogen receptor alpha transcriptional activity in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 30:857–870
- Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR (2000) Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol* 20:8969–8982
- Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robson CN (2000) Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the F-actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol* 14:1618–1626
- Papakonstanti EA, Kampa M, Castanas E, Stourmaras C (2003) A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Mol Endocrinol* 17:870–881
- Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER (2007) A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem* 282:22278–22288
- Pemberton LF, Paschal BM (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6:187–198
- Peterziel H, Mink S, Schonert A, Becker M, Klocker H, Cato AC (1999) Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 18:6322–6329
- Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, Tremblay A (2008) Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 22:317–330
- Prescott J, Coetzee GA (2006) Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Lett* 231:12–19
- Price D, Stein B, Sieber P, Tutrone R, Bailen J, Goluboff E, Burzón D, Bostwick D, Steiner M (2006) Toremifene for the prevention of prostate cancer in men with high grade prostatic intraepithelial neoplasia: results of a double-blind, placebo controlled, phase IIB clinical trial. *J Urol* 176:965–970
- Qiu M, Olsen A, Faivre E, Horwitz KB, Lange CA (2003) Mitogen-activated protein kinase regulates nuclear association of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 17:628–642
- Razandi M, Pedram A, Levin ER (2010) Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 30:3249–3261
- Risbridger GP, Davis ID, Birrell SN, Tilley WD (2010) Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nat Rev Cancer* 10:205–212
- Saitoh M, Ohmichi M, Takahashi K, Kawagoe J, Ohta T, Doshida M, Takahashi T, Igarashi H, Mori-Abe A, Du B, Tsutsumi S, Kurachi H (2005) Medroxyprogesterone acetate induces cell proliferation through up-regulation of cyclin D1 expression via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor-kappaB cascade in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146:4917–4925
- Saporita AJ, Zhang Q, Navai N, Dincer Z, Hahn J, Cai X, Wang Z (2003) Identification and characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor. *J Biol Chem* 278:41998–42005
- Savory JG, Hsu B, Laquian IR, Giffin W, Reich T, Haché RJ, Lefebvre YA (1999) Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 19:1025–1037
- Schuur ER, Loktev AV, Sharma M, Sun Z, Roth RA, Weigel RJ (2001) Ligand-dependent interaction of estrogen receptor-alpha with members of the forkhead transcription factor family. *J Biol Chem* 276:33554–33560
- Shank LC, Kelley JB, Gioeli D, Yang CS, Spencer A, Allison LA, Paschal BM (2008) Activation of the DNA-dependent protein kinase stimulates nuclear export of the androgen receptor in vitro. *J Biol Chem* 283:10568–80
- Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu XD, Baldacci C, Garibaldi S, Caruso A, Fornari L, Naftolin F, Genazzani AR (2006) Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol Endocrinol* 20:1756–1771
- Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ (2002) Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 16:116–127
- Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ (2004) 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 USA* 101:2076–2081
- Stenoien DL, Nye AC, Mancini MG, Patel K, Dutertre M, O'Malley BW, Smith CL, Belmont AS, Mancini MA (2001) Ligand-mediated assembly and real-time cellular dynamics of estrogen receptor alpha-coactivator complexes in living cells. *Mol Cell Biol* 21:4404–4412
- Tyagi RK, Amazit L, Lescop P, Milgrom E, Guiochon-Mantel A (1998) Mechanisms of progesterone receptor export from nuclei: role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and ran guanosine triphosphate. *Mol Endocrinol* 12:1684–1695
- Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, Song CS, Chatterjee B, Roy AK (2000) Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol Endocrinol* 14:1162–1174
- Vallejo G, Ballaré C, Barañao JL, Beato M, Saragüeta P (2005) Progesterin activation of nongenomic pathways via cross talk of progesterone receptor with estrogen receptor beta induces proliferation of endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 19:3023–3037
- Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP (2004) The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380:297–309
- Vicent GP, Ballaré C, Nacht AS, Clausell J, Subtil-Rodríguez A, Quiles I, Jordan A, Beato M (2006) Induction of progesterone target genes requires activation of Erk and Msk kinases and phosphorylation of histone H3. *Mol Cell* 24:367–381
- Vicent GP, Nacht AS, Zaurín R, Ballaré C, Clausell J, Beato M (2010) Role of kinases and chromatin remodeling in progesterone signaling to chromatin. *Mol Endocrinol*. doi:10.1210/me.2010-0027

- Zhang L, Johnson M, Le KH, Sato M, Ilagan R, Iyer M, Gambhir SS, Wu L, Carey M (2003) Interrogating androgen receptor function in recurrent prostate cancer. *Cancer Res* 63:4552–4560
- Zhao HH, Herrera RE, Coronado-Heinsohn E, Yang MC, Ludes-Meyers JH, Seybold-Tilson KJ, Nawaz Z, Yee D, Barr FG, Diab SG, Brown PH, Fuqua SA, Osborne CK (2001) Forkhead homologue in rhabdomyosarcoma functions as a bifunctional nuclear receptor-interacting protein with both coactivator and corepressor functions. *J Biol Chem* 276:27907–27912
- Zheng FF, Wu RC, Smith CL, O'Malley BW (2005) Rapid estrogen-induced phosphorylation of the SRC-3 coactivator occurs in an extranuclear complex containing estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 25:8273–8284
- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P (2003) Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2231–2236
- Zou Y, Tsai WB, Cheng CJ, Hsu C, Chung YM, Li PC, Lin SH, Hu MC (2008) Forkhead box transcription factor FOXO3a suppresses estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 10:R21