



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**“FEDERICO II”**

**FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI**

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E BIOLOGIA  
CELLULARE E MOLECOLARE**

**XX CICLO**

**Proteomica funzionale del recettore degli estrogeni  
in cellule umane di cancro alla mammella ormono  
responsive**

Candidato:

Dott.

**Gianluigi Franci**

Docente Guida:

Ch.mo Prof.

**Alessandro Weisz**

Relatore:

Ch.mo Prof.

**Giuseppe D'Alessio**

**XX CICLO**

**2004-2007**

## INDICE

	Riassunto	pag 1
	Summary	pag 2
1	<b>Introduzione</b>	pag 3
1.1	Gli estrogeni	pag 4
1.2	RE: struttura e domini funzionali	pag 5
1.2.1	RE $\alpha$ e RE: analogie e differenze	pag 6
1.3	Tandem Affinity Purification (TAP-System)	pag 6
1.4	Proteomica	pag 9
1.5	Scopo del lavoro	pag 12
2	<b>Materiali e Metodi</b>	pag 13
2.1	Vettori d'espressione	pag 13
2.2	Condizioni per le colture cellulari	pag 14
2.3	Trasfezioni transienti e stabili	pag 14
2.3.1	Trasfezioni transienti	pag 15
2.3.2	Trasfezioni stabili	pag 16
2.4	Estratti proteici nucleari	pag 16
2.5	SDS-PAGE	pag 17
2.6	Western Blot	pag 17
2.7	Colorazione con blue di comassie colloidale	pag 19
2.8	Elettroforesi Bidimensionale	pag 19
2.8.1	Preparazione e marcatura dei campioni	pag 19
2.8.2	Preparazione e processamento di campioni mediante elettroforesi bidimensionale	pag 20
2.8.3	Acquisizioni e analisi delle immagini	pag 22
2.9	Idrolisi in situ	pag 23
2.10	Spettrometria di massa MALDI	pag 24
2.11	Spettrometria di massa TANDEM	pag 25
2.12	Identificazioni di proteine incognite	pag 25
2.13	Immunoprecipitato della cromatina	pag 26
3	<b>Risultati</b>	pag 28
3.1	Costruzione di vettori di espressione dei recettori ricombinanti con la TAP TAG e relativa valutazione dell'espressione	pag 28
3.2	Saggi di attivazione trascrizionale mediata dai recettori ricombinanti	pag 30
3.3	Purificazione C-TAP RE $\alpha/\beta$	pag 32
3.4	Identificazione di <i>partners</i> dei RE in SDS-PAGE	pag 34
3.5	Elettroforesi bidimensionali dei RE $\alpha/\beta$ ed Identificazione delle proteine interagenti	pag 36
3.6	La beta actina nelle purificazioni	pag 38
3.7	Interazione della beta actina col promotore dei geni estrogeno regolati	pag 40
3.8	Convalida delle identificazioni ottenute per spettrometria di massa	pag 41
4	<b>Discussione</b>	pag 42
5	<b>Conclusioni</b>	pag 45
6	<b>Bibliografia</b>	pag 48

## Riassunto

Il carcinoma mammario (CM) rappresenta il più tipico esempio di neoplasia ormono-dipendente: lo sviluppo e l'accrescimento della massa tumorale sono stimolati dagli steroidi sessuali femminili, in quanto esercitano un'azione mitogena sulle cellule della ghiandola mammaria (1), in particolare dal 17 $\beta$ -estradiolo; questa assunzione è alla base della terapia e della prevenzione del CM con farmaci ad attività antiestrogenica. I due recettori steroidei, recettore degli estrogeni alpha e beta (RE $\alpha$ /RE $\beta$ ) attivati dal legame con l'ormone, formano omodimeri o eterodimeri e agiscono da fattori nucleari nell'attivare la trascrizione di geni E2-responsivi legandosi direttamente al DNA (azione genomica degli estrogeni). A questo classico meccanismo si aggiunge un altro ad azione "non genomica", in cui il complesso recettore-ligando non interagisce direttamente con il DNA ma con effettori di diverse vie di trasduzione del segnale inducendo rapide e transitorie risposte cellulari. Il lavoro di ricerca ha permesso l'identificazione di nuovi interattori molecolari endogeni dei RE $\alpha$ / $\beta$  in cloni cellulari ottenuti da linee cellulari di cancro della mammella umano ormono responsive MCF-7, isolate mediante la cromatografia per affinità TAP Tag. Sono stati generati cloni in MCF-7 che producono stabilmente i RE $\alpha$ / $\beta$  ricombinanti. E' stata valutata l'attivazione trascrizionale mediata dai recettori ricombinanti rispetto ai recettori endogeni mediante saggio di luciferasi. Le purificazioni sono state valutate ed analizzate mediante gel di poliacrilammide monodimensionale e bidimensionale. Sono state applicate tecniche di spettrometria di massa MALDI ed LC-MS\MS per identificare le proteine purificate.

## Summary

The breast cancer (BC) is the most typical example of hormone-dependent neoplasia: the development and increase of tumor are stimulated by feminine sexual steroids, that exercise a mitogenic action on mammary gland cells (1), in particular by  $17\beta$ -estradiol; on this fact is based BC therapy and prevention with antiestrogenic drugs.

Both steroid receptors, estrogen receptor alpha e beta ( $RE\alpha/Re\beta$ ) activated by hormone binding, form *omodimers or eterodimers* and function like nuclear factors activating E2-responsive genes transcription after binding DNA directly (genomic action of estrogens). But another mechanism of action has been described for steroid receptors, defined as “non genomic actions” because the ligand-receptor complex doesn't interacts with DNA but with effectors of different pathways of signal transduction, so inducing rapid and *transitory* cellular responses. We have identified new  $RE\alpha/\beta$  molecular endogenous interactors, in cellular clones obtained from human hormone responsive mammary cancer cell lines MCF-7, by the double TAP Tag tandem affinity purification.

MCF-7 stable clones that produce recombinant  $RE\alpha/\beta$  have been established.

The transcriptional activity of recombinant receptors compared with endogenous receptors has been valuated by Luciferase assay. The purifications have been estimated and analyzed by monodimensional and bidimensional polyacrylamide gels.

MALDI and LC-MS\MS mass spectrometry techniques have been applied to identify purified proteins.

# 1 INTRODUZIONE

Il carcinoma mammario (CM) rappresenta un esempio di neoplasia ormono-dipendente, che origina dai dotti galattofori (forma duttale) o dai piccoli dotti terminali (forma lobulare) della ghiandola mammaria. Lo sviluppo e l'accrescimento della massa tumorale sono stimolati dagli estrogeni (ormoni sessuali femminili), in particolare dal  $17\beta$ -estradiolo, che esercitano un'azione mitogena sulle cellule della ghiandola mammaria (1). L'azione carcinogenetica degli estrogeni è dovuta alla loro capacità di promuovere l'espansione di foci trasformati in individui esposti ad agenti mutageni di diversa natura o geneticamente predisposti a queste patologie (2). Tuttavia, i meccanismi mediante i quali gli estrogeni determinano la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule di CM non sono ancora del tutto chiari; ciò spiega le difficoltà ancora esistenti nella valutazione prognostica e nella gestione terapeutica delle donne affette da questa neoplasia. Gli effetti pleiotropici e tessuto-specifici degli estrogeni sono mediati da due diversi recettori nucleari,  $RE\alpha$  e  $RE\beta$ . Questi, attivati dal legame con l'ormone, formano omodimeri o eterodimeri ( $RE\alpha/RE\beta$ ) e agiscono da fattori trascrizionali nella regolazione dell'espressione di geni E2-responsivi, legandosi direttamente al DNA (azione genomica degli estrogeni). Oltre a questo classico meccanismo d'azione recettoriale è nota, in alcuni tipi cellulari, una via alternativa di trasduzione del segnale che prevede l'interazione a livello citoplasmatico del complesso recettore-ormone con effettori di diversi *pathway* di trasduzione (via "non genomica" d'azione degli estrogeni), in grado di indurre rapide e transitorie risposte cellulari. Recenti studi sostengono il coinvolgimento di un ipotetico RE di membrana, codificato dallo stesso gene, negli effetti a rapida risposta

degli estrogeni (3-4). L'obiettivo di questo studio è quello di mettere a punto un modello sperimentale per l'analisi molecolare del meccanismo degli estrogeni su cellule di CM ormono-responsive, in modo da ottenere nuove informazioni sull'ormono-dipendenza del CM, focalizzando l'attenzione sull'identificazione degli interattori dei RE e dei complessi proteici implicati nella trasduzione del segnale ormonale. Il modello sperimentale oggetto di questo studio si basa sull'utilizzo di vettori che esprimono i due sottotipi recettoriali fusi ad un epitopo proteico, *TAP-tag*, che permette di operare una purificazione delle proteine endogene che interagiscono in vivo con i RE $\alpha/\beta$  ricombinanti.

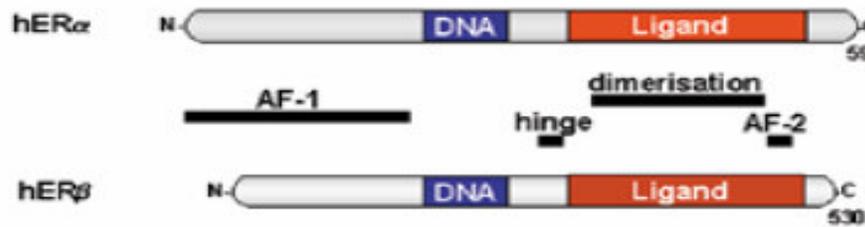
## 1.1 GLI ESTROGENI

Gli estrogeni (C18) appartengono alla famiglia degli ormoni steroidei, un vasto gruppo di ormoni lipofili derivati dal colesterolo (C27). In natura gli estrogeni sono rappresentati da 17 $\beta$ -estradiolo (E<sub>2</sub>), estrone (E<sub>1</sub>), estriolo (E<sub>3</sub>) e funzionano principalmente come ormoni sessuali femminili. Sono costituiti da un sistema ad anelli fusi (6-6-6-5), in cui l'anello fenolico è idrossilato in posizione C-3. L'ossidrilico in posizione C-17 dell'anello pentamerico conferisce l'attività estrogenica, presente in 17 $\beta$ -estradiolo, mentre la sua assenza, nell'estrone, determina una bassa attività ormonale di questo steroide, il cui ruolo nell'organismo probabilmente dipende dalla sua conversione in E<sub>2</sub>. Sia l'estrone che il 17 $\beta$ -estradiolo possono essere convertiti in estriolo; che presenta un ossidrilico anche a livello del C-16 da cui deriva un abbassamento dell'attività estrogenica rispetto a quella dell'estradiolo, ricoprendo un ruolo rilevante solo se presente ad alta concentrazione (gravidanza).

Nella donna gli estrogeni sono prodotti dalle ovaie, dalla placenta, dal corpo luteo durante la gravidanza e una piccola quota anche dal surrene e dal tessuto adiposo. Hanno un ruolo importante nel sistema nervoso centrale e nell'apparato scheletrico e cardiovascolare (5), motivo per cui le donne in età fertile sono protette da patologie come osteoporosi, infarto e morbo di Alzheimer (6). Gli estrogeni sono principalmente responsabili della comparsa di caratteri sessuali secondari femminili, regolano il ciclo mestruale e il decorso della gravidanza.

## **1.2      RECETTORI DEGLI ESTROGENI: STRUTTURA E DOMINI FUNZIONALI**

Gli estrogeni regolano processi biochimici e fisiologici tessuto-specifici principalmente attraverso il legame a specifici recettori, denominati recettori per gli estrogeni (RE). Questi presentano caratteristiche strutturali e funzionali simili. Sono stati identificati diversi domini con specifiche caratteristiche: un dominio N-terminale (*A/B domain*) altamente variabile sia nella sequenza che nella lunghezza contenente la regione AF1(activation Function-1), un dominio centrale (*DNA binding domain*, DBD o C) altamente conservato, un dominio cerniera (*D domain*) importante per la traslocazione nel nucleo dei RE, un dominio E, che lega l'ormone (*ligand-binding domain*, LBD) e un dominio F al C-terminale. Sono stati caratterizzati due sottotipi recettoriali: RE $\alpha$  e RE $\beta$  (Figura 1).



**Figura 1. Rappresentazione schematica di RE $\alpha$  e di RE $\beta$ .**

Il dominio A/B N-terminale contiene il sito AF-1 che lega i fattori di trascrizione, il dominio C (blu) contiene i due motivi *Zinc-finger* per il legame con il DNA; il dominio E/F (rosso) riconosce e lega il ligando e contiene il sito di dimerizzazione. La funzione AF-2, collocata nel dominio E, regola la trascrizione in modo ligando-dipendente (6).

### 1.2.1 RE $\alpha$ E RE $\beta$ : ANALOGIE E DIFFERENZE

RE $\beta$  presenta un'omologia con la isoforma meglio nota di RE, RE $\alpha$ , soprattutto nel dominio di legame al DNA (95.5% di identità) e nel dominio di legame all'ormone, comprendente l'AF-2 (59.7% di identità). Le regioni N-terminali, comprendenti l'AF-1 presentano invece un più basso livello di omologia (16.5% di identità). Le leggere differenze tra le regioni AF/1 dei due recettori sembrano essere la causa della diversa modalità di risposta ad antiestrogeni sintetici come tamoxifene, raloxifene ed ICI-164 e 384, da considerarsi parziali agonisti di RE $\alpha$ , ma antagonisti di RE $\beta$

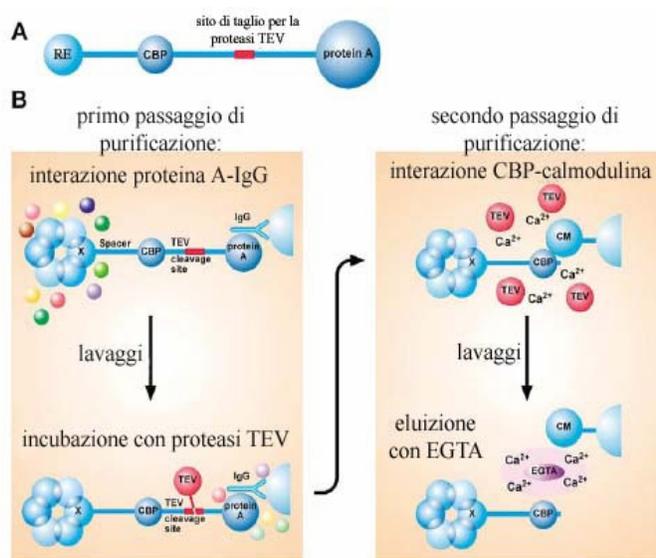
### 1.3 TANDEM AFFINITY PURIFICATION (TAP-SYSTEM)

La "Tandem Affinity Purification" consente di effettuare una rapida purificazione in condizioni native di complessi biologici anche se espressi a livelli fisiologici e pur non conoscendone funzione e composizione risultando un valido supporto per ampliare lo studio di tali complessi su scala proteomica (7). L'interesse dell'identificazione di interazioni proteina-proteina deriva dal

fatto che, il diverso livello di espressione genica non è sufficiente a spiegare la diversità cellulare. Infatti eventi di trascrizione alternative e modifiche post-traduzionali possono aumentare la complessità del proteoma, per cui ciascuna cellula è caratterizzata da un set proteico distinto in cui le proteine associandosi fra esse formano complessi, transienti o stabili, di diverse dimensioni e regolano la maggior parte delle attività cellulari. Le prime applicazioni sperimentali del sistema *TAP* hanno riguardato la purificazione di complessi proteici nel lievito *S.cerevisiae* (8), per poi essere trasferite anche in sistemi di mammiferi (9). Tale metodica prevede l'utilizzo della *TAP-tag* che conta 160 amminoacidi ed è costituita da due domini proteici, uno rappresentato dalla proteina A(*protA*) di *S.Aureus* e l'altro dalla proteina che lega la calmodulina (CBP), separati da un sito di taglio per la proteasi del virus del mosaico del tabacco (TEV) (Figura 2A). Al fine di utilizzare questo metodo di purificazione, il primo passaggio consiste nella fusione della *TAP-tag* alla proteina di interesse con successiva espressione della proteina ibrida di fusione così ottenuta nel tipo cellulare in esame. I complessi comprendenti la proteina di interesse ed i suoi interattori molecolari vengono estratti dalla cellula e purificati mediante cromatografia di affinità in due tappe che sfruttano le due componenti della tag (Figura 2B). Nel primo passaggio, l'estratto proteico cellulare è incubato con una matrice costituita da Agarosio/Sefarosio a cui sono state fissate delle IgG che riconoscono e legano la proteina A, immobilizzando così il complesso proteico. Dopo una serie di lavaggi effettuati per allontanare le proteine aspecifiche non legate alla resina, l'eluizione delle proteine bersaglio è realizzata utilizzando la proteasi TEV, che tagliando a monte della proteina A, che resta legata alle IgG, permette il distacco del recettore

ricombinante e delle proteine interagenti. La TEV è stata scelta perché la sequenza consenso da essa riconosciuta è presente solo in poche proteine umane; in questo modo si evita che l'enzima agisca su proteine che potrebbero essere importanti. Successivamente, i complessi eluiti sono incubati con una matrice di Sefarosio a cui sono state legate delle calmoduline che, in presenza di calcio, legano le CBP delle proteine ibride. Si effettuano dei lavaggi per eliminare la TEV ed altri contaminanti aspecifici. Il complesso proteico, così purificato, è infine eluito aggiungendo agenti chelanti il calcio che, interrompendo le interazioni tra le CBP e le calmoduline, permettono il rilascio del complesso. Il metodo TAP ha il vantaggio di consentire il recupero dei complessi multiproteici anche quando la loro concentrazione nei lisati cellulari è estremamente bassa, permettendo nel contempo un'efficiente purificazione in condizioni native. I complessi purificati vengono analizzati per SDS-PAGE monodimensionale e le bande/spot rivelate in seguito a colorazione con coloranti classici quali Blue di Comassie colloidale o innovativi come quelli fluorescenti, vengono tagliate dal gel e digerite con tripsina. I peptidi recuperati possono essere analizzati mediante *ionizzazione per desorbimento con laser assistita da matrici* (MALDI), che permette di misurare la massa delle molecole.(9-10). Un approccio alternativo è la “*Tandem Mass Spectrometry*”(MS/MS) in cui i peptidi, dopo essere stati misurati mediante spettrometria di massa, sono soggetti ad un'ulteriore frammentazione usando un gas inerte, ottenendo un set di peptidi che differiscono in massa per un solo amminoacido; in questo modo il neo-pattern di frammentazione è più specifico per una data proteina. Nel sistema LC-MS/MS viene unita anche la separazione mediante cromatografia capillare. Gli stessi effetti cellula-specifici degli

estrogeni non sono attribuibili solo al diverso livello di espressione dei RE ma anche ai loro *partners* funzionali, come coregolatori trascrizionali, molecole adattatrici e altre molecole intracellulari che interagiscono fisicamente con i RE determinando la formazione di complessi multiproteici. Le proteine interagenti con i RE ne influenzano funzionalità ossia l'attivazione e la repressione della trascrizione, il controllo del ciclo cellulare e l'interazione con vari *pathways* intracellulari. La metodica precedentemente descritta è stata applicata allo scopo di identificare e isolare complessi formati sia da RE $\alpha$  che da RE $\beta$ .



**Figura 2. Rappresentazione schematica del metodo Tandem Affinity Purification (TAP). A) Struttura della TAP-tag con la Proteina A, la Calmodulin Binding Protein (CBP) e il sito di taglio per la proteasi TEV. B) Schema della procedura di purificazione (9).**

## 1.4 PROTEOMICA

La proteomica costituisce un approccio sperimentale mirato all'identificazione e caratterizzazione su larga scala di molecole proteiche codificate da un genoma (Proteoma). Formate da unità, dette amminoacidi, le proteine sono caratterizzate da una struttura tridimensionale che determina la funzione della

proteina stessa. In altre parole, l'innovazione della proteomica è volta a caratterizzare il complemento tempo- e cellulo- specifico del genoma, piuttosto che quello del singolo componente. Da questa assunzione ne deriva che le principali applicazioni della proteomica riguardino soprattutto l'identificazione di tutte le proteine presenti in un campione con la conseguente definizione del profilo d'espressione proteico in seguito a stimoli farmacologici, chimici e fisici, l'analisi delle modifiche posttraduzionali e non da ultimo la comprensione delle interazioni proteina-proteina, cioè la conoscenza dei legami che esse modulano in un sistema vivente; ne sono un esempio le vie di trasduzione del segnale. A tale proposito risulta evidente il vantaggio dell'approccio proteomico rispetto al doppio ibrido, giacché si possono evidenziare, in questo modo, le relazioni multiple che le proteine stabiliscono e quindi costruire, più efficacemente e rapidamente, la mappa dell'interazioni. Questa metodologia applicata allo studio dei RE permetterà di comprendere origine e progressione del CM ormono-responsivo e soprattutto l'identificazione di bersagli terapeutici. All'analisi proteomica si associa l'elettroforesi bidimensionale, una tecnica separativa ortogonale che risolve le proteine in virtù di due principi fisico-chimici. I polipeptidi in esame vengono separati prima sulla base della loro carica netta mediante isoelettrofocalizzazione (IEF), e poi in base al loro peso molecolare mediante elettroforesi con l'ausilio di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE). L'IEF è eseguita lungo un gel di poliacrilammide in gradiente di pH, generato negli approcci tradizionali attraverso l'introduzione nel gel di speciali composti anfoterici chiamati anfolti. Nella prima dimensione, quindi, ciascun insieme proteico, definito dalla stessa carica netta, si accumula (o "focalizza") in una

banda distinta in corrispondenza del proprio punto isoelettrico, definito come il valore di pH al quale la specie molecolare ha carica netta nulla. Attraverso l'elettroforesi mediante SDS-PAGE, che rappresenta la seconda dimensione, le proteine focalizzate sono separate in funzione del peso molecolare. Mediante diversi sistemi di colorazione, il gel bidimensionale così ottenuto viene visualizzato come una complessa mappa proteomica costituita da migliaia di *spots* ciascuno dei quali corrisponde, con elevata probabilità, ad una singola specie proteica del campione. E' possibile determinare, per ogni proteina risolta, i valori di punto isoelettrico e di peso molecolare, nonché la quantità relativa in base alle coordinate e dall'intensità dello banda corrispondente. Per superare le difficoltà di riproducibilità intrinseche alla tecnica è stata sviluppata una nuova tecnologia, nota come elettroforesi su gel bidimensionale differenziale (2-D DIGE), nella quale i campioni vengono prima marcati con molecole fluorescenti che differiscono negli spettri di eccitazione e di emissione, poi uniti in una miscela, e quindi risolti su un singolo gel bidimensionale. Grazie alla co-migrazione dei campioni vengono ridotte le variazioni metodologiche nella posizione e nella abbondanza degli *spots*, e di conseguenza aumentate la riproducibilità e l'affidabilità dell'analisi. I marcatori impiegati nella DIGE sono molecole fluorescenti di cianina (CyDyes) strutturalmente simili, aventi un gruppo esterico reattivo che viene scambiato per sostituzione nucleofila con il gruppo amminico  $\alpha$  dei residui di lisina nelle proteine, producendo la formazione di un'ammide. I marcatori vengono aggiunti ai campioni proteici in quantità limitanti, così che ogni proteina sia marcata al massimo con una singola molecola di CyDye e venga visualizzata come singola macchia ("marcatura minima"). Le proteine così

separate possono essere identificate mediante spettrometria di massa. Con tali metodologie è possibile ottenere grazie alle caratteristiche di accuratezza, sensibilità e versatilità la misura accurata del peso molecolare del campione in esame. Le più comuni tecniche di spettrometria di massa sono: MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) che permette di analizzare miscele peptidiche mescolate con un eccesso di una opportuna matrice e di ottenere l'identificazione proteica mediante l'uso di banche dati; dove invece questo non fosse sufficiente si può utilizzare LC-MS/MS (liquid chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry) che genera degli spettri di massa utilizzabili come "de novo sequencing", ovvero si riesce a risalire alla sequenza amminoacidica dei peptidi presenti nella analizzatore.

## **1.5 SCOPO DEL LAVORO**

Gli esperimenti presentati in questo elaborato sono stati rivolti all'identificazione di interattori di RE mediante il miglioramento e la messa a punto della metodica Tandem Affinity Purification, al fine di isolare i complessi proteici (recettore degli estrogeni con gli effettivi *partners* molecolari) in condizioni native e purificarne i singoli componenti.

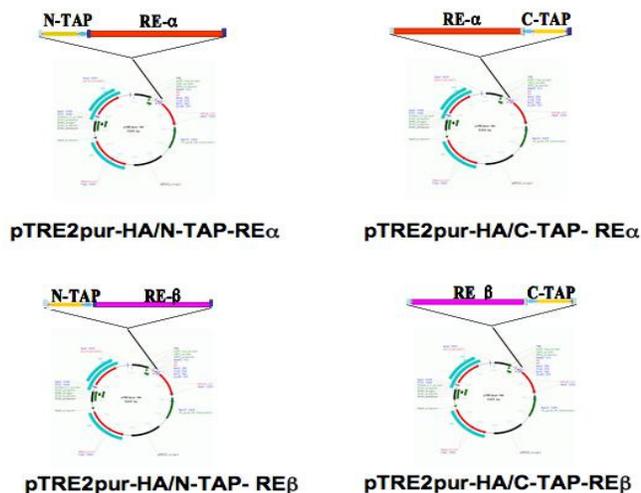
Nel corso del lavoro, è stata analizzata l'espressione dei recettori ricombinanti RE ottenuti clonando la *tap-tag* in C-terminale, paragonandola in diverse linee cellulari. Obiettivo principale della ricerca del laboratorio, è stato dunque quello di identificare *partners* molecolari endogeni dei recettori degli estrogeni ed ampliare le conoscenze relative al meccanismo di trasduzione del segnale ormonale.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 VETTORI DI ESPRESSIONE

Mediante procedure di clonaggio, la *TAP-tag* è stata inserita sia in N che in C-terminale nella corretta cornice di lettura con la regione codificante RE $\alpha$ / $\beta$ , sfruttando la presenza di opportuni siti unici di restrizione a monte e a valle della regione da clonare.

I frammenti di DNA N-TAP-RE $\alpha$ , C-TAP-RE $\alpha$ , C-TAP-RE $\beta$ , N-TAP-RE $\beta$  sono stati tagliati rispettivamente dai vettori pUSE-N-TAP-RE $\alpha$ , pUSE-C-TAP-RE $\alpha$ , pUSE-C-TAP-RE $\beta$ , pUSE-N-TAP-RE $\beta$ , estratti mediante purificazione da gel d'agarosio (kit Quiagen) e clonati nel vettore inducibile da tetraciclina pTRE2pur-HA (Gavin Ac. et al., 2002) Per il clonaggio del frammento N-TAP-RE $\alpha$  sono stati usati gli enzimi NheI e NotI; per i frammenti C-TAP-RE $\alpha$  e C-TAP-RE $\beta$  sono stati usati gli enzimi EcoV e BamHI.



**Figura 3. Costrutti per l'espressione delle proteine di fusione.** La *TAP-tag* è stata clonata sia all'estremità N-terminale che a quella C-terminale del recettore RE $\alpha$ , e del recettore RE $\beta$  nel vettore pTRE2pur-HA. Il

frammento di DNA inserito è sotto il controllo del promotore inducibile da tetraciclina. (11).

## **2.2 CONDIZIONI PER LE COLTURE CELLULARI**

Gli esperimenti sono stati condotti in cellule di CM MCF-7 *Tet-off*, linea cellulare in cui l'espressione genica è inibita in presenza di tetraciclina. Queste cellule sono state mantenute in mezzo di coltura DMEM contenente rosso fenolo (Sigma, UK), complementato con L-Glutammina (2mM), con siero fetale bovino (FBS) al 10% (Hyclone), penicillina (100U/ml), streptomicina (100mg/ml), amfotericina B (250mg/ml), (Sigma, UK). Le cellule sono state tenute in incubazione a 37°C ad una concentrazione fissa di CO<sub>2</sub> (5%), ed il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni.

Per il trattamento con il 17β-estradiolo, le cellule sono state piastrate in mezzo DMEM (Sigma, UK), privo di rosso fenolo (che ha azione estrogeno-simile), addizionato con DCC-FBS al 5%, ossia siero pretrattato con carboni attivi ricoperti da molecole di destrano (DCC: dextran-coated charcoal) allo scopo di rimuovere gli steroidi in esso contenuti. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni giorno.

La tetraciclina, è stata aggiunta alle cellule MCF-7-Tet-Off alla concentrazione di 1µg/ml; il sistema è detto *Tet-off*, perché l'espressione dei RE è inibita dalla presenza della tetraciclina. Queste cellule infatti, esprimono un attivatore (tTA) capace di legare una sequenza regolatrice (TRE) del p-TRE 2-PUR-HA, inducendo l'espressione genica. Se però viene aggiunta tetraciclina, questa si lega all'attivatore allontanandolo dal TRE; la trascrizione viene così inibita.

## **2.3 TRASFEZIONI TRANSIENTI E STABILI**

Per trasfezione si intende il trasferimento, mediante vari metodi (elettroporazione, precipitazione  $\text{CaPO}_4$ , reagenti lipidici cationici, infezione virale e microiniezione nei processi di transgenesi), di sequenze di DNA esogene all'interno di vettori plasmidici trasferiti poi in cellule eucariotiche in coltura, in un uovo fecondato o in embrione al fine di ottenere un'espressione molto elevata di un gene endogeno, modificare le proprietà della cellula, studiare l'espressione e funzione di un gene o di sequenze regolative.

Le trasfezioni possono essere sia transienti che stabili: in una trasfezione transiente il DNA viene espresso prevalentemente nelle prime 48 ore e perso nelle successive divisioni cellulari, invece in quella stabile il DNA si integra stabilmente nel genoma per ricombinazione omologa o non omologa e viene espresso dalle cellule ospiti ad una quindicina di giorni dalla avvenuta trasfezione.

### **2.3.1 TRASFEZIONI TRANSIENTI**

Il DNA è stato trasfettato mediante liposomi, micelle di fosfolipidi che lo legano, lo inglobano e lo veicolano all'interno della cellula.

Cellule MDA-MB-231 sono state trasfettate con i vettori N-TAP-RE $\alpha$ , C-TAP-RE $\alpha$ , N-TAP-RE $\beta$  e C-TAP-RE $\beta$  e i recettori nativi pSG5-HEG0 per RE $\alpha$  e pSG5-Re $\beta$ . Sono state utilizzate piastre per colture cellulari da 60 mm ( $4 \times 10^5$  cellule/piastra). Ai liposomi (LIPOFECTAMINA2000, Invitrogen), posti in appositi tubi di polistirene, sono stati addizionati 500  $\mu\text{l}$  di OPTIMEM (Gibco), mezzo di coltura arricchito ma senza siero; infine a tale miscela è stato aggiunto il DNA da trasfettare (3,5  $\mu\text{g}$ ) ed il tutto fatto incubare per 30 minuti. Conclusa l'incubazione la miscela è stata aggiunta alle cellule in coltura in mezzo OPTIMEM.

Dopo 6 ore di incubazione è stato aspirato il mezzo di trasfezione e aggiunto DMEM supplementato con siero al 10%. A 48 ore è stata valutata l'espressione delle proteine di fusione mediante immunoblotting.

### **2.3.2 TRASFEZIONI STABILI**

Cellule MCF-7 sono state trasfettate con i seguenti plasmidi: pTRE2pur-HA-N-TAP-RE $\alpha$ , pTRE2pur-HA-C-TAP-RE $\alpha$ , pTRE2pur-HA-N-TAP-RE $\beta$  e pTRE2pur-HA-C-TAP-RE $\beta$ . Sono state utilizzate piastre per culture cellulari da 60mm ( $10^6$  cellule/piastra) e la trasfezione è stata fatta mediante liposomi. Le cellule dopo essere state mantenute per 24 ore in mezzo DMEM supplementato con siero al 10%, sono state divise ed incubate con antibiotici di selezione (puromicina e geneticina) alla concentrazione di 200  $\mu$ g/ml per 21 giorni dal momento che il plasmide pTRE2pur-HA è caratterizzato dall'aver resistenza a tali antibiotici. Ciò ha permesso la selezione dei cloni cellulari che sono stati recuperati ed espansi; l'espressione dei RE ricombinanti è stata valutata per immunoblotting.

### **2.4 ESTRATTI PROTEICI NUCLEARI**

L'estrazione frazionata delle proteine nucleari e citosoliche è stata effettuata secondo il protocollo Dignam (13).

Le cellule sono state mantenute per 4 giorni in mezzo privo di steroidi e indotte con  $17\beta$ -estradiolo  $10^{-8}$ M per 30 min.

Dopo aver allontanato il mezzo di coltura, le cellule sono state lavate con PBS più 0,1% EDTA a freddo, raccolte e centrifugate in microcentrifuga a 3000 rpm per 5 min a 4°C per poi risospendere le cellule in un tampone ipotonico pari a 3 volte il volume dello stesso (20mM HEPES pH 7,5, 5mM NaF, 10  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM Phenilmetil sulfonil fluoride

(PMSF), 10 mM Na-Molibdato, 1X inibitori di proteasi) (HB), che provocando osmosi nella cellula, ne facilita la rottura della membrana plasmatica. E' stato aggiunto 0,5% Triton X 100 dopo di che l'omogenato è stato centrifugato a 4°C dell'per 30 sec alla massima velocità così da ottenere un residuo nucleare che è stato poi lavato in 1 ml di tampone HB 1X e risospeso in un volume di tampone di lisi nucleare (NLB) ad elevata concentrazione salina (20 mM Hepes pH 7.9, 25% glicerolo, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM DTT, inibitori di proteasi) pari a quello del residuo. Infine i nuclei sono incubati a 4°C per 30 min in agitazione.

In seguito a centrifugazione per 15 min alla massima velocità, l'estratto proteico nucleare è stato recuperato e quantizzato mediante saggio colorimetrico (Biorad, Italia) e curva standard con BSA per controllare la taratura dello strumento.

Gli estratti proteici sono stati diluiti 1:1 in LemmlyBuffer 2X [8,7% β-mercaptoetanol, 52,17% sodio dodecil solfato (SDS), 0,217M TrisHCl pH 8, 0,026% blu di bromofenolo, 17,4% glicerolo] e bolliti per circa 5 min per favorirne la denaturazione.

## **2.5 ELETTRIFORMESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN SDS (SDS-PAGE)**

Il campione corrispondente ad un purificato da estratti proteici nucleari è stato caricato su gel di poliacrilammide (10x7 cm) al 10%, in tampone di corsa contenente 0,3% Tris, 14,4 mg/ml glicina, 0,1% SDS. Il peso molecolare (PM) della proteina di interesse è determinato confrontando la sua mobilità con quella di marcatori proteici di peso molecolare noto. I campioni sono stati

sottoposti ad elettroforesi con un amperaggio costante di 50 mA fino al raggiungimento della separazione desiderata.

## 2.6 WESTERN BLOT

L'immunoblotting è una tecnica analitica e semiquantitativa che identifica le proteine separate su SDS-PAGE in base al loro peso molecolare mediante il trasferimento su di un filtro di nitrocellulosa e successiva detezione con anticorpi specifici.

Dopo l'elettroforesi, infatti, le proteine sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa (Schleicher e Schuell, Germania) in una soluzione tampone di trasferimento (TRIS 3.03g/L, Glicina 14.4g/L e SDS 1g/L) e metanolo 3mg/ml.

Il foglio di nitrocellulosa poggia su una spugnetta imbevuta di tampone e tre fogli di carta 3MM; il gel è posto sulla nitrocellulosa, su cui si dispongono altri tre fogli di carta e spugnetta; il complesso è racchiuso tra due piastre di plastica perforata posto tra due elettrodi. Il trasferimento è condotto applicando una differenza di potenziale di 100 V per un'ora a freddo.

I filtri vengono colorati con Rosso *Ponceau* come verifica del trasferimento e della quantità dei diversi estratti. Successivamente i filtri sono lavati per allontanare sia residui di metanolo che di colorante e poi bloccati in una soluzione in latte al 5% in TBS-T (1,36 M NaCl, 0,26 mM KCl, 0,25 M Tris con Tween 20 allo 0,5%) per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione. Seguono 3 lavaggi per 10 min ciascuno con soluzione TBS-T. I filtri sono stati incubati con l'anticorpo primario opportunamente diluito in soluzione TBS-T con 0,1% di sodioazide a temperatura ambiente per 2 ore o per tutta la notte, a 4°C. Gli anticorpi primari usati sono Anti-RE $\alpha$  HC-20 (Santa Cruz) 1:3000,

anti-TAP (CAB1001) 1:1000 in 1% latte, anti beta actina 1:2000 (Sigma) tutti diluiti in TBS-T.

Si ripete lo stesso schema di lavaggio *post-blocking* e si prosegue con l'incubazione con anticorpi secondari opportuni per 45 min a temperatura ambiente, diluiti 1:20000 in latte al 3% TBS-T. Gli anticorpi secondari sono coniugati con l'enzima perossidasi di rapano la cui rivelazione si ha applicando il metodo della chemiluminiscenza intensificata (ECL Amersham Italia). In presenza di perossido di idrogeno l'enzima ossida il luminolo, il substrato chemiluminescente, con la concomitante produzione di luce. La luce emessa è rilevata esponendo la membrana ad una lastra autoradiografica.

## **2.7 COLORAZIONE CON BLUE DI COMASSIE COLLOIDALE**

I *gels* processati mediante SDS-PAGE sono stati fissati con una soluzione 40% metanolo, 7% acido acetico, 53% acqua HPLC, in agitazione a temperatura ambiente per 12 ore. Dopodiché sono stati incubati con la soluzione di colorazione Brilliant Blue Comassie Colloidale della Sigma per circa 5 ore, infine il colorante in eccesso viene allontanato con una soluzione al 40 % metanolo a temperatura ambiente per tutta la notte.

## **2.8 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE**

### **2.8.1 PREPARAZIONE E MARCATURA DEI CAMPIONI**

I campioni vengono precipitati aggiungendo 3 volumi di soluzione precipitante (per rendere le proteine insolubili) e 3 volumi di soluzione co-precipitante (per facilitare la separazione delle proteine dalla soluzione) per ogni volume di campione, e centrifugati a 8000 xg per 10 min. Si aggiunge a ciascun

sedimento altro co-precipitante (3-4 volte il volume del sedimento) e si centrifuga di nuovo per altri 5 min.

Per rimuovere contaminanti non proteici dal precipitato si aggiungono, dopo aver agitato con H<sub>2</sub>O distillata (in quantità sufficiente a coprire il precipitato), 1 ml di tampone di lavaggio e si agita fino a che il sedimento non sia completamente disperso. Si incubano i campioni a -20° C per almeno 30 min, agitando vorticosamente per 20-30 sec ogni 10 min, e quindi si centrifugano a 8000 xg per 10 min. Dopo aver allontanato il sovrnatante e lasciato ad asciugare brevemente all'aria il sedimento, si risospende quest'ultimo in un volume di tampone di lisi (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 % w/v, TRIS 30 mM, pH 8.5) pari a 1/20 rispetto a quello iniziale, e si agita fino alla completa dissoluzione. Per rimuovere tutto il materiale insolubile, si centrifuga ulteriormente a 8000 xg per 10 min e si recupera il sovrnatante.

Per marcare 50 µg di proteina sono necessarie 400 pmol di CyDye (Amersham Biosciences), per cui la soluzione stock del fluoroforo, concentrata 1 nmol/µl in dimetilformammide (DMF), viene diluita a 400 pmol/µl (2 µl di soluzione colorante di partenza: 3 µl di DMF), e 1 µl viene aggiunto a 10 µl di ciascun campione. Dopo aver centrifugato brevemente, si lascia in ghiaccio al buio e, dopo 30 min, si blocca la reazione aggiungendo lisina alla concentrazione finale di 1 mM, e incubando in ghiaccio al buio per altri 10 min. Dopo la marcatura, in ciascun tubo vengono miscelati tre campioni differenzialmente marcati, uno dei quali è lo standard interno, costituito da un insieme di tutti i campioni, marcato con Cy2, e le proteine vengono diluite aggiungendo a ciascuna miscela un uguale volume (36 µl) di una soluzione contenente urea 7

M, tiourea 2 M, CHAPS 4 % w/v, DTT 2 % w/v, IPG buffer pH 3-10 NL 2 % v/v, DeStreak Reagent 2.8 % v/v.

### **2.8.2 PREPARAZIONE E PROCESSAMENTO DEI CAMPIONI MEDIANTE ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE**

L'isoelettrofocalizzazione (IEF) è stata eseguita su strisce anidre di 24 cm, contenenti un gradiente di pH da 3 a 10 non lineare immobilizzato lungo un gel omogeneo di poliacrilamide su un supporto di plastica (Immobiline DryStrip, Amersham Biosciences) ed è stato utilizzato il sistema elettroforetico orizzontale Ettan IPGphor II (Amersham Biosciences).

Le strisce vengono reidratate in presenza del campione proteico, per cui ciascuna miscela viene diluita con il tampone di idratazione (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 % w/v, DTT 2 % w/v, IPG buffer pH 3-10 NL 1 % v/v, DeStreak reagent 1.4 % v/v, blu di bromofenolo in tracce) fino al volume richiesto per una singola striscia, uguale a 450  $\mu$ l. Si lascia idratare per almeno 16 ore a temperatura ambiente in uno specifico vassoio (Immobiline DryStrip Reswelling Tray), ricoprendo le strisce con olio di paraffina per prevenire l'evaporazione della soluzione e la cristallizzazione dell'urea.

Le condizioni di IEF sono impostate ad una temperatura di 20 °C e a una corrente massima per strisce di 50  $\mu$ A, secondo il protocollo.

	<i>Step/Grad</i>	<i>Voltaggio (V)</i>	<i>tempo (h)</i>
<i>Step 1</i>	Step	300	3
<i>Step 2</i>	Grad	600	3
<i>Step 3</i>	Grad	1000	3
<i>Step 4</i>	Grad	8000	3
<i>Step 5</i>	Step	8000	10
<i>Step 6</i>	Step	500	3

per un totale di circa 100 kVhrs, usando il software di controllo IPGphor II, attraverso il quale viene anche monitorata la corsa seguendo la costruzione simultanea del grafico del voltaggio, della corrente e dei Volt-ore in funzione del tempo. Prima di eseguire la separazione per SDS-PAGE, le strisce focalizzate vengono equilibrate con tampone A (Tris pH 8.0 100 mM, urea 6 M, glicerolo 30 % v/v, SDS 2% w/v, blu di bromofenolo in tracce, DTT 0,5 % w/v) per 10 min, e quindi con tampone di B (Tris pH 8.0 100 mM, urea 6 M, glicerolo 30 % v/v, SDS 2% w/v, blu di bromofenolo in tracce, iodoacetammide 4,5 % w/v) per altri 10 min. Ciascuna striscia viene poi applicata all'estremità superiore di un gel al 12% di poliacrilammide (acrilammide 12 % v/v, bis-acrilammide 0,32 % v/v, Tris 1,5 M pH 8.8 25 % v/v, SDS 0,1 % w/v, APS 0,1 % w/v, TEMED 0,01 % v/v), preparato tra due lastre a bassa fluorescenza, e fissata con agarosio allo 0.5%. L'SDS PAGE viene eseguita usando l'apparato verticale Ettan Daltsix (Amersham Biosciences), in TGS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % W7v), alla potenza costante di 1 W per gel e mantenendo la temperatura a 20 °C. La corsa viene interrotta quando il fronte di migrazione indicato dal blu di bromo fenolo ha raggiunto il fondo dei gel, cioè dopo circa 16 ore dall'avvio.

### **2.8.3 ACQUISIZIONE E ANALISI DELLE IMMAGINI**

I gel marcati per fluorescenza sono stati acquisiti allo scanner Typhoon 9400 (Amersham Biosciences), impostando le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione specifiche per ciascuno dei tre traccianti, ad una risoluzione di 100  $\mu$ m. Da ciascuna immagine è stata ritagliata l'area di interesse attraverso il software ImageQuant V 5.0 (Amersham Biosciences), e quindi è stata eseguita l'analisi usando il pacchetto DeCyder Differential Analysis Software V 5.0

(Amersham Biosciences), specificamente creato per il sistema DIGE. Il modulo DIA (Differential In-gel Analysis) di questa piattaforma informatica, operando sulle immagini che derivano da un singolo gel, permette un primo livello di analisi, che consiste nel rilevamento e nella quantizzazione automatici delle macchie proteici. Le tre immagini, che corrispondono ai due campioni e allo standard co-migrati nello stesso gel, sono unite a formare un'unica immagine comprendente tutte le macchie, in modo da garantire una corrispondenza univoca, tra di esse, di ciascuno spot rilevato. Le macchie vengono definiti da alcuni parametri numerici (volume, area, altezza del picco, pendenza), calcolati automaticamente, e sulla base dei quali sono costruite rappresentazioni tridimensionali degli macchie.

## **2.9 IDROLISI IN SITU**

Le bande d'interesse sono state scisse ed è stato prelevato un segmento di gel in una regione non contenente proteine, con lo scopo di ottenere uno spettro dei segnali di sottofondo, questa è stata trattata come tutte le altre. Le bande sono state sottoposte ad un processo di deidratazione ed idratazione rispettivamente con acetronitrile (ACN) ed AMBIC 100 mM. La deidratazione effettuata con ACN ha permesso alle maglie del gel di trattenere le proteine in esse contenute e nel contempo la fuoriuscita del colorante Brillant Blue Comassie. Al fine di ridurre i ponti disolfuro il gel è stato trattato con una soluzione 10 mM ditiotreitolo (DTT) in 100 mM AMBIC a 56°C. Per bloccare le Cisteine così ridotte si è usata una soluzione 55 mM iodoacetammide in 100 mM AMBIC e ioncubata per 30 minuti a temperatura ambiente al buio.

La soluzione di alchilante è stata quindi rimossa ed è stato effettuato un ulteriore lavaggio del gel con AMBIC e acetonitrile. La soluzione deidratante è

stata quindi sostituita con una contenente tripsina in concentrazione 12,5 ng/ul, disciolta in 10mM AMBIC, e incubata a 4°C per due ore. Questo passaggio ha lo scopo di favorire l'ingresso dell'enzima proteolitico nel gel, rallentando al contempo l'autoproteolisi dell'enzima. La soluzione ancora presente nella provetta dopo 4 ore è stata rimossa e sostituita con AMBIC 10 mM allo scopo di allontanare tutto l'enzima che non è entrato nel gel. Le eppendorf sono state quindi incubate a 37°C per 18 ore..

Il liquido presente nel tubo dopo la proteolisi è stato prelevato e direttamente analizzato mediante analisi MALDI/MS. Una ulteriore estrazione dei peptidi è stata effettuata deidratando il gel con acetonitrile.

## **2.10 SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI**

Per l'acquisizione degli spettri MALDI/MS sono state utilizzate le strumentazioni MALDI Voyager (Voyager) e MALDI DE-PRO (Reflector) della Applied Biosystems. Volumi di 0,5 µl o 1 µl del campione sono stati miscelati, direttamente sulla piastrina portacampione, con un ugual volume di una soluzione 10 mg/ml di  $\alpha$ -ciano, 70% acetonitrile, 30% H<sub>2</sub>O, 0,1% TFA (matrice).

Per la calibrazione del sistema Voyager alla matrice è stata aggiunta insulina 500 femtomoli/µl. I segnali dell'insulina e del dimero dell'  $\alpha$ -ciano a m/z pari 379.01 consentono di ricavare una calibrazione interna a due punti dello strumento. Per la calibrazione del sistema Reflector è stata utilizzata la miscela di peptidi standard acquistata dalla Applied Biosystem che, posta sulla piastrina portacampione in prossimità del campione da analizzare, ha permesso di ricavare una calibrazione esterna multipunto. Le operazioni di calibrazione

ed elaborazione degli spettri sono state effettuate con i programmi forniti dalla Perseptive Biosystem.

Le analisi LC/MSMS delle miscele peptidiche sono state effettuate utilizzando la spettrometro LCQ Deca della Thermo Finnegan. Per l'elaborazione e la deconvoluzione degli spettri è stato utilizzato il software fornito dalla casa produttrice.

## **2.11 SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM**

La miscela peptidica ottenuta dall'idrolisi con tripsina è stata analizzata mediante esperimenti di LC-ES MS-MS. il digerito triptico è stato separato mediante cromatografia liquida a fase inversa ad alte prestazioni (RP-HPLC). Per l'eluizione sono stati utilizzati una soluzione acquosa contenente 5% acido formico e 0,05% TFA (A) ed una soluzione organica contenente 95% ACN, 5% acido formico e 0,05% TFA (B). I campioni sono stati preventivamente acidificati mediante TFA. L'eluizione è stata rivelata mediante lo spettrometro di massa LCQ Deca, preventivamente calibrato. I cromatogrammi sono stati elaborati con il software eXcalibur fornito dalla Thermo Finnegan.

## **2.12 IDENTIFICAZIONE DI PROTEINE INCOGNITE**

I dati collezionati mediante MALDI/MS sono stati utilizzati per l'identificazione delle proteine incognite in banca dati con due differenti programmi. L'elenco di masse molecolari derivanti dall'idrolisi della proteina viene confrontato con l'elenco di pesi molecolari teorici derivante dalla proteolisi di ognuna delle proteina in banca dati, considerando la specificità dell'enzima. L'indice di probabilità associato ad ognuna delle proteine indicate come probabili è utilizzato per ordinare le possibilità di identificazione. Il

software MsFit (<http://prospector.ucsf.edu>) consente di ricavare dalla banca dati prescelta la sequenza proteica che meglio giustifica il pattern di masse proteolitiche. I pesi molecolari teorici calcolati per ognuna delle proteine in banca dati, considerando la proteolisi secondo la specificità dell'enzima, è confrontato con i dati forniti dall'utente, ricavando la proteina che meglio giustifica i dati sperimentali (*peptide mass fingerprint fitting*). Il software Mascot (<http://www.matrixscience.com>), derivato dal software Mowse, restituisce una lista di putative proteine che giustificano il pattern di masse molecolari sperimentali. Ad ogni proteina è associato un indice di probabilità (*score*) calcolato come  $-10 \cdot \log(P)$ , con P probabilità che l'evento osservato sia casuale. Score superiori a 72 hanno il 99,5% di probabilità di non essere casuali. Le sequenze ottenute dall'interpretazione *de novo* degli spettri di frammentazione sono state confrontate con le proteine presenti in banca dati, per l'assegnazione di eventuali omologie o similarità. A tale scopo sono stati utilizzati i programmi Fasta 3 e Fastas disponibili al sito <http://www.ebi.ac.uk.htm>, la matrice utilizzata per l'assegnazione di similarità è stata BLOSUM 62. Con tutti i software utilizzati è stata effettuata una ricerca nella banca dati NCBIInr e SwissProt. I parametri della ricerca includevano la massa molecolare apparente da elettroforesi denaturante, considerando un errore massimo del 20% e la tolleranza sulle masse determinate mediante MALDI/MS, impostata allo 60 ppm.

### **2.13 IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA**

**Preparazione delle cellule:** Cellule ( $5 \times 10^7$  cellule a punto) sono trattate per 10 min a temperatura ambiente aggiungendo formaldeide alla concentrazione finale dell'1%.

L'azione della formaldeide è neutralizzata aggiungendo glicina alla concentrazione finale di 125mM (il mezzo diventa giallo). La sospensione cellulare è trasferita in tubi e centrifugata a 1200 rpm per 5-10 min. Se sono usate cellule aderenti esse sono staccate in PBS e centrifugate a 1000 rpm a 4°C. E' consigliabile contare le cellule per i passaggi successivi. Durante tutta l'estrazione fino alla sonicazione è necessario lavorare in ghiaccio, con soluzioni fredde e con inibitori di proteasi (PIC+PMSF= \*). Le cellule sono risospese in PBS\*, e quelle dello stesso tipo e alla stessa stimolazione sono raggruppate in un tubo da 50 ml. Dopo averle centrifugate, le cellule sono risospese nel tampone di lisi e messe in agitazione a 4°C per 10 min. Si ripete la centrifugazione a 2000 rpm per conservare i nuclei. I nuclei sono poi lavati un tampone di lavaggio\*

**Sonicazione:** Risospendere in tampone\* RIPA(10 mM Tris pH 8.0, 140 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 0.1% sodio deossicolato, 0.1% SDS, 1% Triton), con una concentrazione di 20 o 25x10<sup>6</sup> cellule-equivalente in 500µl. La sonicazione è ottenuta in un Bioblock Vibra Cell 72434 Sonicator. I nuclei sono sonicati alla potenza massima. Il campione è sonicato per 11 volte per 30 secondi intervallati da 30 secondi di riposo in ghiaccio. Dopo la sonicazione i campioni sono centrifugati a 14000 rpm per 20 min a 4°C. Il surnatante è utilizzato per l'analisi CHIP.

**ChIP:** Normalmente un volume estratto da 5 x 10<sup>6</sup> cellule è usato per una reazione di ChIP. Prima di incubare il campione con l'anticorpo è importante conservarsi una aliquota del campione iniziale da utilizzare in un secondo momento per un' analisi PCR. I campioni sono diluiti in RIPA buffer fino ad 1 ml e puliti con un' incubazione su 50 µl salmon sperm-DNA-ProteinA-

Agarose-BSA slurry (Upstate) per 30 min in agitazione a 4°C. I campioni vengono poi centrifugati per 2 min a 1500rpm a 4°C.

**Legame con l'anticorpo:** L'anticorpo (4 µg) è aggiunto al campione ed incubato per tutta la notte. Successivamente si aggiungono 40µl salmon sperm-DNA-ProteinA-Agarose-BSA e si incubano a 4°C a 750 rpm per 1 ora.

**Lavaggio della resina:** La resina è recuperata mediante centrifugazione a 1500rpm, a 4°C per 2 min. Il surnatante viene allontanato in base all'anticorpo utilizzato, alcuni lavaggi sono fatti con 500 µl per 3-4 volte incubandoli per 5 min ogni volta a 4°C.

In genere, la resina è lavata come segue: 1x in tampone RIPA, 2x in tampone alto sale, 1x in tampone LiCl, 2x in T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>.

**Eluizione:** Dopo fatto l'ultimo lavaggio si risospende la resina in 250 µl di tampone di eluizione. L'eluizione è effettuata per 15 minuti a temperatura ambiente in agitazione. Si recupera il surnatante dopo aver centrifugato la resina. Si ripete il passaggio di eluizione.

**Separazione:** 20µl di 5M NaCl sono aggiunti a circa 500µl di campione. La separazione avviene a 65°C per 12 ore. Si recupera il DNA. Le proteine sono degradate tramite l'uso di Proteinasi K incubati con 10µl di 0,5M EDTA, 20µl di 1M Tris pH6,5 e 2µl di 10mg/ml Proteinase K per 1 ora a 45°C. Il DNA è poi recuperato grazie ad estrazione fenolo/cloroformio/isoammilico (25:24:1). IL DNA è risospeso in 30-40µl di acqua milliQ oppure TE 1X (TRIS/EDTA). La PCR può essere effettuata su questi campioni usando da 2 a 4µl. I campioni iniziali vengono diluiti da 5 a 10 volte prima della PCR.

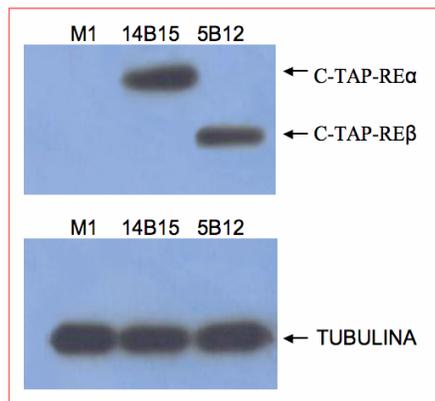
### 3. RISULTATI

#### 3.1 COSTRUZIONE DI VETTORI DI ESPRESSIONE DEI RECETTORI RICOMBINANTI CON LA TAP-TAG E RELATIVA VALUTAZIONE DELL' ESPRESSIONE

La *Tandem Affinity Purification* comporta la fusione della *TAP-tag* alla proteina di interesse e la successiva espressione delle proteine di fusione, cui segue l'estrazione proteica ed una rapida purificazione mediante due tappe di cromatografia di affinità (vedi materiali e metodi)

I frammenti N-TAP-RE $\alpha$ , C-TAP-RE $\alpha$ , C-TAP-RE $\beta$ , N-TAP-RE $\alpha$  sono stati clonati nel vettore inducibile da tetraciclina pTRE2pur-HA (11). L'espressione stabile delle proteine di fusione è stata ottenuta trasfettando, con i 4 tipi di costrutti *TAP*, cellule della linea ormono-responsiva MCF-7. Dopo selezione con geneticina e puromicina, i cloni sono stati espansi e analizzati per verificare la capacità di espressione delle proteine ibride mediante *immunoblotting* individuando in tal modo i cloni che presentano l'espressione della proteina ricombinante, senza variazione della ploidia. La presenza della *TAP-tag* rende le proteine RE più pesanti: la proteina di fusione C-TAP-RE $\alpha$  diventa di circa 96 KDa (RE $\alpha$  è di 67 KDa), mentre C-TAP-RE $\beta$  diventa di circa 83KDa (RE $\beta$  *wild type* è circa 54KDa). **La Figura 4** mostra solo l'espressione delle proteine ibride RE $\alpha$  e RE $\beta$  rispettivamente nei cloni 14B15 e 5B12 che esprimono il RE fuso, al C-terminale della *TAP-tag*, poichè non si sono ottenuti i cloni all' N-terminale. Il clone M-1, trasfettato stabilmente con pTRE2pur-HA-TAP esprime la proteina endogena e la *TAG* ed è stato utilizzato come controllo negativo al fine di stabilire la corretta massa dei

recettori ricombinanti, in caso di bande aspecifiche, e come controllo negativo nelle successive purificazioni. Dalla Figura si evince come il clone 14B15 esprima meglio il recettore ibrido rispetto al 5B12. Differenze del livello di espressione si sono verificate anche nei cloni trasfettati in maniera transiente con lo stesso costrutto (dati non mostrati). Appurati il diverso livello di espressione della proteina ricombinante tra i numerosi cloni analizzati e la possibilità di variazione nel tempo della quantità espressa nello stesso clone, è stato necessario effettuare, costantemente, analisi dei vari cloni per immunoblotting così da selezionare quelli che mostravano una più alta e stabile espressione della proteina ricombinante. La Figura 4 rappresenta estratti totali proteici di alcuni dei cloni selezionati esprimenti stabilmente i RE $\alpha$ / $\beta$  (rispettivamente chiamati 14B15 e 5B12); mostra inoltre l'assenza della proteina ricombinante nelle cellule trasfettate stabilmente con il costrutto portante solo la *TAP-tag* (M1).

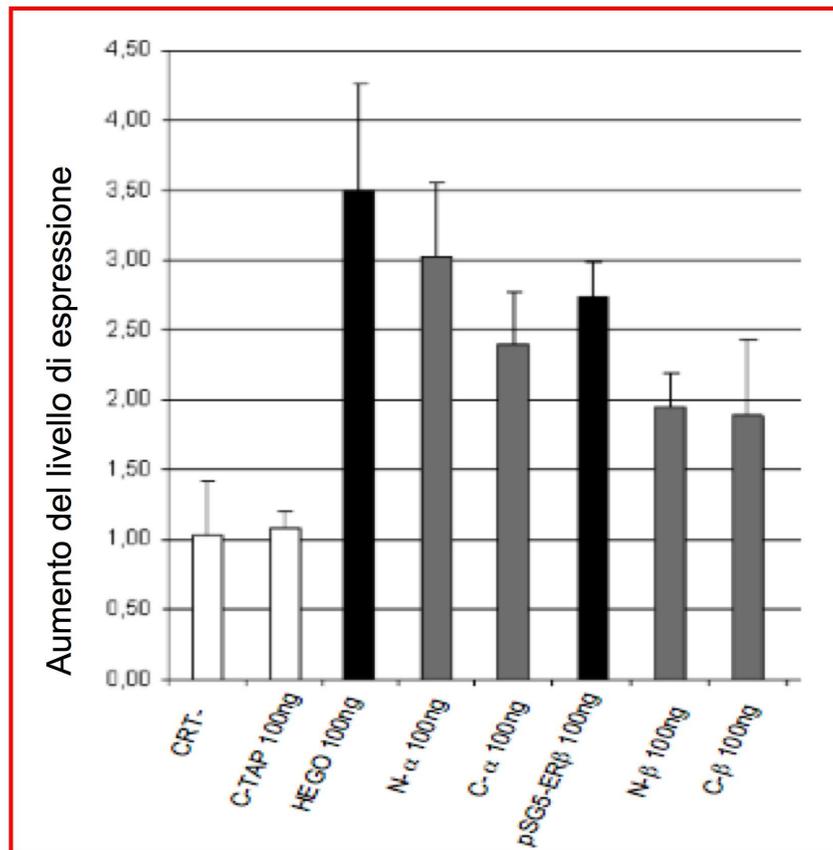


**Figura 4. Analisi dell'espressione dei RE $\alpha$  e RE $\beta$  nei cloni stabili.** L'espressione delle proteine di fusione è stata verificata mediante immunoblotting. E' stato usato un Ab anti-TAP per riconoscere le proteine chimeriche ed un anticorpo anti-tubulina per normalizzare le quantità di proteine estratte ed analizzate

### 3.2 SAGGI DI ATTIVAZIONE TRASCRIZIONALE MEDIATA DAI RECETTORI RICOMBINANTI

Al fine di verificare l'attività trascrizionale mediata dai recettori ricombinanti sono state trasfettate, cellule MDA-MB-231 (RE-negative), in modo

transiente, con i vettori esprimenti le proteine di fusione e con i recettori nativi (HEGO per RE $\alpha$  e pSG5-RE $\beta$  per RE $\beta$ ) insieme al vettore ERE-tk-luc, contenente a valle come gene-reporter la luciferasi sotto il controllo di un promotore estrogeno-reattivo. Le cellule sono state cotrasfettate anche con il plasmide che esprime l'enzima della  $\beta$ -galattosidasi per normalizzare l'efficienza di trasfezione.



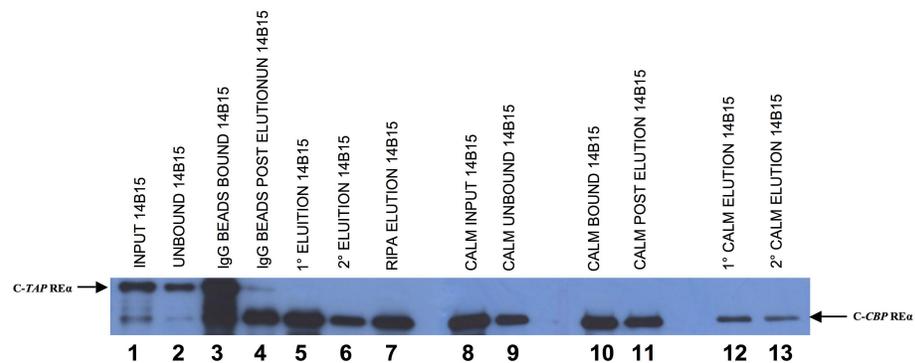
**Figura 5. Saggi di attivazione trascrizionale mediati dalle proteine di fusione.** I costrutti esprimenti le proteine di fusione (N-TAP-RE $\alpha$ , C-TAP-RE $\alpha$ , N-TAP-RE $\beta$  e C-TAP-RE $\beta$ ) e i recettori nativi (pSG5-HEGO per RE $\alpha$  e pSG5 per RE $\beta$ ) sono stati trasfettati in modo transiente nelle cellule MDA-MB-231 (RE-negative), insieme al vettore reporter ERE-TK-luc, che contiene il gene della luciferasi sotto il controllo di un promotore estrogeno-dipendente. E' riportato l'aumento dell'espressione rispetto al controllo non trattato. Il segno (-) indica le cellule non trasfettate con alcun vettore

Le cellule, tenute in coltura, per 4 giorni in mezzo privo di steroidi, sono state trasfettate con 100ng dei vettori di espressione e indotte con E2 per 24 ore. L'attività di trascrizione è stata analizzata mediante saggio luciferasico,

ed i dati mostrati derivano dall'analisi di quattro esperimenti indipendenti. I valori di incremento relativi all'attivazione del gene della luciferasi indica che la funzione transattivante di entrambi i recettori non è alterata dalla presenza della TAP-tag. L'attivazione della luciferasi indotta dai recettori ricombinanti varia leggermente rispetto al tipo di costrutto, ma l'efficienza della trascrizione del gene reporter risulta essere più bassa rispetto ai rispettivi recettori nativi, HEGO-RE $\alpha$  e pSG5-RE $\beta$ .

### 3.3 PURIFICAZIONE DI C-TAP-RE $\alpha/\beta$

Una volta messe a punto le condizioni per mediare il legame delle proteine di fusione alle IgG e per la conseguente eluizione, si è proceduto alla completa purificazione dei complessi proteici formati dal recettore. Per l'esperimento è stato utilizzato il clone 14B15, cresciuto in terreno DMEM deprivato di E<sub>2</sub> e trattato con DCC. I campioni così ottenuti sono stati analizzati mediante western blot (Figura 6).

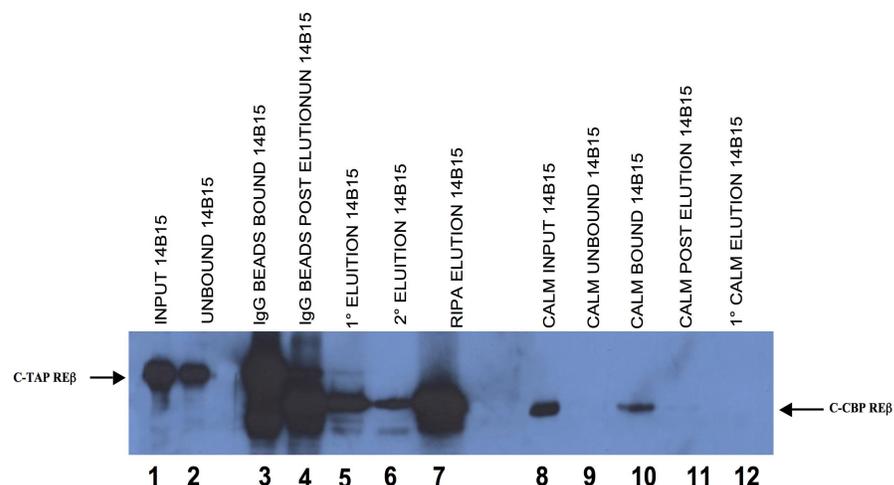


**Figura 6. Analisi mediante Western Blot dell'espressione di RE $\alpha$  nel clone 14B15.** Il clone 14B15 (esprimente C-TAP-RE $\alpha$ ) è stato sottoposto a purificazione completa *Tandem Affinity Purification*. Dei vari campioni sono stati caricati i seguenti rapporti: 1,2: 1/3200; 3,4: 1/200; 5,6,7: 1/60; 8,9: 1/120; 10,11,12,13: 1/30.. È stato utilizzato un Ab anti-TAP.

Dall'analisi del western blot si è osservato che circa il 30% di C-TAP-RE $\alpha$

non si lega alla resina di IgG. Nel 1° eluato TEV abbiamo circa il 30% della proteina ricombinante che si era legata alla prima resina, nel 2° eluato portiamo in soluzione circa il 10% del C- TAP-RE $\alpha$ , e nell' eluizione con tampone RIPA ancora circa il 30 % viene eluito, mentre circa il 30% della proteina ricombinate anche se tagliata, non si eluisce dalla resina di IgG. Circa il 60% della proteina ricombinante non si riesce a legare alla resina di calmoduline; del 40% di proteina ricombinate che si lega alla resina di calmoduline, solo il 10% si riesce ad eluire. Il vettore C-TAP-RE $\beta$  5B12 è stato sottoposto allo steso protocollo di purificazione e, anche in questo caso, l'efficienza della stessa è stata monitorata mediante Western blot (Figura 7) utilizzando un Ab anti TAP.

Dall' analisi del western blot si osserva che circa il 30% di N-TAP RE $\beta$  non si lega alla resina di IgG. Nel 1° eluato TEV osseva circa il 20% della proteina ricombinante, e nel 2° eluato circa il 10% del C- TAP Re $\alpha$ , mentre nell' eluizione con tampone RIPA si eluisce circa il 40%, per cui il 30% resta legato alla resina di IgG. La proteina ricombinante si lega molto bene alla resina di calmoduline, ma in questo caso l'eluizione non avviene.



**Figura 7. Analisi mediante Western Blot dell'espressione di RE $\beta$  nel clone 5B12.** Il clone 5B12 (esprimente C-TAP-RE $\beta$ ) è stato sottoposto a

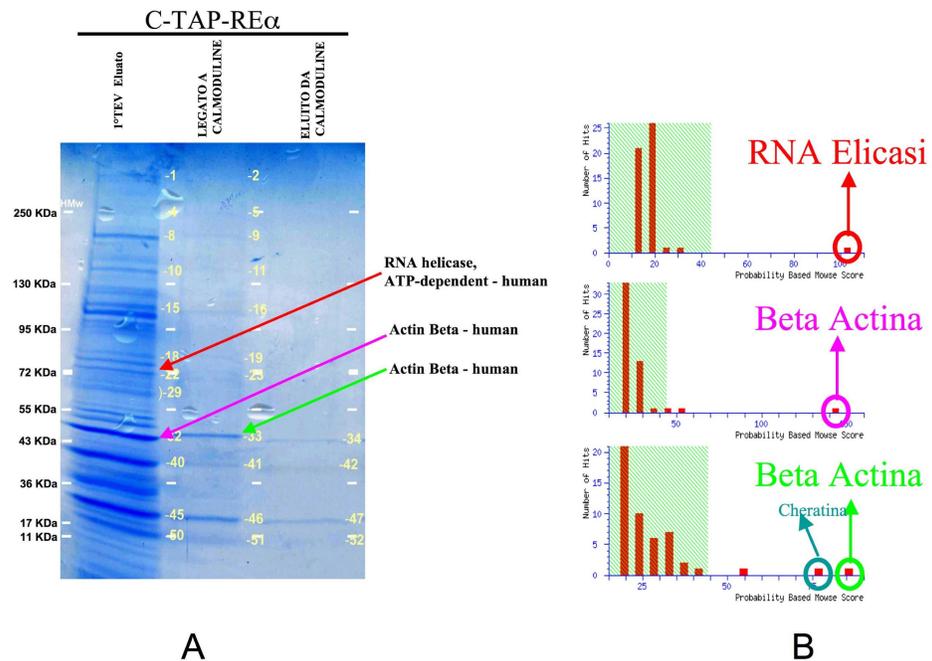
purificazione completa *Tandem Affinity Purification*. Dei vari campioni sono stati caricati i seguenti rapporti: 1,2: 1/3200; 3,4: 1/200; 5,6,7: 1/60; 8,9: 1/120; 10,11,12,13: 1/30.

Circa il 30% della proteina viene tagliata dalla proteasi TEV, il resto viene tagliato ma non si eluisce dalla resina di IgG mentre si ottiene un buon legame, sembrerebbe del 100%, alla resina di calmodulina

### **3.4 IDENTIFICAZIONE DEGLI INTERATTORI DEI RE MEDIANTE SDS-PAGE E SPETTROMETRIA DI MASSA**

Mediante SDS-PAGE sono stati analizzati i campioni della purificazione di C-TAP RE $\alpha/\beta$ , in particolare quelli ottenuti dal primo TEV eluato, dal legame a resina di calmoduline e dagli eluati delle stesse calmoduline, al fine di verificare la presenza di interattori del recettore per poi poterli identificare tramite Spettrometria di Massa. La metodica *Tandem Affinity Purification* è una procedura che consente di lavorare in condizioni non denaturanti, eccetto l'ultimo passaggio; ciò implica che fino alla fine conserviamo le interazioni che legano altre proteine al recettore degli estrogeni e solo con la sua ultima eluizione queste componenti del complesso vengono separate e possono essere visualizzate su gel di poliacrilammide. Per identificare i partners specifici e non dei due RE, i campioni sono stati caricati su *gel* gradiente 4-20% poliacrilammide utili al fine di evitare contaminazioni da cheratine e soprattutto ottenere una buona separazione di tutte le proteine presenti. Individuate le bande, dopo colorazione con blue comassie colloidale, sono state tagliate e sottoposte alla procedura di idrolisi in situ. L'analisi preliminare ha rivelato la presenza nell' eluato TEV e nel legame a calmodulina di una proteina nucleare molto abbondante, ovvero la Beta Actina umana non conosciuta come

interattore del recettore. Inoltre l'analisi ha dato come identificazione nell'eluato TEV della RNA Elicasi ATP dipendente, partner già noto come (12).

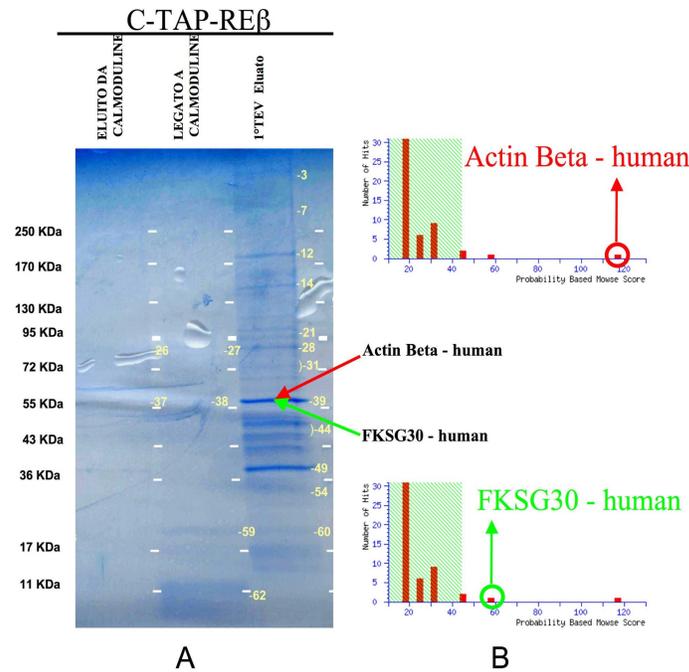


**Figura 8. Elettroforesi in SDS-PAGE e analisi per Spettrometria di Massa di alcuni passaggi della purificazione TAP.**

A) I campioni 1° eluato dalla resina IgG, legame a calmodulina ed eluito da calmodulina sono stati caricati nei rapporti di 1/96, 1/48 e 1/36 del totale in un gel gradiente 4%-20% poliaccrilamide. Le frecce colorate indicano le proteine identificate per spettrometria di massa. L'analisi ha permesso l'identificazione della RNA Elicasi ATP nel primo campione e della beta actina nel primo e nel secondo campione.

B) Analisi dei dati ottenuti per spettrometria di massa LC-MS/MS.

La stessa analisi è stata condotta per i campioni del clone 5B12. I risultati evidenziano come nell'eluato TEV ci siano molte bande in comune con l'eluato TEV del clone 14B15, ma soprattutto molte diverse; questo è indice che le proteine che vengono copurificate con i recettori sono specifiche e non casuali. Le identificazioni ottenute per spettrometria di massa sono accurate nei campioni più abbondanti, mentre alcune meno rappresentate non hanno un'identificazione sicura.



**Figura 9. Elettroforesi in SDS-PAGE e analisi per Spettrometria di Massa di alcuni passaggi della purificazione TAP.**

A) I campioni 1° Tev eluato, legame a calmodulina ed eluizione da calmodulina di una purificazione del clone 5B12 sono stati caricati nei rapporti di 1/34, 1/29 e 1/11 in un un gel gradiente 4%-20% poliaccrilamide. Le frecce colorate indicano le proteine identificate per spettrometria di massa. L'analisi ha permesso l'identificazione della beta actina e della FKSG30 - human nello stesso campione.

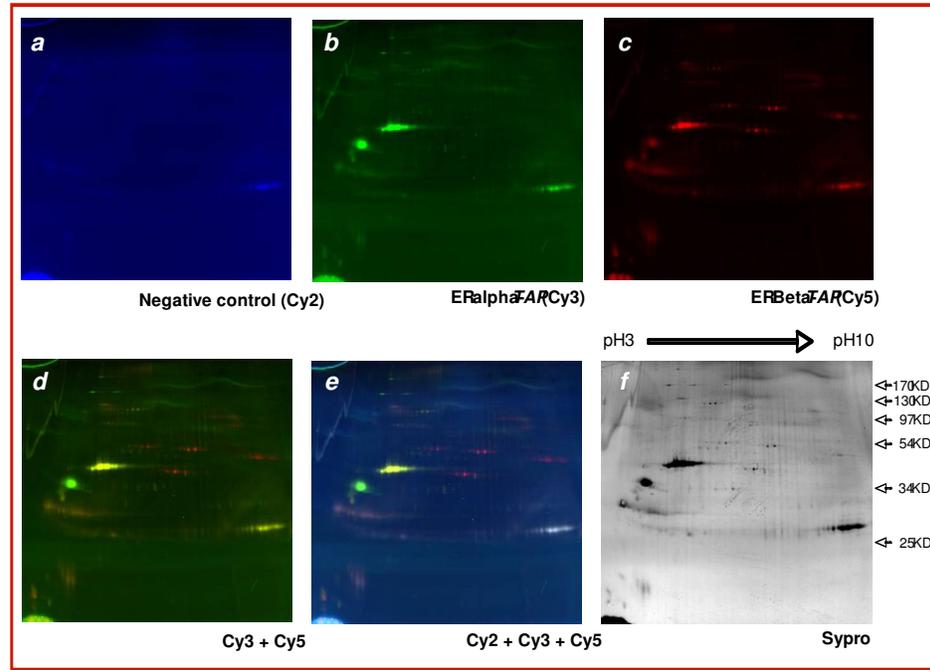
B) Analisi dei dati ottenuti per spettrometria di massa LC-MS/MS.

### 3.5 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE DEI RE $\alpha/\beta$ ED IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE INTERAGENTI

Sono stati analizzati ,in laboratorio, i campioni del primo passaggio di purificazione su un gel bidimensionale, vedi materiali e metodi, con l'utilizzo di coloranti fluorescenti. I purificati sono stati marcati con dye fluorescenti, in particolare è stato utilizzato il Cy2 per il purificato dal clone M1, Cy3 per il purificato 14B15 e il Cy5 per 5B12. Dalle immagini ottenute dall'analisi dei tre campioni (Figura 10), si evincono differenze nei profili di separazione dei campioni; ciò suggerisce l'avvenuto isolamento di specifici *partners* di

sottotipi del recettore.

In seguito, le macchie significative dei tre campioni sono stati prelevati dal gel e sottoposti ad analisi mediante tecniche di spettrometria di massa.

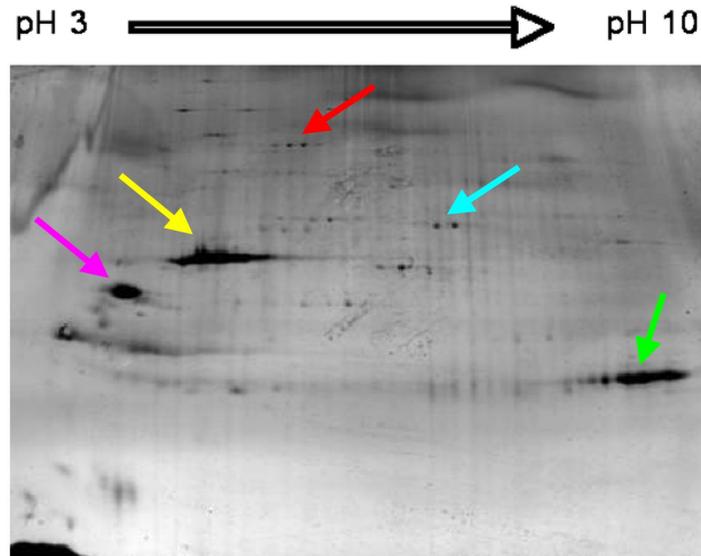


**Figure 10. Elettroforesi bidimensionale e colorazione fluorescente dei purificati.**

I purificati di ERalpha-TAP e ERbeta-TAP e del Controllo Negativo sono stati marcati rispettivamente con i fluorofori Cy3, Cy5 e Cy2 mischiati e poi analizzati mediante elettroforesi bidimensionale. Il gel risultante è stato letto con uno scanner a laser a differenti lunghezze d'onda (a-c) prima di colorare con il colorante fluorescente Sypro (f). In (d) e (e), le macchie in giallo rappresentano le proteine in comune tra ER $\alpha$  e  $\beta$ , in bianco proteine in comune tra tutti e tre i campioni (ER $\alpha$ , ER $\beta$  e del controllo negativo), in verde le proteine specifiche di ER $\alpha$  e in rosso quelli specifici per ER $\beta$ .

Come risulta dalla tabella riassuntiva abbiamo ottenuto diverse identificazioni.

Di notevole interesse sono le identificazioni della beta actina anche nel bidimensionale a riprova che l'interazione e/o la presenza dell'actina nel complesso dei RE è stabile e riproducibile; inoltre sono state identificate altre proteine quali, gelsolina, alpha septina 11, nucleofosmina, che sono proteine note interagire con la beta actina ed alcune di loro anche con i RE.



A

Campione	Numero di accesso (NCBI) e nome proteina identificata	PM (Da)	Numero peptidi	Risultato
	gi/4504165 Gelsolin isoform a precursor	86043	6 nella regione 148-748	230
	gi/8922712 Septin 11	49652	11 nella regione 2-418	413
	gi/14250401 actin, beta	42128	6 nella regione 19-326	234
	gi/10835063 Nucleophosmin	32726	10 nella regione 33-267	477
	gi/25013638 N1a-Pro protein [Tobacco Etch virus]	27738	2 nella regione 68-242	142

B

### Figura 11. Identificazione degli interattori dei RE mediante spettrometria di massa.

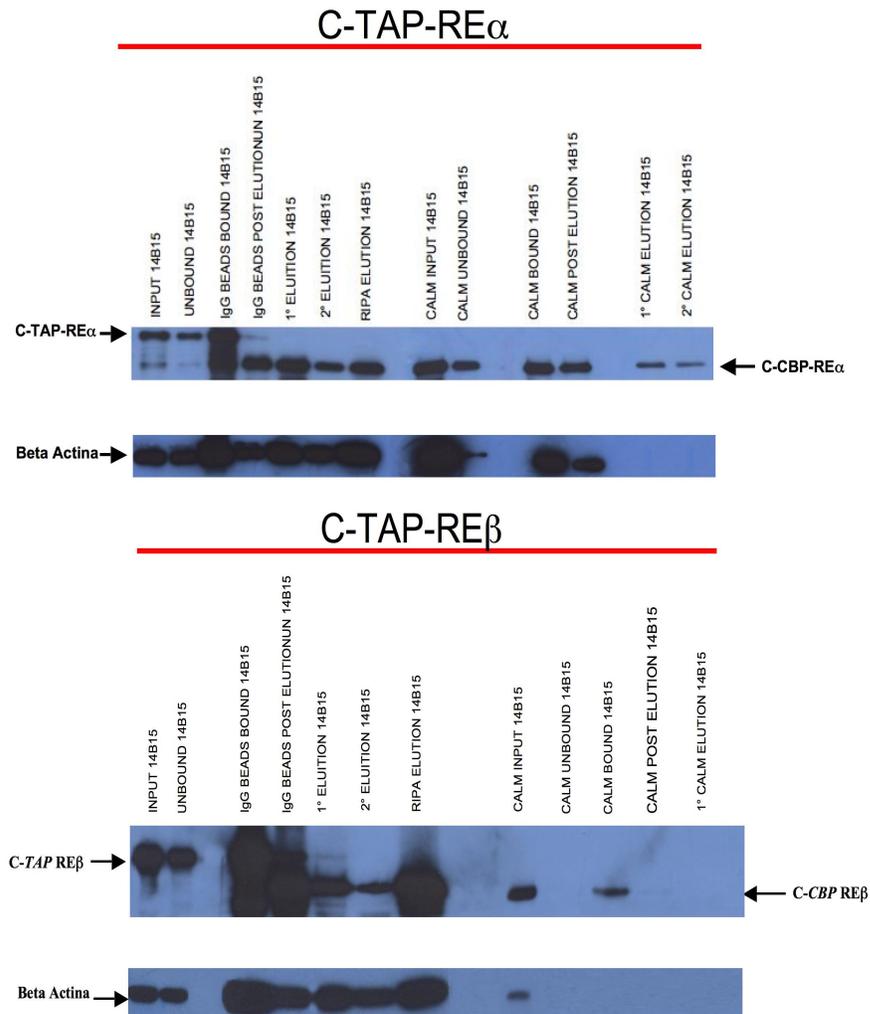
**A:** Gel bidimensionale rivelato con il colorante fluorescente Sypro.

**B:** Risultati dell'analisi di spettrometria di massa condotta sui peptidi ottenuti mediante digestione triptica delle bande separate per elettroforesi bidimensionale. Le frecce presenti in A hanno un codice a colore corrispondente alle identificazioni della tabella B dove risultano identificate le seguenti proteine: gelsolina, septina 11, beta actina, nucleofosmina, e tev proteasi.

### 3.6 LA BETA ACTINA NELLA PURIFICAZIONE DEI RE $\alpha/\beta$

Le analisi mediante spettrometria di massa delle macchie prelevate in seguito ad elettroforesi bidimensionale e le bande prelevate dal gel monodimensionale hanno portato, dunque, all'identificazione della beta

actina quale partner dei RE $\alpha/\beta$ . Tale interazione è stata confermata successivamente mediante western blot. I filtri relativi alle purificazioni C-TAP-RE $\alpha/\beta$  mostrate in Figura 12 sono stati ibridati con un anticorpo contro la beta actina umana. Nell'immagine viene comparata la precedente ibridazione con anticorpo anti TAP con la nuova ibridazione con uno anti  $\beta$ -actina.



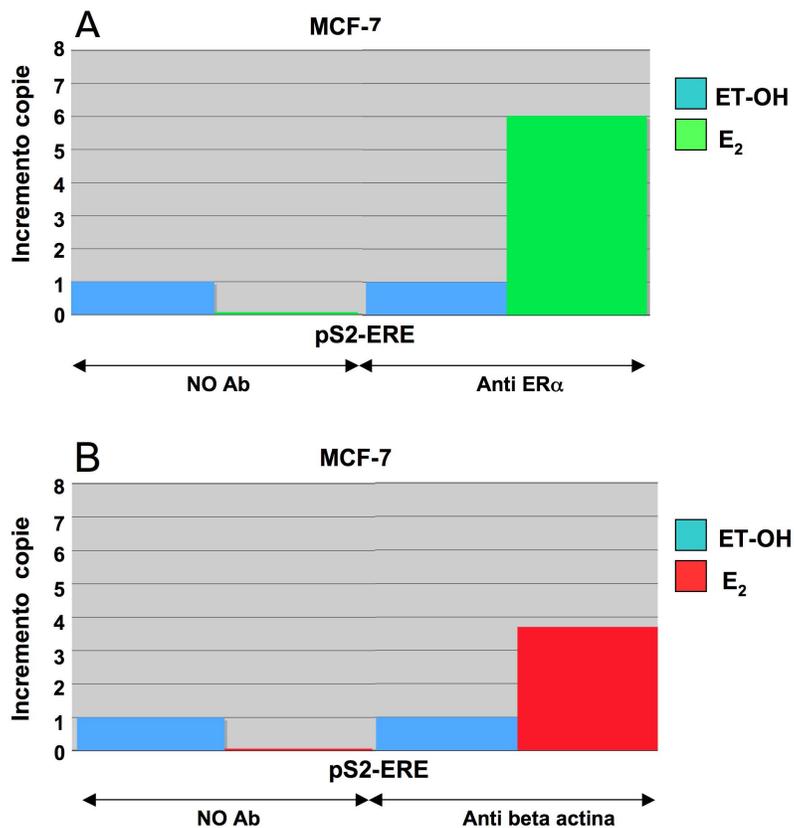
**Fig. 12 Analisi mediante Western Blot con anticorpo anti beta actina dei campioni ottenuti dalle purificazioni dei RE $\alpha/\beta$**

I filtri mostrati in Figura 6 e 7 sono stati incubati con anticorpo contro beta actina.

### 3.7 INTERAZIONE DELLA BETA ACTINA COL PROMOTORE DEI GENI ESTROGENO REGOLATI

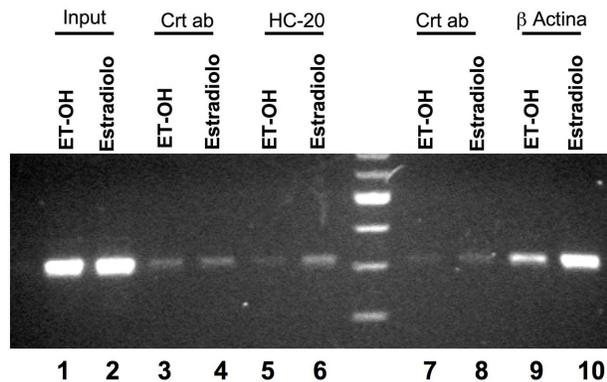
Al fine di verificare la presenza della beta actina, o il suo richiamo sui geni estrogeno regolati dopo stimolazione con estradiolo mediata dai recettori ricombinanti, cellule MCF-7 ormono responsive sono state sottoposte ad analisi mediante immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) con l'anticorpo per la beta actina. Le cellule sono state mantenute per 4 giorni in mezzo privo di steroidi, e indotte con E2 per 45 min.

In Figura 13 sono riportati i valori ottenuti mediante RT-PCR, sui campioni di cromatina immunoprecipitati del controllo negativo e RE $\alpha$  HC-20 Santa Cruz (A), controllo negativo e anti beta actina (B); la regione amplificata è nel promotore del gene estrogeno regolato *pS2*.



**Figura 13 La beta actina sul promotore dei geni estrogeno regolati**  
Richiamo della beta actina sull' ERE del gene *pS2* dopo stimolazione con estradiolo.

Successivamente il DNA immunoprecipitato con la ChIP è stato amplificato per PCR (Figura 14), come riportato in Figura 14 il trattamento con E<sub>2</sub> dopo 4 giorni di deprivazione da estradiolo induce una maggiore interazione di ER $\alpha$  con il promotore del gene estrogeno regolato *pS2* e contemporaneamente si osserva un aumento dell'interazione dello stesso promotore con la beta actina.



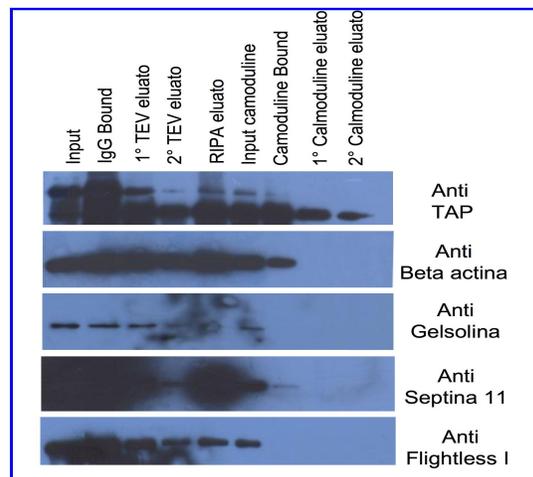
**Figura 14. Elettroforesi degli amplificati per PCR dei frammenti di DNA immunoprecipitati mediante ChIP.**

Dopo 34 cicli, si vince nella sesta lane un aumento nel segnale del campione immunoprecipitato con HC-20 e indotto con E<sub>2</sub>, cosa che si ripete nella lane 10 con il campione immunoprecipitato con anti beta actina.

### **3.8 CONVALIDA DELLE IDENTIFICAZIONI OTTENUTE PER SPETTROMETRIA DI MASSA**

Le proteine identificate per spettrometria di massa sono state convalidate mediante analisi di western blot. I campioni ottenuti dalla purificazione del clone 14B15 sono stati processati tramite SDS-PAGE e poi trasferiti su filtro di nitrocellulosa, Il risultato varia a seconda del tipo di anticorpo, della sua qualità, sensibilità e relativa abbondanza della proteina da riconoscere. Il primo anticorpo utilizzato è stato l'Anti-TAP che

riconosce la presenza della proteina chimerica fino all'eluizione dalla seconda resina di affinità. Il filtro è stato successivamente reibridato con anti beta actina, visibile fino al legame alla seconda resina, ma non nelle eluizioni dalla stessa. Risultato ottenuto anche con l'anti alpha septina 11, mentre con l'anti gelsolina e anti flightless si vede fino all'input delle calmoduline. La scelta di quest'ultima proteina anche se non presente nella tabella delle identificazioni è stata fatta perché appartiene alla famiglia delle gelsoline, con cui condivide molti domini e sequenze conservate e soprattutto perché da letteratura si sapeva interagire con l'actina e con il RE $\alpha$ .



**Fig. 15. Convalida delle identificazioni ottenute mediante spettrometria di massa con analisi di immunoblotting**

I campioni provenienti dalla purificazione di RE $\alpha$  sono stati analizzati mediante western blot ed ibridati con: 1) anti tap; 2) anti beta actina; 3) anti gelsolina; 4) anti alpha septina 11; anti *flightless* 1. Si evidenzia la presenza delle proteine riconosciute dagli anticorpi 2 e 4 fino al legame della resina di calmoduline.

## 4 DISCUSSIONE

L'analisi delle interazioni proteina-proteina rappresenta uno degli obiettivi di primaria importanza nella ricerca scientifica. La proteomica funzionale risulta

essere fondamentale per comprendere la funzione delle proteine che per la maggior parte è determinata dal loro interagire con altre proteine, come nel caso di molte patologie complesse come il cancro. La complessità che c'è dietro può quindi essere compresa al meglio andando ad indagare come tutte queste proteine interagiscono tra di loro in persone sane e malate. Per questo motivo l'analisi proteomica degli interattori dei recettori degli estrogeni costituisce l'obiettivo principale della ricerca del laboratorio

Infatti, gli estrogeni hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo del CM in quanto esercitano un'azione mitogena sulle cellule dell'epitelio mammario. Solo il 5-10% di questi tumori della mammella è da attribuire a cause genetiche, in quanto il loro sviluppo dipende prevalentemente da fattori che gravitano intorno alla sfera endocrina e riproduttiva. Tuttavia, il meccanismo tramite il quale gli estrogeni stimolano la proliferazione cellulare non è ancora del tutto chiaro, nonostante l'evidente relazione tra l'azione estrogenica e la carcinogenesi della ghiandola mammaria. Gli estrogeni agiscono attraverso due specifici recettori, RE $\alpha$  e RE $\beta$ , i quali possono mediare la loro azione sia da fattori trascrizionali (via genomica), sia come modificatori indiretti dell'attività di altri geni, come quelli che regolano il ciclo cellulare. Si ipotizza che alla base di questo comportamento ci sia una diversità nella trasmissione intracellulare del segnale ormonale, legata ad una eterogenea espressione delle proteine che interagiscono con i RE. All'interno di questo gruppo di proteine sono presenti fattori trascrizionali ed altre molecole intracellulari, le quali interagendo con il RE partecipano alla trasduzione del segnale ormonale.

Per questo risulta importante identificare i diversi fattori molecolari che

interagiscono con i RE in modo da avere un'idea chiara dell'origine dei vari fenotipi di carcinoma mammario e per lo sviluppo di nuove terapie più specifiche contro il tumore della mammella. L'identificazione di interazioni proteina-proteina richiede l'isolamento dei complessi proteici in condizioni non denaturanti. Abbiamo utilizzato in questo lavoro un sistema di purificazione, "*Tandem Affinity Purification*", basato sull'espressione della proteina d'interesse in forma ricombinante con una specifica marcatura (tag). Allo scopo di studiare la rete d'interazione dei RE $\alpha/\beta$  si sono ottenuti 4 tipi di vettori di espressione: pTRE2pur-HA-N-TAP-RE $\alpha$ , pTRE2pur-HA-C-TAP-RE $\alpha$ , pTRE2pur-HA-N-TAP-RE $\beta$  e pTRE2pur-HA-C-TAP-RE $\beta$ .

Constatato il diverso livello di espressione della proteina ricombinante tra i numerosi cloni analizzati e la possibilità di variazione nel tempo della quantità espressa nello stesso clone, è stato necessario selezionare per immunoblotting. Alla fine sono stati scelti cloni che presentano un maggiore e costante livello di espressione per ogni tipo di costrutto, in particolare: 14B15 (C-TAP-RE $\alpha$ ), 5B12 (C-TAP-RE $\beta$ ).

Dopo aver dimostrato che la tag non interferiva con la normale transattivazione dei RE abbiamo stabilito un protocollo di lisi nucleare e di purificazione: coltura in DMEM deprivato di E<sub>2</sub>; lisi e binding di 2 ore a 4°C in tampone NLB con la resina; per gli altri passaggi è stato seguito l'usuale protocollo che prevede l'utilizzo del CB Buffer per il legame alle calmoduline ed eluizione con EGTA. E' chiaro che la metodica di purificazione ha ancora dei margini di miglioramento. Si ottengono buone rese di legame alla resina di IgG ma l'efficienza di eluizione dopo taglio con TEV è ancora bassa. Il legame alla seconda resina di purificazione è efficiente, ma l'eluizione ha una

scarsa resa. I purificati analizzati per monodimensionale e bidimensionale sono stati sottoposti ad analisi di spettrometria di massa, dalla quale si è evidenziata la presenza di interattori nuovi come RNA elicasi ATP dipendente e di nuovi interattori come la beta actina, la nucleofosmina, la alpha septina 11, gelsolina. Questo lascia presupporre un nuovo pathway per i RE $\alpha/\beta$ , confermato dall' effettiva presenza della beta actina sul promotore del gene estrogeno regolato pS2 dopo 45 minuti di stimolazione con E<sub>2</sub>. Questo risultato ha evidenziato il potenziale di questa metodica che può essere migliorata nel primo passaggio di purificazione dove una quota di proteina ricombinante non riesce ad andare in soluzione anche se tagliata dalla proteasi TEV, e soprattutto nell'efficienza del secondo passaggio di purificazione ancora troppo bassa.

La complessità del campione proveniente dal primo passaggio di purificazione è stata semplificata dall'analisi dello stesso su un gel bidimensionale colorato con coloranti fluorescenti. Questo tipo di analisi ha permesso di verificare la presenza di proteine comune nelle purificazioni dei due RE, ma anche , e molto interessante , di proteine specifiche dei singoli RE.

## 5 CONCLUSIONI

Lo scopo di questo progetto è stato quello di identificare e studiare gli interattori dei recettori degli estrogeni per meglio interpretare i molteplici ruoli svolti da questi nello sviluppo e progressione del carcinoma mammario.

L'approccio utilizzato è la “*Tandem Affinity Purification (TAP)*”.

La *TAP* è stata messa a punto nelle condizioni di lisi, di legame e di eluizione

del primo e del secondo passaggio, mentre è ancora in atto il miglioramento del secondo passaggio.

La purificazione del complesso proteico, tramite il metodo *TAP*, legato al recettore ha permesso l'individuazione di partners noti come l'RNA elicasi ATP dipendente, già caratterizzato come interattore del recettore, e di nuovi partners tra cui la beta actina dimostrando la sua presenza nel complesso dei RE e suggerendo anche la sua valenza funzionale sul promotore di un gene estrogeno regolato. L'obiettivo ultimo del progetto è quello di scoprire nuovi interattori del recettore ancora sconosciuti e confrontare i diversi interattomi di linee cellulari di carcinoma mammario ormono-dipendenti con quelle ormono-indipendenti, per definire i *partners* proteici che, interagendo con i RE, portano ad una perdita del fenotipo ormone-responsivo. Tale ricerca potrà essere condotta anche tramite *RNAinterference* che, silenziando determinati bersagli proteici, potrà meglio mettere in luce le *pathways* di trasduzione del segnale ormonale. Il sistema di purificazione può essere utilizzato per analizzare l'effetto di mutazioni sulle interazioni proteiche e sull'assemblaggio dei complessi macromolecolari confrontando i diversi *patterns* di proteine ottenuti dopo purificazione dei complessi *wilde-type* e mutanti. L'identificazione dei *partners* molecolari sarà di supporto per la creazione di nuove terapie farmacologiche, "*protein drug*," che inibiscano lo sviluppo e la progressione del carcinoma mammario. Il vantaggio nell'utilizzo di questi farmaci è quello di eliminare i rischi associati alla somministrazione di *drugs* che agiscono più a monte, mRNA e DNA, avendo così un'azione più specifica. Il progetto in corso vede l'utilizzo di un nuovo approccio per semplificare l'estratto di proteine nucleare, ovvero l'uso di gradienti di

glicerolo. E' inoltre in corso lo studio dei *partners* di RE $\alpha$  e RE  $\beta$  in risposta a ligandi selettivi di sintesi, quali piranosilpiperazoltrioolo (PPT) per RE $\alpha$  e diarilpropionitrile (DPN) per RE  $\beta$ .

L'obiettivo ultimo del progetto sarà quello di scoprire interattori del recettore ancora sconosciuti e confrontare i diversi interattomi di linee cellulari di CM ormono-dipendenti con quelli di cellule ormono-indipendenti, in modo da definire i *partners* proteici che, interagendo con i RE, portano alla perdita del fenotipo ormono-responsivo. Inoltre, purificazioni eseguite in parallelo, partendo da estratti proteici delle cellule da noi studiate e da cellule esprimenti i differenti *partners* mutati, chiariranno l'effetto di mutazioni sulle interazioni proteiche e sull'assemblaggio dei complessi macromolecolari, confrontando i diversi profili proteici ottenuti dopo purificazione dei complessi WT e mutanti.

## 6 Bibliografia

- 1 Henderson BE., Bernstein L., Ross RK. HORMONES AND THE ETIOLOGY OF CANCER. In: Cancer Medicine, 5th ed., Canada; 2000.
- 2 Bonadonna G., Valagussa P. NEOPLASIE DELLA MAMMELLA. In: Medicina oncologica. 6° edizione. Bonadonna G, Robustelli della Cuna G. Masson, Milano. 1999; p. 719 sgg.
- 3 Razandi M., Pedram. A, Marchentah I., Greene et al. PLASMA MEMBRANE ESTROGEN RECEPTORS EXISTS AND FUNCTION AS DIMMERS. Molecular Endocrinology, 2004 18(12):2854-2865
- 4 Razandi M., Alton G., Pedram A. et al. IDENTIFICATION OF A STRUCTURAL DETERMINANT NECESSARY FOR THE AT THE PLASMA MEMBRANE. LOCALIZATION AND FUNCTION OF THE ESTROGEN RECEPTOR  $\alpha$  Molecular and Cellular Biology, 2003; p. 1633-1646
- 5 Watanabe T., Inoue S., Sumito O. AGONISTIC EFFECT OF TAMOXIFEN IN DEPENDENT ON CELL TYPE, ERE-PROMOTER CONTEXT, AND ESTROGEN RECEPTOR SUBTYPE: FUNCTIONAL DIFFERENCE BETWEEN ESTROGEN RECEPTORS  $\alpha$  AND  $\beta$  . Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997; 236:140-145
- 6 Dechering K., Boersma C., Mosselman S. ESTROGEN RECEPTORS ALPHA AND BETA: TWO RECEPTORS OF A KIND? Current Med Chem. 2000;7(5):561-76
- 7 Puing O., Caspary F., Rigaut G., et al. THE TANDEM AFFINITY PURIFICATION (TAP) METHOD: A GENERAL PROCEDURE OF PROTEIN COMPLEX PURIFICATION. Methods 2001; 24, 218-229

- 8 Andreas Bauer and Bernhard Kuster AFFINITY PURIFICATION-MASS SPECTROMETRY POWERFUL TOOLS FOR THE CHARECTERIZATION OF PROTEIN COMPLEXES J. Biochem 2003; 270,570-5788
- 9 Anne Claude Gingras, Ruedi Aebersold and Brian Raught ADVANCES IN PROTEIN COMPLEX ANALYSIS USING MASS SPECTROMETRY J Physiol 563.1 (2005) pp 11-21
- 10 Andrew J. Ling, Tracey C., Fleischer, Connie M., Weaver, Vincent R.,Gerbasi, Jennifer L. Jennings PURIFYNG PROTEIN COMPLEXES FOR MASS-SPECTROMETRY: APPLICATIONS TO PROTEIN TRANSLATION Methods 35,2005, 274-290
- 11 Gavin Ac, Bosche M, Superti-Furga G. FUNCTIONAL ORGANIZARION OF THE YEAST PROTEOME BY SYSTEMATIC ANALYSIS OF PROTEIN COMPLEXES. Nature 2002; 415:141-147
- 12 Endoch H., Maruyama K., Masuhiro Y., Kobayashi Y.,Goto M.,Tai H.,Yanagisawa J.,Metzger D., Hashimoto S.,Kato Shigeaki. PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF P68 RNA HELICASE ACTING AS A TRANSCRIPTIONAL COACTIVATOR SPECIFIC FOR THE ACTIVATION FUNCTION 1 OF HUMAN ESTROGEN RECEPTOR  $\alpha$ . Mol. and Cell. Biol. 1999; vol 19 No 8 5363-5372
- 13 Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. ACCURATE TRANSCRIPTION INITIATION BY RNA POLYMERASE II IN A SOLUBLE EXTRACT FROM ISOLATED MAMMALIAN NUCLEI. Nucleic Acids Res. 1983 Mar 11;11(5):1475-89.