

# Meccanismi molecolari di trasduzione del segnale

## IV Recettori per gli ormoni steroidei

Copyright © 2001-2019 by Giorgio Sartor.  
All rights reserved.

M04-04 - Versione 1.4.1 - 20/10/2019

1

# Recettori degli ormoni steroidei

**Canale ionico controllato**  
Si apre o chiude in risposta alla concentrazione di un ligando o di un potenziale di membrana

**Recettore a sette eliche transmembrana**  
Il ligando si lega al recettore e attiva una proteina intracellulare che lega GTP e che regola un enzima che catalizza la sintesi di un secondo messaggero

**Recettore senza attività enzimatica intrinseca**  
Interagisce con una protein chinasi citosolica che agisce sull'espressione genica direttamente o attraverso una cascata di protein chinasi

**Membrana plasmatica**

**Specie ionica**

**Recettore enzimatico**  
Il ligando si lega al dominio extracellulare e stimola un'attività enzimatica intracellulare

**Recettore degli ormoni steroidei**  
L'ormone si lega ad un recettore nucleare che regola l'espressione genica

**Membrana Nucleare**

**Recettore di adesione**  
Il ligando si lega ad un dominio extracellulare, cambia conformazione e cambia la sua interazione con il citoscheletro

**Cascata delle chinasi**

**DNA**

**mRNA**

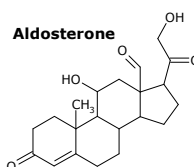
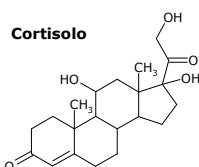
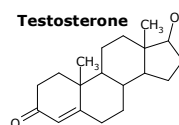
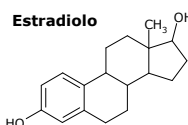
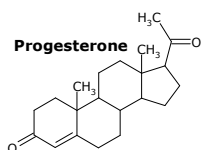
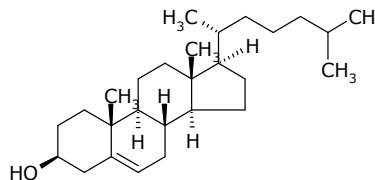
**Proteina**

v. 1.4.1 © gsartor 2019 M04 - Trasduzione del segnale IV 2

2

# Ormoni steroidei

- Precursore comune: Colesterolo
- Secreti da:
  - Organi riproduttivi
  - Corteccia surrenale
- Metaboliti attivi della Vitamina D

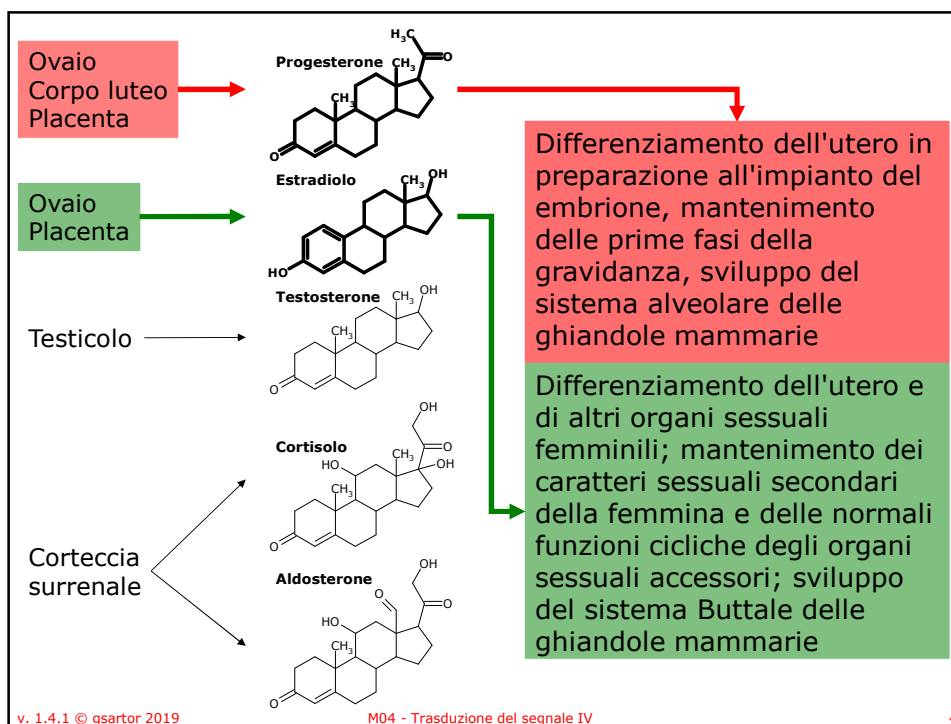


v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

3

3

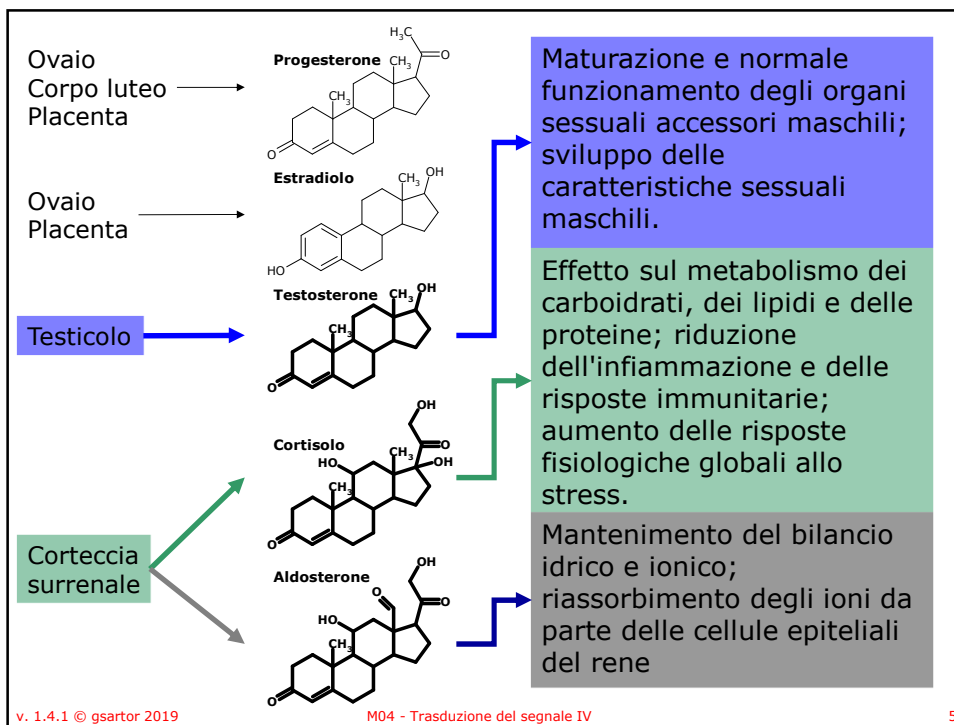


v. 1.4.1 © gsartor 2019

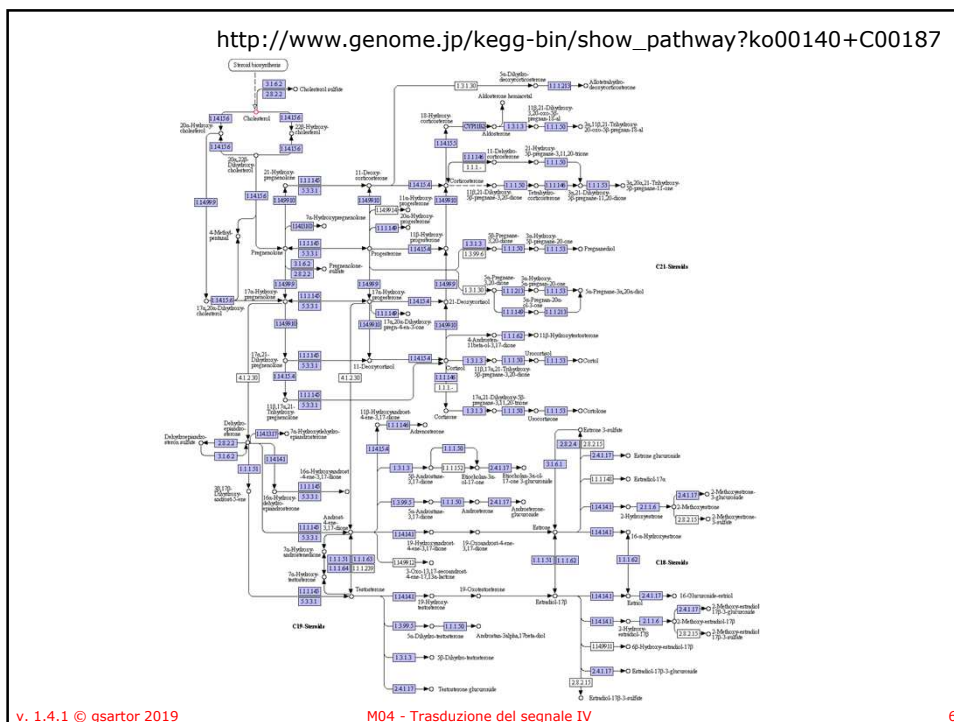
M04 - Traduzione del segnale IV

4

4



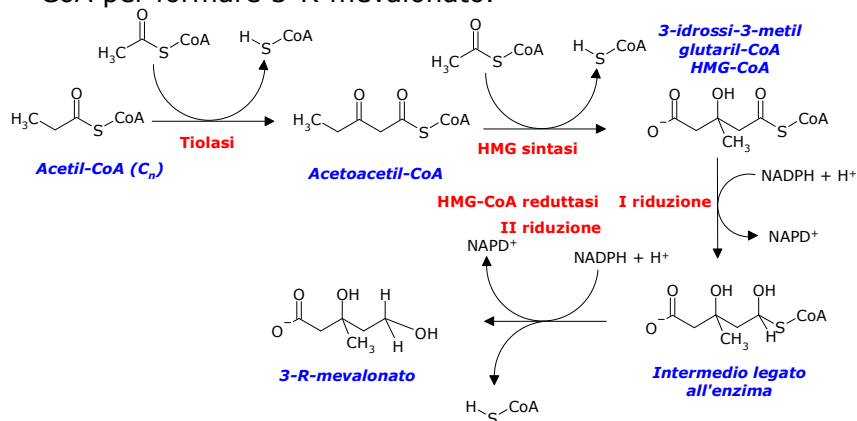
5



6

## Biosintesi del colesterolo

- Viene sintetizzato nelle cellule epatiche a partire da acetil-CoA per formare 3-R-mevalonato.



v. 1.4.1 © gsartor 2019

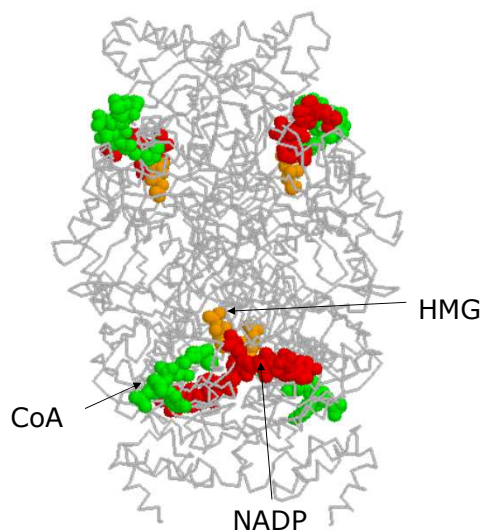
M04 - Trasduzione del segnale IV

7

7

## HMG reduttasi EC 1.1.1.34

- È una glicoproteina di membrana del reticolo endoplasmatico,
- Il suo peso molecolare è di 97 kD,
- Il sito attivo è rivolto verso il citoplasma.
- È anch'essa regolata dal sistema protein chinasi.



v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

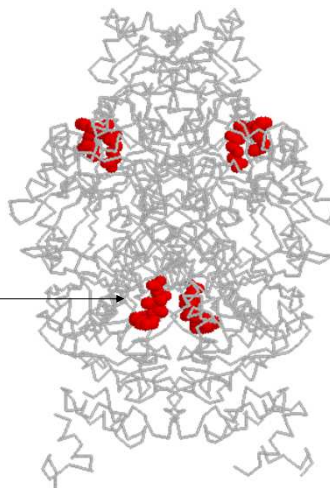
8

8

## HMG reduttasi EC 1.1.1.34

- Viene inibita dalle statine, usate come farmaci per ridurre elevati livelli di colesterolo.

Mevastatina



v. 1.4.1 © gsartor 2019

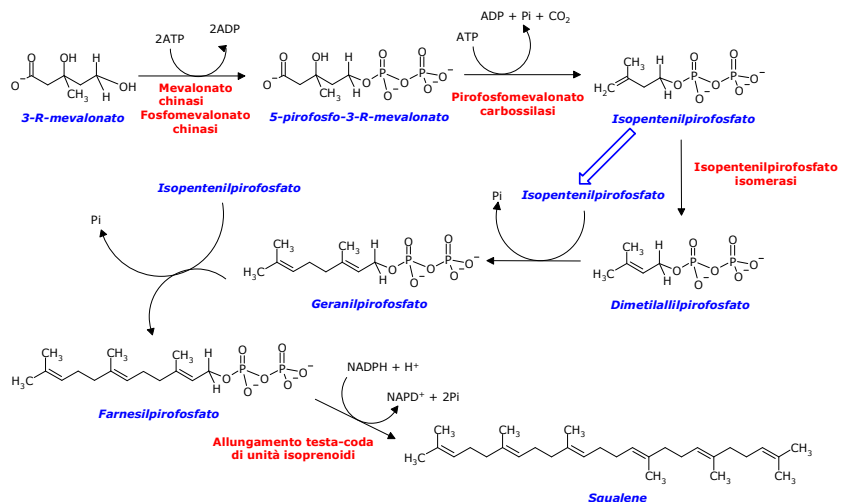
M04 - Traduzione del segnale IV

9

9

## Biosintesi del colesterolo

- Il mevalonato viene convertito in squalene attraverso l'allungamento con unità isoprenoidi.



v. 1.4.1 © gsartor 2019

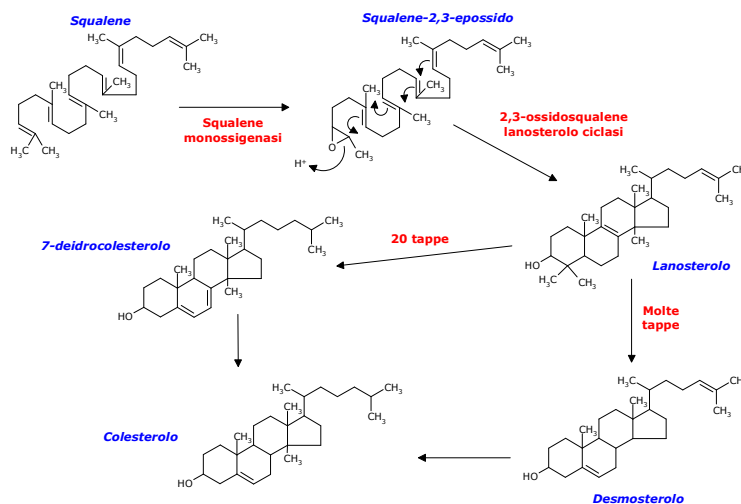
M04 - Traduzione del segnale IV

10

10

## Biosintesi del colesterolo

- Lo squalene viene convertito in colesterolo attraverso monossigenasi e cicliasi.



v. 1.4.1 © gsartor 2019

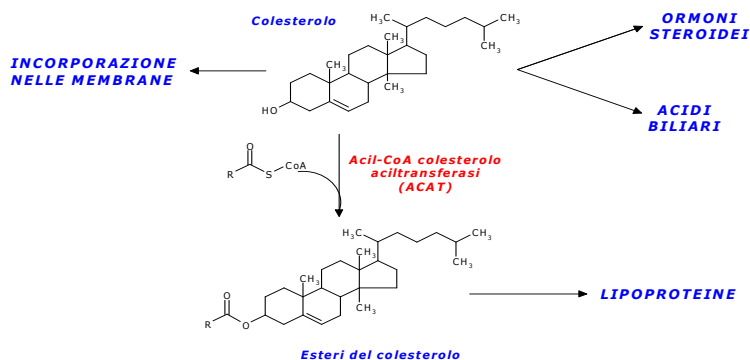
M04 - Traduzione del segnale IV

11

11

## Destino del colesterolo

- Il colesterolo può:
  - entrare nella costituzione delle membrane,
  - essere convertito in esteri del colesterolo e trasportato dalle lipoproteine alle cellule bersaglio
  - essere sorgente per la sintesi degli ormoni steroidei e gli acidi biliari.

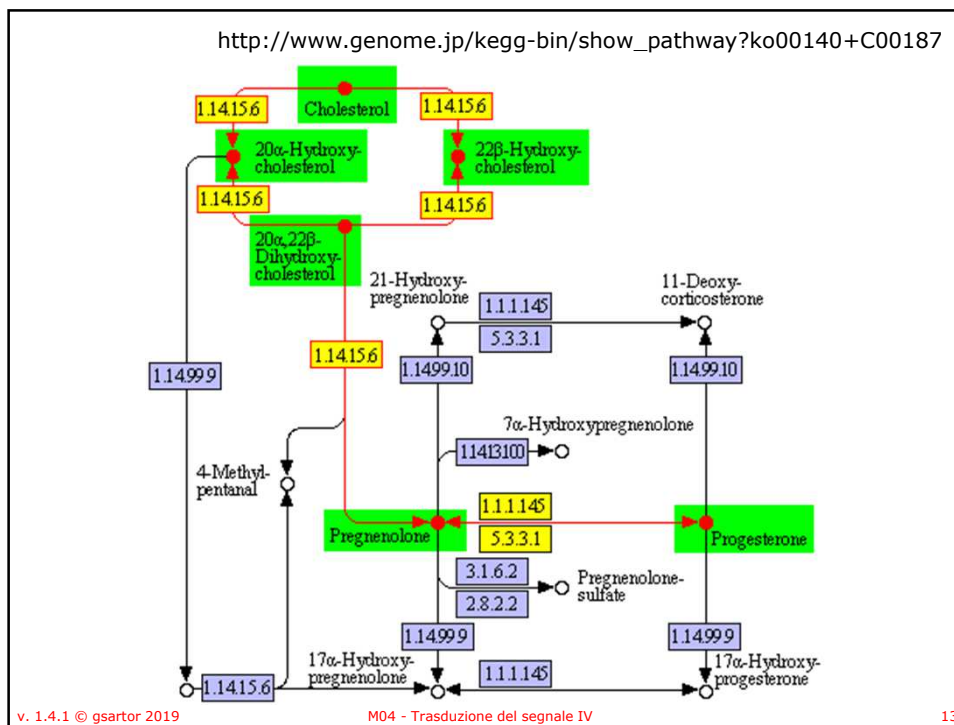


v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

12

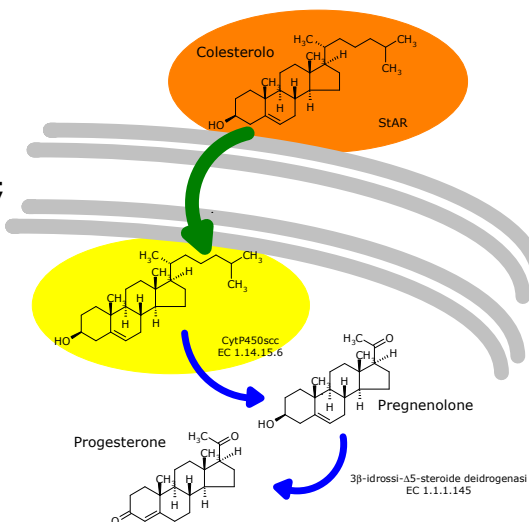
12



13

## Sintesi del progesterone

- Il colesterolo viene trasportato nel mitocondrio grazie ad una proteina di trasporto: *Steroidogenic Acute Regulatory protein* (StAR), (rate-limiting step);
- Viene processato da CytP450scc (side chain cleavage) che causa il taglio della catena laterale del colesterolo per formare pregnenolone;
- Il pregnenolone viene quindi ossidato a progesterone.



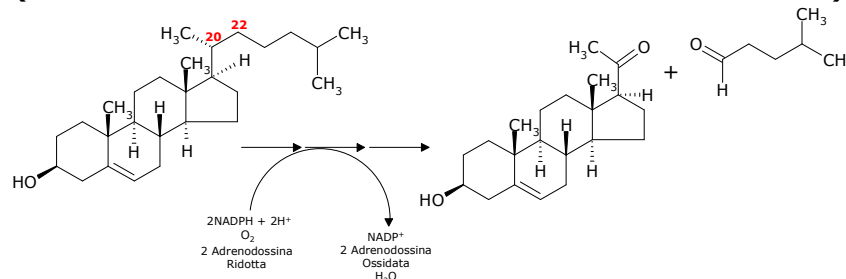
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

14

14

## Colesterolo monoossigenasi (CYTP450scc - EC 1.14.15.6 - CYP11A)



- CytP450scc catalizza una reazione in tre stadi:
  - Idrossilazione al C22
  - Idrossilazione al C20
  - Taglio tra C20 e C22
- La sorgente iniziale di elettroni è NADPH che trasferisce elettroni all'adrenodossina via adrenodossina-NADP<sup>+</sup> reduttasi.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

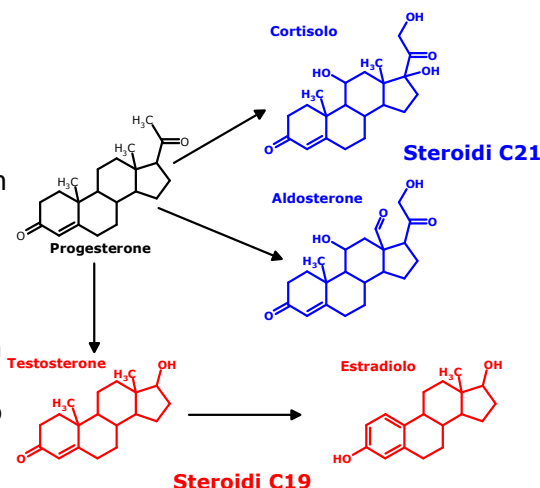
M04 - Trasduzione del segnale IV

15

15

## Sintesi ormoni steroidei

- Tutti gli ormoni steroidei nei mammiferi sono sintetizzati a partire dal colesterolo attraverso un intermedio comune, il progesterone
- Gli enzimi della steroidogenesi sono in parte mitocondriali ed in parte microsomiali, con conseguente movimento dei substrati dentro e fuori dal mitocondrio



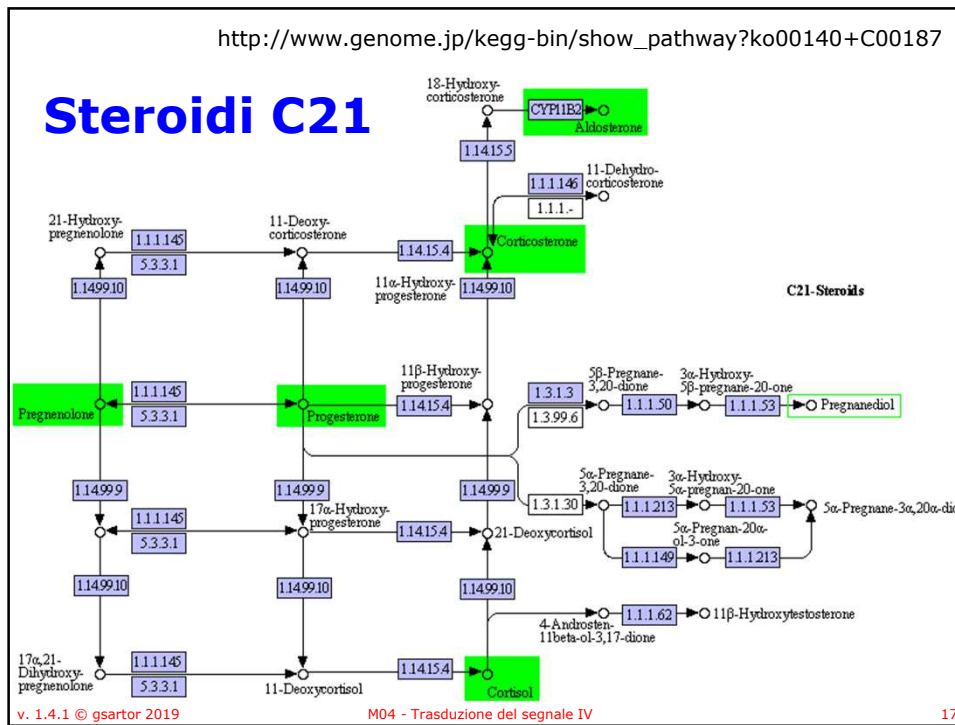
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

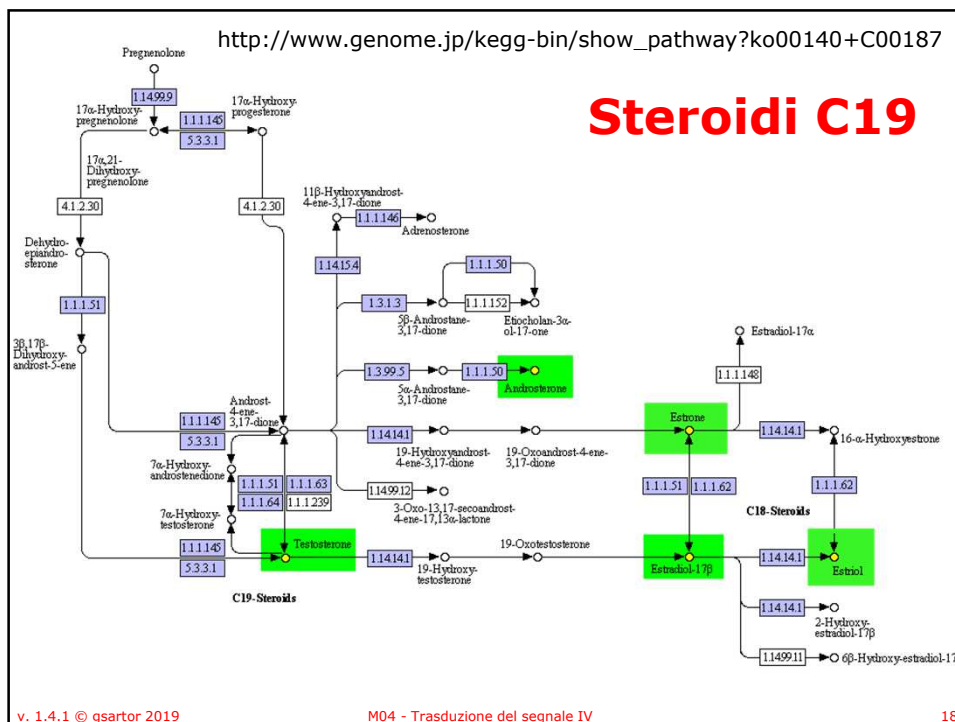
16

16



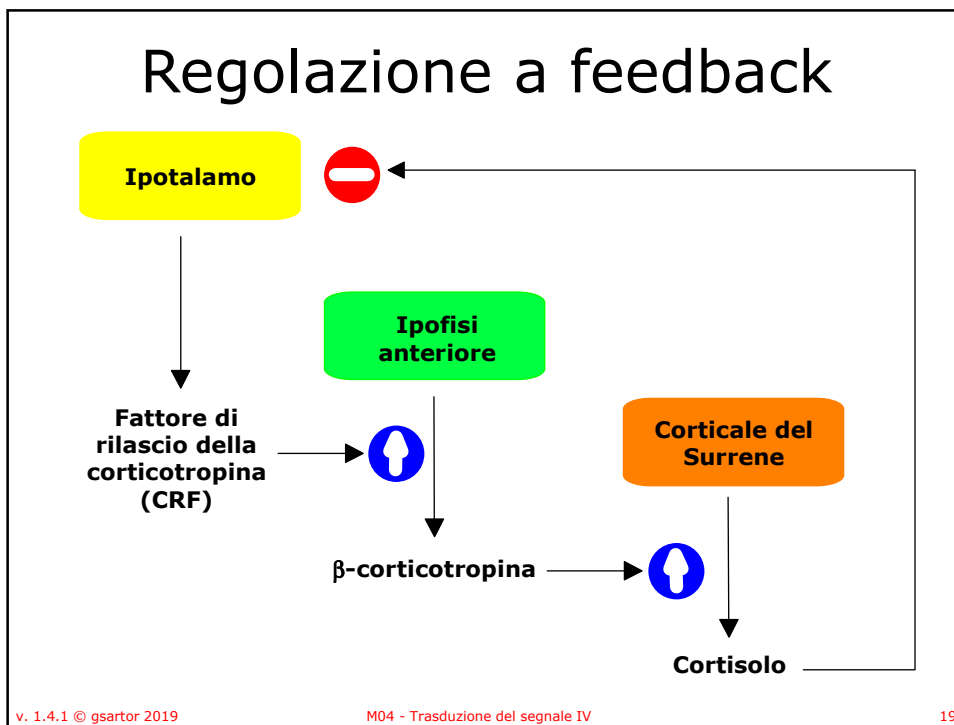


17

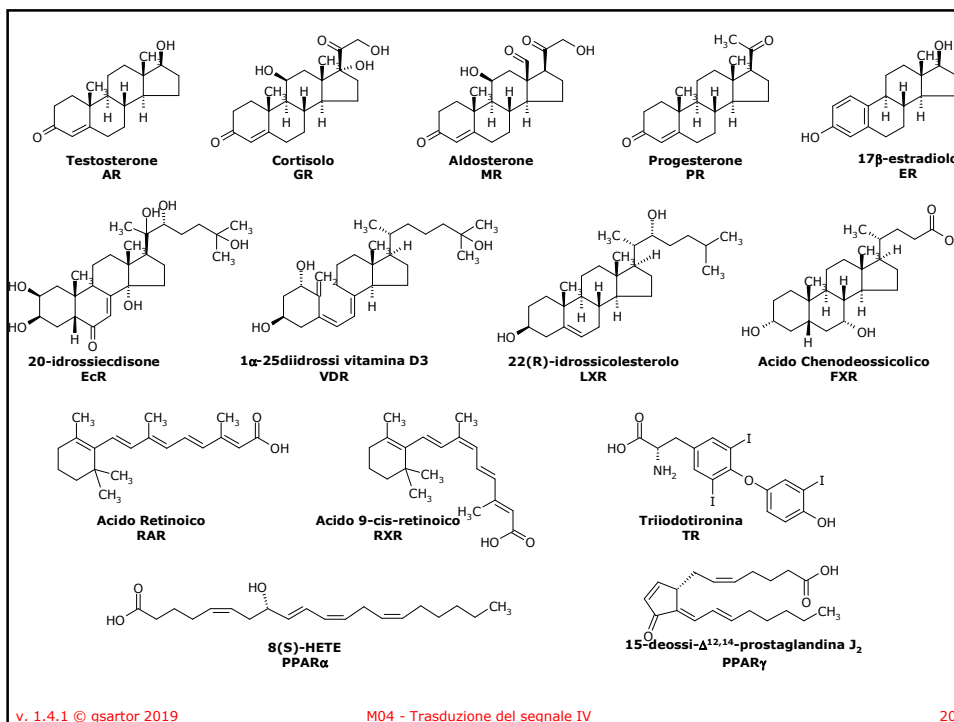


18

# Regolazione a feedback



19



20

## Azione degli ormoni steroidei

- Gli ormoni steroidei sono immessi in circolo e si legano a proteine di trasporto
- Tali proteine mantengono una riserva circolante di ormoni in caso di improvvisi cambiamenti della loro concentrazione plasmatica e prolungano la vita media degli ormoni.
  - **Glucocorticoidi e progestinici** → transcortina o CBG (corticosteroid-binding globulin)
  - **Aldosterone** → non si lega ad una proteina specifica
  - **Androgeni ed estrogeni** → SHBG (sex hormone-binding globulin)
- Gli ormoni steroidei agiscono tramite recettori intracellulari, espressi nelle cellule bersaglio
- Gli estrogeni esplicano parte della loro azione **anche** tramite un recettore metabotropo (detto GPR30: G protein-coupled receptor 30 o GPER1: G protein-coupled estrogen receptor 1) che attiva una proteina Gq

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

21

21

## Stadi dell'azione degli ormoni steroidei

- A. Riconoscimento della struttura ormonale da parte della cellula bersaglio;
- B. passaggio dell'ormone all'interno della cellula;
- C. sua captazione da parte di una proteina specifica definita "recettore";
- D. traslocazione del complesso ormone-recettore attivato nel nucleo e legame alla cromatina nucleare;
- E. dissociazione dalla molecola recettoriale ed attivazione della RNA polimerasi;
- F. sintesi di RNA messaggero per la sintesi di proteine che determinano l'azione dello steroide.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

22

22

## Estrogeni (ER)

- Gli estrogeni hanno un ruolo fondamentale nei processi di crescita e differenziamento cellulari, soprattutto a livello degli organi riproduttivi femminili e maschili, delle ghiandole mammarie e dei sistemi scheletrico e cardiovascolare.
  - **17 $\beta$ -estradiolo (E2)**: prodotto soprattutto dalle ovaie, specificamente dalle cellule della teca e della granulosa dei follicoli, dal corpo luteo e dall'unità feto-placentare durante la gravidanza; è l'estrogeno con maggiore attività.
  - **Estrone**: prodotto principalmente a livello ovarico, è l'estrogeno maggiormente presente nelle donne dopo la menopausa;
  - **Estriolo**: deriva dall'ossidazione degli altri estrogeni, che avviene principalmente a livello del fegato, ed acquista un ruolo rilevante nell'organismo solo se è presente in elevate concentrazioni, condizione che si verifica durante la gravidanza.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

23

23

## Recettori degli estrogeni (ER)

- L'attività degli estrogeni avviene mediante il legame ai **recettori** per gli estrogeni
- **Recettori di tipo I**:
  - si trovano sotto forma di omodimeri o eterodimeri, complessati con le proteine dello shock termico, (Hsp) nel citoplasma.
  - Gli estrogeni attraversano per diffusione le membrane cellulari e, una volta giunti legano gli ER con interazioni non covalenti, provocandone la dissociazione dalle Hsp.
  - Il complesso estrogeno-recettore migra nel nucleo dove riconosce e lega regioni specifiche di DNA (Estrogen Response Elements: ERE), modulando il processo di trascrizione di geni bersaglio degli estrogeni.
- **Recettori di tipo II**:
  - non sono legati a Hsp, e sono localizzati nel nucleo

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

24

24

## Recettore cellulare

### A. alta affinità di legame

- L'alta affinità di legame è indispensabile per la definizione di **recettore ormonale**: gli **ormoni steroidei** sono presenti nel plasma e nei tessuti in concentrazione relativamente bassa e spesso legati a strutture proteiche, con bassa affinità, non definibili quindi come recettori.

### B. capacità limitata

- Il **recettore è saturabile** e quindi è limitato il numero di molecole capaci di entrare nella cellula bersaglio. La saturabilità della proteina legante recettoriale varia nelle diverse situazioni fisiologiche e determina l'ampiezza della risposta biologica. La **concentrazione dei recettori** per cellula bersaglio è compresa tra  $10^3$  e  $10^5$ ;

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

25

25

## Recettore cellulare

### C. specificità

- Ogni **recettore è specifico** per una classe di ormoni (il recettore per gli estrogeni lega solo le strutture di tipo estrogenico), con risposta cellulare specifica;

### D. reversibilità di legame

- Il **complesso ormone-recettore (HR) è dissociabile**; quando il legame è specifico la velocità di dissociazione è lenta;

### E. specificità tissutale

- La differenza tra organi **non ormono-responsivi** ed organi **ormono-responsivi** risiede nella distribuzione sia quantitativa che qualitativa dei recettori;

### F. risposta biologica

- Una risposta biologica specifica definisce sia il recettore, sia l'organo bersaglio: la presenza della risposta biologica testimonia la presenza di un recettore specifico.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

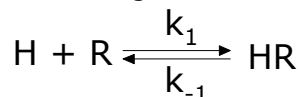
M04 - Trasduzione del segnale IV

26

26

## Cinetica del legame recettoriale

Il legame ormone-recettore segue la reazione:



Indicando con  $k_1$  e  $k_{-1}$  le costanti di associazione e dissociazione rispettivamente, quando il sistema è all'equilibrio le velocità di associazione e dissociazione sono uguali e si ottiene:

$$\frac{[H][R]}{[HR]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_d$$

[H] = concentrazione dell'ormone libero  
[R] = concentrazione del recettore libero

dove  $K_d$  è la costante di dissociazione all'equilibrio e rappresenta la misura dell'affinità del recettore all'equilibrio.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

27

27

## Cinetica del legame recettoriale

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

$$[HR] = [H][R] \frac{1}{K_d}$$

Che viene definita come **risposta biologica** che dipende quindi da:

**Concentrazione dell'ormone libero;**  
**Concentrazione del recettore;**  
**Costante di affinità dell'ormone per il recettore;**

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

28

28

## Cinetica del legame recettoriale

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

$$[HR] = [H][R] \frac{1}{K_d}$$

Che viene definita come **risposta biologica** che dipende quindi da:

- Concentrazione dell'ormone libero;**
- Concentrazione del recettore;**
- Costante di affinità dell'ormone per il recettore;**

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

29

29

## Cinetica del legame recettoriale

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

$$[HR] = [H][R] \frac{1}{K_d}$$

Che viene definita come **risposta biologica** che dipende quindi da:

- Concentrazione dell'ormone libero;**
- Concentrazione del recettore;**
- Costante di affinità dell'ormone per il recettore;**

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

30

30

## Cinetica del legame recettoriale

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

$$[HR] = [H][R] \frac{1}{K_d}$$

Che viene definita come **risposta biologica** che dipende quindi da:

**Concentrazione dell'ormone libero;**

**Concentrazione del recettore;**

**Costante di affinità dell'ormone per il recettore;**

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

31

31

## Cinetica del legame recettoriale

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

$$[HR] = [H][R] \frac{1}{K_d}$$

Che viene definita come **risposta biologica** che dipende quindi da:

**Concentrazione dell'ormone libero;**

**Concentrazione del recettore;**

**Costante di affinità dell'ormone per il recettore;**

v. 1.4.1 © gsartor 2019

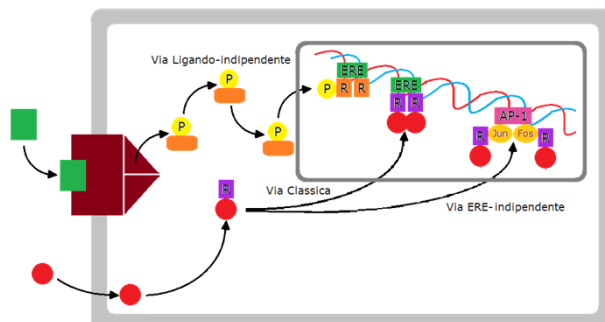
M04 - Trasduzione del segnale IV

32

32



## Meccanismi d'azione degli estrogeni



- Gli effetti biologici degli estrogeni sono mediati da almeno quattro diverse vie di segnalazione:
  1. via classica (ligando dipendente);
  2. via ligando indipendente;
  3. via ERE-indipendente;
  4. via non genomica.
- La regolazione di questi meccanismi è fondamentale per il mantenimento di una corretta omeostasi cellulare.

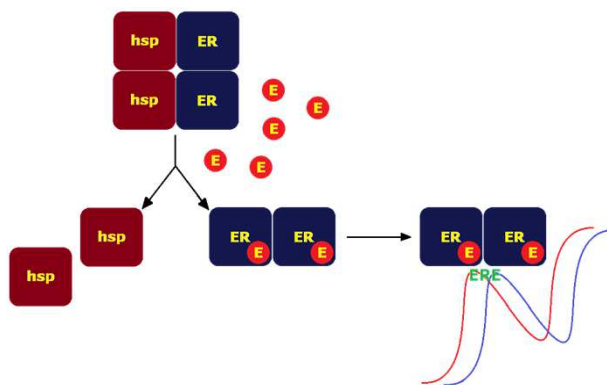
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

33

33

## Via classica ligando-dipendente



- L'azione dei recettori degli estrogeni sui siti ERE è un classico esempio di azione genomica dei recettori nucleari.
- In assenza di ligando estrogenico, ER è mantenuto a livello nucleare complessato con le proteine hsp70, hps90 e hps56.

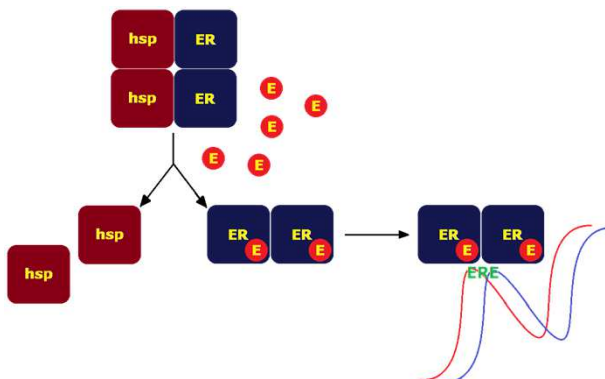
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

34

34

## Via classica ligando-dipendente



- L'azione dei recettori degli estrogeni sui siti ERE è un classico esempio di azione genomica dei recettori nucleari.
- In assenza di ligando estrogenico, ER è mantenuto a livello nucleare complessato con le proteine hsp70, hsp90 e hsp56.

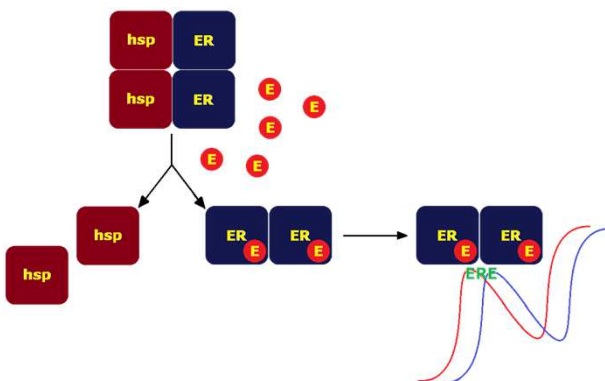
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

35

35

## Via classica ligando-dipendente



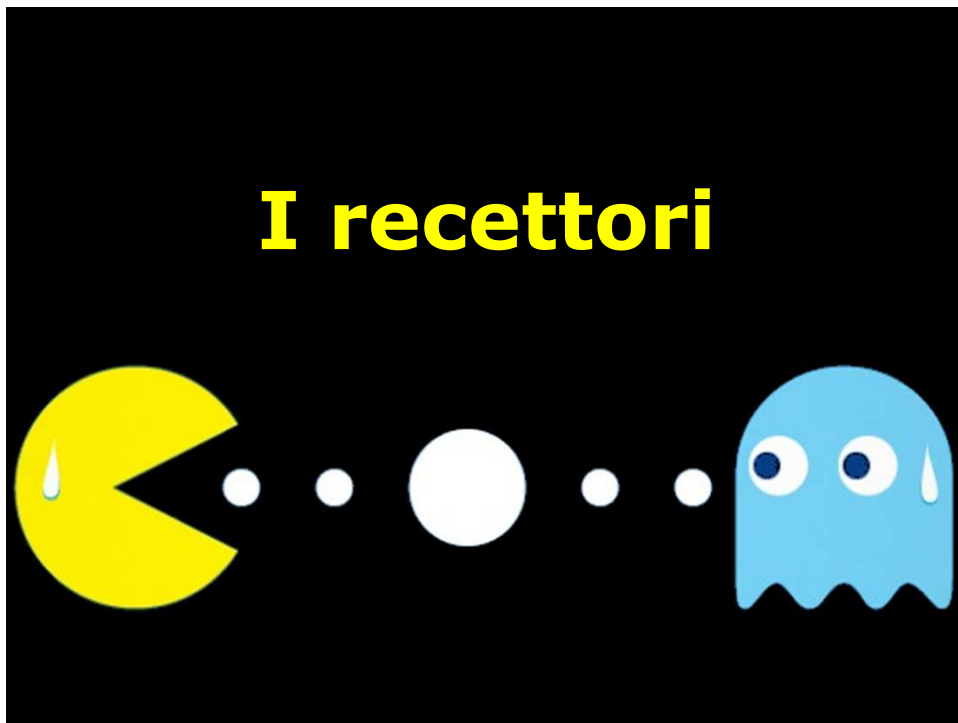
- In seguito al legame con l'estrogeno, il recettore va incontro a cambiamenti conformazionali che interessano soprattutto il dominio di legame del ligando (LBD), in particolare l'elica 12, determinando il distacco dalle hsp, la dimerizzazione ed il legame al DNA.
- Quest'ultimo avviene in corrispondenza delle sequenze ERE, elementi *enhancer* localizzate in *cis* in geni sottoposti a controllo estrogenico.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

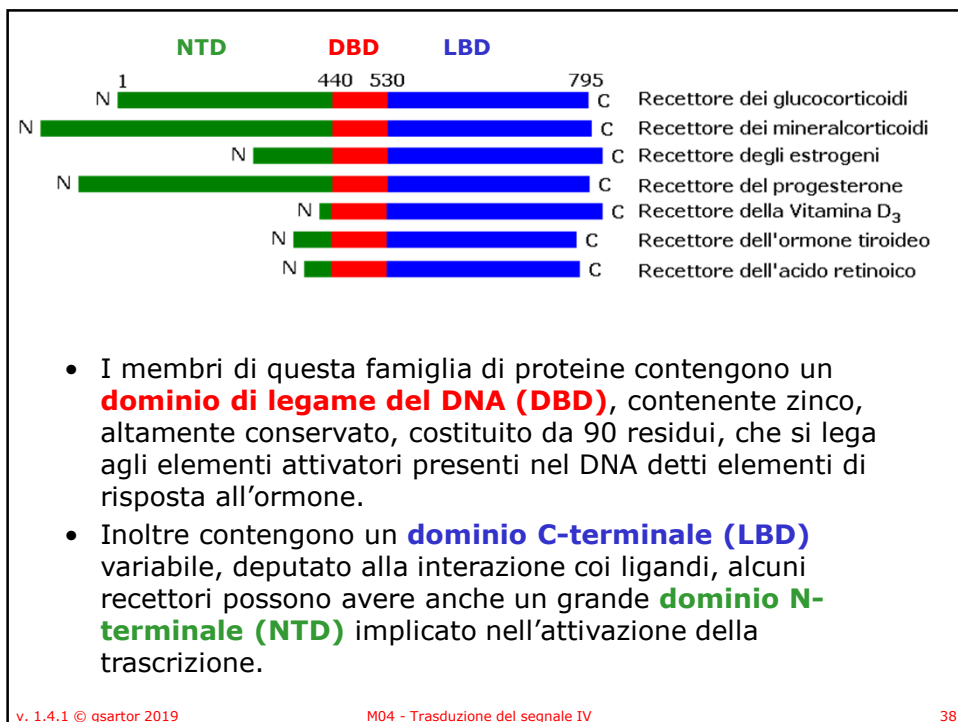
M04 - Trasduzione del segnale IV

36

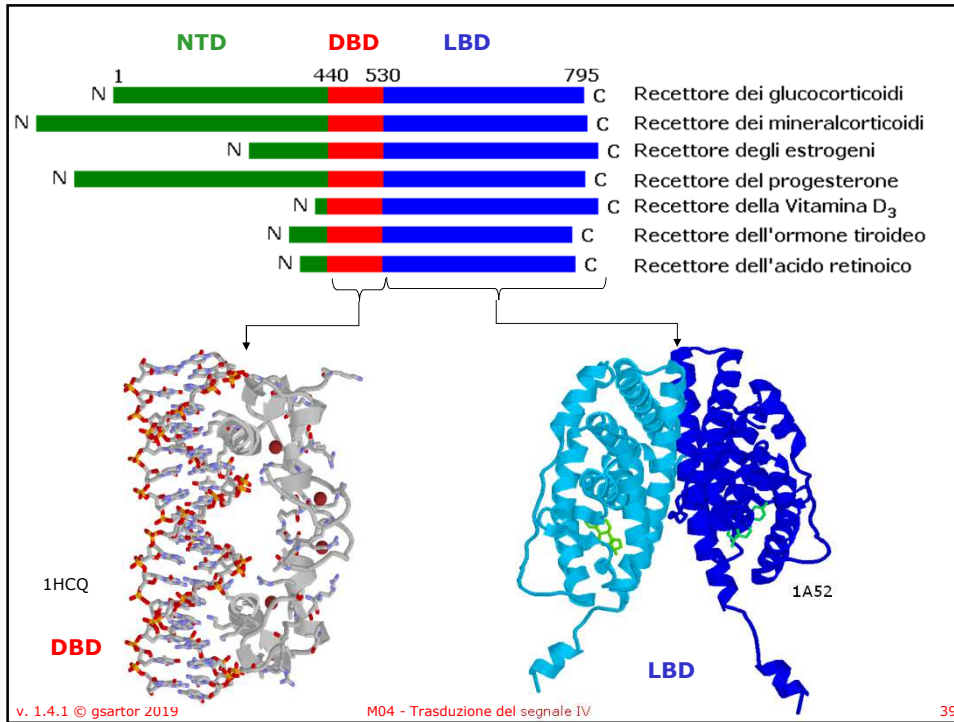
36



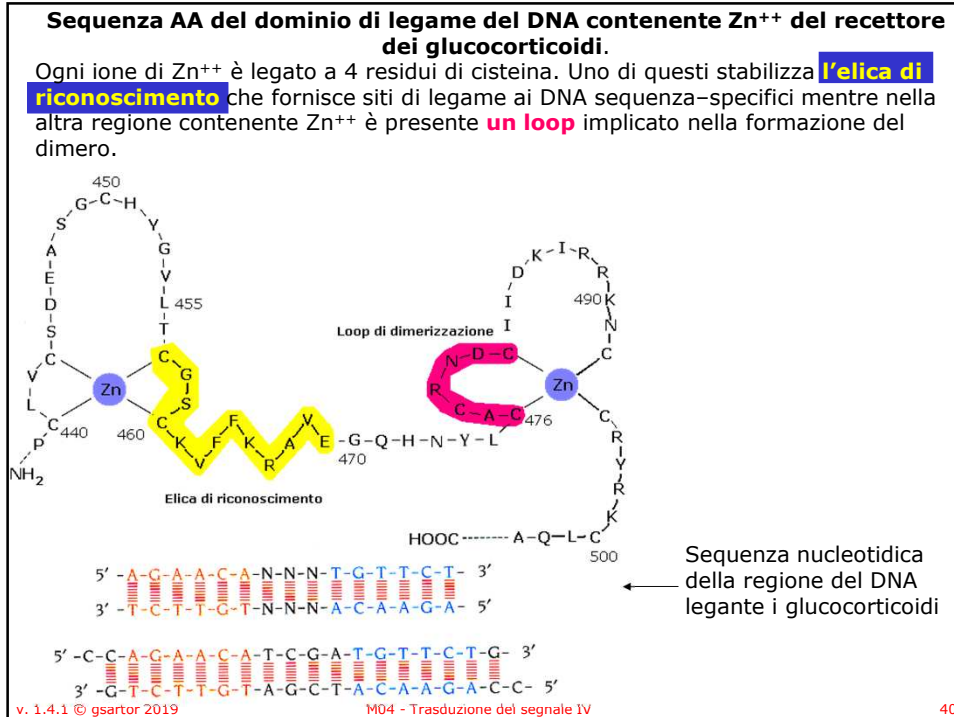
37



38

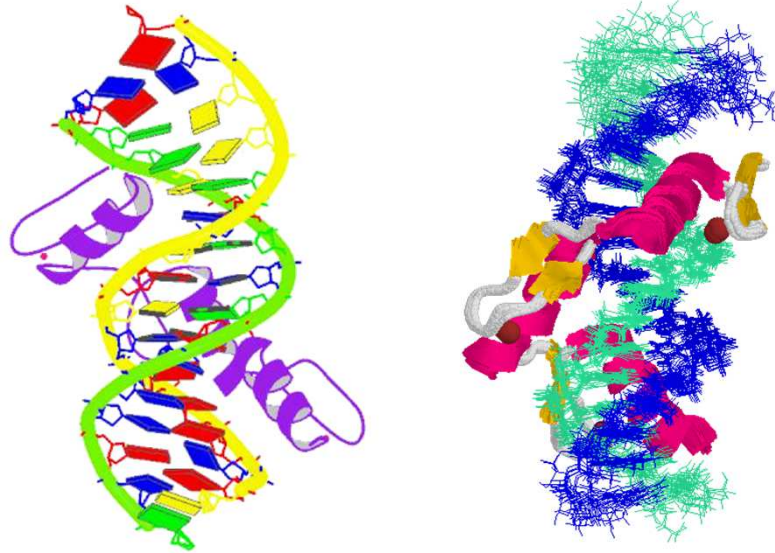


39



40

**Sequenza AA del dominio di legame del DNA contenente Zn del recettore dei glucocorticoidi.**



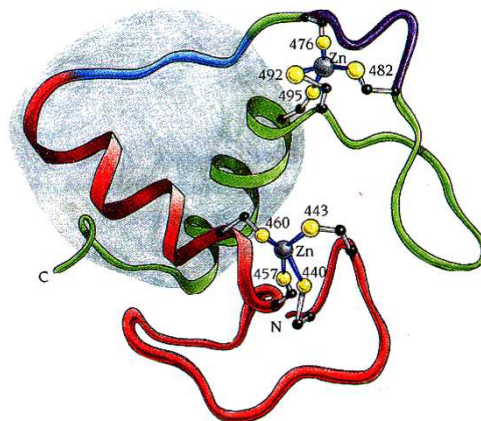
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

41

41

- Nella struttura i due motivi leganti lo ione  $Zn^{2+}$  non sono separati in due unità discrete ma sono intrecciati a formare un dominio globulare in cui sono presenti numerose interazioni tra le due unità digitiformi.
- In ognuno dei due motivi contenenti  $Zn^{2+}$ , la seconda coppia delle cisteine leganti lo  $Zn^{2+}$  dà inizio a un'α-elica anfipatica.



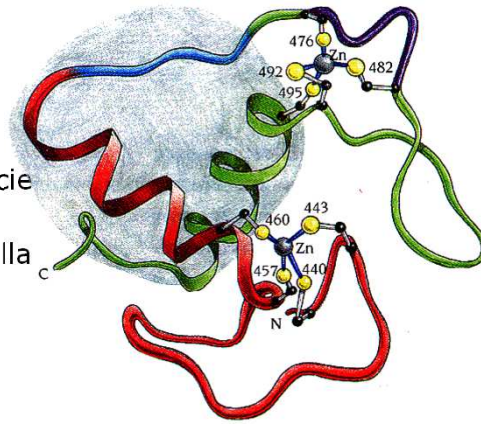
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

42

42

- I lati idrofobi delle due  $\alpha$ -eliche si impaccano l'uno contro l'altro formando un *core* con un interno idrofobo.
- Le catene laterali idrofile presenti sull'altro lato della prima  $\alpha$ -elica sono esposte al solvente e formano la superficie di interazione con il DNA.
- I due ioni  $Zn^{2+}$  e le regioni della proteina tra i ligandi di questi formano protrusioni che si proiettano da questo *core* idrofobico.



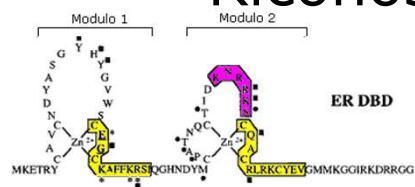
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

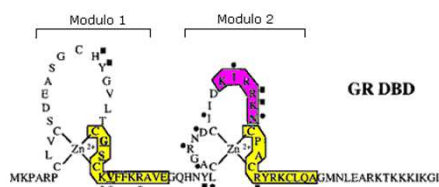
43

43

## Riconoscimento



5' - AGGCANNNTGACCT  
TCCAGTNNNAGTGA - 5' ERE



5' - AGAACANNNTGTCT  
TCTTGTNNNACAAGA - 5' GRE

- Le regioni del DNA che legano il recettore, gli elementi di risposta agli ormoni, comprendono due semisiti palindromici identici (ognuno di sei paia di basi separate da una regione spaziatrice di tre coppie di basi) la cui sequenza è indifferente ma la cui lunghezza è cruciale per il corretto legame del recettore ai due semisiti.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

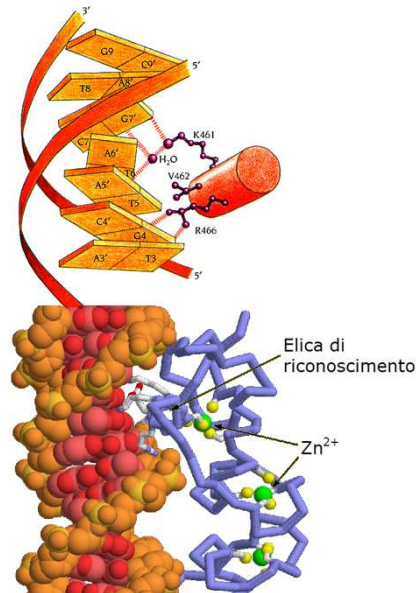
44

44

## Riconoscimento

- I contatti con i margini delle basi presenti nel solco maggiore sono dovuti alle interazioni dei tre residui presenti nella metà N-terminale dell'elica di riconoscimento del GR:

- Lys 461;
- Val 462;
- Arg 466.



v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

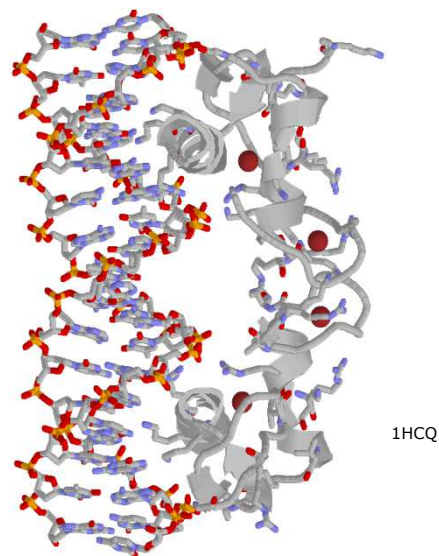
45

45

## Riconoscimento

- I contatti con i margini delle basi presenti nel solco maggiore sono dovuti alle interazioni dei tre residui presenti nella metà N-terminale dell'elica di riconoscimento del GR:

- Lys 461;
- Val 462;
- Arg 466.



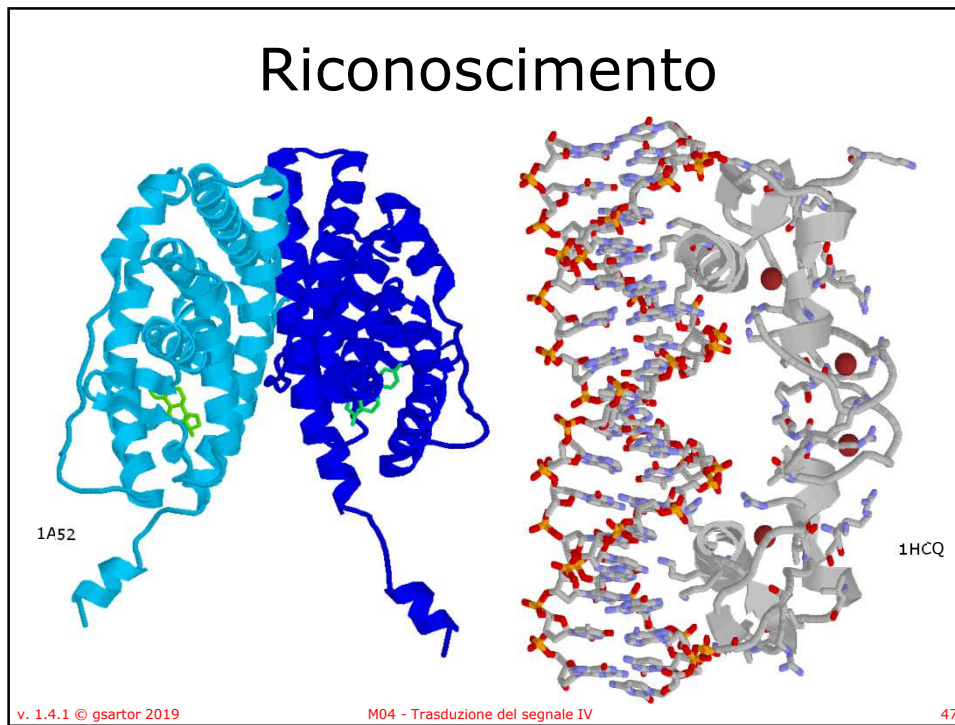
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

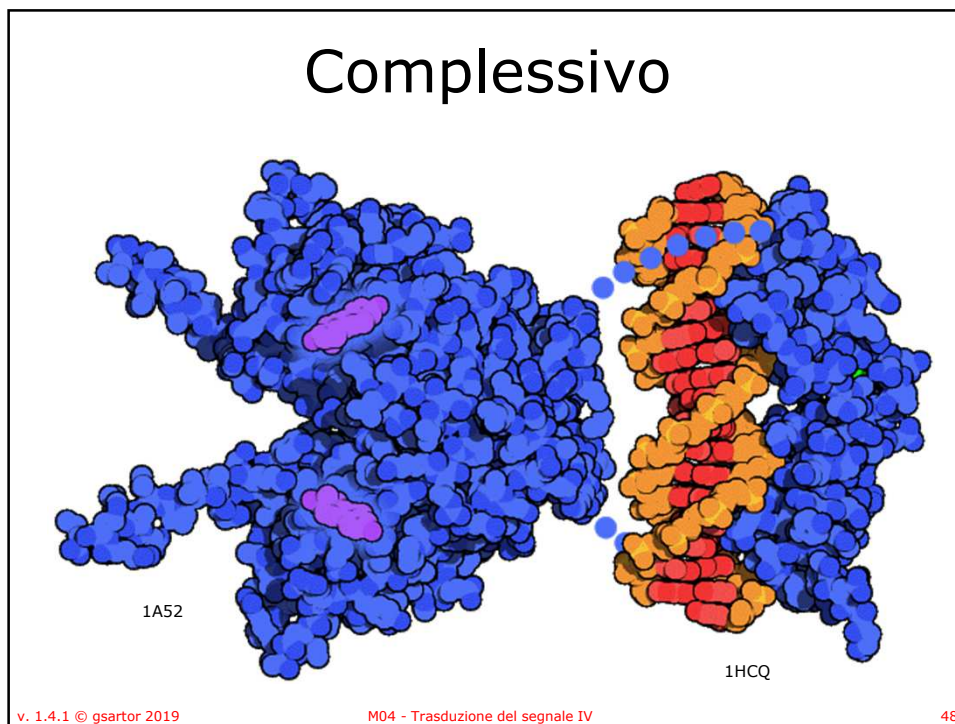
46

46





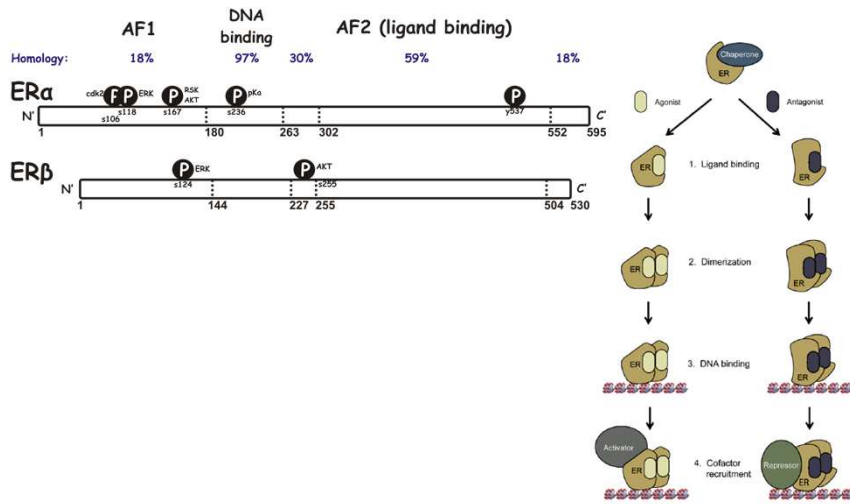
47



48



# Recettori degli estrogeni (ER)



v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

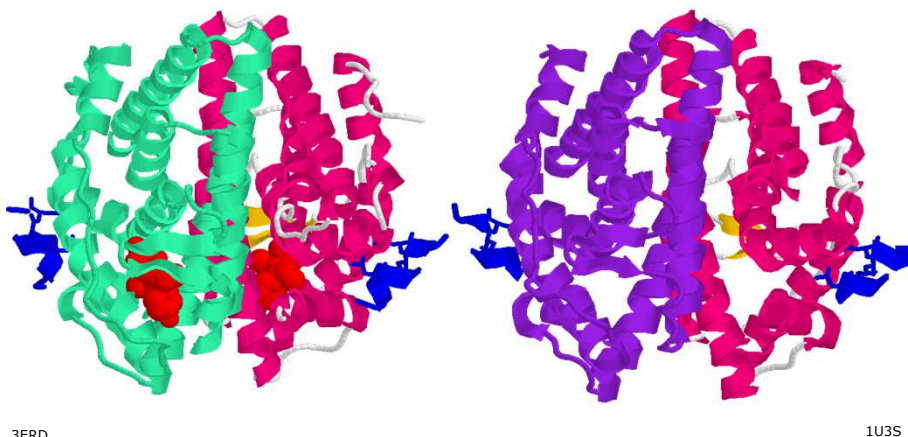
49

49

# Recettori

ERα

ERβ



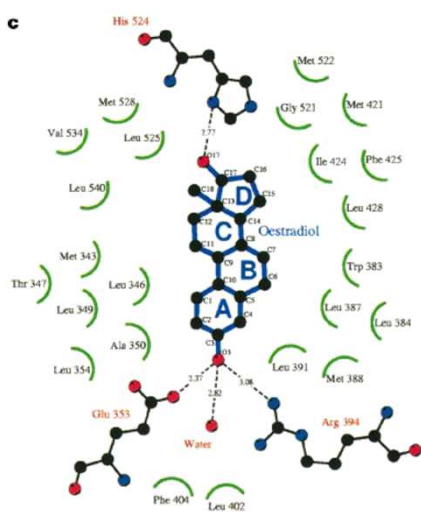
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

50

50

## Recettori degli estrogeni (ER)



- La tasca idrofobica di legame ospita al suo interno due regioni polari poste alle estremità opposte della cavità.
- Nel complesso ER $\alpha$ -E2 (17 $\beta$ -estradiolo) gli amminoacidi Glu353 e Arg394 rivestono il ruolo di punti di ancoraggio per il gruppo OH in posizione 3 di E2 e una molecola d'acqua ne stabilizza l'interazione.
- La seconda regione polare, attraverso l'amminoacido His524, interagisce invece con il gruppo OH in posizione 17.

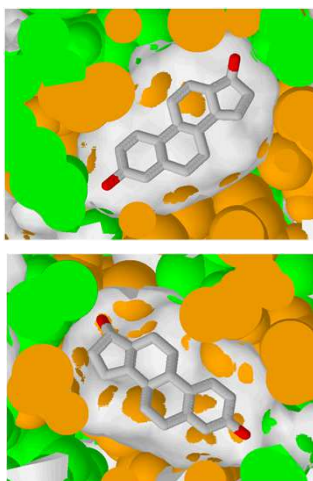
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

51

51

## Recettori degli estrogeni (ER)



1QKU

- La tasca idrofobica di legame ospita al suo interno due regioni polari poste alle estremità opposte della cavità.
- Nel complesso ER $\alpha$ -E2 (17 $\beta$ -estradiolo) gli amminoacidi Glu353 e Arg394 rivestono il ruolo di punti di ancoraggio per il gruppo OH in posizione 3 di E2 e una molecola d'acqua ne stabilizza l'interazione.
- La seconda regione polare, attraverso l'amminoacido His524, interagisce invece con il gruppo OH in posizione 17.

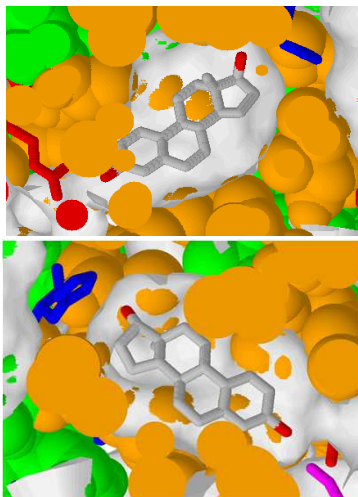
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

52

52

## Recettori degli estrogeni (ER)



1QKU

v. 1.4.1 © gsartor 2019

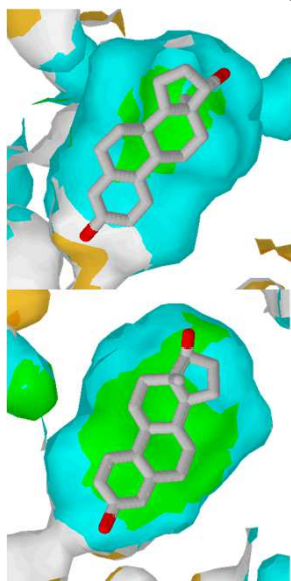
M04 - Trasduzione del segnale IV

53

53

- La **tasca idrofobica** di legame ospita al suo interno due regioni polari poste alle estremità opposte della cavità.
- Nel complesso ER $\alpha$ -E2 (**17 $\beta$ -estradiolo**) gli amminoacidi **Glu353** e **Arg394** rivestono il ruolo di punti di ancoraggio per il gruppo OH in posizione 3 di E2 e una **molecola d'acqua** ne stabilizza l'interazione.
- La seconda regione polare, attraverso l'amminoacido **His524**, interagisce invece con il gruppo OH in posizione 17.

## Recettori degli estrogeni (ER)



1QKU

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

54

54

- La **tasca idrofobica** di legame ospita al suo interno due regioni polari poste alle estremità opposte della cavità.
- Nel complesso ER $\alpha$ -E2 (**17 $\beta$ -estradiolo**) gli amminoacidi **Glu353** e **Arg394** rivestono il ruolo di punti di ancoraggio per il gruppo OH in posizione 3 di E2 e una **molecola d'acqua** ne stabilizza l'interazione.
- La seconda regione polare, attraverso l'amminoacido **His524**, interagisce invece con il gruppo OH in posizione 17.

## Recettori degli estrogeni (ER)



- Il **dominio A/B**, localizzato all'amino-terminale, è il dominio meno conservato tra i diversi membri della famiglia dei recettori nucleari ed include la regione *activation function 1* (AF1) con funzione di transattivazione.
- La funzione AF1 regola la trascrizione dei geni bersaglio, in modo ligando-indipendente. La sua variabilità strutturale è un elemento importante per conferire la specificità d'azione a ciascun recettore. In particolare, la regione AF1 di ER $\beta$  (al contrario di Er $\alpha$ ) contiene una porzione con funzione repressiva, che diminuisce l'attività trascrizionale del recettore ER $\beta$  stesso.

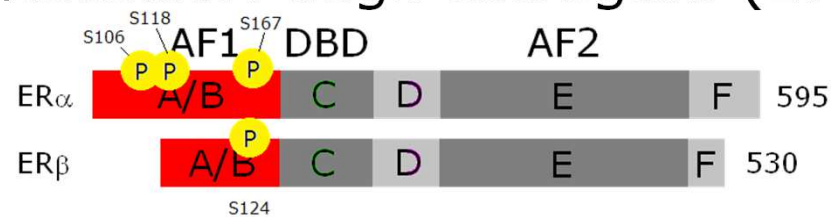
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

55

55

## Recettori degli estrogeni (ER)



- Il **dominio A/B**, presenta diversi siti di fosforilazione ed è bersaglio della via di segnalazione mediata dalle MAP kinasi.
  - Siti di fosforilazione in AF1 di Er $\alpha$ : S106 (CDK2), S118 (ERK), S167 (RSK, AKT)
  - Siti di fosforilazione in AF1 di Er $\beta$ : S124 (ERK)

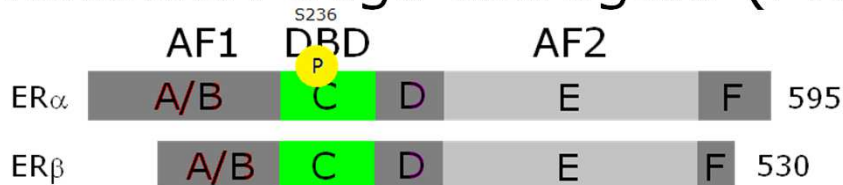
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

56

56

## Recettori degli estrogeni (ER)



- Il **dominio C** o *DNA Binding Domain (DBD)*, è il dominio più conservato tra tutti i recettori nucleari, ed è deputato al legame con il DNA e alla dimerizzazione dei recettori.
  - In ERα S236 è fosforilato da PKA
- Sono stati descritti omodimeri ed eterodimeri di recettori per gli estrogeni, con affinità paragonabili per il DNA.

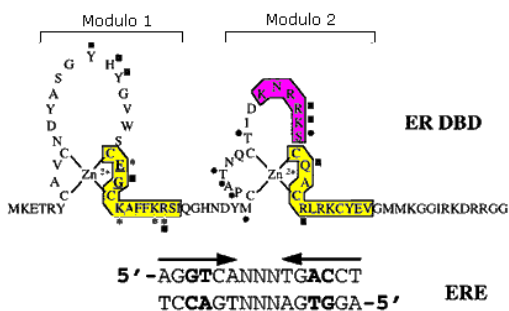
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

57

57

## Recettori degli estrogeni (ER)



- **Il dominio DBD** contiene cisteine in posizioni molto conservate che, per mezzo di legami di coordinazione con due ioni zinco, conferiscono alla proteina una conformazione spaziale detta *Zinc finger* che permette l'inserimento del recettore all'interno del solco maggiore del DNA e la formazione di ponti a idrogeno con le cariche negative del DNA.

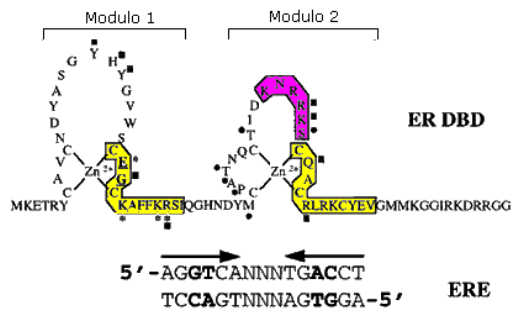
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

58

58

## Recettori degli estrogeni (ER)



- In prossimità del primo motivo zinc-finger si trova la regione P-box (*proximal-box*) responsabile del riconoscimento specifico delle sequenze di DNA, mentre in prossimità del secondo zinc-finger si trova la D-box (*distal-box*) coinvolta nella dimerizzazione dei recettori.

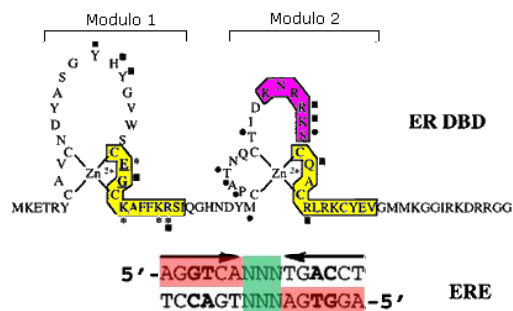
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

59

59

## Recettori degli estrogeni (ER)



- Il DBD dei recettori per gli estrogeni riconosce sequenze specifiche di DNA dette sequenze ERE (*estrogen responsive element*), sequenze palindromiche **AGGTCA** separate da **tre nucleotidi**, localizzate a livello dei promotori di geni sottoposti a controllo estrogenico.

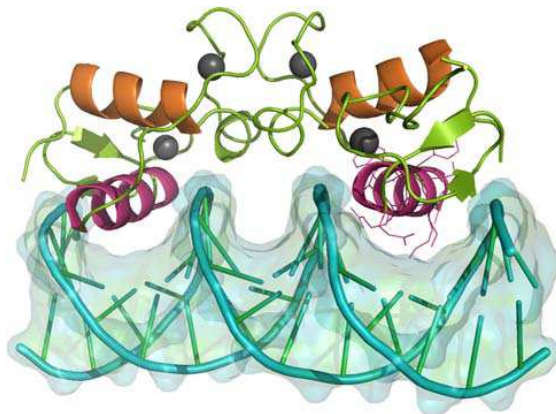
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

60

60

## Recettori degli estrogeni (ER)



- Sono presenti due motivi ad  $\alpha$ -elica: una di queste due eliche interagisce con il solco maggiore della doppia elica di DNA e l'altra ne stabilizza il complesso.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

61

61

## Recettori degli estrogeni (ER)



- Il **dominio D** è un dominio flessibile, che connette i domini C ed E e contiene un residuo fosforilabile (S255).
- Il **dominio E** rappresenta il sito di legame per il ligando (*Ligand Binding Domain, LBD*). Contiene inoltre la sequenza segnale per la localizzazione nucleare (*Nuclear Localization Signal, NLS*) e media l'interazione con le HSP.
- A livello di LBD è localizzato il dominio di transattivazione AF2 (*Activation Function 2*) che, interagendo con coattivatori e corepressori, regola la trascrizione genica in modo ligando-dipendente

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

62

62



Advanced Drug Delivery Reviews 62 (2010) 1265–1276

Contents lists available at ScienceDirect

**Advanced Drug Delivery Reviews**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/addr](http://www.elsevier.com/locate/addr)




## Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment<sup>☆</sup>

Erin K. Shanle, Wei Xu<sup>\*</sup>

*McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin, 1400 University Avenue, Madison, WI 53706, USA*  
*Molecular and Environmental Toxicology Center, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA*

---

**ARTICLE INFO**

*Article history:*  
 Received 25 February 2010  
 Accepted 4 August 2010  
 Available online 10 August 2010

**Keywords:**  
 Estrogen receptor alpha  
 Estrogen receptor beta  
 SERMs  
 SERDs  
 Selective agonist  
 Antagonist  
 Breast cancer  
 Prostate cancer  
 Colon cancer

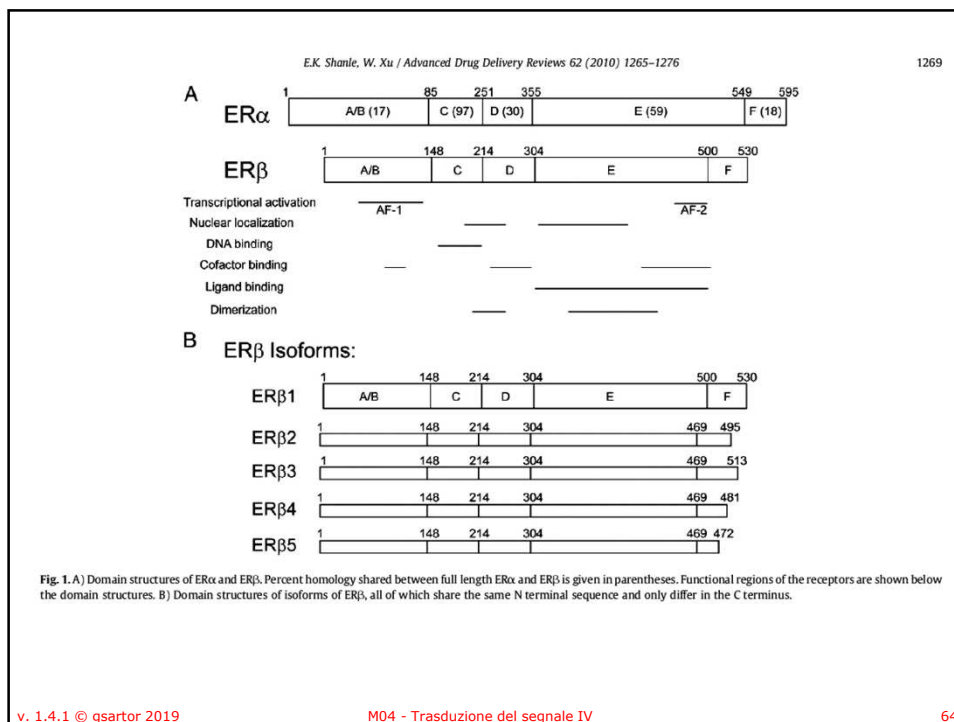
**ABSTRACT**

Estrogens regulate growth and development through the action of two distinct estrogen receptors (ERs), ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which mediate proliferation and differentiation of cells. For decades, ER $\alpha$  mediated estrogen signaling has been therapeutically targeted to treat breast cancer, most notably with the selective estrogen receptor modulator (SERM) tamoxifen. Selectively targeting ERs occurs at two levels: tissue selectivity and receptor subtype selectivity. SERMs have been developed with emphasis on tissue selectivity to target ER signaling for breast cancer treatment. Additionally, new approaches to selectively target the action of ER $\alpha$  going beyond ligand-dependent activity are under current investigation. As evidence of the anti-proliferative role of ER $\beta$  accumulates, selectively targeting ER $\beta$  is an attractive approach for designing new cancer therapies with the emphasis shifted to designing ligands with subtype selectivity. This review will present the mechanistic and structural features of ERs that determine tissue and subtype selectivity with an emphasis on current approaches to selectively target ER $\alpha$  and ER $\beta$  for cancer treatment.

Published by Elsevier B.V.

v. 1.4.1 © gsartor 2019 M04 - Trasduzione del segnale IV 63

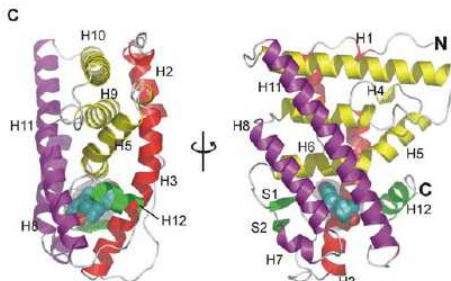
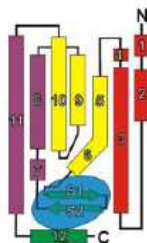
63



64



## Recettori degli estrogeni (ER)



- Le eliche si organizzano in tre strati di eliche antiparallele formando un "sandwich ad  $\alpha$ -eliche":
  - il core centrale è formato dalle eliche H5, H6, H9 e H10, ed è racchiuso tra due strati formati rispettivamente dall'eliche H1-H4 e dalle eliche H7, H8 e H11.
  - L'elica H12 e il foglietto  $\beta$  affiancano il sandwich.
  - Il sito di legame dell'ormone è una tasca idrofobica formata dalle eliche H3, H6 e H8 ed H11, e chiusa da un lato dall'elica H12, dall'altro dal foglietto  $\beta$ .

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

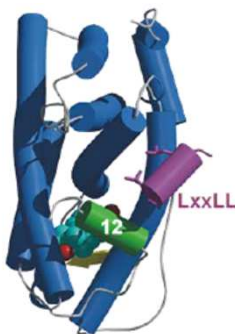
65

65

## Recettori degli estrogeni (ER)



+ AGONIST

+ AGONIST  
+ NR Box+ AF2  
ANTAGONIST

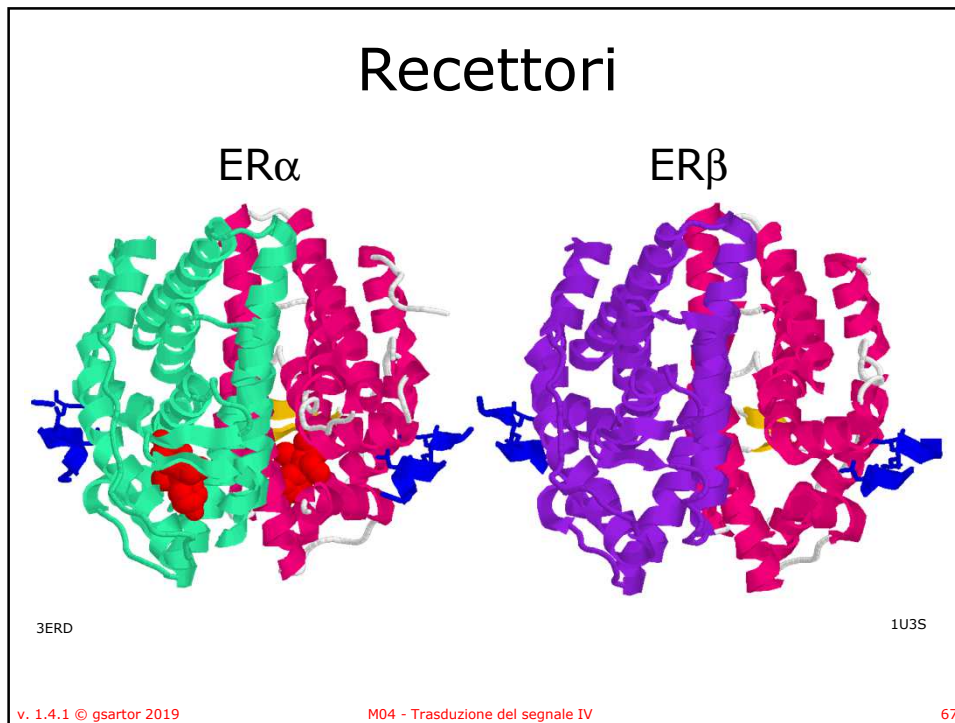
- Il dominio AF2 è formato dalle eliche H3-H5 e H12, le quali, in seguito al legame con il ligando, si assemblano a formare una superficie idrofobica in grado di interagire con il motivo conservato **ricco di leucine (LXXLL)** presente in numerose proteine coregolatrici della trascrizione (Steroid Receptor Coactivator – SRC).

v. 1.4.1 © gsartor 2019

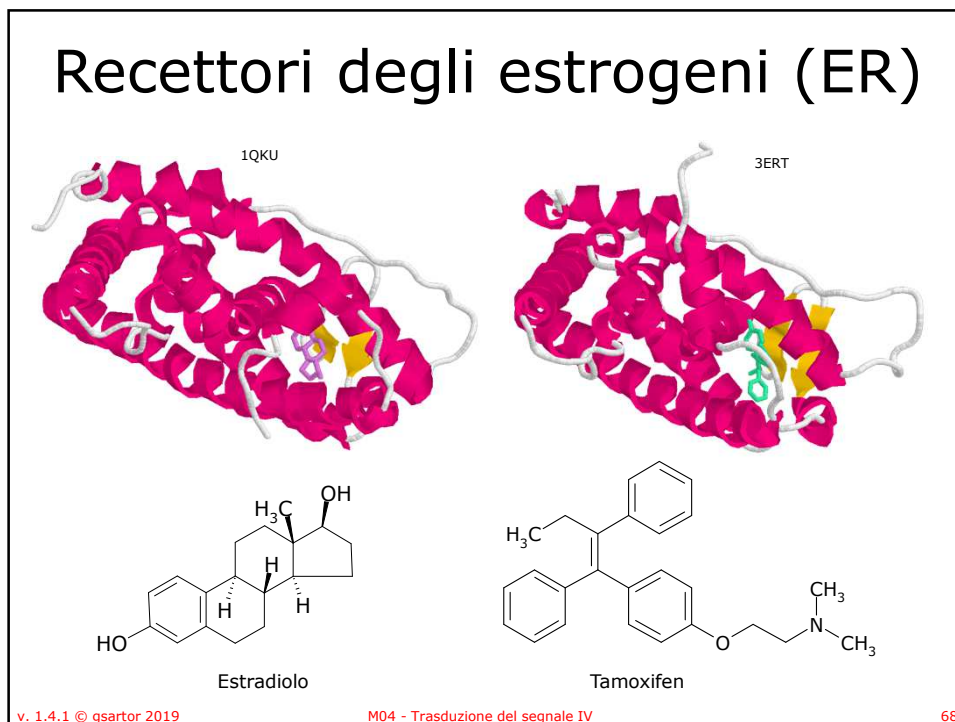
M04 - Traduzione del segnale IV

66

66

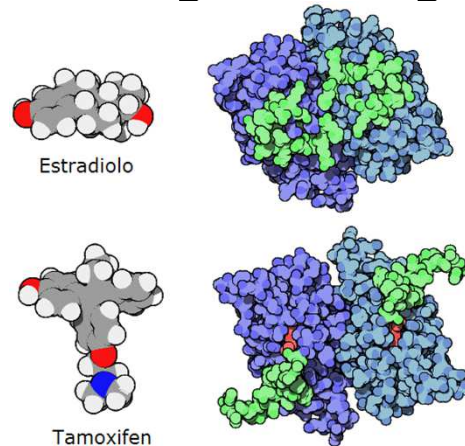


67



68

## Recettori degli estrogeni (ER)



- Tamoxifen è un farmaco che mima l'estradiolo e si lega al recettore
- Una volta legato cambia forma al loop di interazione con le proteine coregolatrici impedendone l'interazione.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

69

69

## Isoforme dei recettori per gli estrogeni

- Le due isoforme principali di ER, ER $\alpha$  e ER $\beta$  sono codificate da geni differenti, localizzati rispettivamente sul cromosoma 6 (6q25.1), e sul cromosoma 14 (14q22-24). Pur avendo alta omologia di sequenza, sono caratterizzate da una diversa distribuzione tissutale, differenti effetti trascrizionali e affinità di legame per i ligandi.
  - **ER $\alpha$**  è principalmente espresso nel tessuto mammario, nel tessuto uterino, nella vagina, ma è presente in numerosi altri organi.
  - Una volta attivato dal ligando estrogenico o per fosforilazione, attiva la trascrizione di geni bersaglio legando sequenze specifiche sul DNA, promuovendo i processi di **proliferazione e differenziamento cellulari**.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

70

70

## Isoforme dei recettori per gli estrogeni

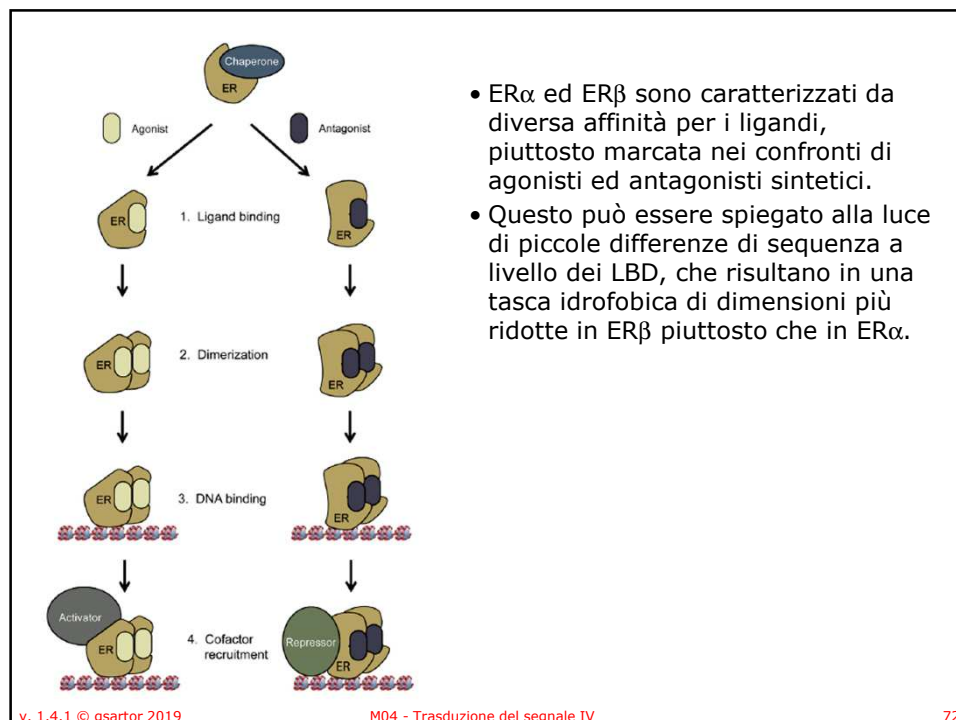
- **ER $\beta$**  mostra un profilo di espressione diverso, che comprende ovaio, prostata, testicoli, milza, polmoni, ipotalamo e timo.
- Sono espressi, seppur a bassi livelli, nel sistema nervoso centrale (nuclei della base, corteccia, ippocampo, ipotalamo) e nel sistema cardiovascolare.
- Pur condividendo il meccanismo d'azione con ER $\alpha$ , sembra agire da repressore trascrizionale, esplicando così un **effetto antiproliferativo**.
- In particolare, la regione AF1 di ER $\beta$  sembra avere minore capacità di transattivazione su geni reporter sotto il controllo di sequenze ERE rispetto a ER $\alpha$ , mentre l'attività della regione AF2 è comparabile per i due recettori.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

71

71



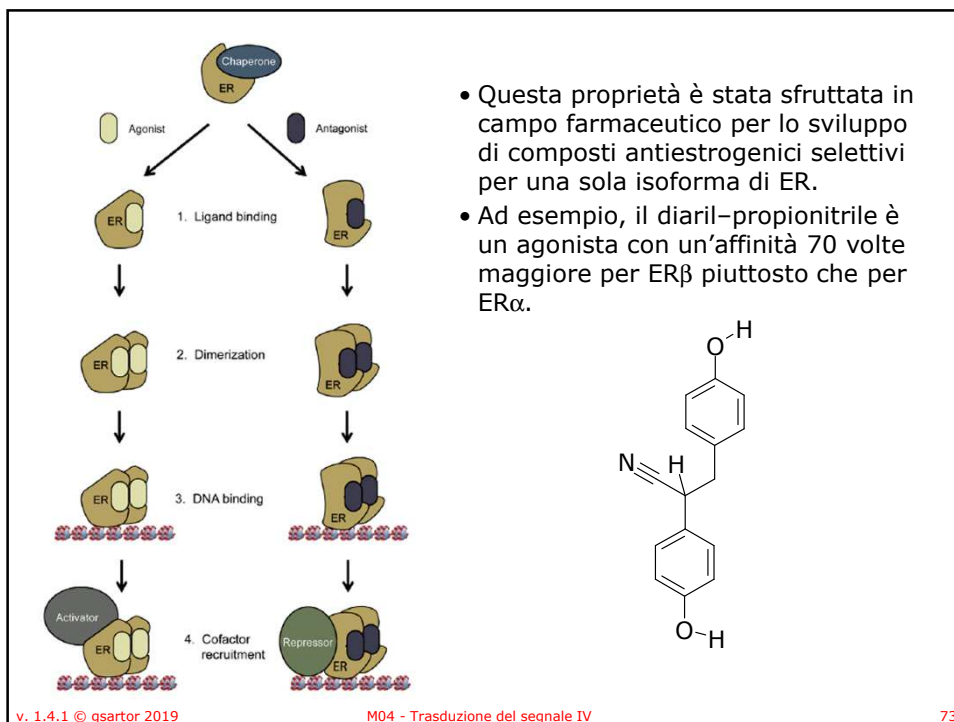
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

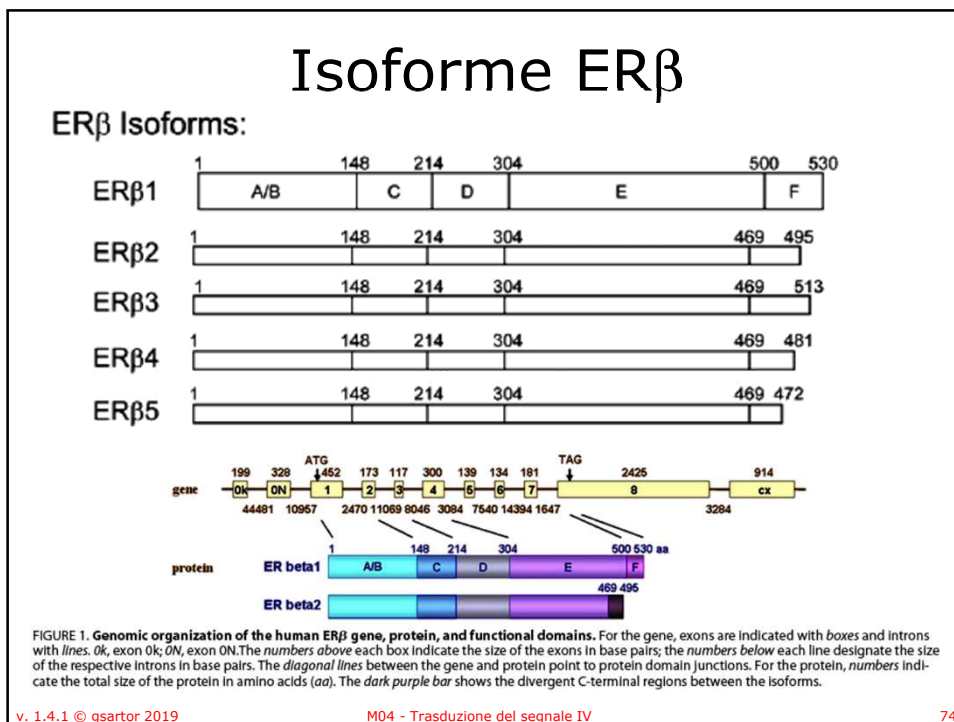
72

72

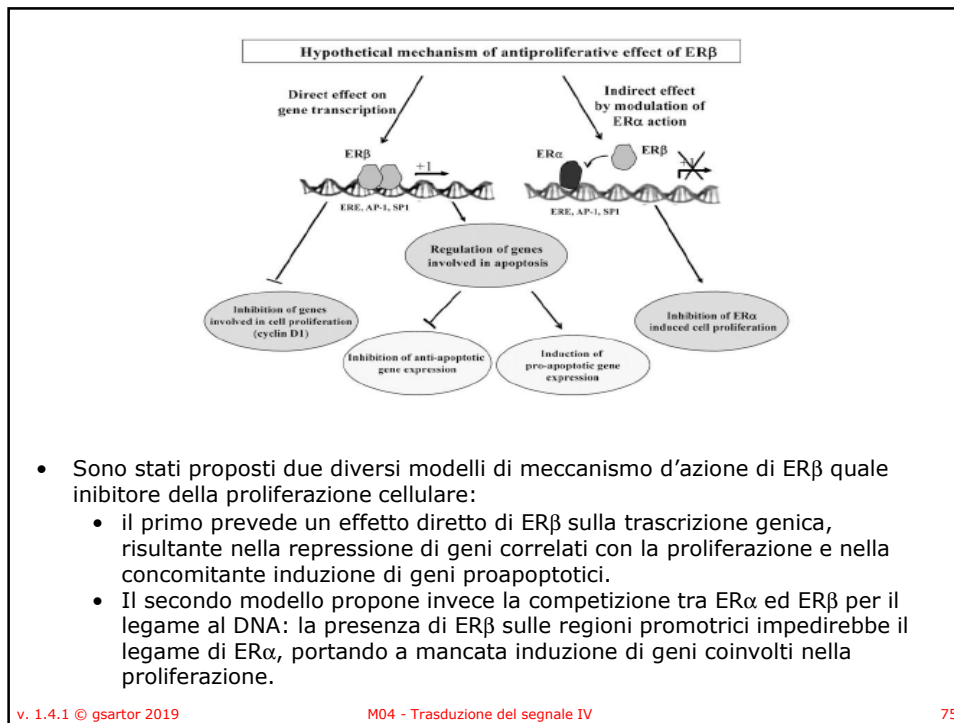
- ER $\alpha$  ed ER $\beta$  sono caratterizzati da diversa affinità per i ligandi, piuttosto marcata nei confronti di agonisti ed antagonisti sintetici.
- Questo può essere spiegato alla luce di piccole differenze di sequenza a livello dei LBD, che risultano in una tasca idrofobica di dimensioni più ridotte in ER $\beta$  piuttosto che in ER $\alpha$ .



73



74



75

- Sono stati proposti due diversi modelli di meccanismo d'azione di ER $\beta$  quale inibitore della proliferazione cellulare:
  - il primo prevede un effetto diretto di ER $\beta$  sulla trascrizione genica, risultante nella repressione di geni correlati con la proliferazione e nella concomitante induzione di geni proapoptotici.
  - Il secondo modello propone invece la competizione tra ER $\alpha$  ed ER $\beta$  per il legame al DNA: la presenza di ER $\beta$  sulle regioni promotrici impedirebbe il legame di ER $\alpha$ , portando a mancata induzione di geni coinvolti nella proliferazione.

## Mutazioni dei recettori

- Le mutazioni a carico del recettore ER $\alpha$  possono essere classificate in tre gruppi a seconda del significato funzionale.
  - I "mutanti negativi" sono parzialmente o completamente inattivi e non influenzano la funzionalità dei recettori *wild-type*. Questo tipo di mutazioni sono quelle più diffuse nei tumori e solitamente sono localizzate a livello del carbossi-terminale, nel sito LBD.
  - Il secondo tipo di mutanti è rappresentato dai mutanti "dominanti negativi", completamente inattivi e che rendono inattivo anche il recettore *wild-type* (es. delezione dell'esone 7).
  - Il terzo tipo include le mutazioni che rendono il recettore attivo anche in assenza di ligando e sono denominate "dominanti positive"

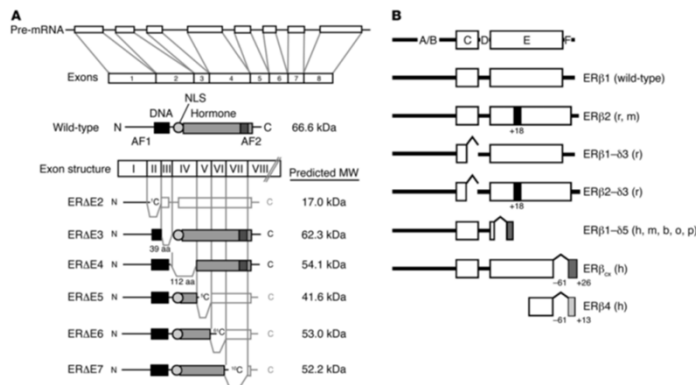
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

76

76

## Mutazioni dei recettori



- La maggior parte delle isoforme del recettore ER $\alpha$  possiede un'attività trascrizionale residua, a eccezione di ER $\Delta$ E5, a cui manca quasi interamente LBD.
- Al recettore ER $\Delta$ E2 manca il DBD, e il dominio di dimerizzazione,
- Al recettore ER $\Delta$ E3 manca una parte del DBD.
- ER $\Delta$ E4 non lega né il DNA né il ligando, essendo troncato per una parte del LDB,
- ER $\Delta$ E6 è troncato sia per una parte dell'LDB che per il dominio di dimerizzazione.
- ER $\Delta$ E3, ER $\Delta$ E5, e ER $\Delta$ E7 sono mutanti dominanti negativi.

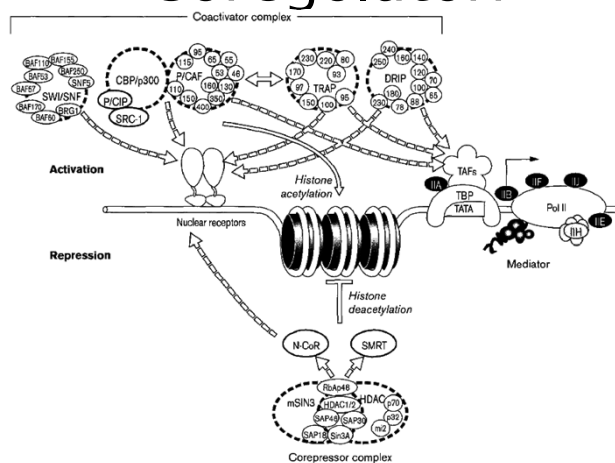
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

77

77

## Coregolatori



- Il riposizionamento dell'elica 12 favorisce inoltre l'esposizione della regione AF-2, di natura idrofobica, capace di reclutare proteine coregolatrici della trascrizione. Tra queste, i coattivatori promuovono l'interazione con il complesso di inizio della trascrizione; al contrario, i corepressori hanno un effetto negativo.

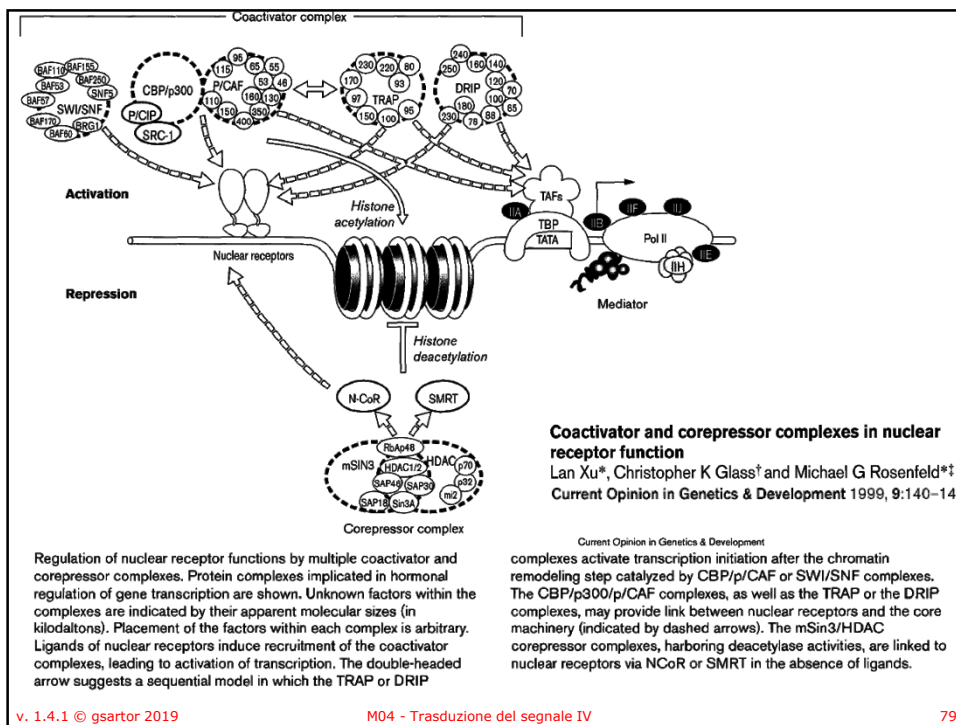
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

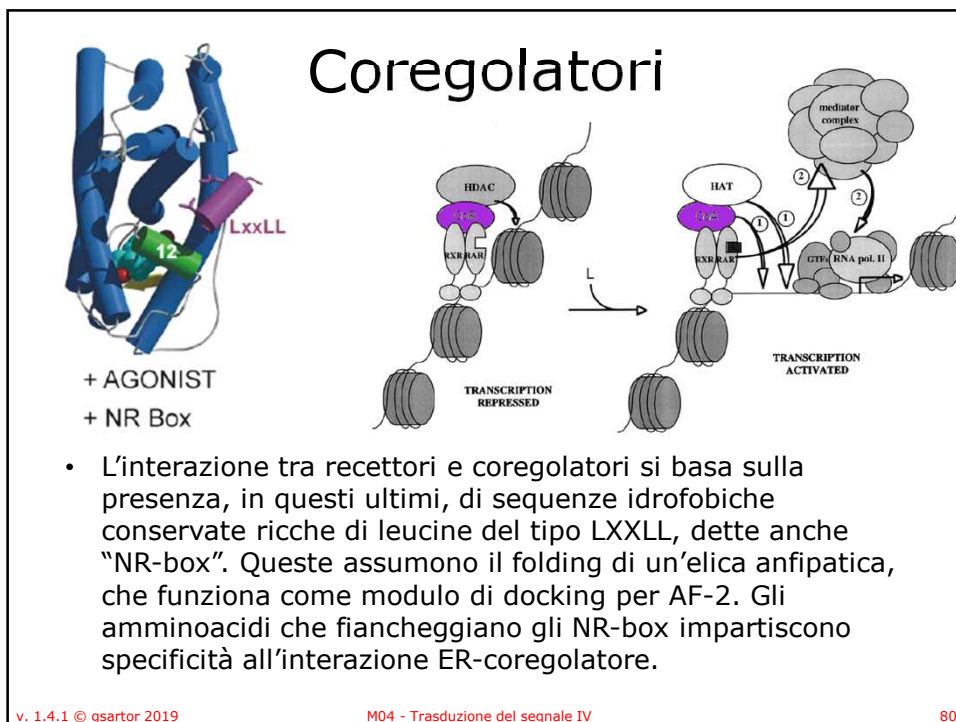
78

78





79



80



## Coregolatori

- Diversi coregolatori sono enzimi coinvolti nel rimodellamento della cromatina: molti coattivatori presentano attività acetil-trasferasica istoniche (HAT), o si associano ad HAT, facilitando l'attivazione della trascrizione attraverso il rilassamento nucleosomico. Analogamente i corepressori hanno attività deacetilasi istonica (HDAC) favorendo la compattazione della cromatina, e quindi il silenziamento genico.

v. 1.4.1 © gsartor 2019 M04 - Traduzione del segnale IV 81

81

## Dinamica del meccanismo recettoriale

- In assenza di ormone il recettore è complessato nel citoplasma con proteine chaperone; Il dominio NTD/AF1 non è strutturato come i domini DBD e LBD;
- Il legame con l'ormone (I) causa il riarrangiamento del dominio LBD (elica 12, AF2). Il che porta alla traslocazione verso il nucleo e al legame con ERE e con proteine coregolatrici (II);
- Questo legame porta ad un aumento dell'ordine nel dominio NTD/AF1 che facilita l'interazione con i sistemi di trascrizione al promotore (III);

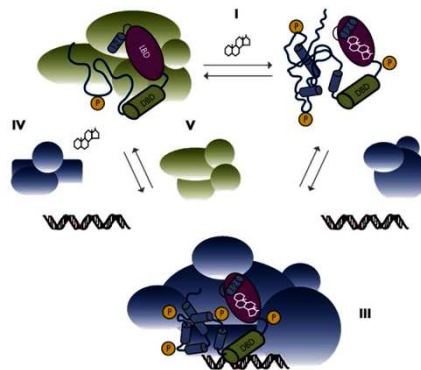
Tratto da: Allosteric Modulators of Steroid Hormone Receptors: Structural Dynamics and Gene Regulation  
Raj Kumar and Iain J. McEwan  
Endocr Rev. Apr 2012; 33(2): 271-299.

v. 1.4.1 © gsartor 2019 M04 - Traduzione del segnale IV 82

82

## Dinamica del meccanismo recettoriale

- Il legame al DNA può regolare in modo allosterico il legame del ligando che può portare alla formazione di un complesso recettore-complesso di trascrizione (IV)
- La formazione del complesso DNA/Ligando/Recettore deve essere rapidamente reversibile e ciò può essere aiutato dalla presenza delle proteine chaperone che aiutano il riciclo nel citoplasma
- Le modifiche post-traduzionali del recettore (P) permettono la regolazione fine del segnale.



Tratto da: Allosteric Modulators of Steroid Hormone Receptors: Structural Dynamics and Gene Regulation  
Raj Kumar and Iain J. McEwan  
Endocr Rev. Apr 2012; 33(2): 271-299.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

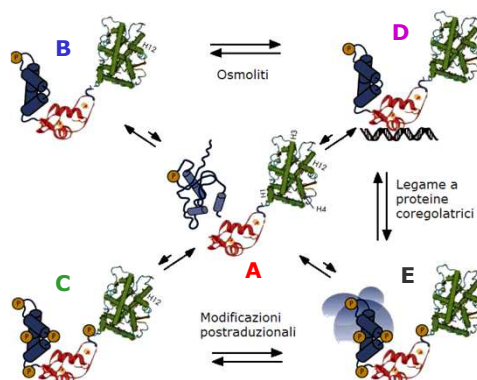
M04 - Trasduzione del segnale IV

83

83

## Ripiegamento del dominio NTD

- NTD esiste in un insieme di conformazioni più meno stabili (A).
- Una conformazione può esser stabilizzata dal legame con:
  - osmoliti (B)
  - da modificazioni post-traduzionali (C)
  - dal legame con il DNA (D) e
  - dal legame con proteine coregolatrici (E)



Tratto da: Allosteric Modulators of Steroid Hormone Receptors: Structural Dynamics and Gene Regulation  
Raj Kumar and Iain J. McEwan  
Endocr Rev. Apr 2012; 33(2): 271-299.

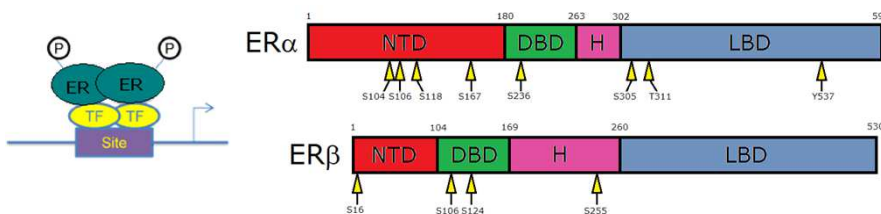
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

84

84

## Via di segnalazione ligando-indipendente



- ER può essere attivato anche in assenza di ligando, attraverso la fosforilazioni di particolari residui. Il dominio A/B di ER $\alpha$  contiene diversi residui di serina (104, 106, 118, 167) conservati che sono bersaglio di fosforilazione.
- La fosforilazione della S118 di ER $\alpha$  è mediata dalle MAP chinasi, attivate dal legame con EGF al suo recettore di membrana EGFR, e determina il reclutamento di complessi coregolatori.

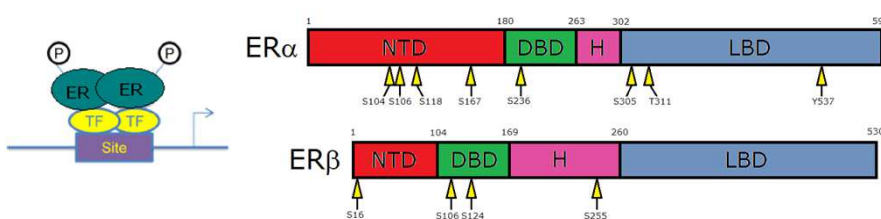
v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

85

85

## Via di segnalazione ligando-indipendente



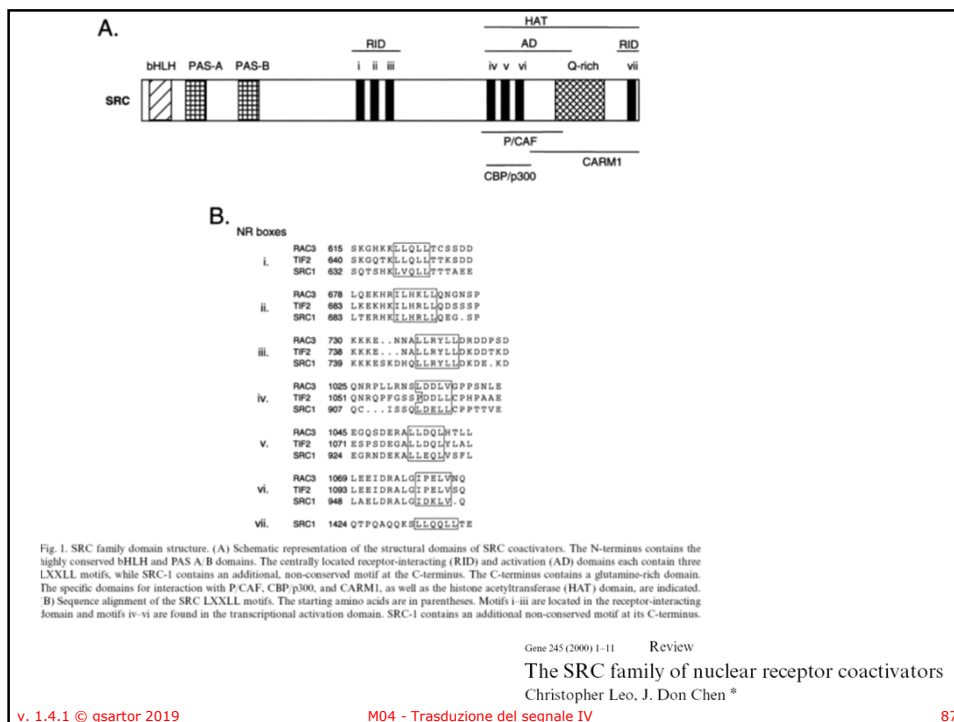
- La stessa fosforilazione può essere indotta da altri fattori di crescita, quali l'insulina, i fattori di crescita insulino-simili I e II (IGF-I ed IGF-II) e il fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ).
- La fosforilazione della Ser167 di ER $\alpha$  sembra invece mediata dalla Ck2 e risulta in una aumentata affinità del recettore stesso per il DNA .
- Anche ER $\beta$  può essere attivato in modo ligando-indipendente, mediante fosforilazione delle Ser106 e Ser124 operata dalle MAP chinasi, in presenza di EGF. Questa fosforilazione determina il reclutamento ligando-indipendente di SRC-1 ed il conseguente aumento dell'attività trascrizionale di ER $\beta$ .

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

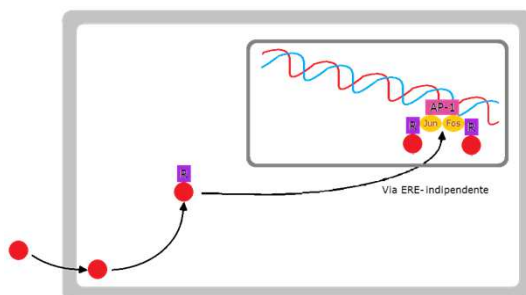
86

86



87

## Via di segnalazione ERE-indipendente



- I recettori degli estrogeni, una volta attivati dal ligando, sono in grado di modulare anche la trascrizione di geni che non presentano sequenze ERE nei propri promotori.
- In questi casi la transattivazione non sarebbe diretta, ma mediata da altri fattori di trascrizione, come AP-1 (*Activating-Protein-1*), costituito da un eterodimero delle proteine Jun e Fos, e Sp-1 (*Stimulating protein 1*), che riconosce sequenze di DNA ricche di guanine e citosine.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

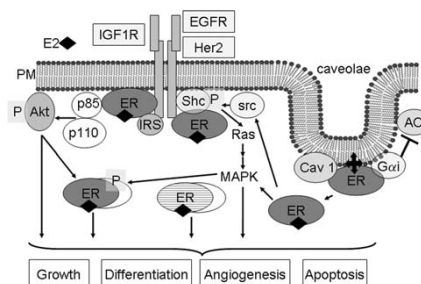
M04 - Traduzione del segnale IV

88

88

## Via di segnalazione non genomica

- È stato osservato che la somministrazione di E2 può avere anche effetti a breve termine (da secondi a minuti), che includono l'attivazione di chinasi e fosfatasi e aumentano il flusso di ioni attraverso le membrane, che presuppongono un'azione non genomica di ER.
- È stato infatti proposto l'esistenza di un pool di ER di membrana che, attivati dal legame con E2, sarebbe in grado di interloquire direttamente con vie di segnalazione citoplasmatiche, tra cui quelle delle MAPK e di Src.



v. 1.4.1 © gsartor 2019

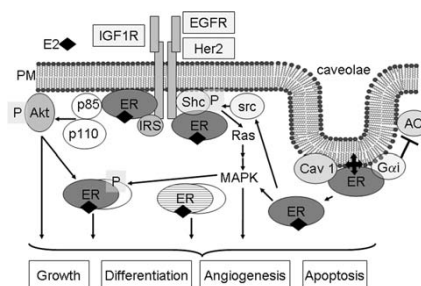
M04 - Trasduzione del segnale IV

89

89

## Via di segnalazione non genomica

- In particolare si è osservato che il recettore dell'aldosterone aumenta l'attività della Na/K ATPasi, dei canali del sodio e del potassio a livello della membrana basolaterale nelle cellule del tubulo distale e del dotto collettore del nefrone.



v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

90

90

# Via di segnalazione non genomica

554

M. Luciani et al./Steroids 69 (2004) 553-559

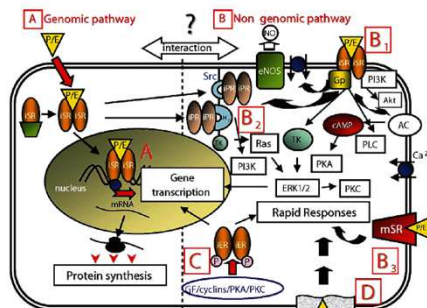


Fig. 1. Different intracellular signalling pathways activated by progesterone and estrogens in target cells (modified from [19]). (A) Genomic pathway through classical cytosolic/nuclear receptors acting as nuclear transcription factors; (B) nongenomic pathway mediating rapid effects through classical cytosolic/nuclear receptor spanning through plasma membrane (B1) or acting through multi-protein complex associated to Src on the inner part of plasma membrane (B2) or through membrane receptors (B3); (C) Alternative pathways such as activation by GF and intracellular kinases of the classical ER by phosphorylation in absence of the steroid ligand (C) and nonreceptor mediated membrane perturbation by P and E (D) are also indicated. E: estrogens; P: progesterone; iER and pPR: classical cytosolic/nuclear ER and PR; mSR: membrane PR and ER; Gp: G protein; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; NO: nitric oxide; TK: tyrosine kinases; AC: adenylate cyclase; SRE: src homology domain; PLC: phospholipase C; PKA: protein kinase A; ERK1/2: extracellular signal regulated kinases 1/2; DAG: diacyl glycerol; IP<sub>3</sub>: inositol 3-phosphate; PKC: protein kinase C; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol biphosphate; GF: growth factors; P: phosphorylation; : mRNA synthesizing ribosome; : ions channel; : heat shock protein associated to ER; : Src.

- C'è evidenza che alcuni recettori per ormoni steroidei possano estendersi sulla membrana plasmatica per interagire con ormoni al di fuori della cellula.

v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Traduzione del segnale IV

91

91

# Via di segnalazione non genomica

- I recettori per gli ormoni steroidei possono anche funzionare al di fuori del nucleo accoppiando il segnale ormonale al segnale di trasduzione cinasico e inositolo fosfato.

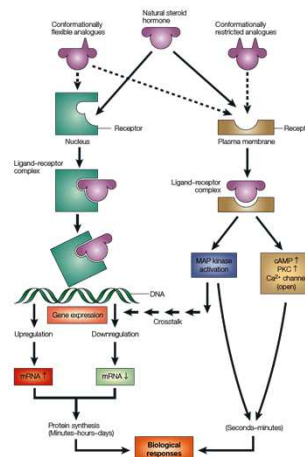


Figure 1 | Pathways for generating biological responses by steroid hormones. In the genomic pathway (left-hand side), occupancy of the nuclear receptor by the cognate steroid hormone leads to an up- or downregulation of genes subject to hormone receptor regulation. In the rapid response pathway (right-hand side), occupancy of a putative membrane receptor (which in some instances might be a membrane-associated nuclear receptor) by the steroid hormone can lead to the initiation of rapid responses that are coupled through appropriate second messenger systems, either directly to the generation of the end biological response(s) or indirectly through modulation of genomic responses; the examples included in the figure are not intended to be exhaustive. The figure also indicates the possibility of conformationally flexible agonist analogues of the parent steroid hormone binding to the nuclear or preposed membrane receptors. Further, it is known that conformationally restricted analogues can occupy the membrane receptor and elicit only rapid responses. These possibilities are further discussed in the text. FIG. 1 and FIG. 4 (examples of conformationally restricted analogues and FIG. 6, cAMP, cyclic AMP; MAP, mitogen-activated protein; mRNA, messenger RNA; PKC, protein kinase C.

## STEROID-HORMONE RAPID ACTIONS, MEMBRANE RECEPTORS AND A CONFORMATIONAL ENSEMBLE MODEL

Anthony W. Norman<sup>1,2</sup>, Mathew T. Mizwicki<sup>1</sup> and Derek P. G. Norman<sup>1\*</sup>

v. 1.4.1 © gsartor 2019

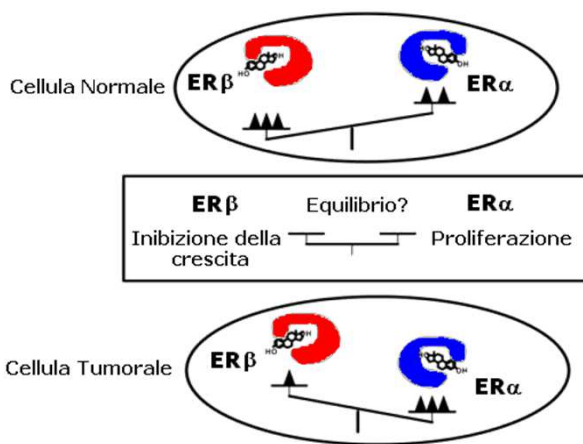
M04 - Traduzione del segnale IV

92

92

## I recettori per gli estrogeni e la carcinogenesi

In diversi modelli cellulari di cancro della mammella e dell'ovaio, la riduzione dell'espressione di ER $\beta$  durante la carcinogenesi è da ricondursi a meccanismi epigenetici, che comprendono la metilazione delle citosine delle isole CpG del promotore, nonché l'ipoacetilazione istonica del gene ER $\beta$ .



v. 1.4.1 © gsartor 2019

M04 - Trasduzione del segnale IV

93

93

## Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
  - CHAMPE Pamela, HARVEY Richard, FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] - Zanichelli
  - NELSON David L., COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
  - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
  - VOET Donald, VOET Judith G, PRATT Charlotte W. FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
  - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
  - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
  - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da: <http://www.gsartor.org/pro>

- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

**Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor**  
Università di Bologna

Giorgio Sartor  
Ufficiale: [giorgio.sartor@unibo.it](mailto:giorgio.sartor@unibo.it)  
Personale: [giorgio.sartor@gmail.com](mailto:giorgio.sartor@gmail.com)

Aggiornato il 20/10/2019 20:49:42

94