

Titolo: Il recettore dell'acido retinoico beta media l'effetto inibitorio della crescita dell'acido retinoico promuovendo l'apoptosi nelle cellule di cancro al seno umano - Retinoic acid receptor beta mediates the growth inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells

Codice: RET015

Autore: Liu et al.

Data: 1996

Rivista: *Molecular and Cellular Biology* 16(3): 1138–1149

Argomento: retinoidi

Accesso libero: no

DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.16.3.1138>

URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1128/MCB.16.3.1138>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2024/02/05/ret015-liu-et-al-1996/>

Parole chiave: retinoidi, recettori, cancro al seno, RAR  $\beta$ , RAR  $\alpha$ , apoptosi, inibizione

Tumore: tumore al seno

Traduzione: tradotti con minime semplificazioni le sezioni "Riassunto, "Introduzione" e "Discussione". Presentata per punti la sezione "Risultati".

**Punti di interesse:** Questo lavoro è uno studio in vitro che ha preso in esame sei linee cellulari di cancro al seno, sia ormono-dipendenti che non ormono-dipendenti, nelle quali è stato determinato l'espressione dei recettori dell'acido retinoico in presenza e assenza di acido retinoico. E' stato valutato l'effetto del trattamento con retinoidi sia in termini di inibizione della crescita cellulare che di induzione dell'apoptosi. Inoltre tramite la creazione di vettori specifici, i geni per il recettori dei retinoidi alfa e beta sono stati introdotti nelle cellule non ormono-dipendenti ed è stato studiato come cambiava la risposta al trattamento con acido retinoico. I risultati hanno dimostrato che l'espressione del gene RAR  $\beta$  è stata drammaticamente indotta dall'acido retinoico nelle linee cellulari di cancro al seno ormono-dipendenti ma non in quelle ormono-indipendenti. L'induzione di RAR  $\beta$  da parte dell'acido retinoico era correlata all'effetto inibitorio dei retinoidi sulla crescita nelle linee cellulari studiate e all'aumento dell'apoptosi. La sensibilità all'acido retinoico nelle cellule ormono-dipendenti è stata diminuita utilizzando un antagonista selettivo di RAR  $\beta$ . Dopo l'introduzione del gene di RAR  $\beta$  la sensibilità ai retinoidi nelle cellule ormono-indipendenti è stata ripristinata. L'introduzione di RAR  $\alpha$  ha anche ripristinato la sensibilità dell'acido retinoico nelle cellule ormono-indipendenti, ma questo ripristino è stato ottenuto mediante l'induzione dell'espressione endogena di RAR $\beta$ . I dati presentati in questo studio indicano che i retinoidi, attraverso l'attivazione del recettore RAR  $\beta$  promuovono l'apoptosi e l'inibizione della crescita nelle cellule del cancro al seno. La perdita dell'espressione del gene RAR  $\beta$  potrebbe essere un fattore coinvolto nella perdita di sensibilità all'acido retinoico e potrebbe contribuire alla trasformazione fenotipica delle cellule tumorali.

Traduzione articolo

## Riassunto

**È noto che i retinoidi inibiscono la crescita di linee cellulari del cancro al seno ormono-dipendenti ma non quella di cellule del cancro al seno ormono-indipendenti. Abbiamo studiato il coinvolgimento dei recettori dell'acido retinoico (RA) (RAR) negli effetti differenziali di inibizione della crescita dei retinoidi e il meccanismo sottostante. I nostri dati dimostrano che l'induzione di RAR $\beta$  da parte dell'acido retinoico è correlata all'effetto inibitorio sulla crescita dei retinoidi. Le cellule ormono-indipendenti hanno acquisito la sensibilità all'acido retinoico quando il vettore di espressione RAR $\beta$  è stato introdotto ed espresso nelle cellule. Inoltre, la sensibilità all'acido retinoico delle cellule ormono-dipendenti è stata inibita da un antagonista selettivo di RAR $\beta$  e dall'espressione dell'RNA antisenso di RAR $\beta$ . L'introduzione di RAR  $\alpha$  ha anche ripristinato la sensibilità dell'acido retinoico nelle cellule ormono-indipendenti, ma questo ripristino è stato ottenuto mediante l'induzione dell'espressione endogena di RAR $\beta$ . Inoltre, mostriamo che l'induzione dell'apoptosi contribuisce all'effetto inibitorio della crescita di RAR $\beta$ . Pertanto, RAR $\beta$  può mediare l'azione dei retinoidi nelle cellule del cancro al seno promuovendo l'apoptosi. La perdita di RAR $\beta$ , quindi, può contribuire alla tumorigenicità delle cellule epiteliali mammarie umane.**

## Introduzione

È noto che i retinoidi, i derivati naturali e sintetici della vitamina A, regolano un'ampia gamma di processi biologici, tra cui crescita, differenziazione e sviluppo (26, 48, 63). Sono attualmente utilizzati nel trattamento del cancro epiteliale e della leucemia promielocitica e vengono valutati come agenti preventivi e terapeutici per una varietà di altri tumori umani (26, 47, 48, 63). Gli effetti dei retinoidi sono mediati principalmente da due classi di recettori nucleari: i recettori dell'acido retinoico (RA) (RAR) (4, 6, 23, 40, 62) e i recettori dei retinoidi X (RXR) (27, 43, 49, 50, 81). RAR e RXR sono membri della superfamiglia dei recettori degli ormoni steroidei-tiroidei che comprende anche i recettori degli estrogeni e della vitamina D (10, 17, 25, 51, 85). Entrambi i tipi di recettori dei retinoidi sono codificati da tre geni distinti,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Questi recettori mostrano modelli distinti di espressione durante lo sviluppo e la differenziazione (26), suggerendo che ciascuno di essi può avere una funzione specifica. L'acido retinoico all-trans e 9-cis (28, 45), i due derivati attivi conosciuti della vitamina A, funzionano essenzialmente come ormoni interagendo con specifici recettori dei retinoidi. L'RA all-trans lega e attiva i RAR e l'RA 9-cis è in grado di legare e attivare sia RAR che RXR. RAR e RXR modulano l'espressione dei loro geni bersaglio interagendo come omodimeri o eterodimeri con determinate sequenze genetiche indicate come elementi di risposta all'acido retinoico (RARE) (7, 37, 43, 52, 81–83, 86). Alcuni dei geni bersaglio sono gli stessi RAR (14, 29, 42, 44, 71), in particolare il gene RAR  $\beta$ , per il quale esiste un elemento di risposta specifico ( $\beta$  RARE) che media l'espressione del gene RAR  $\beta$ , indotta da RA in molti tipi cellulari diversi. Questa sequenza RARE  $\beta$  si trova nella regione promotrice del gene del recettore (14, 29, 71). L'autoregolazione del gene RAR  $\beta$  svolge presumibilmente un ruolo critico nell'amplificare la risposta dell'RA.

È noto che l'attività alterata dei recettori nucleari è associata alla cancerogenesi. Nelle cellule umane di leucemia promielocitica acuta, viene prodotto un RAR  $\alpha$  anormale a causa di una traslocazione cromosomica (13, 36). Il coinvolgimento di RAR  $\beta$  nello sviluppo del cancro è stato originariamente suggerito dalla scoperta che era integrato dal virus dell'epatite B nell'epatoma umano (12). Recentemente, si è scoperto che RAR  $\beta$  non era espresso in numerosi tumori maligni, tra cui il carcinoma polmonare, il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo e il carcinoma mammario (22, 30, 32, 60, 72, 84). Dato che i retinoidi sono attori chiave nella rete regolatrice della differenziazione e proliferazione cellulare (26, 48, 63), i recettori dei retinoidi alterati possono provocare percorsi di differenziazione cellulare anormali e una perdita del loro effetto antiproliferante (67, 79). Recentemente, diversi studi hanno riportato che i retinoidi possono

indurre l'apoptosi in diversi tipi di cellule (58, 61, 68). L'apoptosi, una morte cellulare programmata, è un processo fisiologico importante nel normale sviluppo e nell'omeostasi dei tessuti e funziona come un percorso suicida autonomo che limita il numero di cellule (19, 74). L'induzione dell'apoptosi da parte dei retinoidi può rappresentare un importante meccanismo attraverso il quale i retinoidi inibiscono la crescita delle cellule tumorali. L'alterazione dell'attività dei recettori dei retinoidi può quindi portare alla soppressione dell'apoptosi e provocare l'accumulo patologico di cellule aberranti e malattie che coinvolgono i tumori.

Un volume considerevole di dati sull'uomo e sugli animali ha suggerito che i retinoidi sono nuovi agenti per la prevenzione e il trattamento del cancro al seno (11, 33, 56). Negli animali, la somministrazione di retinoidi inibisce l'inizio e la promozione di tumori mammari indotti da agenti cancerogeni (11, 56). In vitro, è stato dimostrato che i retinoidi inibiscono la crescita delle cellule del cancro al seno umano (20, 21, 39, 53, 65, 69, 70, 73, 75–77).

L'inibizione della crescita di tali cellule in coltura è stata osservata quando i retinoidi sono somministrati da soli o in combinazione con altri agenti, come antiestrogeni (20, 39) o interferone (78), con i quali sono stati osservati effetti sinergici. Sulla base di questi risultati sono stati condotti numerosi studi clinici con i retinoidi (5, 9, 55). Sfortunatamente, questi primi studi clinici con pazienti con cancro al seno avanzato non hanno dimostrato alcun effetto significativo, tranne che alcuni benefici sono stati osservati quando i retinoidi venivano usati insieme agli antiestrogeni (5). Le osservazioni che i retinoidi sono efficaci nella prevenzione dello sviluppo del cancro al seno e che l'attività viene persa nelle pazienti con cancro al seno avanzato suggeriscono che si verifica una perdita di sensibilità ai retinoidi durante la progressione di un tumore al seno.

Questa perdita è supportata anche da osservazioni in vitro secondo cui gli effetti inibitori della crescita dei retinoidi sono osservati principalmente nelle cellule di cancro al seno ormono-dipendenti e positive al recettore degli estrogeni (ER) e che le cellule ormono-indipendenti e ER-negative sono refrattarie all'effetto dei retinoidi. (20, 75). Restano in gran parte poco chiari il modo in cui i retinoidi inibiscono la crescita delle cellule del cancro al seno ormono-dipendenti e il modo in cui il loro effetto inibitorio viene perso nelle cellule ormono-indipendenti. In questo studio, abbiamo determinato l'espressione dei RAR in un numero di linee cellulari di cancro al seno ormono-dipendenti e indipendenti in assenza e presenza di RA. I nostri risultati hanno dimostrato che l'espressione del gene RAR  $\beta$  è stata drammaticamente indotta dall'acido retinoico nelle linee cellulari di cancro al seno ormono-dipendenti ma non in quelle ormono-indipendenti. L'induzione di RAR  $\beta$  da parte dell'acido retinoico era correlata all'effetto inibitorio dei retinoidi sulla crescita nelle linee cellulari studiate. La necessità dell'espressione di RAR  $\beta$  per l'inibizione della crescita indotta dall'acido retinoico è stata ulteriormente dimostrata dal ripristino della sensibilità ai retinoidi nelle cellule ormono-indipendenti dopo l'introduzione di RAR  $\beta$  e dalla diminuzione della sensibilità di RA nelle cellule ormono-dipendenti a causa di un antagonista selettivo di RAR  $\beta$  e l'espressione dell'RNA antisense RAR  $\beta$ . Inoltre, i nostri dati hanno dimostrato che RAR  $\beta$  potrebbe promuovere l'apoptosi nelle cellule del cancro al seno. Pertanto, la perdita dell'espressione del gene RAR  $\beta$  potrebbe essere uno dei principali fattori responsabili della perdita di sensibilità all'acido retinoico nelle cellule di cancro al seno e potrebbe contribuire alla loro trasformazione fenotipica.

## Risultati

- 1) L'attivazione dei RAR e non degli RXR è responsabile dell'inibizione della crescita indotta dal RA nelle cellule del cancro al seno.
- 2) L'induzione di RAR  $\beta$  da parte dell'RA è correlata all'effetto inibitorio sulla crescita dell'RA.
- 3) Regolazione anomala della trascrizione di  $\beta$  RARE (elementi di risposta nella parte iniziale della sequenza genica del recettore  $\beta$ ) nelle cellule di cancro al seno ormono-indipendenti.
- 4) Recupero della sensibilità RA nelle cellule di cancro al seno ormono-indipendenti mediante espressione di RAR  $\beta$ .

- 5) L'induzione di RAR  $\beta$  da parte di RAR  $\alpha$  è responsabile del recupero della sensibilità all'acido retinoico nelle cellule di cancro al seno ormono-indipendenti.
- 6) RAR  $\beta$  è essenziale per l'inibizione della crescita indotta da RA nelle cellule ormono-dipendenti.
- 7) RAR  $\beta$  attivato dal RA promuove l'apoptosi nelle cellule del cancro al seno.

### Discussione

I retinoidi sono efficaci inibitori della crescita delle cellule del cancro al seno. Tuttavia, l'inibizione della crescita è spesso osservata nelle cellule di cancro al seno ormono-dipendenti ma non in quelle ormono-indipendenti (20, 75). In questo studio, abbiamo dimostrato che l'espressione del gene RAR  $\beta$  è fondamentale per l'inibizione della crescita indotta da RA. Utilizzando retinoidi selettivi per i recettori, mostriamo innanzitutto che l'attivazione degli RXR non è coinvolta nelle linee cellulari (ZR-75-1 e T-47D) studiate (Fig. 1). I retinoidi che attivano RXR e inducono la formazione di omodimeri RXR non hanno mostrato un chiaro effetto sulla crescita di due diverse linee cellulari di cancro al seno ormono-dipendenti (ZR-75-1 e T-47D), mentre i retinoidi che attivano RAR sono risultati efficaci quanto l'acido retinoico all-trans.

Questi dati sono coerenti con i risultati ottenuti da uno studio precedente che utilizzava diversi retinoidi selettivi per RXR in cellule MCF-7 e altre linee cellulari di cancro al seno (69). Pertanto, l'attivazione selettiva della via dell'omodimero RXR potrebbe non contribuire in modo sostanziale all'inibizione della crescita indotta da RA nelle cellule di cancro al seno analizzate e l'attivazione della via RAR potrebbe essere fondamentale. In precedenza, sono stati condotti diversi studi per chiarire il ruolo dei RAR negli effetti inibitori differenziali della crescita dell'RA nelle linee cellulari di cancro al seno ormono-dipendenti e indipendenti (64, 75). Questi studi e il presente studio (Fig. 2) hanno mostrato livelli di espressione comparabili di mRNA di RAR  $\gamma$  in tutte le linee cellulari, indipendentemente dallo stato del recettore degli estrogeni (ER), e nessun cambiamento marcato del livello di espressione durante il trattamento con RA all-trans, indicando che RAR  $\gamma$  è improbabile che sia coinvolto nella funzione differenziale di inibizione della crescita dell'RA all-trans. Tuttavia, uno studio recente suggerisce che RAR  $\gamma$  può funzionare per mediare l'effetto sinergico di inibizione della crescita di RA e interferone sulle cellule del cancro al seno (78). Nel caso di RAR $\alpha$ , Roman et al. (64) hanno scoperto che era espresso in tutte le linee cellulari, con livelli più elevati riscontrati nelle linee cellulari ormono-dipendenti rispetto alle linee indipendenti. Nel nostro studio sono stati osservati due trascritti RAR in tutte le linee cellulari indagate. Tuttavia, erano meno abbondanti nelle linee cellulari MB231 e MB468 (Fig. 2) ma erano altamente espressi in un'altra linea ormono-indipendente (BT-20). Sebbene questi risultati suggeriscano che RAR  $\alpha$  possa essere coinvolto, le variazioni nei livelli di espressione di RAR  $\alpha$  (riferimento 64 e questo studio) non possono spiegare in modo soddisfacente le drammatiche differenze nella sensibilità delle diverse linee cellulari di cancro al seno all'RA. Finora, l'espressione di RAR  $\beta$  è stata studiata da diversi studi (64, 72, 75). van der Burg et al. (75) hanno osservato livelli elevati di RAR  $\beta$  in due delle tre linee ormono-dipendenti (ZR-75-1 e T-47D) ma non in linee indipendenti, ad eccezione di Hs578T. Al contrario, RAR  $\beta$  era espresso in tutte le linee cellulari indipendenti analizzate da Roman et al. (64), mentre non è stato rilevato nelle linee dipendenti, comprese T-47D e MCF-7, o era espresso a un livello basso in altre linee dipendenti. In un altro studio (72), il trascritto RAR  $\beta$  nelle cellule MCF-7 e ZR-75-1 è stato rilevato solo quando è stato utilizzato l'RNA poli(A) 1. Questi risultati diversi possono essere dovuti alla variabilità delle linee cellulari utilizzate, ma è più probabile che siano dovuti alle diverse condizioni di coltura utilizzate, poiché l'espressione di RAR  $\beta$  è molto sensibile alla regolazione del RA a causa della presenza di  $\beta$  RARE nel suo promotore (14, 29, 71). Per stabilire chiaramente il ruolo di RAR  $\beta$ , abbiamo esaminato l'espressione di RAR  $\beta$  in diverse linee cellulari ormono-dipendenti e indipendenti sia in presenza che in assenza di acido retinoico all-trans (Fig. 2). In assenza di RA all-trans, tutte queste linee cellulari non presentavano trascritto RAR  $\beta$  rilevabile. Tuttavia, in presenza di RA, l'espressione di RAR  $\beta$  era fortemente aumentata

nelle linee cellulari ormono-dipendenti (ZR-75-1, T-47D e MCF-7) ma non nelle linee cellulari indipendenti (MB231, BT-20 e MB468). La correlazione tra l'espressione di RAR  $\beta$  indotta da RA all-trans con l'inibizione della crescita indotta da RA all-trans in queste cellule (Fig. 2) implica che RAR  $\beta$  è richiesto per l'inibizione della crescita indotta da RA all-trans nelle linee cellulari di cancro al seno.

Il ruolo di RAR  $\beta$  nel mediare l'inibizione della crescita indotta da RA all-trans è ulteriormente dimostrato dai nostri studi di trasfezione stabile. Le cellule MB231 indipendenti dagli ormoni prive di RAR  $\beta$  non hanno mostrato una risposta di crescita all'RA all-trans (Fig. 2).

Tuttavia, quando il gene RAR  $\beta$  è stato introdotto ed espresso nelle cellule, sono stati osservati gli effetti inibitori dell'RA all-trans sulla crescita dipendente e indipendente dall'ancoraggio delle cellule (Fig. 4 e 5). Al contrario, le cellule ZR-75-1 ormono-dipendenti che esprimevano stabilmente l'RNA antisense RAR  $\beta$  mostravano una sensibilità RA all-trans fortemente ridotta (Fig. 7). Inoltre, quando abbiamo utilizzato un antagonista selettivo del RAR  $\beta$  (LE135) (46) insieme all'RA all-trans, abbiamo scoperto che poteva prevenire in modo significativo l'inibizione della crescita indotta da RA all-trans nelle linee cellulari ZR-75-1 e T-47D (Fig. 7). Insieme, questi dati dimostrano chiaramente che RAR  $\beta$  può mediare l'inibizione della crescita indotta da RA all-trans nelle cellule di cancro al seno. Questa conclusione è supportata da un recente studio che mostra che la senescenza delle cellule epiteliali mammarie umane normali determina un aumento dell'espressione dell'mRNA di RAR  $\beta$  (72).

Studi precedenti (64, 70, 75) e questo studio (Fig. 2) mostrano che le trascrizioni di RAR  $\alpha$  non sono espresse o sono espresse a livelli relativamente bassi in alcune linee cellulari ormono-indipendenti, suggerendo che RAR  $\alpha$  può anche partecipare alla mediazione della inibizione della crescita di RA all-trans. Infatti, abbiamo scoperto che RAR  $\alpha$  potrebbe ripristinare la sensibilità RA all-trans quando era stabilmente espresso nelle cellule MB231 (Fig. 6), che è un risultato simile a quello di un'osservazione precedente (69). Tuttavia, RAR  $\alpha$  non è responsabile dell'effetto di RAR  $\beta$ , poiché non abbiamo osservato alcun miglioramento delle trascrizioni di RAR  $\alpha$  nelle cellule MB231 che esprimevano RAR  $\beta$  introdotto (dati non mostrati). Quando abbiamo analizzato l'espressione di RAR  $\beta$  endogeno nelle cellule che esprimevano RAR  $\alpha$  introdotto, abbiamo scoperto che era significativamente migliorata in presenza di RA all-trans (Fig. 6c). Nel nostro test di trasfezione transitoria, abbiamo osservato che la cotrasfezione di RAR  $\alpha$  potrebbe aumentare l'attività di  $\beta$  RARE nelle cellule ormono-indipendenti (dati non pubblicati). Pertanto, l'effetto di RAR  $\alpha$  può essere in parte dovuto alla sua attivazione di RAR  $\beta$  endogeno attraverso l'attivazione di  $\beta$  RARE, che quindi innesca la segnalazione di inibizione della crescita. Tuttavia, RAR  $\alpha$  da solo potrebbe non essere sufficiente per rendere le cellule del cancro al seno reattive all'RA, come è stato visto con le cellule BT20, che esprimono un livello relativamente alto di trascrizione di RAR  $\alpha$  (Fig. 2a) ma che sono tuttavia resistenti all-trans RA (Figura 2d). È probabile, quindi, che un'altra proteina nucleare possa partecipare alla regolazione della sensibilità al RA nelle cellule di cancro al seno.

L'effetto inibitorio sulla crescita dell'RA sembra dipendere dallo stato ER. Resta da chiarire se questa dipendenza sia dovuta ad una coincidenza derivante dalla progressione di un tumore o se gli estrogeni influenzino in qualche modo l'attività dell'acido retinoico. Nelle cellule con trasfezione stabile che esprimono RAR  $\beta$ , non abbiamo osservato alcun cambiamento nei livelli di espressione del recettore degli estrogeni (ER) (dati non mostrati), indicando che le attività del recettore degli estrogeni non sono coinvolte nell'inibizione della crescita delle cellule del cancro al seno mediata da RAR  $\beta$ . Recentemente, abbiamo osservato che l'RA può inibire l'attività trascrizionale dell'ER nelle cellule di cancro al seno (41). Rubin et al. (65) hanno anche riferito che l'RA 9-cis potrebbe sottoregolare l'attività dell'ER nelle cellule MCF-7.

Questi dati dimostrano un possibile dialogo incrociato tra la segnalazione dei retinoidi e la

segnalazione degli estrogeni nelle cellule di cancro al seno che potrebbe influenzare l'inibizione della crescita indotta da RA nelle cellule di cancro al seno.

I meccanismi attraverso i quali i retinoidi regolano negativamente la crescita sono in gran parte sconosciuti. Un possibile meccanismo è il loro effetto inibitorio sull'attività regolatoria trascrizionale dei prodotti di geni che sono comunemente associati alla proliferazione cellulare (67, 79). In questo studio, forniamo prove che l'induzione dell'apoptosi da parte di RAR  $\beta$  può rappresentare un altro importante meccanismo mediante il quale RA esercita la sua funzione di inibizione della crescita. L'apoptosi, come forma distinta di morte cellulare, è un processo importante che può portare alla regressione del tumore e la soppressione dell'apoptosi è spesso associata a una sopravvivenza cellulare anormale e a una crescita maligna. È stato suggerito che l'apoptosi dei linfoblasti indotta da ormoni steroidei, come i glucocorticoidi, spieghi l'attività antileucemica di questi agenti (74). È stato anche riportato che i retinoidi inducono la morte cellulare nelle cellule ematopoietiche (58) e nelle cellule del cancro al seno (61, 68). Resta da vedere come viene mediata l'apoptosi indotta dai retinoidi. Le osservazioni (16, 54) secondo cui l'espressione di RAR  $\beta$  nell'arto del topo in via di sviluppo è altamente ristretta al mesenchima delle regioni interdigitali destinate a subire apoptosi (38) implicano che RAR  $\beta$  potrebbe essere associato alla morte cellulare programmata. In questo studio, abbiamo osservato l'apoptosi indotta da RA nelle cellule ZR-75-1 che esprimevano altamente RAR  $\beta$ . L'inibizione dell'attività di RAR  $\beta$  mediante l'espressione dell'RNA antisenso di RAR  $\beta$  ha ridotto il numero di cellule apoptotiche (Fig. 8g). Al contrario, l'apoptosi indotta da RA è stata osservata solo nelle cellule indipendenti dagli ormoni quando RAR  $\beta$  è stato introdotto ed espresso nelle cellule (Fig. 8g). Questi dati dimostrano chiaramente che RAR  $\beta$  è in grado di mediare l'apoptosi indotta da RA delle cellule di cancro al seno.

RAR  $\beta$  è espresso nel tessuto mammario normale e nelle linee cellulari normali del seno umano (72). Nel nostro studio, l'espressione di RAR  $\beta$  indotta da RA all-trans è stata trovata solo nelle linee cellulari di cancro al seno ormono-dipendenti e non in linee cellulari indipendenti. Poiché le cellule del cancro al seno ormono-indipendenti sono generalmente considerate rappresentative di quelle in una fase avanzata della progressione del tumore al seno, questa osservazione suggerisce che la perdita dell'espressione del gene RAR  $\beta$  può avere importanti conseguenze patogene durante lo sviluppo del cancro al seno umano. L'alterazione delle attività di RAR  $\beta$  potrebbe essere coinvolta nello sviluppo del cancro al fegato umano (12). Nel cancro del polmone e della mammella, si verifica con alta frequenza una delezione del braccio corto del cromosoma 3p, una regione che mappa vicino al gene RAR  $\beta$  (15, 59, 80). Livelli anormalmente bassi di espressione del gene RAR  $\beta$  sono stati osservati in molte linee cellulari di cancro polmonare umano e in altre linee cellulari tumorali (22, 30, 32, 60, 86) e si è ipotizzato che contribuiscano alla progressione neoplastica delle linee cellulari umane di carcinoma orale a cellule squamose (32) e alla tumorigenicità delle cellule HeLa trasformate da papillomavirus umano di tipo 18 (3). Inoltre, è stato dimostrato che RAR  $\beta$  funziona come gene soppressore del tumore nelle cellule di carcinoma polmonare epidermoide (31). Queste osservazioni, quindi, suggeriscono che un basso livello di espressione del gene RAR  $\beta$  può essere un importante fattore che contribuisce allo sviluppo del cancro. La presente scoperta che RAR  $\beta$  può promuovere l'apoptosi suggerisce che la perdita delle attività di RAR  $\beta$  potrebbe rimuovere tale meccanismo di controllo negativo, con conseguente proliferazione cellulare incontrollata e, quindi, un miglioramento del fenotipo trasformato delle cellule.

In conclusione, i nostri risultati dimostrano che la perdita dell'espressione e della regolazione del gene RAR  $\beta$  da parte dell'RA all-trans è una caratteristica comune associata alle cellule di cancro al seno ormono-indipendenti e può essere uno dei principali fattori responsabili della ridotta sensibilità ai retinoidi durante la progressione del tumore al seno. Pertanto, il livello di espressione del gene RAR  $\beta$  e la sua risposta all'acido retinoico possono servire come fattori diagnostici per il cancro e possono essere utilizzati anche per determinare se i pazienti con cancro al seno risponderanno al

trattamento dell'acido retinoico. I nostri risultati dimostrano anche che RAR  $\beta$  media l'effetto inibitorio sulla crescita del RA in parte inducendo l'apoptosi cellulare che, una volta persa, può contribuire allo sviluppo del cancro. L'osservazione che l'introduzione del gene RAR  $\beta$  nelle cellule tumorali RAR  $\beta$ -negative può ripristinare la sensibilità al RA fornisce preziose indicazioni per lo sviluppo di nuove strategie per il trattamento del cancro al seno umano.