

# EKSPRESI GEN RESEPTOR ESTROGEN (Gen RE) SELAMA DIFERENSIASI SEKS MASKULIN GONAD EMBRIO PENYU HIJAU (*Chelonia mydas*)<sup>\*</sup>

Oleh :

Kurniadi Iham, M.Si.<sup>†</sup>

<sup>\*</sup> Penelitian didanai DIPA UNAND, tahun anggaran 2006.

<sup>†</sup> Staf pengajar jurusan Biologi FMIPA Unand

## ABSTRAK

Penyu hijau (*Chelonia mydas*) merupakan salah satu reptilia yang determinasi seksnya bergantung suhu (*TSD – Temperature-dependent Sex Determination*). Pada hewan TSD, hormon seks steroid diduga turut berperan dalam diferensiasi seks. Salah satu hormon tersebut adalah estrogen yang dapat berperan di dalam sel apabila berikatan dengan reseptor estrogen. Penelitian ini bertujuan untuk melihat ekspresi gen reseptor estrogen (gen RE) selama diferensiasi seks gonad embrio penyu hijau (*C. mydas*) yang diinkubasikan pada suhu maskulinisasi (25°C). Gonad embrio yang digunakan berasal dari telur yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi berumur 30 hari (tahap indiferen awal/LA), 38 hari (tahap indiferen lanjut/IL), 56 hari (tahap sedang berdiferensiasi/SD), 86 hari (tahap telah berdiferensiasi/TD). RNA total dari gonad embrio berbagai tahap tersebut diisolasi dengan menggunakan reagen TRIzol<sup>®</sup> (TRIzol<sup>®</sup> Reagent, GIBCO BRL), selanjutnya dilakukan RT-PCR untuk gen RE dengan menggunakan primer spesifik yaitu *ER-Trach upper* dan *lower*, yang dirancang berdasarkan mRNA *Trachemys scripta*. Hasil RT-PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose dan keberadaan larik fragmen cDNA sebesar lebih kurang 400 pb menunjukkan bahwa gen RE tersebut diekspresikan. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa gen RE hanya diekspresikan pada gonad berumur 30 hari (LA) dan 38 hari (IL) inkubasi. Diduga pada inkubasi suhu maskulinisasi, gen RE hanya diekspresikan pada tahap awal perkembangan gonad. Akan tetapi RE yang diekspresikan nampaknya tidak menjadi RE yang fungsional sehingga terjadi inaktivasi ekspresi gen RE pada tahap selanjutnya (SD dan TD). Dapat disimpulkan bahwa ekspresi gen reseptor estrogen selama diferensiasi seks gonad embrio penyu hijau bergantung kepada suhu inkubasi dan tahap perkembangan gonad.

## 1. PENDAHULUAN

Penyu hijau (*Chelonia mydas*) hidup di perairan laut. Indonesia merupakan hewan reptilia yang determinasi dan diferensiasi seksnya tergantung pada suhu inkubasi telur. Sistem determinasi seks ini dikenal sebagai *Temperature-dependent sex determination* (TSD). Hewan TSD tidak memiliki kromosom heteromorfik dan determinasi seksnya

dapat dipengaruhi oleh suhu inkubasi telur. Hal ini berbeda dibandingkan dengan sebagian besar vertebrata lainnya yang determinasi seksnya dikenal sebagai *Chromosomal sex determination* (CSD) atau *Genotypic sex determination* (GSD). Hewan-hewan CSD dan GSD memiliki kromosom seks heteromorfik (Gilbert, 2000).

Hingga saat ini mekanisme determinasi dan diferensiasi seks pada

hewan TSD belum diketahui secara pasti, meskipun telah banyak dilakukan penelitian mengenai keterlibatan dan peranan hormon seks steroid dan enzim yang terlibat dalam steroidogenesis seperti enzim aromatase. Enzim aromatase berperan dalam mengaromatisasi androgen menjadi estrogen. Pada beberapa hewan TSD seperti pada *Trachemys scripta*, enzim aromatase dan estrogendiduga berperan dalam diferensiasi seks gonad (Crews, 1994). Pieau *et al.* (1995) menyatakan bahwa suhu inkubasi tidak berperan secara langsung dalam determinasi dan diferensiasi seks gonad hewan TSD. Menurut Desvages & Pieau, (1992) dan Pieau, (1996) pada *E.orbicularis* suhu inkubasi menentukan sintesis enzim aromatase, yang selanjutnya akan mempengaruhi aromatisasi hormon androgen menjadi estrogen. Pada suhu inkubasi feminisasi sintesis enzim aromatase meningkat sehingga gonad indifferen akan berdiferensiasi menjadi ovarium. Pieau (1999) menduga bahwa suhu inkubasi mengatur faktor-faktor termosensitif yang mempengaruhi siklus AMP atau faktor-faktor lainnya yang berperan dalam transkripsi gen *P450<sub>arom</sub>*.

Pieau *et al.* (1999) menyatakan bahwa estrogen dan reseptor estrogen (RE) diperlukan untuk diferensiasi gonad menjadi ovarium. Bergeron *et al.* (1998) menyatakan bahwa terdapat perbedaan

ekspresi gen *RE* selama perkembangan gonad *T. scripta* yang bergantung pada suhu inkubasi dan tahap perkembangan gonad. Pada *T. scripta* terjadi penurunan ekspresi gen *RE* selama proses diferensiasi gonad betina sedangkan pada gonad embrio jantan ekspresi gen *RE* sama pada semua tahap perkembangan.

Ekspresi gen *RE* dipengaruhi oleh faktor-faktor transkripsi tertentu antara lain *Activator protein-1* (AP-1) dan AP-2 (Uht, *et al.*, 1997, Maruyama, *et al.*, 2001 dan Lambertini, *et al.* 2003). AP-2 akan berikatan dengan *promoter* gen *RE* sedangkan AP-1 berikatan dengan *enhancer* gen *RE* (Tanimoto, *et al.*, 1999 dan McPherson & Weigel, 1999). Ekspresi AP-2 diregulasi oleh *retinoic acid* (RA), dimana peningkatan ekspresi RA akan meningkatkan ekspresi AP-2 (Williams & Tjian, 1991). RA merupakan derivat dari retinol (vitamin A) seringkali dikenal sebagai morfogen yang berperan dalam diferensiasi (Lewin, 2000 dan Livera *et al.*, 2002). Sedangkan dengan adanya pengikatan AP-1 pada *enhancer* gen *RE* maka transkripsi gen *RE* akan meningkat (Tang, Treillux & Brown, 1997, Hayashi *et al.*, 1997, McPherson & Weigel, 1999 dan Maruyama *et al.* 2001).

Cavaillès (2002) menyatakan bahwa kompleks E-RE akan meregulasi ekspresi gen lain. Kompleks ini dapat berperan sebagai faktor transkripsi gen lain seperti

misalnya *EGF* (Ignar-Trowbridge *et al.* 1995). Menurut Stoica *et al.*, (2000) *EGF* meningkatkan konsentrasi ER dan meningkatkan jumlah *binding site* estradiol. Dalam hal ini terlihat pengaruh yang resiprokal antara antara ER dengan *EGF*. Selain itu *EGF* berperan dalam proses pertumbuhan dan diferensiasi organ yang diinduksi oleh estrogen. Ekspresi *EGF* mempengaruhi transkripsi gen-gen yang terlibat dalam proliferasi sel gonad seperti *SFI*, *DAX1*, *WT1* dan *WNT4*.

Ekspresi gen *RE* diduga tidak memiliki pola yang sama selama proses diferensiasi seks gonad pada berbagai hewan TSD seperti halnya ekspresi gen *P450<sub>arom</sub>*. Pada *C.mydas* gen *P450<sub>arom</sub>* hanya diekspresikan pada gonad embrio betina sejak stadium indifferen, sedangkan pada *T.scripta* dan *Malaclemys terrapin* gen *P450<sub>arom</sub>* baru diekspresikan sesudah stadium indifferen. Mengingat adanya perbedaan ekspresi gen *P450<sub>arom</sub>* yang mungkin berhubungan dengan ekspresi gen *RE*, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengamati ekspresi gen *RE* selama diferensiasi seks gonad *C. mydas* untuk mengetahui lebih lanjut mekanisme determinasi dan diferensiasi seks pada *C. mydas*.

Penelitian ini dilakukan untuk mengamati ekspresi gen *RE* selama diferensiasi seks *C. mydas* selama

diferensiasi seks gonad yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi.

## II. BAHAN DAN CARA KERJA

### 1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan selama delapan bulan dari bulan Mei sampai Desember 2006, di Laboratorium Perkembangan Hewan Departemen Biologi ITB Bandung.

### 2 Bahan dan alat

#### a. Telur *C. mydas*

Telur *C. mydas* yang digunakan dalam penelitian ini adalah telur yang baru dioviposisikan yang didapatkan dari pantai Pangumbahan, Sukabumi Selatan Jawa Barat. Telur-telur ini dimasukkan ke dalam kotak yang berisi pasir laut dan dibawa ke Laboratorium Biologi Perkembangan Departemen Biologi ITB. Pada hari ke 11 telur-telur dipindahkan untuk diinkubasi di dalam inkubator (Blue M<sup>®</sup>) pada suhu  $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$  (suhu feminisasi).

#### b. Isolasi gonad.

Penyu dibedah dan diisolasi gonadnya pada umur-umur yang telah ditentukan, sesuai dengan tahap diferensiasi gonad (tabel 1). Gonad yang telah diisolasi tersebut dikoleksi dalam *cryotube* dan disimpan dalam nitrogen cair pada suhu  $-96^{\circ}\text{C}$  (Barlian, 1999)

Tabel 1. Isolasi gonad embrio *C.mydas* yang diinkubasi pada suhu inkubasi maskulinisasi.

No	Tahap	Hari ke
1	Indiferen (I)	30
2	Sedang berdiferensiasi (SD)	38
3	Sedang berdiferensiasi (SD)	56
4	Telah berdiferensiasi (TD)	86

#### c. Isolasi RNA total

Isolasi RNA total dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol<sup>®</sup> (GIBCO<sup>®</sup> BRL).

#### d. Penentuan kuantitas dan kualitas RNA total

Kandungan RNA total diukur dengan menggunakan spektrofotometer (Ultraspec 2000, Pharmacia, Biotech<sup>®</sup>). Kuantitas RNA total dihitung dengan mengikuti cara Davis *et al.* (1994). Elektroforesis dilakukan pada gel agarosa 1%/BBE. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan dengan transiluminator di atas lampu UV (320nm) dan difoto dengan kamera Polaroid<sup>®</sup> untuk dokumentasi.

#### e. RT (Reverse Transcription)

RNA total yang didapatkan selanjutnya disintesis menjadi cDNA (*complementary DNA*) dengan proses *reverse-transcription* oleh enzim M<sub>-</sub>MLVRT 200 U/μl (*Moloni Murin Leukemia Virus-RT*, GIBCO<sup>®</sup>BRL),

dengan thermocycler PCR (Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2400).

#### f. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Fragmen cDNA hasil RT diamplifikasi dengan menggunakan enzim *Taq polymerase* (GIBCO<sup>®</sup>BRL) dan sepasang primer spesifik untuk reseptor estrogen yang dirancang berdasarkan mRNA RE *T. scripta* (MWG-Biotech AG), (Up : 5'-GCC TGG TTA GAT ACT GAT GAT TGG-3' dan Low : 5'-GAT GTG CGA GAG TAT GAG GAG GAG-3')

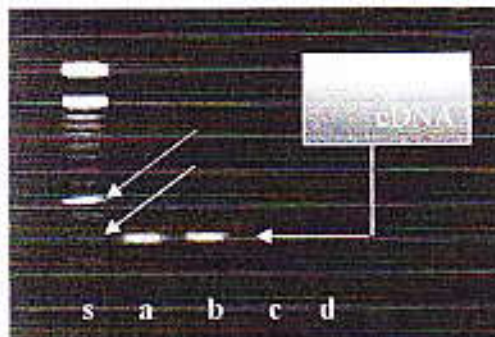
Berdasarkan mRNA RE *T. scripta*, hasil amplifikasi fragmen cDNA yang menggunakan kedua primer tersebut adalah fragmen sebesar lebih kurang 400 pb. PCR diprogram untuk reaksi sebagai berikut : Denaturasi 94<sup>o</sup>C selama 2 menit, reaksi berulang sebanyak 35 kali yang masing-masing terdiri atas Denaturasi (94<sup>o</sup>C, 30 detik), *Annealing* (54,2<sup>o</sup>C, 1 menit ) dan *Extension* (68<sup>o</sup>C, 1 menit). Selanjutnya reaksi tersebut diakhiri dengan *Extension* pada suhu 68<sup>o</sup>C selama 7 menit. Hasil PCR ini kemudian dielektroforesis

#### g. Analisis fragmen cDNA

Fragmen cDNA yang dihasilkan dari proses RT-PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1%/TAE. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan dengan transiluminator dengan lampu UV (320nm) dan didokumentasi dengan kamera Polaroid<sup>®</sup>.

### III. HASIL DAN DISKUSI

Pada gonad *C.mydas* yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), ditemukan larik fragmen DNA dengan ukuran 400 pb. Berbeda dengan gonad embrio *C.mydas* yang diinkubasi pada suhu feminisasi (Ilham, Barlian & Tan, 2004), larik cDNA RE hanya didapatkan pada tahap indifere awal dan tahap indifere lanjut saja. Dari gambar 1 tidak terlihat perbedaan ketebalan yang jelas antara kedua larik tersebut.



Gambar 1 Elektroforegram RT-PCR gonad *C.mydas* yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ); s. DNA Ladder 100pb; a. tahap indifere awal (30 hari); b. tahap indifere lanjut (38 hari); c. tahap sedang berdiferensiasi (56 hari); d. tahap telah berdiferensiasi (86 hari);

Pada tahap indifere awal ini, diduga suhu inkubasi maskulinisasi yang rendah ( $25^{\circ}\text{C}$ ) tidak memberikan tekanan terhadap faktor-faktor transkripsi seperti yang terjadi pada gonad yang diinkubasi pada suhu feminisasi ( $31^{\circ}\text{C}$ ). Pada suhu maskulinisasi ini penempelan RA ke CRABP tidak mengalami hambatan

sehingga jumlah RA yang masuk ke dalam inti lebih banyak dibandingkan tahap yang sama pada suhu feminisasi. Jumlah RA yang banyak di dalam inti sel memungkinkan tingginya ekspresi AP-2 (Williams & Tjian, 1991). Sebagai faktor transkripsi RE, ketersediaan RA dalam jumlah banyak ini juga dapat menyebabkan banyaknya gen RE yang ditranskripsikan menjadi RNA RE, sehingga ekspresi mRNA RE menjadi sangat kuat (+++) (Tabel 2).

Tabel 2 : Kemunculan larik fragmen DNA 400pb hasil amplifikasi mRNA RE gonad *C.mydas* yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi

Tahap	Fragmen DNA 400pb
Indifere awal (30 hari)	+++
Indifere lanjut (38 hari)	+++
Sedang diferensiasi (56 hari)	-
Telah diferensiasi (86 hari)	-

Keterangan : (-) = tidak ada; (+) = tipis; (++) = agak tebal; (+++) = tebal,

Suhu maskulinisasi diduga juga tidak memberikan tekanan terhadap ekspresi AP-1. AP-1 berperan sebagai faktor transkripsi yang menempel pada *enhancer element* gen RE (McPherson & Weigel, 1999) dimana diketahui bahwa aktifitas peningkatan transkripsi (*enhance activity*) diinduksi dari urutan basa yang merespon AP-1 (Tang *et al.*, 1997). Maruyama *et al.* (2001) menyatakan bahwa

AP-1 berperan dalam meningkatkan transkripsi gen *RE*. Dalam kondisi over ekspresi RE, diketahui AP-1 juga diekspresikan dengan kuat. Tanimoto *et al.* (1999) menyatakan bahwa AP-1 menempel pada daerah tertentu di gen *RE* yang bertanggung jawab terhadap meningkatnya ekspresi gen *RE* pada sel-sel MCF-7. Dengan kondisi tidak ada tekanan ini maka AP-1 dapat meningkatkan transkripsi gen *RE* sehingga dihasilkan lebih banyak mRNA RE.

Sementara itu pada suhu maskulinisasi ini estrogen tidak disintesis. Fitriyanti (2001) menyatakan bahwa gen *P450arom* tidak diekspresikan pada semua tahap diferensiasi gonad *C.mydas* yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi. Dengan tidak terekspresikannya gen *P450arom* maka tidak terbentuk enzim aromatase dan proses sintesis estrogenpun tidak terjadi.

Secara histologis pada tahap ini tidak ada perbedaan struktur sel yang menyusun gonad tahap indiferen awal suhu maskulinisasi dengan gonad tahap indiferen awal suhu feminisasi. Barlian (1999) menyatakan bahwa gonad *C.mydas* tahap indiferen awal yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi terdiri dari selapis sel epitel silindris pada bagian korteksnya dan kelompok-kelompok sel tidak teratur pada bagian medulanya.

Pada tahap indiferen lanjut (38 hari) larik fragmen cDNA yang didapat sama tebal dengan tahap sebelumnya.(+++)(Tabel 7). Berarti pada tahap ini gen *RE* diekspresikan sama kuatnya dengan tahap indiferen awal (30 hari).

Pada tahap inipun tidak ditemukan adanya ekspresi gen *P450arom* (Fitriyanti, 2001) sehingga tidak ada estrogen yang disintesis. Dengan tidak adanya estrogen maka tidak terbentuk kompleks E-RE seperti terjadi pada gonad yang diinkubasi pada suhu feminisasi. Tanpa adanya kompleks E-RE ini dapat dipastikan mekanisme umpan balik positif tidak terjadi selama diferensiasi gonad pada suhu maskulinisasi ini, sehingga ekspresi gen *RE* yang didapatkan pada tahap ini bukanlah merupakan ekspresi yang diinduksi oleh mekanisme umpan balik positif.

Dengan tidak terbentuknya kompleks E-RE, maka RE yang dihasilkan menjadi tidak fungsional. Kemungkinan mRNA RE tidak sampai ditranslasikan menjadi protein RE atau walaupun ditranslasikan protein yang terbentuk menjadi tidak fungsional. Alberts (1994) menyatakan bahwa ekspresi suatu gen dikontrol melalui enam langkah antara lain kontrol terhadap proses transkripsi, proses RNA, proses transport RNA, proses translasi, degradasi RNA dan aktifitas protein. Setelah proses transkripsi terdapat lima dari enam kemungkinan yang dapat menyebabkan suatu gen tidak

terekspresikan menjadi protein yang fungsional.

Dengan tidak adanya mekanisme umpan balik positif ini maka tidak terdapat faktor yang menginduksi ekspresi RE secara simultan. Kalau pada suhu feminisasi setelah tahap indiferen ini ekspresi gen *RE* juga diinduksi oleh adanya mekanisme ini sehingga bertambah kuat, maka pada suhu maskulinisasi hal tersebut tidak ada sehingga ekspresi gen *RE* hanya diinduksi oleh faktor yang sama dengan tahap sebelumnya.

Pada tahap selanjutnya (tahap sedang berdiferensiasi dan telah berdiferensiasi) tidak terdeteksi larik cDNA RE, yang berarti tidak ada ekspresi RE. Setelah pada tahap sebelumnya ekspresi yang didapatkan cukup kuat, maka pada tahap ini sama sekali tidak diekspresikan. Hal ini diduga karena adanya inaktivasi faktor-faktor yang mempengaruhi ekspresi RE, sehingga tidak terjadi transkripsi gen *RE*.

Waktu terjadinya inaktivasi gen-gen tersebut diperkirakan berada pada suatu waktu kritis yang merupakan tahap sensitif suhu (TSP- *temperature sensitive period*). TSP merupakan waktu yang sangat penting dalam determinasi kelamin hewan-hewan TSD, dan berlangsung selama 10-15 hari pada akhir sepertiga pertama masa inkubasi. Faktor-faktor yang menentukan determinasi seks sangat berperan pada tahap ini.

Jarak waktu antara pengamatan tahap indiferen lanjut (hari ke 38) dengan tahap sedang berdiferensiasi (hari ke 56) cukup jauh yaitu 18 hari, sehingga waktu tepatnya terjadi inaktivasi tersebut tidak diketahui dengan pasti. Tetapi ekspresi gen *RE* kemungkinan akan mengalami penurunan yang cukup tajam dan bertahap selama waktu tersebut hingga akhirnya tidak ada sama sekali.

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut :

- Gen *RE* hanya diekspresikan pada tahap awal perkembangan gonad yang dikubasi pada suhu inkubasi maskulinisasi. Hal ini berbeda dengan suhu feminisasi dimana terjadinya peningkatan ekspresi gen *RE* sejalan dengan tahap perkembangan gonad.
- Suhu maskulinisasi diduga menginaktivkan ekspresi gen-gen faktor transkripsi RE pada tahap sedang berdiferensiasi.

#### VI. DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. 1994. *Molecular biology of the Cell* 3<sup>rd</sup> ed. Garland Pub, Inc. New York, p. 729-731.
- Barlian, A. 1999. *Determinasi dan diferensiasi seks gonad embrio penyu hijau (*Chelonia mydas*)*. Disertasi. ITB. Bandung. hal 70-72.

- Bergeron, J.M., Gahr, M., Horan, K., Wibbels, T., & Crews, D. 1998. Cloning and *in situ* hybridization analysis of estrogen receptor in the developing gonad of red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Develop. Growth Differ.* 40: 243-254.
- Cavaillès, V., 2002. Estrogen and receptors : an evolving concept. *Climacteric*, Suppl 2:20-6.
- Crews, D. 1994. Temperature, steroid and sex determination, *J. Endocrinol.* 142:
- Fitrianti, S., 2001. *Eksresi gen P450 aromatasase (P450<sub>arom</sub>) selama diferensiasi seks gonad embrio penyu hijau (Chelonia mydas) yang dikubasi pada suhu maskulinisasi*, Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Hayashi S., Imai, K., Suga, K., Higashi, Y., & Nakchi, K., 1997. Two promoter in expression of estrogen receptor messenger RNA in human breast cancer. *Carcinogenesis*, 18(3):459-64
- Ignar-Trowbridge, D.M., Pimentel, M., Teng, C.T., Korach, K.S. & McEachlan, J.A. 1995. Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signalling systems. *Env. Health Perspectives* 103 (7).
- Ilham, K., A.Barlian, & M.I. Tan. *Eksresi Gen RE Selama Diferensiasi Seks Feminin Gonad Embrio Penyu Hijau* JUMPA, ed. Oktober 2004
- Lambertini, E., Penolazzi L., Giordano, S., Del Senno, I., & Piva, R., 2003. Expression of human estrogen receptor alpha gene is regulated by promoter F in MG-63 osteoblastic cells. *J. Biochem*
- Livera, G., Rouiller-fabre, V., Pairault, C., Levacher, C. & Habert, R., 2002. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction*, 124(2):173-80.
- Maruyama, S., Fujimoto, N., Asano, K., & Ito, A., 2001. suppression by estrogen receptor beta of Ap-1 mediated transactivation estrogen receptor alpha. *J. Steroid Biochem Mol Biol.*, 78(2):177-84
- McPherson, L.A., & Weigel, R.J., 1999. AP2alpha and AP2gamma : a comparison of binding site specificity and transactivation of the estrogen receptor promoter constructs. *Nucleic Acids Res.*, 27(20):4040-9
- Pieau, C., 1995. Temperature variation and sex determination in reptile. *BioEssays*, 18: 19-26.
- Pieau, C., Girondot, M., Desvages, G., Dorizzi, M., Richar-Mercier, N., Zabor-ski, P. 1995. Temperature variation sex determination in reptilia. *Experimental medicine* 13: 526-523.
- Stocia, A., Saceda, M., Doraiswamy V.L., Coleman, C & Martin, M.B., 2000. regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by epidermal growth factor. *J. Endocrinol.* 165(2):371-8
- Tang, Z., Treilleux, I. & Bropwa, M. 1997. A transcriptional enhancer required for the differential expression of the human estrogen receptor in breast cancer. *Mol Cell Biol.* 17(3):1274-80
- Tanimoto, K., Hidetaka, E., Yoshida, Hayashi, S., 1999. Regulation of estrogen receptor alpha gene mediated by promoter B responsible for enhanced expression in human breast cancer. *Nuc. Acid. Res.*, 27(3):903-9.
- Uht, R.M., Anderson, C.M., Webb, R. & Kushner, P.J., 1997. Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated. *Endocrinology*, 138(7):2900-8.
- Williams, T., Tjian, R., 1991. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* 5(4):670-82.