

**Araştırma Makalesi**

**G-Proteini ile İlişkili Östrojen Reseptörünün Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Proliferasyonu ve Apoptozisi Üzerine Etkisi**

**Effects of G Protein-Coupled Estrogen Receptor on Cell Proliferation and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line**

Akif Hakan Kurt<sup>1</sup>, Ahmet Çelik<sup>2</sup>, Bekir Mehmet Kelleci<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

<sup>2</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

<sup>3</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

**Özet**

**Amaç:** Östrojenin bilinen reseptörleri (ER $\alpha$ , $\beta$ ) dışında farklı bir reseptör aracılığıyla hızlı sinyal yanıtları veya transkripsiyon olayları oluşturduğu gösterilmiştir. G-proteini ile ilişkili olan bu yeni reseptöre GPER1 adı verilmiştir. G-1, GPER1 agonistidir ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hücrelerinin proliferasyonunu ve apoptozunu etkileyip etkilemediğine ilişkin bir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada KHDAK hücre hattında östrojenin ve GPER1 agonisti G-1'in hücre proliferasyonu ve apoptozisi üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

**Yöntem:** Bu çalışmada Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilen A549 hücreleri kullanıldı. A549 hücreleri, 17 $\beta$ -estradiol ve G-1 (10<sup>-8</sup>-10<sup>-5</sup> M) ile 48 ve 72 saat inkübe edildi. Hücre proliferasyonunu değerlendirmek amacıyla MTT ve Apoptozisi göstermek için kaspaz-3 kiti kullanıldı. İstatistiksel değerlendirilme için ANOVA ve Dunnet post hoc testi kullanıldı. p < 0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

**Bulgular:** A549 hücrelerinde 48 ve 72 saat 17 $\beta$ -estradiol inkübasyonu hücre proliferasyonunda anlamlı bir etki oluşturmadı. 10<sup>-5</sup> M G-1 hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı. G-1'in apoptotik aktivitesi ise antiproliferatif etkisine paralel olarak 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda önemli artış gösterdi.

**Sonuç:** Bulgularımız, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde GPER1 reseptörünün antiproliferatif ve apoptotik rolünün olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** A549; akciğer kanseri; 17 $\beta$ -estradiol; G-1; GPER1

**Abstract**

**Aim:** Estrogen receptors other than the existed ones (ER $\alpha$ , $\beta$ ) have been shown to be evident at the molecular events such as fast signaling or transcription events. Associated with the G-protein receptor, this new receptor is called as GPER1. G-1 is known as a GPER1 agonist and how it affects the cell proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) remains elusive. Therefore, in this study the role of estrogen and GPER1 agonist G1 on the cell proliferation and apoptosis are investigated at the NSCLC cell line.

**Method:** In this study, the American Type Culture Collection (ATCC) A549 cells were used. A549 cells, 17 $\beta$ -estradiol and G-1, aGPER1 agonist, at 10<sup>-8</sup>-10<sup>-5</sup> M concentrations were incubated for 48 and 72 hours. In order to evaluate the cell proliferation and apoptotic activity MTT kit and caspase-3 were used. For statistical evaluation ANOVA followed by Dunnet post hoc tests were used. P values < 0.05 were considered as significant.

**Results:** 17 $\beta$ -estradiol in A549 cells 48 and 72 hours of incubation did not produce a significant effect on cell proliferation. 10<sup>-5</sup> M of G1 significantly reduced the cell proliferation. Additionally, parallel to its anti-proliferative influence, G-1 significantly increased the apoptosis with a concentration of 10<sup>-5</sup> M.

**Conclusion:** Our findings suggest that GPER1 receptors may have anti-proliferative and apoptotic roles in non-small cell lung cancer cells.

**Keywords:** A549; lung cancer; 17 $\beta$ -estradiol; G-1; GPER1

*\*Bu çalışma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (BAP-2013/1-27M) tarafından desteklenmiştir.*

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2014;7(1):12-16

Geliş tarihi : 23.05.2014

Kabul tarihi : 06.08.2014

Yazışma adresi : Yrd. Doç. Dr. Akif Hakan KURT, Kahramanmaraş Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Bahçelievler Kampüsü - Kahramanmaraş

Tel : 0344 2802658

Faks : 0344 2802686

E-posta : hkurt@ksu.edu.tr

## Giriş

Akciğer kanseri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli sağlık sorunlarından biridir. Diğer kanser ölümleri azalırken akciğer kanserine bağlı ölümlerde 3 kat artış meydana gelmiştir (1,2). Küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastaların uzun dönemli sağ kalım oranları kötü olmaya devam etmektedir. Günümüzde yeni gelişen tanısal metodlara, ilerlemiş cerrahi tekniklere ve cerrahi dışı tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen genel olarak küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı sadece %14'dür (3).

Başta meme ve endometrium karsinomu olmak üzere, bir grup neoplastik hastalıkta yapılan çalışmalarda östrojen reseptörlerinin prognostik önemi belirlenmiştir (4,5). Epidemiyolojik çalışmalar kadınlarda akciğer kanserinin aynı yaştaki erkeklere göre daha az sıklıkta görüldüğünü ortaya koymuştur (6). Kadınlarda doğum sayısı arttıkça akciğer kanseri gelişme riskini düşürdüğü ve hormon replasman tedavisinin akciğer kanseri gelişimini azalttığı düşünülmektedir (7).

Yakın zamana kadar, östrojenlerin etkisine sadece klasik östrojen reseptörlerinin aracılık ettiği biliniyordu. Klasik reseptörlerin aktivasyonu sonrasında bu reseptörler çekirdeğe geçerek, genomik veya nongenomik yanıtları oluştururlar (8). Ancak östrojen reseptör alfa (ER $\alpha$ ) ve östrojen reseptör beta (ER $\beta$ ) inhibisyonu veya bu reseptörlerin ortadan kaldırılması çeşitli dokularda östrojen cevaplarını ortadan kaldırmamıştır (9). Yapılan çalışmalar G proteini ile kenetli östrojen reseptör 1 (GPER1) varlığını göstermiştir ve östrojen bu reseptör aracılığıyla hızlı sinyal yanıtları veya transkripsiyon olayları oluşturur (10).

GPER1 reseptörü membranda, çekirdekte, endoplazmik retikulumda, mitokondri ve golgi cisimciğinde yer alabilmekte ve etkileri bulunduğu hücresel yapılara göre değişebilmektedir (11,12). Sağlıklı akciğer dokusunda ve akciğer tümörlerinde GPER1 reseptörünün eksprese edildiği bildirilmiş ama akciğer kanser hücrelerinde bugüne kadar proliferatif veya apoptotik etkileri gösterilmemiştir. Bu nedenle, bu çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanser (KHDAK) hücre hattında östrojenin ve GPER1 agonisti G-1'in hücre proliferasyonu ve apoptozisi üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntemler

### Hücre Hatları ve Hücre Kültürü Koşulları

Bu çalışmada küçük hücreli olmayan (adenokarsinom) akciğer kanseri hücre hattı A549 kullanıldı. A549 hücre hattı American Type Tissue Culture Collection'dan (ATCC) temin edildi. Uygun şartlar altında gelen hücreler %1 Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B (PSA), %1 L-glutamin ve %10 Fetal Bovine Serum

(FBS) ile desteklenmiş RPMI 1640 besiyerinde kültüre alındı. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> varlığında üretildi. İverted mikroskopta her gün kontrolleri yapıldı. 25 cm<sup>2</sup>lik flaskın %70-80 tabanı kanser hücreleri ile kaplanmış ise deney gruplarına dahil edildi.

### Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

Hücre proliferasyonunu değerlendirmek amacı ile günümüzde en yaygın olarak kullanılan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından bir tetrazolyum tuzunun bir formazan ürününe çevrilmesi ve ortaya çıkan bu ürünün miktarının spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanan hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Bu amaçla A549 hücreleri 96-kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekildi. 24 saat sonra plakaların içindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklara fenol kırmızısı içermeyen RPMI1640 içerisinde hazırlanan 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> ve 10<sup>-5</sup> M 17 $\beta$ -estradiol ve G-1 uygulandı. G-1, dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözülerek hazırlandı (en yüksek konsantrasyonunda DMSO oranı %0.1). Etken madde uygulandıktan sonra plakalar etüvde inkübasyona bırakıldı. 48. ve 72. saatlerde plakalardaki besiyerleri uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 0.5 mg/ml konsantrasyondaki MTT solüsyonundan eklendi ve 37°C'de 4 saat etüvde inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda plakadaki her bir kuyucuğa, çözücü olarak 100  $\mu$ l DMSO ilave edildi. Süre sonunda 490 nm ve 630 nm dalgaboyu referans aralığında her bir kuyucuğun absorpsans değeri (OD), spektrofotometre kullanılarak okundu.

### Kaspaz-3 Enzim Düzeylerinin Gösterilmesi

Kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesi amacı ile kaspaz-3 kolorimetrik değerlendirme kiti kullanılmıştır. Bu amaçla 1 $\times$ 10<sup>6</sup> hücre, 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 2 ml besiyerine ekilmiş 72 saat boyunca farklı dozlarda G-1'e maruz bırakılmışlardır. Bu inkübasyon süresinden sonra, hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek toplanmış ve süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, hücrelerin üzerine 100  $\mu$ l soğutulmuş lizis tamponu ilave edilip karıştırılmış ve buzun üzerinde 10 dk bekletilmiştir. Örnekler ependorf tüpe alınmış ve 15000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant, steril yeni bir ependorf tüpe alınıp ayrı ayrı kuyucuklara 50  $\mu$ l süpernatantlardan ve 50  $\mu$ l 2X reaksiyon tamponu, 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropiplara ekim yapılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 5  $\mu$ l kaspaz-3 kolorimetrik substratı ilave edilip 37°C'de 2 saat bekletilmiştir. Sonuçlar 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile okunmuştur. Bu yöntemle hücrelerde durağan ve ilaç uygulamaları sonrasında kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler belirlenmiş olmuştur.

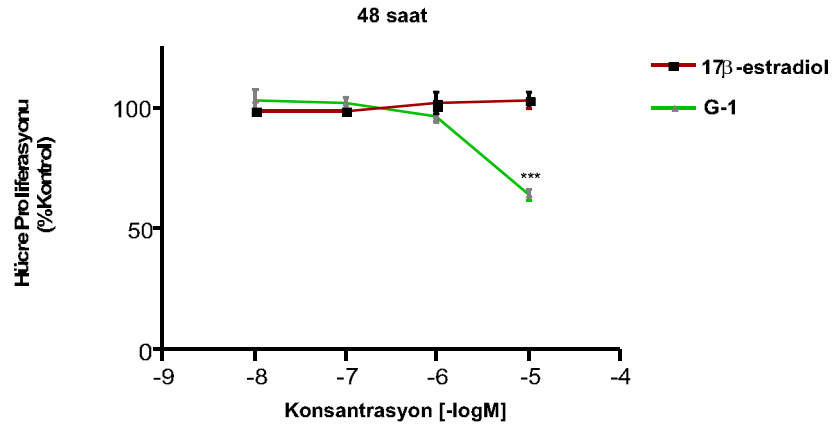
### İstatistiksel Analizler

Veriler, ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirilme için ANOVA ve Dunnet post hoc testi kullanıldı.  $p < 0.05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.

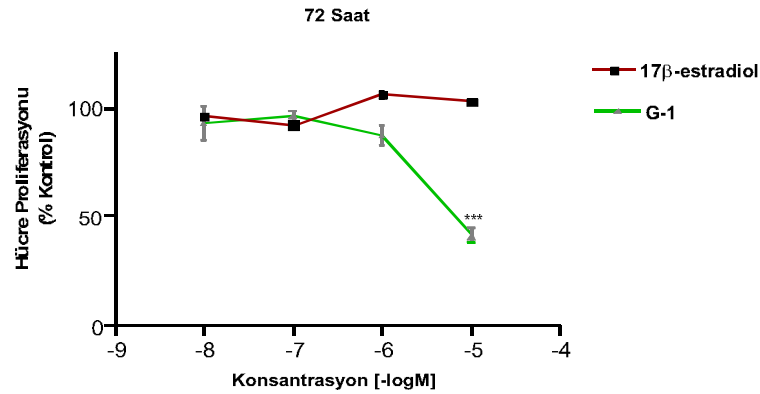
### Bulgular

A549 hücrelerinde 48 ve 72 saat  $17\beta$ -estradiol

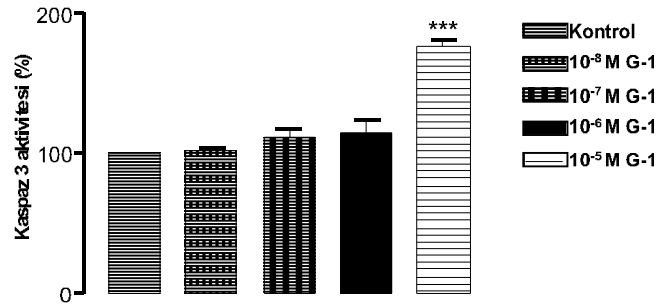
inkübasyonu hücre proliferasyonunda anlamlı bir etki oluşturmadı. GPER1 agonisti G-1 hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı. Antiproliferatif etki, istatistiksel olarak kontrole göre 48. saatte  $10^{-5}$  M konsantrasyonda  $p < 0.001$  (Şekil 1) ve 72. saatte  $10^{-5}$  M konsantrasyonda  $p < 0.001$  olarak belirlenmiştir (Şekil 2). G-1'in apoptotik aktivitesi ise antiproliferatif etkisine paralel olarak  $10^{-5}$  M konsant-rasyonda



Şekil 1. A549 hücrelerinin  $17\beta$ -estradiol ve G-1 maruziyeti sonrası hücre proliferasyonu analizi ( $10^{-8}$  ve  $10^{-5}$  M ve 48 saat,  $n=6$ ). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. \*\*\*:  $p < 0.001$ .



Şekil 2. A549 hücrelerinin  $17\beta$ -estradiol ve G-1 maruziyeti sonrası hücre proliferasyonu analizi ( $10^{-8}$  ve  $10^{-5}$  M ve 72 saat,  $n=6$ ). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. \*\*\*:  $p < 0.001$ .



Şekil 3. A549 hücrelerinin G-1 maruziyeti sonrası kaspaz-3 aktivitesi değişimi ( $10^{-8}$  ve  $10^{-5}$  M ve 72 saat,  $n=5$ ). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. \*\*\*:  $p < 0.001$ .

önemli artış gösterdi ve  $10^{-5}$  M konsantrasyonda  $p < 0.001$  olarak belirlendi (Şekil 3).

### Tartışma

Bu çalışma, insan A549 KHDAK hücrelerinde östrojenin ve GPER1 agonisti G-1'in, antiproliferatif ve apoptotik etkilerini değerlendirerek, terapötik özelliğinin olup olmadığını araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. A549 hücrelerinde farklı saat ve farklı konsantrasyonlarda  $17\beta$ -estradiol uygulaması hücre proliferasyonu etkilemezken, yüksek konsantrasyonda uygulanan GPER1 agonisti G-1, hücre proliferasyonu azaltmıştır. Yüksek konsantrasyonda uygulanan G-1, kaspaz-3 enzim aktivitesini yaklaşık iki kat arttırmıştır.

Epidemiyolojik çalışmalar kadınlarda akciğer kanserinin aynı yaştaki erkeklere göre daha az sıklıkta görüldüğünü ortaya koymuştur (6). Kadınlarda doğum sayısı arttıkça akciğer kanseri gelişme riskini düşürdüğü ve hormon replasman tedavisinin akciğer kanseri gelişimini azalttığı düşünülmektedir (7).

Son birkaç yıl içinde yapılan çalışmalar östrojenin bilinen reseptörleri dışında G-proteini ile ilişkili yeni bir reseptörünün (GPER1) varlığını göstermiştir (10). GPER1'in, insan beyin, karaciğer, kalp, pankreas, plaseenta, kan damarları, kemik, lenfoid doku, endometrium, over, meme ve akciğer, kanseri dokularında ekspres edildiği gösterilmiştir (13-19). G-1'in (1-[4-(6-bromobenzo[1,3]dioksol-5-il)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-siklopenta[c]kinolin-8-il]-etanon) GPER1'in spesifik agonisti olduğu ileri sürülmektedir (20). G-1'in PC-3 prostat ve MCF-7 meme kanser hücre hatlarında GPER1 bağımlı (21,22), KGN ovaryum ve MDA-MB 231 meme kanser hücre hatlarında GPER1 bağımsız proliferasyonu engelleyici ve apoptozu uyarıcı özellikleri gösterilmiştir (23). G-1'in farklı kanser hatlarındaki antiproliferatif etkileri, bu çalışmadaki A549 hücrelerinde elde edilen sonuçlarla uyumlu görülmektedir.

G-1'in hangi mekanizma ile A549 hücrelerinde apoptozu tetiklediğini göstermek için apoptoz yollarının aktivasyonu incelenmiştir. Bu nedenle, çeşitli apoptotik cevaplara aracılıkta merkezi rol oynadığına inanılan kaspaz sisteminin etkinliği, farklı dozlarda ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) G-1'in A549 hücrelerinde 72 saatte kaspaz-3 aktivitesi değişimine bakılarak test edildi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında  $10^{-5}$  M konsantrasyonda kaspaz-3 aktivitesi etkinliğinde belirgin artış tespit edildi. Bu gözlemler, G-1'in kaspaz yolları üzerinden apoptozu tetiklediğine işaret etmektedir.

Özet olarak, bu çalışmada GPER1 agonisti G-1'in, A549 KHDAK hücrelerinde antiproliferatif ve apoptotik etkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışma GPER1 reseptörlerini akciğer kanser hastaları için yeni bir hedef haline getirebilir ve akciğer kanser hastaları üzerinde ikinci basamak çalışmaların yapılmasına öncülük edebilir.

### Kaynaklar

1. Fidaner C, Eser SY, Parkin DM. Incidence in Izmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry. *Eur J Cancer* 2001;37(1):83-92.
2. Lynn T, Richard A. Lung Cancer, Epidemiology and carcinogenesis in General Thoracic Surgery, 5<sup>th</sup> Ed., Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins ed T.W. Shields, 2000:1215-28.
3. Bilgel N. Türkiye'de sigara içme yaygınlığı. In: Özyardımcı N. (ed). Sigara ve Sağlık. Bursa, 2002;59-73.
4. Concongiu M, Chambers JT, Voynick JM, Pirro M, Schwartz PE. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1989;94(3): 247-54.
5. Giri DD, Dundas SA, Nottingham JF, Underwood JC. Estrogen receptors in benign epithelial lesions and intraductal carcinomas of the breast: an immunohistological study. *Histopathol* 1989;15(6):574-84.
6. Donington JS, Colson YL. Sex and gender differences in non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2011;23(2):137-45.
7. Cari LM, Amy BG, Elise DB, Alina VB, Raymond TJ, James VL, Christopher AL, Donna P, Sara JS, Glenwood ET, Curtis CH. Reproductive and hormonal factors and the risk of nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2011;128(6): 1404-13.
8. Luksha L, Kublickiene K. The role of estrogen receptor subtypes for vascular maintenance. *Gynecol Endocrinol* 2009;25(2):82-95.
9. Ullrich ND, Krust A, Collins P, MacLeod KT. Genomic deletion of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  does not alter estrogen-mediated inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx and contraction in murine cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294(6):2421-7.
10. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* 2008;70:165-90.
11. Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Schoor M, Vonk R, Fritzeimer KH. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biol Reprod* 2009;80(1):34-41.
12. Mizukami Y. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr* 2010;57(2):101-7
13. Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and

- peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;228(2):285-92.
14. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 1997;45(3):607-17.
  15. Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, Delellis RA, Steinhoff MM, Sabo E. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res* 2006;12(21):6359-66.
  16. Heino TJ, Chagin AS, Savendahl L. The novel estrogen receptor G-protein-coupled receptor 30 is expressed in human bone. *J Endocrinol* 2008;197(2):1-6.
  17. O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF Jr, George SR. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics* 1998;47(2):310-3.
  18. Smith HO, Leslie KK, Singh M, Qualls CR, Revankar CM, Joste NE, Prossnitz ER. GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(4):381-9.
  19. Zhang Z, Duan L, Du X, Ma H, Park I, Lee C, Zhang J, Shi J. The proliferative effect of estradiol on human prostate stromal cells is mediated through activation of ERK. *Prostate* 2008;68(5):508-16.
  20. Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol* 2006;2(4):207-12.
  21. Queeny C, Hung-Ming L, Chi-Fai N, Amy L, Eddie C, Ho-Keung N, Shuk-Mei H, Kin-Mang L. Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest. *Cell Death Differ* 2010;17(9):1511-23.
  22. Ariazi EA, Brailoiu E, Yerrum S, Shupp HA, Slifker MJ, Cunliffe HE, Black MA, Donato AL, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ, Jordan VC. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Res* 2010;70(1):1184-94.
  23. Cheng XL, Chao J, John SD. The putative G-protein coupled estrogen receptor agonist G-1 suppresses proliferation of ovarian and breast cancer cells in a GPER-independent manner. *Am J Transl Res* 2012;4(4):390-402.