

# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

Dottorato di ricerca in Biologia e Patologia Molecolare

**Ciclo XXIII°**

Studio dei meccanismi di morte  
dopo somministrazione di catechine estratte  
dal tè verde in cellule epiteliali prostatiche  
immortalizzate e tumorigeniche.

Coordinatore:

**Chiar.mo Prof. Valeria Dall'Asta**

Tutor:

**Chiar.mo Prof. Saverio Bettuzzi**

Dottorando:

**Alessandro Silva**

In copertina, tecnica mista  
acrilico e collage di Christian Bassi,  
liberamente rielaborata dall'immagine  
di copertina di AUTOPHAGY,  
vol.6 - 16 novembre 2010.

Dedicata a,  
*K:\Alessandro Silva \Alessandro Silva*  
*\DOTTORATO DI RICERCA 2011*  
*\TESI DI DOTTORATO 2012*  
*\pino* e ad un salvataggio,  
ad una stella disegnata  
su un finestrino appannato,  
alla faccia n°26  
al Regno di Buio Fatuo  
ed il suo Cappellaio Matto,  
ad un piede di pezza bruciacchiato,  
al Rumore feroce in questo tempo  
che ancora mi offende.

26/01/2012



## INDICE

Pag. 9      **Sommario**

## PARTE PRIMA

### CAPITOLO 1. PROFONDO VERDE.

Pag. 13      **Profondo verde**, pag.15. Un po' di epidemiologia, pag.16. I nutraceutici, pag.17. **Riassunto**, pag.20. **I polifenoli del tè verde**, pag.20. **Definizione e caratteristiche biochimiche dei polifenoli**, pag.21. Cosa sono davvero i polifenoli?, pag.21. Il gruppo idrossifenolico, pag.22. Chimica di una tazza di tè verde, pag.24. **Polifenoli e cellule eucariotiche**, pag.28. La scoperta di un recettore di superficie per l'EGCG, pag.28. 67LR, inibizione della crescita ed induzione di apoptosi, pag.29. I polifenoli del tè verde come sensori molecolari, pag.29. **Farmacocinetica e farmacodinamica di catechine del tè verde**, pag.32. Assorbimento, pag.32. Distribuzione, pag.33. Enzimologia e biotrasformazione, pag.33. Metabolismo ed eliminazione, pag.35. Sicurezza e tossicità del tè verde e dell'EGCG, pag.35. **Riassunto**, pag.36. **Polifenoli del tè verde: legami ad alta affinità di bersagli molecolari**, pag.37. **Modulazione di apoptosi e arresto del ciclo cellulare da parte di EGCG**, pag.37. **Modulazione della segnalazione cellulare e dell'attività di trascrizione da parte dell'EGCG**, pag.38. L'inibizione della via di segnalazione di NF-κB, pag.38. L'inibizione del pathways di trasduzione del segnale mediati dal recettore del fattore di crescita epidermico e dal recettore per la laminina, pag.38. L'inibizione della trasduzione del segnale mediata dal Fattore di Crescita insulina-simile, pag.39. **Modulazione della segnalazione cellulare associata all'angiogenesi, metastatizzazione e migrazione**, pag.42. L'inibizione del fattore di crescita vascolare endoteliale, pag.42. L'inibizione della metalloproteinasi della matrice, pag.43. L'inibizione di urochinasi attivatore del plasminogeno, pag.43. **Modulazione di altre molecole da parte dell'EGCG**, pag.44. L'inibizione del proteasoma, pag.45. Attività antiossidante e pro-ossidativa e induzione di enzimi disintossicanti, pag.45. **Riassunto**, pag.46. **Bibliografia**, pag.47.

### CAPITOLO 2. CELLULE DURE A MORIRE.

Pag. 51      **Cellule dure a morire**, pag.53. **Apoptosi**, pag.54. Morfologia dell'apoptosi, pag.54. Meccanismi di apoptosi, pag.55. Caratteristiche biochimiche dell'apoptosi, pag.55. La via di segnalazione estrinseca, pag. 57. Via della Perforina/Granzima, pag.58. La via di segnalazione intrinseca, pag.59. **La Famiglia di proteine Bcl-2**, pag.62. Localizzazione sub-cellulare della famiglia delle proteine Bcl-2, pag.64. **La fase di esecuzione**, pag.65. **Apoptosi fisiologica e patologica**, pag. 65. **Inibizione dell'apoptosi**, pag.67. **Riassunto**, pag.68. **Autofagia: cos'è?**, pag.68. **I lisosomi**, pag.69. **Tipologie di autofagia**, pag.69. Autofagia chaperone-mediata, pag.69. Microautofagia, pag.71. La macroautofagia: meccanismi molecolari e aspetti morfologici, pag.72. **Formazione dell'autofagosoma**, pag.74. Induzione, pag.74. Formazione delle vescicole, pag.75. Ampliamento e completamento delle vescicole,

pag.75. Recupero, pag.77. Maturazione della vescicola, pag.77. Fusione, pag.78. Acidificazione e degrado, pag.79. Degrado ed efflusso lisosomiale, pag.79. **Regolazione citoplasmatica e nucleare dell'autofagia nei mammiferi**, pag.80. **Riassunto**, pag.81. **Introduzione all'Anoikis**, pag.81. **L'anoikis**, pag.82. **Ruolo delle integrine nell'anoikis**, pag.83. Associazione tra integrine e FAK, pag.84. Associazione tra integrine e Src, pag.85. Associazione tra integrine e recettori dei fattori di crescita, pag.85. **Regolazione dell'anoikis**, pag.86. Anoikis e via estrinseca, pag.86. Anoikis e via intrinseca, pag.87. Specie reattive dell'ossigeno, pag.88. ERK: Cross-Talk Propagato, pag.88. **p53: un legame tra sorveglianza del genoma e anoikis?**, pag.89. **Protein Chinasi Associate alla Morte**, pag.90. **Quando autofagia e apoptosi convergono nell'anoikis**, pag.90. **Riassunto**, pag.91. **Organelli sull'orlo di una crisi di nervi**, pag.92. **Il Reticolo endoplasmatico rugoso**, pag.92. **I recettori dell'UPR e la loro risposta allo stress**, pag.94. **La risposta dei recettori in condizioni di stress severo e prolungato**, pag.97. **Vivere o morire?**, pag.97. **Riassunto**, pag.99. **Bibliografia**, pag.100.

### CAPITOLO 3. LE RELAZIONI PERICOLOSE.

Pag. 109 **Apoptosi, autofagia ed ERS**, pag.109. **L'autofagia quando l'apoptosi viene inibita**, pag.110. Apoptosi a seguito di inibizione dell'autofagia, pag.111. **Citoprotezione indotta da autofagia**, pag.112. La rimozione di aggregati proteici mediata da autofagia, pag.112. Rimozione di organelli dannosi mediata da autofagia, pag.112. Autofagia e arresto del ciclo cellulare durante l'inibizione della morte cellulare, pag.113. **Il suicidio cellulare mediato dalla Autofagia**, pag.113. L'autofagia come killer, pag.113. L'autofagia come innesco di apoptosi o necrosi, pag.114. L'autofagia come un guardiano del genoma?, pag.114. **Apoptosi e autofagia: comuni bersagli a monte**, pag.115. Mediatori generali stress: ROS, ceramide e  $Ca^{2+}$ , pag.115. Giunzioni tra reticolo endoplasmatico e mitocondri, pag.115. Il ruolo di p53, pag.116. Le proteine BH-3 only, pag.119. L'inibizione di autofagia da parte dei complessi Beclina-1:Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>, pag.119. La famiglia delle proteina chinasi associata alla morte, pag.121. p19ARF/p14ARF e le loro isoforme, pag.121. **Organelli sotto stress in apoptosi e autofagia**, pag.122. Lo stress mitocondriale e quello dell'ER, pag.122. **Quando l'autofagia esclude l'apoptosi e viceversa**, pag.123. ATG5 in autofagia e apoptosi, pag.124. L'interazione tra Bcl-2 e Beclina-1, pag.125. Il reostato Beclina-1/Bcl-2, pag.126. **La famiglia Bcl-2, ERS e apoptosi**, pag.127. La fase di esecuzione dell'apoptosi indotta da ERS e la risposta chemioterapica, pag.129. **Riassunto**, pag.131. **Bibliografia**, pag.132.

### CAPITOLO 4. CARCINOMA DELLA PROSTATA: DR. JEKYLL e MR. HYDE.

Pag. 137 **La prostata: cenni di anatomia e fisiologia**, pag.137. **Epidemiologia ed eziologia del tumore della prostata**, pag.139. **Diagnosi e classificazione istologica del tumore prostatico**, pag.140. **Adenocarcinoma prostatico e androgeni**, pag.143. **Riassunto**, pag.144. **PCa e molecole target**, pag.145. Ruolo centrale del percorso PI3K/PTEN/Akt/mTOR nel cancro alla prostata, pag.145. Ruolo di segnalazione MAPK nel carcinoma della prostata, pag.147. Ruoli delle proteine del ciclo cellulare nel PCa, pag.146. La famiglia Bcl-2 e gli inibitori

delle caspasi nel cancro alla prostata, pag.152. **Nuovi target per la chemioprevenzione del PCa**, pag.153. Segnalazione Wnt, pag.153. Segnalazione Hh, pag.154. Segnalazione Notch, pag.154. **Riassunto**, pag.156. **Apoptosi, anoikis e microambiente tumorale**, pag.157. **Transizione epitelio/mesenchimale: gli attori principali**, pag.157. Snail, pag.158. Twist, pag.158. NF-Kb, pag.159. **Lo stroma reattivo**, pag.159. **Significato dell'anoikis nelle metastasi tumorali**, pag.160. Galectine, pag.160. Trk-B, pag.161. Caveolina-1, pag.161. **Il fattore di crescita-1 insulino-simile e sua connessione con le integrine**, pag.161. **Riassunto**, pag.163. **Anoikis in PCa: guadagno della libertà e incontro con la morte**, pag.163. **Approfondimenti molecolari della segnalazione indotta da anoikis in PCa**, pag.164. La funzione dei recettori di morte nell'Anoikis, pag.164. Le integrine e le molecole ad esse connesse, pag.165. La famiglia di chinasi SRC, pag.165. La chinasi collegata alle integrine, pag.165. **La transizione epitelio-mesenchimale e la formazione di uno stroma reattivo nel PCa**, pag.166. **Le proteine BH3-only nella progressione metastatica del PCa**, pag.167. **Nuovi target per la Terapia del carcinoma prostatico**, pag.167. Galectine, pag.167. Caveolina, pag.167. Trk-B, pag.167. IGF-1, pag.168. **Riassunto**, pag.170. **Autofagia e tumorigenesi**, pag.171. **L'autofagia nella soppressione del tumore**, pag.171. **Funzioni di promozione del tumore da parte del macchinario autofagico**, pag.171. Ipossia, pag.173. Necrosi, infiammazione e distacco dall'ECM, pag.174. Autofagia e dormienza, pag.175. **Riassunto**, pag.178. **La segnalazione tra ECM e macchinario autofagico**, pag.178. Via sensibile ai nutrienti e ai fattori di crescita, pag.179. Percorsi sensibili al metabolismo energetico, pag.179. Risposte integrate a stress di varia natura, pag.180. **Autofagia e tumorigenesi del PCa**, pag.181. Tirosina chinasi Src, pag.181. GRP78/BiP ed AR, pag.182. **Riassunto**, pag.183. **Polifenoli del tè verde per la chemioprevenzione del cancro alla prostata**, pag.184. **Studi in colture cellulari: modulazione della segnalazione cellulare associata all'arresto del ciclo cellulare, apoptosi e metastasi**, pag.184. EGCG induce apoptosi e arresto del ciclo cellulare, pag.184. EGCG agisce come agente sensibilizzante nelle cellule LNCaP resistenti all'apoptosi, pag.185. EGCG e i percorsi p38/JNK/ERK e PI(3)K/Akt, pag.186. **EGCG e la modulazione di altri segnali cellulari**, pag. 186. Effetti pro-e anti-ossidanti ed il metabolismo degli acidi grassi, pag.186. EGCG e i suoi bersagli molecolari delle vie infiammatorie (NF-kB e COX-2), pag.186. EGCG, il recettore degli androgeni e il PSA, pag.187. EGCG e gli enzimi di disintossicazione, pag.188. EGCG e la metilazione del DNA, pag.188. **EGCG e Studi condotti su modelli animali**, pag.190. **EGCG e Studi clinici condotti su esseri umani**, pag.195. Studio n°1, pag.195. Studio n°2, pag.195. Studio n°3, pag.196. Studio n°4, pag.197. **Riassunto**, pag.198. **Bibliografia**, pag.199.

## PARTE SECONDA

### CAPITOLO 5. SCOPO DELLA TESI

Pag. 213 **Scopo della tesi.**

### CAPITOLO 6. MATERIALI E METODI

Pag. 215 **Caratteristiche delle linee cellulari impiegate e loro mantenimento**, pag.215. **Polyphenon E<sup>®</sup>: descrizione ed esperimenti**, pag.218. Curva dose-risposta e IC<sub>50</sub> del Poly-E, pag.218. Saggi sperimentali con Poly-E, pag.219. **Analisi del ciclo cellulare (FACS monodimensionale)**, pag. 219. **DNA laddering**, pag.220. **Vitalità delle linee cellulari dopo il trattamento**, pag.221. Test di esclusione del colorante Trypan blue, pag.221. Analisi morfologica attraverso microscopia ottica e laser-confocale, pag.222. Colorazione con arancio di acridina, pag.223. **Profilo proteomico e distribuzione di marker molecolari delle linee cellulari sottoposte a trattamento**, pag.224. Estrazione e dosaggio delle proteine, pag.225. SDS-PAGE e analisi Western Blot, pag.225. Valutazione dell'apoptosi mediante saggio colorimetrico, pag.228. **Estrazione dell'RNA**, pag.229. Retrotrascrizione, pag.229. RT-qPCR, pag.229. **Analisi statistica**, pag.231. **Immunocitochimica**, pag.232.

### CAPITOLO 7. RISULTATI.

Pag. 235 **Curva dose-risposta**, pag.235. **Conta vitale con Trypan Blue**, pag.236. **Analisi del ciclo cellulare**, pag.237. **Dna laddering**, pag.237. **Analisi morfologica al microscopio a fluorescenza**, pag.243. **Colorazione con Arancio di Acridina ed Immunocitochimica**, pag. 244. **Analisi western blot di caspasi iniziatrici ed esecutrici ed analisi morfologica con colorazioni vitali al microscopio confocale al laser**, pag.251. **Analisi degli mRNA retrotrascritti con qRT-PCR e livello di espressione proteomico di proteine coinvolte nello stress del Reticolo endoplasmatico**, pag.256. **Analisi immunocitochimica indiretta con anticorpo anti-calreticulina**, pag. 261. **Espressione di p38 MAPK e molecole BH-only della famiglia Bcl-2 aventi funzioni pro-apoptiche**, pag.264.

### CAPITOLO 8. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Pag. 267 **Discussione e conclusioni**, pag.267. **Il trattamento con Poly-E induce un blocco della proliferazione e morte cellulare in linee PNT1a e PC-3**, pag.267. **Il trattamento con Poly-E provoca alterazioni morfologiche e degli organelli citoplasmatici con attivazione di distinti programmi di morte cellulare, caratterizzati da tempi e modalità di esecuzione diversificate per le cellule PNT1a e PC-3**, pag.268. **L'alterazione dell'omeostasi cellulare indotta dal Poly-E attiva percorsi di autofagia, ERS ed UPR con distinti significati per le cellule PNT1a e PC-3**, pag.270. **Il coinvolgimento di p38 MAPK e dei membri BH3-only nei processi di apoptosi e di morte per vacuolizzazione non autofagica rispettivamente in cellule PNT1a e PC-3 a seguito del trattamento con Poly-E**, pag.272. **Conclusioni**, pag.275. **Bibliografia**, pag. 278.



## SOMMARIO.

L'infuso di foglie di tè verde (*C. sinensis*) è una bevanda estremamente popolare in tutto il mondo il cui consumo abituale, secondo solo a quello dell'acqua, è da tempo stato associato a benefici per la salute. Tra questi, oltre ad esiti positivi sul diabete, obesità e malattia neurologiche, quello più rilevante è l'effetto chemiopreventivo in un ampio ambito di patologie tumorali. A tal proposito è da tempo stabilito come, gran parte degli effetti benefici generali e di possibile chemioprevenzione del cancro da parte del tè verde, siano mediate da alcuni dei suoi componenti, i polifenoli e, soprattutto la (-)epigallocatechin-3-gallato (EGCG), la catechina più abbondante in assoluto (50-80% del peso secco di una foglia; 200-300 mg in una tazza di tè verde).

L'attività chemiopreventiva dell'EGCG è supportata da osservazioni epidemiologiche, studi su colture cellulari, su modelli animali e sull'uomo. Recenti studi clinici di fase I e II sono stati condotti per esplorare gli effetti chemiopreventivi dell'EGCG negli esseri umani rivelando come il trattamento con EGCG inibisce, con varie modalità ed in organi diversi (quali fegato, polmone, stomaco, seno, prostata e colon), la proliferazione e la trasformazione di cellule pre-neoplastiche e neoplastiche come pure la neoangiogenesi, l'invasione del tumore e la formazione di metastasi in organi diversi come fegato, stomaco, polmone, seno, prostata e colon.

Numerosi studi *in vitro* hanno evidenziato come l'EGCG induca l'arresto della crescita, alterando l'espressione di proteine che regolano il ciclo cellulare e sopprimendo l'espressione di alcuni oncogeni. Provoca inoltre morte cellulare modificando il rapporto delle proteine Bcl2/Bax in maniera da favorire l'apoptosi. Il blocco della proliferazione e l'induzione di morte cellulare sono indipendenti dallo stato della proteina p53 ma, in generale, è possibile affermare che, cellule aventi una p53 funzionante rispondono a dosi inferiori di EGCG. È stato suggerito che i polifenoli estratti dal tè verde siano in grado di inibire il processo di carcinogenesi, modulando una vasta gamma di vie di trasduzione del segnale coinvolte nello sviluppo del cancro, quali Jak/STAT, MAPK, PI(3)K/Akt, Wnt, Notch. È stato anche proposto che, almeno *in vitro*, le catechine estratte dal tè verde siano inibitori dell'attività del proteasoma e che, quindi, interferiscano con le vie di degradazione delle proteine ubiquitina-dipendenti.

È interessante notare come gli effetti antiproliferativi e pro-apoptotici delle catechine del tè verde siano specifici per le cellule trasformate, mentre non si riscontrino effetti tossici su colture primarie di cellule normali. Risultati ottenuti in studi precedentemente pubblicati dal nostro gruppo di ricerca e da altri autori, hanno confermato che l'EGCG risulta efficace nell'inibire la proliferazione sia di cellule epiteliali prostatiche immortalizzate non tumorigeniche (PNT1a), sia di cellule pienamente trasformate, metastatiche, androgeno indipendenti e tumorigeniche, quali le PC-3, risultando invece inefficace in cellule epiteliali prostatiche normali in coltura primaria.

Questo risultato è particolarmente importante, in quanto evidenzia che l'effetto citotossico e citostatico delle catechine del tè verde è specifico per le cellule trasformate.

I dati raccolti hanno confermato come la somministrazione di Polyphenon E® (Poly-E) risulti citotossica per entrambe le linee cellulari, PNT1a e PC-3, sebbene le concentrazioni di inibizione della proliferazione (IC<sub>50</sub>), siano diverse nelle due linee (rispettivamente 35 µg/mL e 145 µg/mL). Inoltre, abbiamo verificato che le due linee cellulari rispondono al trattamento con Poly-E attivando percorsi molecolari diversificati, nei modi e nei tempi di attuazione, che portano in ogni caso all'inesco di un meccanismo di morte programmata.

Le PNT1a reagiscono al trattamento con Poly-E attraverso meccanismi inizialmente citoprotettivi. L'inesco del processo autofagico, che abbiamo verificato fra le 6 e le 12 ore di trattamento, è da considerarsi un evento marginale e transitorio, con funzioni pro-sopravvivenza. Esso risulta anche causa di una concomitante e transitoria attivazione di meccanismi associati a stress del reticolo endoplasmatico (ERS), che tendono ad autolimitarsi dopo le 12 ore. Dalle 24 ore in avanti, gli iniziali percorsi di sopravvivenza messi in atto da queste cellule lasciano il posto all'attivazione di un programma di apoptosi intrinseca che coinvolge sia le propteine BH3-only (membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2) che il clivaggio delle caspasi -9, -7 e -3. Il tutto si conclude con l'attivazione della PARP e la frammentazione del DNA, mentre, in concomitanza, le cellule perdono il contatto con la superficie di crescita e se ne distaccano (morte per anoikis).

Le cellule PC-3 sono più resistenti delle PNT1a al trattamento con le catechine, e richiedono concentrazioni più elevate di Poly-E (145 µg/mL) per andare incontro prima al blocco della proliferazione e poi a morte.

Il processo morfologico più evidente nelle cellule PC-3 dopo la somministrazione di Poly-E è una massiccia vacuolizzazione citoplasmatica che porta a stravolgere l'aspetto della cellula la quale rimane comunque aderente al substrato di crescita fino alla morte. Le indagini da noi svolte hanno permesso di appurare come, in queste cellule, il Poly-E induca un marcato e persistente ERS, che si concretizza nell'induzione del fattore di trascrizione ATF4 e, di conseguenza, nell'aumento della trascrizione di eIF2α (poi fosforilata), GADD34 e CHOP, noti marcatori di stress del reticolo. L'aumento dell'espressione di questi geni è stato anche verificato a livello di proteina.

p38 MAPK è un membro della famiglia di MAP chinasi attivato tramite fosforilazione in risposta a varie tipologie di stress. Mentre il percorso di ERK (MAPK attivate da segnali extracellulari) regola principalmente un programma di proliferazione e sopravvivenza, la via di segnalazione che coinvolge JNK è in grado di promuovere sia la proliferazione che l'apoptosi. È già noto in letteratura come la via di p38 MAPK, può essere implicata nella soppressione della tumorigenesi, poichè inibisce la proliferazione cellulare attraverso una riduzione dell'espressione della ciclina D1 e il coinvolgimento di geni oncosoppressori quali p16/Rb e p19ARF/p53.

Mentre in cellule PNT1a il ruolo di p38 MAPK, sulla base delle indagini dai condotte, non appare definibile con chiarezza, nelle cellule PC-3 abbiamo verificato una marcata attivazione di p38 $\alpha$  dopo 24 ore di trattamento con Poly-E, che si mantiene fino a 48 ore. L'aumento della fosforilazione di p38 $\alpha$ , nelle cellule PC-3, correla con l'aumento dell'espressione di proteine pro-apoptotiche della famiglia Bcl-2, come PUMA e Bax, coinvolte nell'attivazione della via di morte che culmina con l'aumento della permeabilizzazione della membrana mitocondriale ed il rilascio di AIF. Non possiamo inoltre escludere che, sempre p38 $\alpha$ , sia coinvolto nell'attivazione di CHOP di concerto con ATF4, e contribuisca a mantenere elevati i valori di questo marcatore di ERS.

In conclusione, i nostri dati evidenziano come il reticolo endoplasmatico rappresenti un bersaglio cellulare particolarmente importante nel meccanismo di azione antiproliferativo e pro-apoptotico delle catechine del tè verde. Ulteriori approfondimenti saranno necessari per delucidare, in termini meccanicistici, quali molecole intervengano fra l'induzione dell'ERS, l'UPR e l'attivazione di meccanismi effettori di morte cellulare.

Gli estratti standardizzati di catechine del tè verde si propongono come agenti naturali nella prevenzione del cancro per la loro assenza di tossicità sicurezza, i bassi costi e la biodisponibilità. Pertanto potrebbero risultare utili ulteriori approfondimenti sulla valutazione dell'utilizzo delle catechine da sole o in combinazione con terapie convenzionali per la prevenzione della progressione tumorale e/o il trattamento delle neoplasie umane.



# I

## **PARTE PRIMA**

---

1. Profondo verde
2. Cellule dure a morire
3. Le Relazioni Pericolose
4. Carcinoma della Prostata:  
Dr. Jekyll e Mr. Hyde



# 1

## PROFONDO VERDE.

---

**1** Secondo un'antica leggenda cinese, la scoperta del tè (*C. sinensis*, Theaceae) va attribuita a un loro remoto imperatore, Shénnóng (神農) o Shen Nung, di cui si dice che avesse testa d'uomo e corpo di serpente. Shen Nung, attento e rispettoso dell'igiene, era spesso in viaggio e nel corso delle sue peregrinazioni era solito, durante i ristori meditativi, bere soltanto acqua di ruscello posta a riscaldare sul fuoco. Un giorno, nel 2737 a.C., mentre l'imperatore era seduto a riposare all'ombra di un albero di tè selvatico, la brezza fece cadere alcune foglie all'interno dell'acqua messa a bollire: il liquido si fece all'istante di colore giallo-oro e diffuse una dolce fragranza. L'imperatore bevve l'infuso e dichiarò che esso dava *“vigore del corpo, felicità della mente e determinazione degli scopi”*.

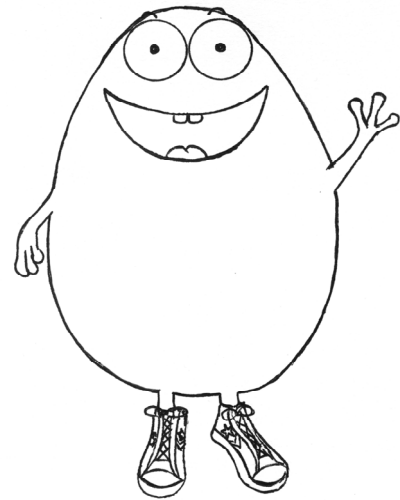
Il tè fu introdotto in Giappone dalla Cina come bevanda medicamentosa attorno all'800 d.C. da alcuni monaci buddisti che si erano recati in Cina per motivi di studio. Nel 1211, il monaco zen Eisai scrisse il libro giapponese sul tè intitolato **“Conservare la salute bevendo tè”** (“Kissa yojoki”), nel quale spiegava come *“Il tè è una medicina miracolosa per salvaguardare le condizioni di salute. Ha una straordinaria capacità di prolungare la vita. Laddove viene coltivato, si vive più a lungo”*. Dai tempi antichi, il tè viene considerato una medicina. Per assorbirne i suoi naturali e benéfici componenti, occorre macinare finemente le preziose foglie fino a ottenere una polvere, proprio come avviene per la maggior parte delle altre piante medicinali. Lo stesso Ippocrate, il padre della medicina, quasi 25 secoli fa, proclamò: “Fa che il cibo sia la tua medicina e la medicina il tuo cibo”. Esplorare l'associazione tra dieta e salute continua ancora oggi. È risaputo, ad esempio, che ben il 35% di tutti i tumori può essere prevenuto da opportuni cambiamenti del regime alimentare. La carcinogenesi è un processo a più fasi che coinvolgono la trasformazione, la sopravvivenza, la proliferazione e l'invasione, l'angiogenesi e la formazione di metastasi del tumore; l'insieme di queste fasi può richiedere fino a 30 anni. Come la dieta può prevenire il cancro è al centro di molte discussioni. Particolare importanza rivestono i nutraceutici, composti derivati da spezie, legumi, frutta, noci e verdure, i quali possono modulare le vie infiammatorie e dunque influenzare le tappe attraverso cui progredisce un tumore [1].

### Un po' di epidemiologia.

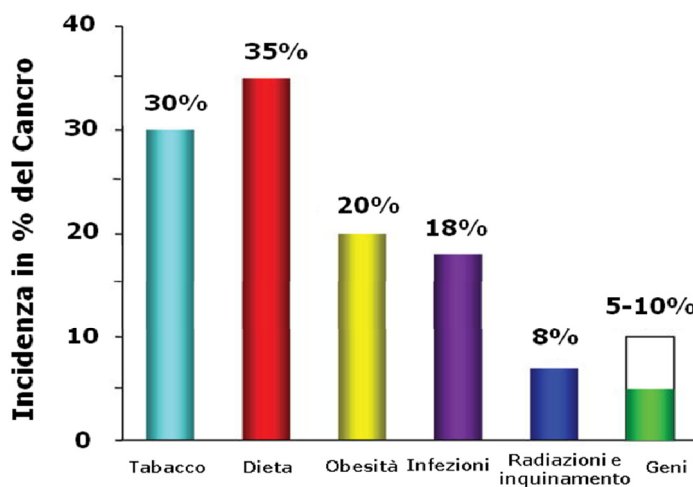
**2** La formazione di tumori negli esseri umani è un processo a più stadi, nel corso dei quali l'accumulo di alterazioni di fattori genetici ed epigenetici conduce alla progressiva trasformazione di una cellula normale in una cellula maligna.

Le cellule tumorali acquisiscono abilità diverse: diventano resistenti alla inibizione della crescita, proliferano senza dipendenza da fattori di crescita, replicano senza limiti eludendo l'apoptosi e metastatizzano [2]. Sebbene i meccanismi con cui le cellule tumorali acquistano queste capacità siano variabili tra le tipologie di tumori, la maggior parte dei cambiamenti fisiologici associati a questi meccanismi coinvolgono l'alterazione delle vie di trasduzione del segnale.

Nonostante lo sviluppo di nuove terapie, il cancro resta la seconda causa principale di morte negli Stati Uniti, quasi un decesso ogni quattro. Oggi si ritiene che il 90-95% di tutti i tumori siano attribuita allo stile di vita, con il rimanente 5-10% a causa di geni difettosi (figura 1) [3]



**Cellula sana e vitale.**

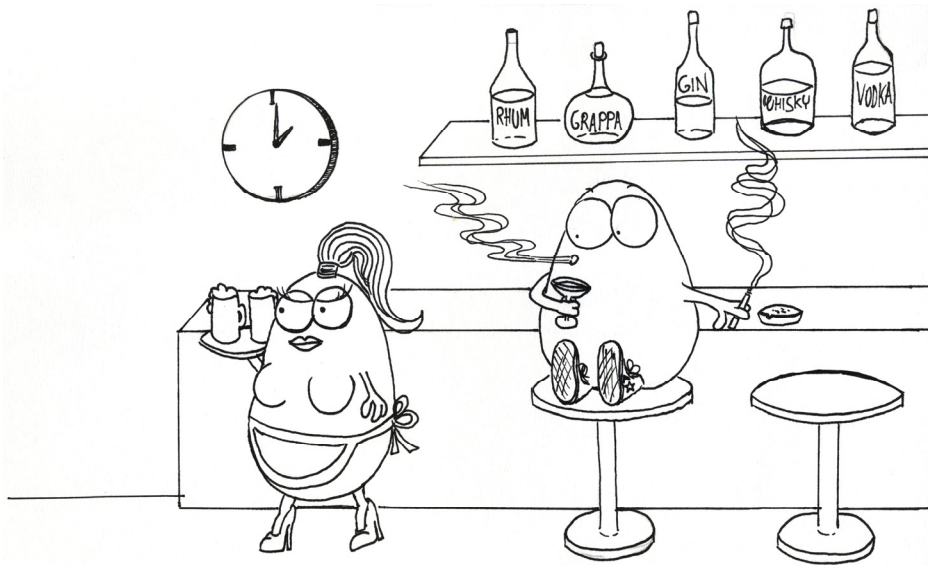


**Figura 1.** Il cancro è una malattia prevenibile che richiede grandi cambiamenti nello stile di vita. (Modificato da Aggarwal BB et al., 2009).

Nel 2010, per esempio, circa 171.000 morti per cancro si sono verificate per il consumo di tabacco. Inoltre, un terzo di tutte le morti per cancro negli Stati Uniti sono imputabili a scarsa attività fisica, sovrappeso e obesità. Quasi 30 anni fa, i Professori Doll e Peto, dopo aver condotto uno studio epidemiologico per l'Organizzazione Mondiale della Sanità, suggerirono come un'appropriata nutrizione potrebbe prevenire circa un 35% di morti per tumore e che fino al 90% di alcuni tumori potrebbe essere evitato valorizzando una corretta alimentazione. Una recente revisione ha fornito una panoramica delle evidenze epidemiologiche a sostegno del ruolo svolta da dieta, farmaci e stile di vita, nella riduzione del rischio di cancro colon-



rettale [4, 5]. Allo stesso modo, numerose fonti di informazioni, riguardo la presenza di determinati agenti nutritivi nella dieta, indicherebbero una riduzione del rischio di sviluppo di tumori della pelle, della prostata, della mammella e del polmone [6-9].



Questo evidenzia come gran parte dell'incidenza di sviluppo di una malattia tumorale potrebbe essere evitata consumando una dieta sana, riducendo l'uso di tabacco, facendo una regolare attività fisica e mantenendo un peso corporeo ottimale.

È ormai chiaro che i fenotipi tumorali risultano dalla mancata regolazione di oltre 500 geni in più passaggi nelle vie di segnalazione cellulare. L'inibizione del prodotto di un singolo gene o di un percorso di segnalazione cellulare è improbabile per prevenire o curare il cancro e le prime terapie anticancro si basavano proprio sull'inattivazione o l'espressione di un singolo bersaglio molecolare. L'inefficacia e l'alto costo di questi approcci hanno portato alla progettazione di farmaci che modulano l'attività di bersagli multipli o la combinazione di diverse molecole attive contro più bersagli molecolari. Come risultato, le aziende farmaceutiche sono sempre più interessate a sviluppare terapie "multi target", anche con molecole di origine vegetale.

### I nutraceutici.

**3** Molti agenti nutritivi di origine vegetale presenti nella dieta hanno facoltà di intervenire in più percorsi di segnalazione cellulare. Inoltre, questi prodotti sono meno costosi, più sicuri e facilmente disponibili di quanto lo siano i farmaci di sintesi [10, 11]. Alcuni di questi agenti nutritivi sono attualmente in uso in studi clinici ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), mentre altri sono già stati approvati per i loro effetti benefici [12].


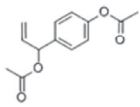

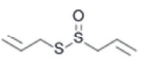

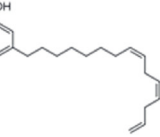

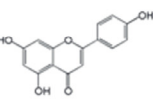

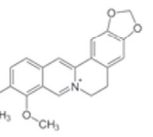

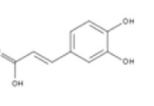

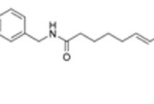

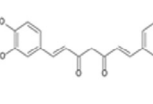

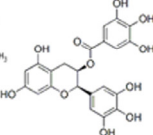

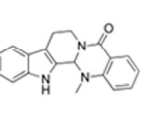

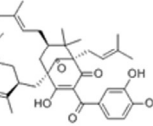

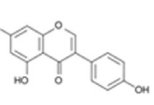

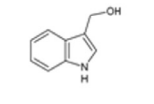

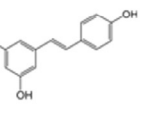

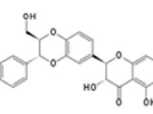

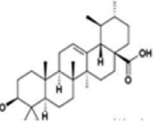

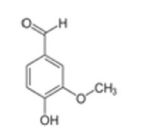

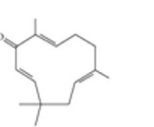
A tali sostanze è stato attribuito il nome di **nutraceutico** (termine formato dalla combinazione delle parole "nutrizione" e "farmaceutica" e coniato da

Stefano DeFelice nel 1989) per designare semplicemente qualsiasi sostanza considerata un alimento (o parte di un alimento) che fornisce benefici per la salute. Negli ultimi dieci anni, un certo numero di nutraceutici sono stati identificati da fonti naturali; si tratta di molecole chimicamente diverse che possono agire a livello di bersagli molecolari presenti nei cinque specifici processi di tumorigenesi: **sopravvivenza, proliferazione, invasione, angiogenesi e metastasi** (tabella 1). Diversi nutraceutici sono non solo in grado di inibire la tumorigenesi uccidendo le cellule trasformate ma anche di potenziarla, risparmiando le cellule tumorali ed eliminando quelle sane [13, 14]. Nella tabella 1.1 sono riportati alcuni del vasto numero di nutraceutici identificati fino ad oggi.

**Tabella 1. Sorgente dei nutraceutici e loro molecole target legate ai tumori.**

NUTRACEUTICI	BERSAGLI MOLECOLARI
<b>ACA</b>	• Survivina, IAP-1/-2, XIAP, Bcl-2, Bcl-X <sub>L</sub> , Bfl-1/A1, FLIP, ciclina D1, c-Myc
<b>Allicina</b>	• ICAM-1, FGF2, VEGF
<b>Acido Anacardico</b>	• Bcl-2, Bcl-X <sub>L</sub> , cFLIP, cIAP-1, survivina, ciclina D1, COX-2
<b>Apigenina</b>	• ICAM-1, HIF-1, VEGF
<b>Berberina</b>	• Bcl-2, Bcl-X <sub>L</sub> , ciclina D1, c-Myc, FAK, IKK, NF-κB, u-PA, MMP-2/-9
<b>Acido Caffeico</b>	• MMP-9
<b>Capsaicina</b>	• Bcl-2, Bcl-X <sub>L</sub> , survivina, E2F, PI3K/AKT/Rac1, VEGF, p38 MAPK, p125(FAK), AKT
<b>Curcumina</b>	• IAP-1, Bcl-2, survivina, PAK1, ciclina D1, VEGF, NF-κB, AP-1
<b>EGCG</b>	• Bcl-2, Bcl-X <sub>L</sub> , Mcl-1, PI3K/AKT, Ras/ERK, JAK/STAT, NF-κB, AP-1, uPA, VEGF, ERK-1/-2
<b>Evodiamine</b>	• Bcl-2, Bcl-X <sub>L</sub> , Mcl-1, cdc25c, ciclina B1, cdc2, NF-κB, MMP-9
<b>Garcinolo</b>	• Src, ERK, AKT, ciclina D3
<b>Genisteina</b>	• Bcl-2, Bcl-X <sub>L</sub> , ATM, Chk-1/-2, cdc25, NF-κB, AP-1, u-PA, VEGF, FGF-2, NF-κB, AKT
<b>Indolo-3-carbinolo</b>	• p53, casp-8, E-caderina, α-, β-, e γ-catenin
<b>Quercetina</b>	• Bcl-X <sub>L</sub> , ciclina D1, MMP-2/-9, VEGF, STAT-3
<b>Resveratrolo</b>	• Survivina, NF-κB, MMP-2/-9, VEGF, FGF, MAPK
<b>Silibinina</b>	• p53, Bax, Apaf-1, Casp-3, CDK-2, -4, -6, Ciclina D1, D3, E, p18, p21, p27, MMP-2, u-PA, TIMP-2, NOS, COX, HIF-1α, VEGF
<b>Acido Ursico</b>	• JNK, AKT, COX-2, cyclin-D1, NF-κB, MMP-9, VEGF, NO
<b>Vanillina</b>	• MMP-9, HGF, PI3K/AKT, VEGF
<b>Zerumbone</b>	• Bcl-2, ciclina B1, cdc25c, cdc2, NF-κB, MMP-9

## Composti fitochimici ad attività antitumorale di origine alimentare.

<b>GALANGA</b> <i>(Alpinia galanga)</i>  Acetossi ciavicolico acetato 	<b>AGLIO</b> <i>(Allium sativa)</i>  Allicina 	<b>ANACARDO</b> <i>(Semecarpus anacardium)</i>  Acido anacardico 	<b>PREZZEMOLO</b> <i>(Pestroselinum crispum)</i>  Apigenina 	<b>CRESPINO</b> <i>(Berberis vulgaris)</i>  Berberina 	<b>CAFFE'</b> <i>(Coffea arabica)</i>  Acido caffeico 
<b>PEPERONCINO</b> <i>(Capsicum annuum)</i>  Capsaicina 	<b>CURCUMA</b> <i>(Curcuma longa)</i>  Curcumina 	<b>TE' VERDE</b> <i>(Camellia sinensis)</i>  Epigallocatechina-3-gallato 	<b>EVODIA</b> <i>(Evodia rutaecarpa)</i>  Evodiammina 	<b>GARCINIA</b> <i>(Garcinia indica)</i>  Garcinolo 	<b>SOIA</b> <i>(Glycine max)</i>  Genisteina 
<b>BROCCOLI</b> <i>(Brassica oleracea italica)</i>  Indolo-3-carbinolo 	<b>UVA ROSSA</b> <i>(Vitis vinifera)</i>  Resveratrolo 	<b>CARDO MARIANO</b> <i>(Silybum marianum)</i>  Silibinina 	<b>MELA</b> <i>(Malus communis)</i>  Acido ursico 	<b>VANIGLIA</b> <i>(Vanilla planifolia)</i>  Vanillina 	<b>GINGER SELVATICO</b> <i>(Zingiber zerumbet)</i>  Zerubone 

**TABELLA 1.1** Comuni sorgenti di nutraceutici che includono frutti, verdure, semi e spezie e loro formula di struttura.

### Riassunto.

**4**

*La tumorigenesi è un processo a più fasi regolato da molteplici vie di segnalazione, bersaglio delle terapie anticancro. Molte delle vie cellulari si sovrappongono e, pertanto, la scelta di un singolo bersaglio da colpire potrebbe, in ultima analisi, avere poco o nessun effetto. La strategia vincente è la necessità di più terapie combinate o un'unica terapia che colpisca più bersagli. I nutraceutici sono poco costosi, prontamente disponibili, con una potenziale attività su più bersagli molecolari che ha attirato l'attenzione delle scienze mediche in questi ultimi dieci anni come possibile nuova arma nella lotta contro il cancro. Tuttavia, l'efficacia della maggior parte dei nutraceutici è stata testata solo in condizioni pre-cliniche, sia in vitro che in vivo. Se e come gli effetti benefici potranno esercitarsi anche sugli esseri umani è in gran parte sconosciuto. In alcuni casi, l'interruzione di un percorso molecolare può portare a modificazioni di tipo patologico. Per esempio, la funzione anti-angiogenica del resveratrolo non è solo limitata all'angiogenesi patologica ma colpisce anche l'angiogenesi fisiologica [15]. È inoltre possibile che le osservazioni ottenute in contesti sperimentali non fossero dovute all'attività del nutraceutico ma sostenute da forme intermedie o metaboliti dello stesso formati durante il processo. Infine, non è da sottovalutare il problema della scarsa biodisponibilità e l'utilizzo di ingenti quantità di nutraceutici per ottenere effetti concreti. L'introduzione di analoghi sintetici potrebbe essere una soluzione per queste limitazioni. È chiaro dunque come sia necessaria una migliore comprensione dell'efficacia dei nutraceutici nella prevenzione del cancro. Gli studi futuri dovrebbero concentrarsi sulla caratterizzazione attenta e accurata dei meccanismi molecolari coinvolti nelle azioni dei nutraceutici, la determinazione della loro efficacia dopo studi in vivo su modelli animali di cancro e la dimostrazione della loro sicurezza ed efficacia negli studi clinici condotti su esseri umani.*

## I Polifenoli del tè verde.

**5**

Mangiare cinque porzioni di frutta e verdura al giorno è ciò che è altamente raccomandato e pubblicizzato oggi per garantire salute e forma fisica. Bere tè verde regolarmente, mangiare cioccolato di tanto in tanto, oltre che gustare un paio di bicchieri di vino rosso al giorno è stato dimostrato aumentare la durata media della vita. Perché? La risposta è ancora oggetto di esame scientifico, ma una particolare classe di composti naturali che si trovano in frutta e verdura è considerata fondamentale per apportare benefici alla salute umana: si tratta dei polifenoli.

A tal proposito, esistono evidenze ormai certe che i polifenoli del tè verde, in particolare la (-)-epigallocatechin-3-gallato, inibiscono la carcinogenesi

attraverso meccanismi non completamente caratterizzati dal punto di vista biochimico [16].

### Definizione e caratteristiche biochimiche dei polifenoli.

**6** Prima di essere chiamati polifenoli, queste molecole erano denominate “tannini vegetali” ed identificate come estratti di varie piante utilizzati essenzialmente per la concia della pelle di animali, allo scopo di trasformarla in cuoio. Una raffinata definizione a livello molecolare di cosa fossero i polifenoli arrivò da Edwin Haslam, biochimico britannico che ha dedicato la sua carriera allo studio di molti, se non tutti, gli aspetti della scienza dei polifenoli. Haslam propose che il termine “polifenoli” dovesse essere utilizzato per tutti quei composti solubili in acqua con masse molecolari variabili da 500 a 3000-4000 Da ed in possesso di 12-16 gruppi idrossifenolici distribuiti su 5-7 anelli aromatici, per un totale di 1000 Da di massa molecolare relativa. A questo, si aggiungeva quanto già definito anni prima dai biochimici White, Bate-Smith e Swain, ossia la capacità di precipitare alcuni alcaloidi, la gelatina e le proteine [17].

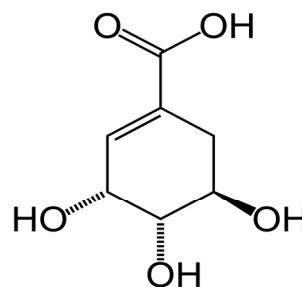
**7** *Cosa sono davvero i polifenoli?* Nel suo libro di riferimento del 1998 intitolato “*Practical Polyphenolics*” Haslam ha riconosciuto solo tre classi di prodotti naturali conformi alle restrizioni implicite nella definizione di White, Bate-Smith, Swain e lo stesso Haslam (definizione WBSSH)[18]. Queste tre classi di “veri” polifenoli sono:

1. le **proantocianidine** (o **tannini condensati**) come le *procianidine*, che derivano dalla oligomerizzazione di unità flavan-3-olo ossia (Epi)catechina, epigallocatechina e fisetinidolo [19];
2. i **gallo- ed i ellagi-tannini** (o **tannini idrolizzabili**), ricavabili dal metabolismo dei derivati shikimati dell’acido gallico (Box 1.) [20];
3. i **florotannini** che si trovano nelle alghe rosso-marrone ed essenzialmente derivano dall’oligomerizzazione di floroglucinolo (1,3,5-triidrossibenzene) [21].

Queste tre classi di polifenoli sono tutti raggruppati sotto il termine di **TANNINI** che deriva dalla parola francese “tan” (polvere di corteccia di quercia tradizionalmente utilizzata per la concia delle pelli), essa stessa etimologicamente derivata dall’antica radice lessicale celtica “*Tann*”, con il significato di “quercia”.

**Box 1. L’acido shikimico**, più comunemente noto nella forma anionica shikimato, è un importante intermedio biochimico in piante e microorganismi. Il suo nome deriva dal fiore giapponese *shikimi* (*Illicium anisatum*) da cui è stato isolato per la prima volta. L’acido shikimico è un precursore biosintetico delle seguenti classi di composti:

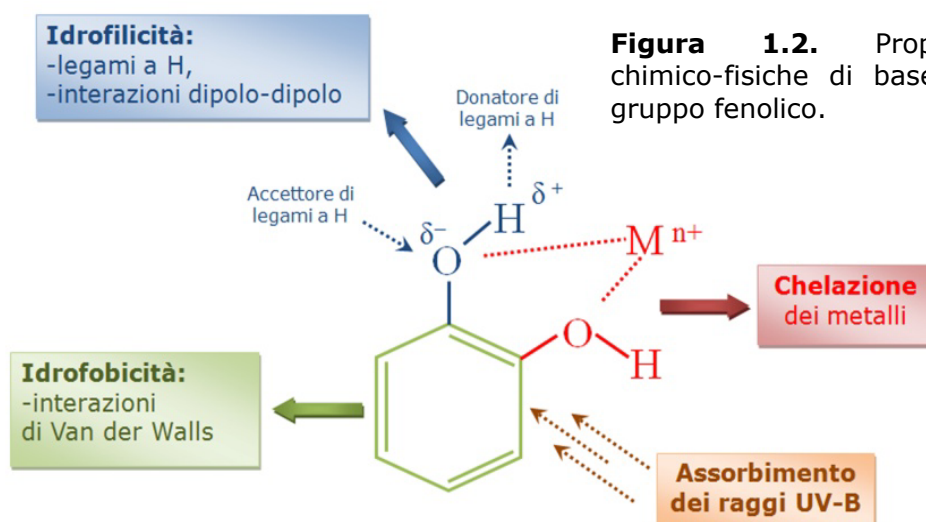
- *aminoacidi aromatici fenilalanina, tirosina e triptofano; indolo e derivati indolici;*
- *alcaloidi e metaboliti aromatici;*
- *tannini e flavonoidi.*



Diversi altri gruppi di composti fenolici delle piante, inseriti nella categoria dei tannini, possono essere considerati tuttavia come “veri” polifenoli, rispettando in larga misura la definizione WBSSH. Ne sono un esempio la **epicatechina gallato (ECG)** e l'**epigallocatechina gallato (EGCG)**, flavanoli presenti nel tè verde i quali formano, attraverso trasformazione ossidativa, **teaflavine dimeriche** ed i complessi oligo/polimerici di **tearubigina**, presenti nel tè nero [21].

**8** *Il gruppo idrossifenolico.* Esistono diverse e valide motivazioni per studiare i composti polifenolici. Dall'espressione delle forme strutturali più comuni all'assemblaggio di complessi oligo/polimerici, i polifenoli vegetali presentano una notevole gamma di proprietà biochimico-fisiche, che li rendono piuttosto unici tra i prodotti naturali. In generale, i polifenoli vegetali sono implicati in diversi ruoli, tra cui il conferire resistenza alle piante contro agenti patogeni microbici, animali erbivori ed insetti e proteggerle dalle radiazioni solari, fungendo da schermo contro i raggi UV-B fattore che, probabilmente, fu determinante nel corso dell'evoluzione a breve termine [22].

La forma strutturale più elementare dei polifenoli è rappresentato da un gruppo idrossifenolico (PhOH). Questo rappresenta la porzione anfifilica della molecola che unisce il carattere idrofobico del nucleo aromatico planare con il carattere idrofilo del sostituente idrossilico, il quale può agire sia come donatore di legami a idrogeno o come accettore. Interazioni idrofobiche deboli (tipo forze di van der Waals) e formazione di legami a idrogeno sono apparentemente dicotomici, ma rappresentano spesso effetti complementari sfruttati dai gruppi fenolici per interagire fisicamente con altre biomolecole, tra cui le proteine [23].



**Figura 1.2.** Proprietà chimico-fisiche di base del gruppo fenolico.

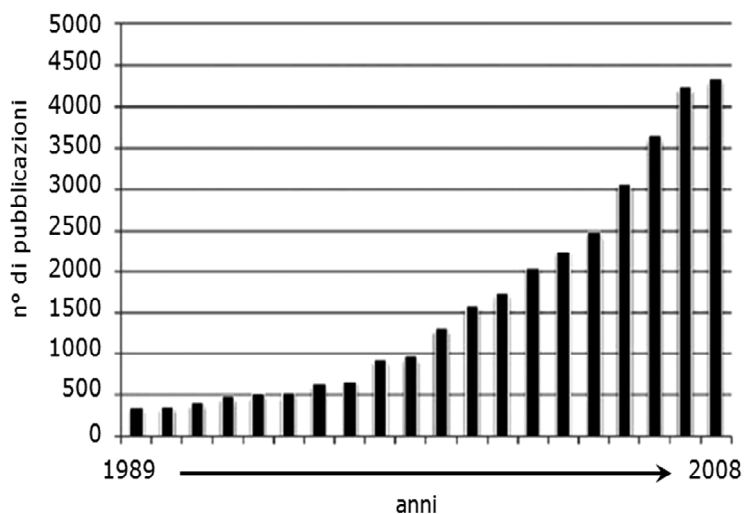
La presenza di due gruppi idrossilici adiacenti su di un anello aromatico consente la chelazione dei metalli, una risorsa importante dei composti fenolici delle piante per il contributo che danno alla pigmentazione così come

all'assorbimento ciclico di nutrienti cationici quali ferro, manganese, calcio, magnesio e rame [24]. Inoltre, comparato con il picco massimo di assorbimento del benzene in acqua (254 nm), il gruppo fenolico presenta un assorbimento spostato verso il rosso, a 270 nm. La presenza di un gruppo idrossilico aggiuntivo e/o quella di un gruppo elettron-attrattore in posizione para-, come un carbonile o un gruppo propenoil estere, spesso prodotti dalle piante, possono spostare ulteriormente l'assorbimento massimo entro il range dei raggi UV-B (280-320 nm). In tal modo, i metaboliti fenolici forniscono una protezione contro i danneggiamenti del DNA indotti dalle radiazioni solari (figura 1.2) [25].

Non deve quindi sorprendere il fatto che l'evoluzione abbia conservato e migliorato la presenza di molecole con gruppi chimici funzionali, grazie ai quali le piante elaborano metaboliti secondari utili al loro sviluppo ed alla loro sopravvivenza. Non deve nemmeno rappresentare una sorpresa che i polifenoli vegetali siano stati da lungo tempo considerati come un *pool* di prodotti naturali bioattivi con potenziali benefici per la salute umana. Estratti di piante, erbe, spezie ricchi in polifenoli sono usati da migliaia di anni nella medicina tradizionale orientale e la letteratura abbonda di *report* in cui si chiarisce che la maggior parte di questi farmaci alternativi a base di erbe comunemente utilizzati oggi presentano come principi attivi uno o più composti fenolici.

L'assunzione regolare di frutta e verdura è oggi fortemente consigliata nelle diete americane ed europee, soprattutto perché si ritiene che i polifenoli in essi contenuti possano svolgere un ruolo importante nella protezione della salute a lungo termine, riducendo in particolare il rischio di patologie croniche e malattie neurodegenerative. Questa aggiornata (ed ancora in aumento) legittimazione dei benefici apportati dai polifenoli vegetali alla salute umana, ha scatenato una rivalutazione di diversi alimenti e bevande derivati dalle piante, come tè, vino rosso, caffè, cioccolato e altri prodotti ricavati da frutta e bacche. Per tale motivo, un enorme aumento del numero di pubblicazioni scientifiche sui polifenoli si è verificato negli ultimi 20 anni (figura 1.3).

**Figura 1.3.** Aumento del numero di pubblicazioni riguardanti i polifenoli dal 1998 al 2008. Sorgente: SciFinder Scholar (modificato da Quideau S. et al., 2011).



**9**

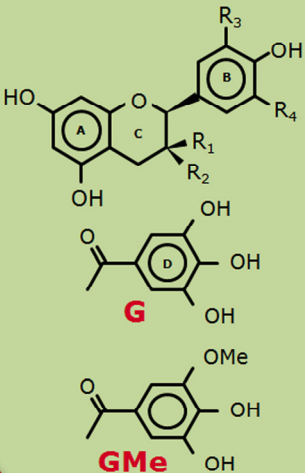
**Chimica di una tazza di tè verde.** I composti fitochimici che si trovano in molti semi, frutti e piante possiedono proprietà antitumorali e rappresentano un promettente approccio terapeutico per la prevenzione ed il trattamento di più tipologie di cancro. È stato a tal proposito dimostrato come i costituenti del tè verde esibiscano varie proprietà biologiche e farmacologiche. La composizione chimica del tè verde ad uso alimentare, fatta eccezione per poche reazioni enzimatiche che si verificano subito dopo la raccolta, rappresenta in pratica la composizione delle foglie fresche dato che, la procedura di lavorazione, prevede la sola essiccazione ad alte temperature e non la fermentazione (parziale o completa, come accade rispettivamente per il tè nero e quello Oolong).

Una tipica tazza di tè verde (100 mL) preparata con una proporzione di 1 g di foglie ogni 100 mL di acqua, non portata all'ebollizione e lasciate in infusione dai 3 ai 5 minuti, contiene circa 142 mg di EGCG, 65 mg di EGC, 28 mg di ECG, 17 mg di EC e 76 mg di caffeina [26].

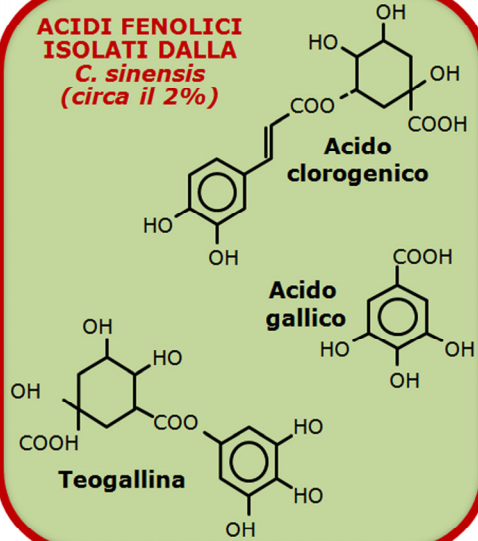
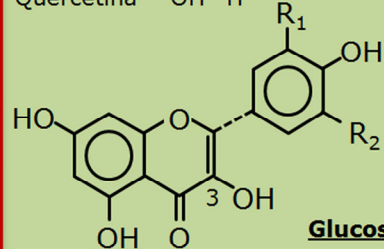
Tutte le catechine sono caratterizzate dalla sostituzione con gruppi triidrossilici sull'anello B e la sostituzione con un gruppo *m*-5,7 diidrossilico sull'anello A. L'anello B risulta il principale sito di reazioni antiossidante e l'attività antiossidante è incrementata da strutture triidrossiliche sull'anello D (gruppo gallato) (figura 1.4). Tra gli altri componenti del tè verde possiamo ricordare i flavonoidi e gli acidi fenolici (figura 1.5), gli alcaloidi e le protoantocianidine (figura 1.6), l'aminoacido teanina (figura 1.7) e, per concludere, vitamine (C, K e del gruppo B) e minerali (alluminio e manganese).



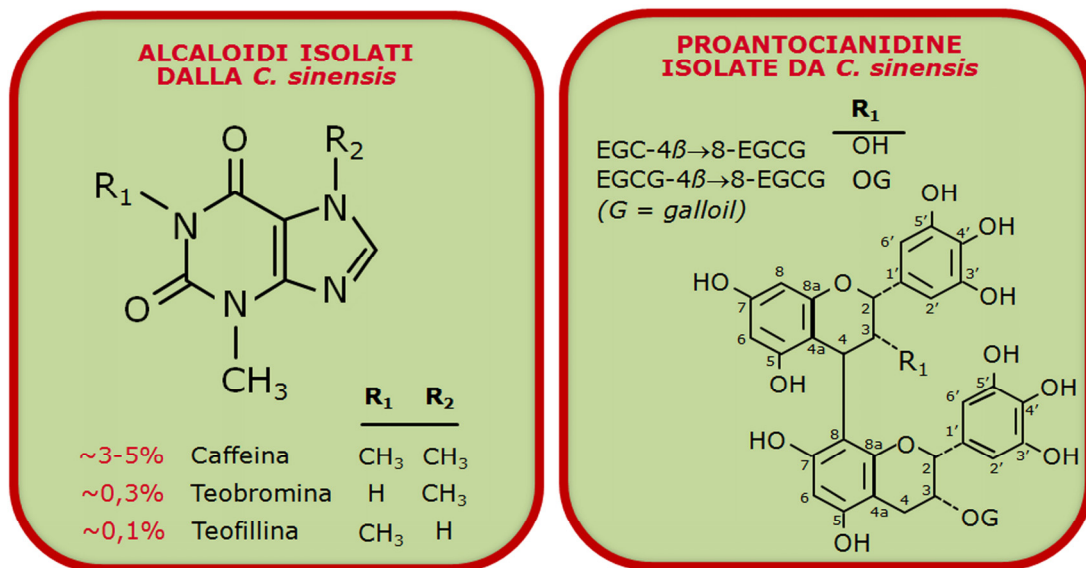


		<b>FLAVANOLI ISOLATI DALLA <i>C.Sinensis</i> (~25-30% nella pianta)</b>			
		<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>R<sub>3</sub></u>	<u>R<sub>4</sub></u>
	(+)-Gallocatechina	OH	H	OH	OH
	(-)-Epigallocatechina	H	OH	OH	OH
	(+)-Catechina	OH	H	H	OH
	(-)-Epigallocatechin 3-O-gallato	H	OG	OH	OH
	(+)-Gallocatechin 3-O-gallato	OG	H	OH	OH
	(-)-Epigallocatechin 3-O-(3'-O-metil)-gallato	H	OGMe	OH	OH
	(-)-Epiafzelechina	H	OH	H	H
	(-)-Epicatechin 3-O-gallato	H	OG	H	OH
	(-)-Epicatechina	H	OH	H	OH

**Figura 1.4.** I prodotti responsabili dell'attività biologica sono i derivati dei flavanoli (catechine ed i loro isomeri, le epicatechine). In particolare la (-)-epigallocatechin-3 gallato (EGCG) è il prodotto più attivo e anche il più abbondante negli estratti di tè verde e nella pianta dove se trova circa il 20-30% in peso secco. Il tè verde ha un contenuto di EGCG 10 volte superiore al tè nero e 2,5 volte superiore al tè Oolong.

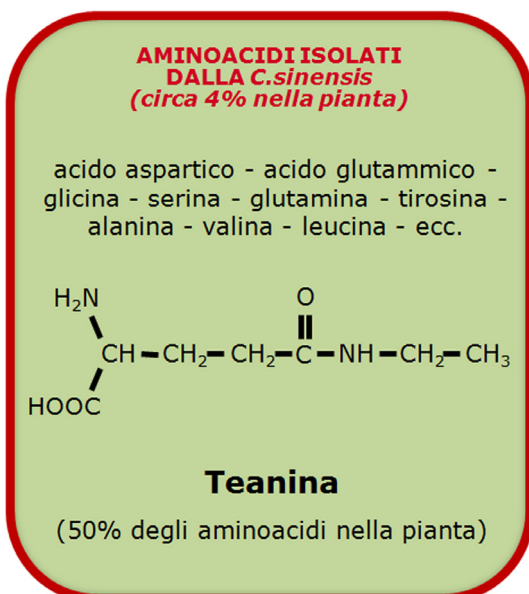
<b>ACIDI FENOLICI ISOLATI DALLA <i>C. sinensis</i> (circa il 2%)</b>		<b>FLAVONOIDI ISOLATI DALLA <i>C. sinensis</i> (circa il 6%)</b>													
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th><u>R<sub>1</sub></u></th> <th><u>R<sub>2</sub></u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Miricetina</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Kampferolo</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Quercetina</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	Miricetina	OH	OH	Kampferolo	H	H	Quercetina	OH	H		<b>Glucosidi</b> 3-O-glucoside 3-O-ramnoside 3-O-ramnodiglucoside
	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>													
Miricetina	OH	OH													
Kampferolo	H	H													
Quercetina	OH	H													

**Figura 1.5.** Un'altra classe di polifenoli presenti nel tè verde sono i flavonoidi derivati della miricetina, quercetina e kampferolo presenti nella pianta per circa il 6% soprattutto sotto forma di glicosidi. Gli acidi fenolici ritrovati nel tè verde (circa il 2% del totale) sono principalmente l'acido gallico, la teogallina (un estere dell'acido gallico) e l'acido clorogenico, un composto praticamente ubiquitario nel mondo vegetale.

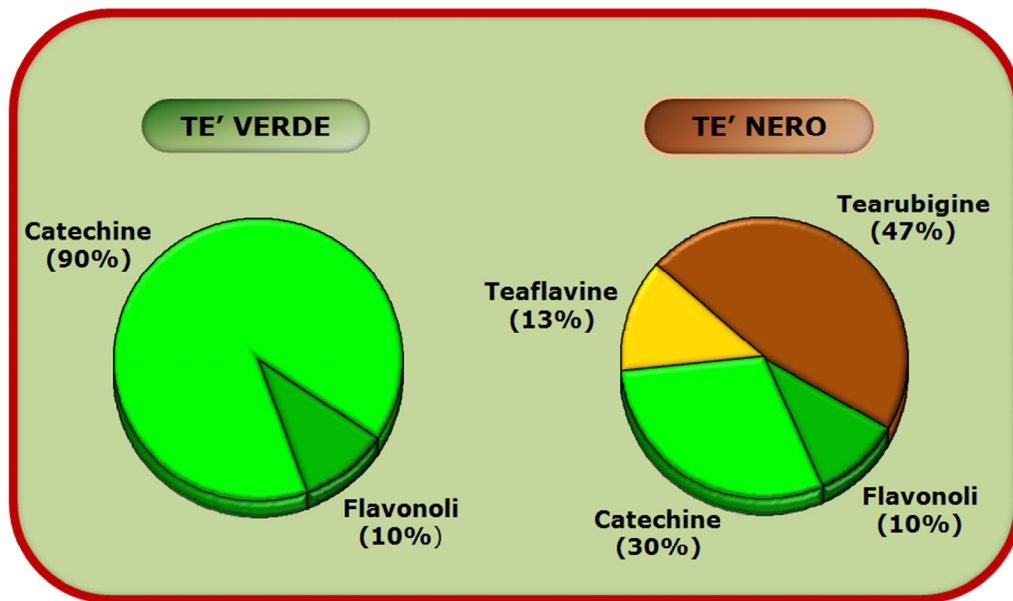


**Figura 1.6.** La quantità di basi puriniche caffeina, teobromina e teofillina presenti nel tè è elevata, intorno al 3-5%, e la caffeina è il composto più abbondante, ~30-50 mg per tazza. Si tratta di un tasso relativamente basso, se confrontato con il tè nero (40-80 mg) e molto inferiore al caffè espresso (tenendo conto dell'inevitabile approssimazione di queste misurazioni). Inoltre gli effetti eccitanti della caffeina sono attenuati dalla presenza della **L-teanina**, che ne riduce l'assorbimento.

Sempre appartenenti alla classe dei polifenoli sono le **proantocianidine** presenti in tracce nel tè verde. Sono dette impropriamente tannini poiché, con questo termine, si indicano in maniera inesatta i polifenoli antiossidanti responsabili dell'aroma e del gusto amarognolo. Sarebbe più opportuno chiamarli "flavonoidi del tè", essendo diversi dai tannini commerciali e dall'acido tannico. Le protoantocianidine, in particolare, sono *tannini condensati* perché sono polimeri di flavonoidi condensati principalmente tramite legami C-C che non vengono facilmente idrolizzati in condizioni normali.

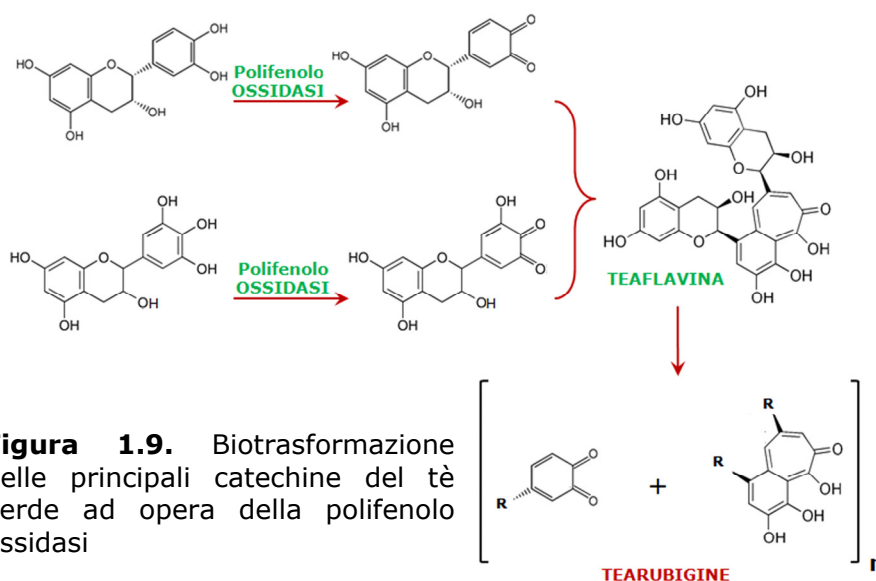


**Figura 1.7.** Un'altra classe di composti importanti nel tè sono gli aminoacidi, presenti nell'ordine del 4%. La teanina è un aminoacido peculiare del tè e rappresenta il 50% degli aminoacidi presenti. L'importanza della teanina deriva dal fatto che, durante la produzione del tè nero, reagendo con i polifenoli produce le aldeidi, responsabili dell'aroma del tè.



**Figura 1.8.** Le catechine reagendo con la polifenolo ossidasi si trasformano principalmente in tearubigina (circa il 47%), teaflavina (13%) mentre il 30% rimane inalterato. I flavonoli non subiscono trasformazioni.

Nella lavorazione del tè nero, invece, la maggior parte dei flavanoli, di natura monomerica, va incontro ad una polimerizzazione ossidativa con formazione di **bisflavanoli**, **tearubigine** e **tea flavine**, dal caratteristico anello benzotropolonico, che conferisce al tè nero il colore ed il sapore caratteristici (figura 1.8 e 1.9). È la presenza di un'enzima distintivo, una **polifenolo ossidasi**, a catalizzare l'ossidazione aerobica delle catechine nel momento in cui la struttura cellulare è danneggiata, durante la lavorazione dei tè nero ed Oolong [27].

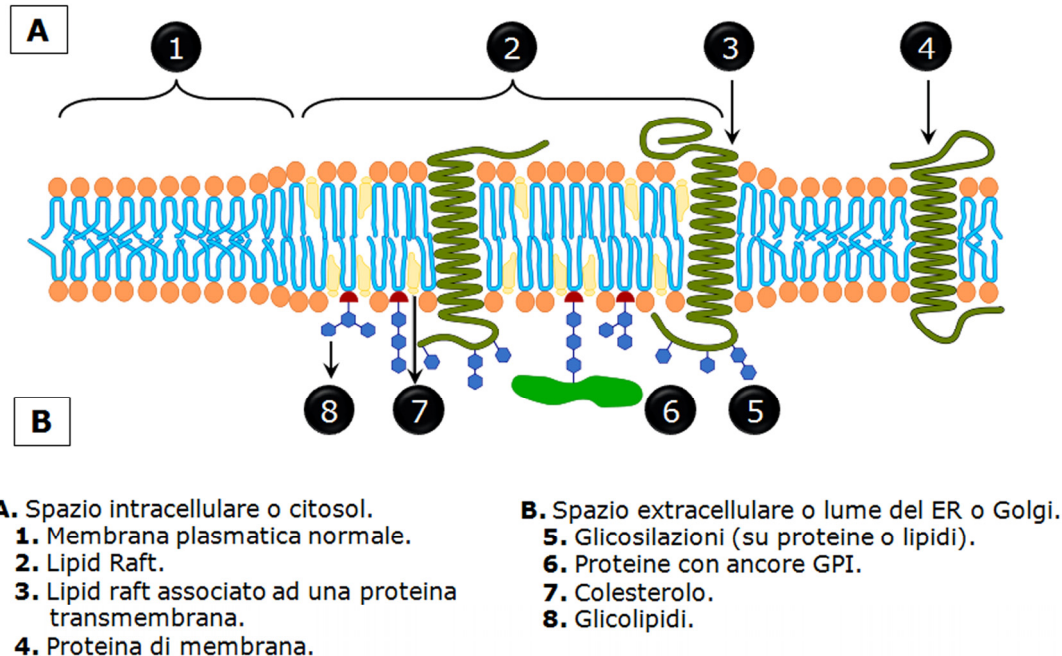


## Polifenoli e cellule eucariotiche.

**10**

**La scoperta di un recettore di superficie per l'EGCG.** Entro un range di concentrazioni variabili tra 0.1 e 100  $\mu\text{M}$  sono stati riportati numerosi effetti biologici anche se, come descritto, gli studi farmacocinetici negli esseri umani indicano come il picco di concentrazione plasmatica di una singola dose di EGCG sia inferiore a 1  $\mu\text{M}$  e scenda ulteriormente a livello intracellulare.

Per chiarire in dettaglio le basi molecolari dell'azione della EGCG è stata utile l'individuazione di un recettore specifico come iniziatore del percorso per la generazione di risposte cellulari e la comprensione della specifica segnalazione operata dall'EGCG. L'acido trans-retinoico (ATRA) esalta il legame di EGCG alla superficie delle cellule tumorali [28]. Utilizzando una strategia di clonaggio a sottrazione, attraverso librerie di cDNA costruite a partire da cellule trattate o non trattate con ATRA, è stato possibile isolare un singolo bersaglio che permetteva il legame di EGCG alla superficie della cellula. La successiva analisi di sequenza del DNA ha identificato in questo sconosciuto candidato il **Recettore per la Laminina da 67-kDa (67LR)**, la maggior parte dei quali si localizza nelle regioni *lipid rafts* (figura 1.10) con un modello di distribuzione che mostra una buona correlazione con il livello di EGCG associato alla membrana plasmatica dopo il trattamento delle cellule [29].



**Figura 1.10. Le zattere lipidiche** (note anche con il corrispondente nome inglese *lipid rafts*) sono regioni della membrana cellulare costituite da una particolare combinazione di glicosfingolipidi e recettori proteici organizzati in microdomini. Questi microdomini di membrana formano compartimenti specializzati che sono adibiti a centri di organizzazione per vari processi: assemblaggio di molecole di

segnalazione, modifica della fluidità di membrana, neurotrasmissione, regolazione e traffico di recettori e altre proteine di membrane. [30] Le zattere lipidiche sono più ordinate e strettamente organizzate rispetto al doppio strato fiancheggiante ma possono fluire liberamente in esso. La ricerca ha dimostrato come i lipid rafts contengono generalmente da 3 a 5 volte la quantità di colesterolo che si trova nel doppio strato circostante e sono inoltre arricchiti in sfingolipidi come sfingomielinina (più del 50% rispetto alla membrana plasmatica).

**11** *67LR, inibizione della crescita ed induzione di apoptosi.* 67LR è stata scoperta da tre laboratori indipendenti nel 1983 (31, 32). Il suo gene, tuttavia, codifica per una proteina di soli 37 kDa. La discrepanza tra i due pesi molecolari è stata successivamente risolta mostrando come il prodotto del gene da 37 kDa funge da precursore monomero al dimero da 67 kDa [33]. Il recettore mostra di essere acilato da tre acidi grassi (palmitato, stearato e oleato) necessari per la formazione del dimero da 67 kDa [34]. L'espressione di 67LR mostra di essere sovra-regolata nelle cellule neoplastiche rispetto alle loro controparti normali e direttamente correlata ad un incremento dell'invasività e del potenziale metastatico [35]. Il recettore è implicato sia nell'aggancio alla **Matrice ExtraCellulare (ECM)**, indotto da laminina, che nella migrazione di cellule tumorali [36].

È interessante notare come il **Precursore del Recettore della Laminina non modificato da 37 kDa (37LRp)** è un componente ribosomiale e, omologhi di questa proteina, si trovano in tutti e cinque i regni. Inoltre, 67LR, sia in forma monomerica che dimerica, ha dimostrato di localizzarsi nel nucleo delle cellule eucariotiche e di interagire con gli istoni [37].

La fosforilazione dei residui Thr18/Ser19 nel **Regolatore della Catena Leggera della Miosina (MRLC)** disciplina l'associazione tra la miosina II e l'actina filamentosa (F-actina) la quale incentiva sia la formazione delle fibre di stress in cellule in interfase che l'anello contrattile nelle cellule in divisione. L'incubazione, con EGCG, di cellule HeLa umane di carcinoma della cervice uterina, causa una loro retrazione, con la comparsa di lacune intercellulari. La disorganizzazione diffusa nelle fibre da stress nel corpo cellulare centrale, a seguito di trattamento con EGCG, ed una riduzione della fosforilazione di MRLC, sembra essere mediata da 67LR, il quale aumenta significativamente la percentuale di cellule in fase G2/M.

La EGCG risulta in grado di indurre, almeno *in vitro*, l'arresto della crescita e la successiva morte cellulare per apoptosi in cellule di Mieloma Multiplo (MM) primario estratte da paziente, pur non avendo alcun effetto significativo sulla crescita delle cellule normali, come le **Cellule Mononucleate del Sangue Periferico (PBMC)** ed i fibroblasti.

**12** *I polifenoli del tè verde come sensori molecolari.* Nel tentativo di chiarire i meccanismi coinvolti nell'azione antitumorale di EGCG è stata adottata la metodologia degli **Elementi di Soppressione Genetica (GSE)**. I GSE sono brevi frammenti di cDNA codificanti dei peptidi che agiscono come inibitori dominanti delle funzioni di una proteina o come RNA antisense per bloccarne l'espressione genica. Per riconoscere i geni che

mediano la sensibilità delle cellule all'EGCG, sono stati selezionati GSE che conferissero resistenza all'EGCG.

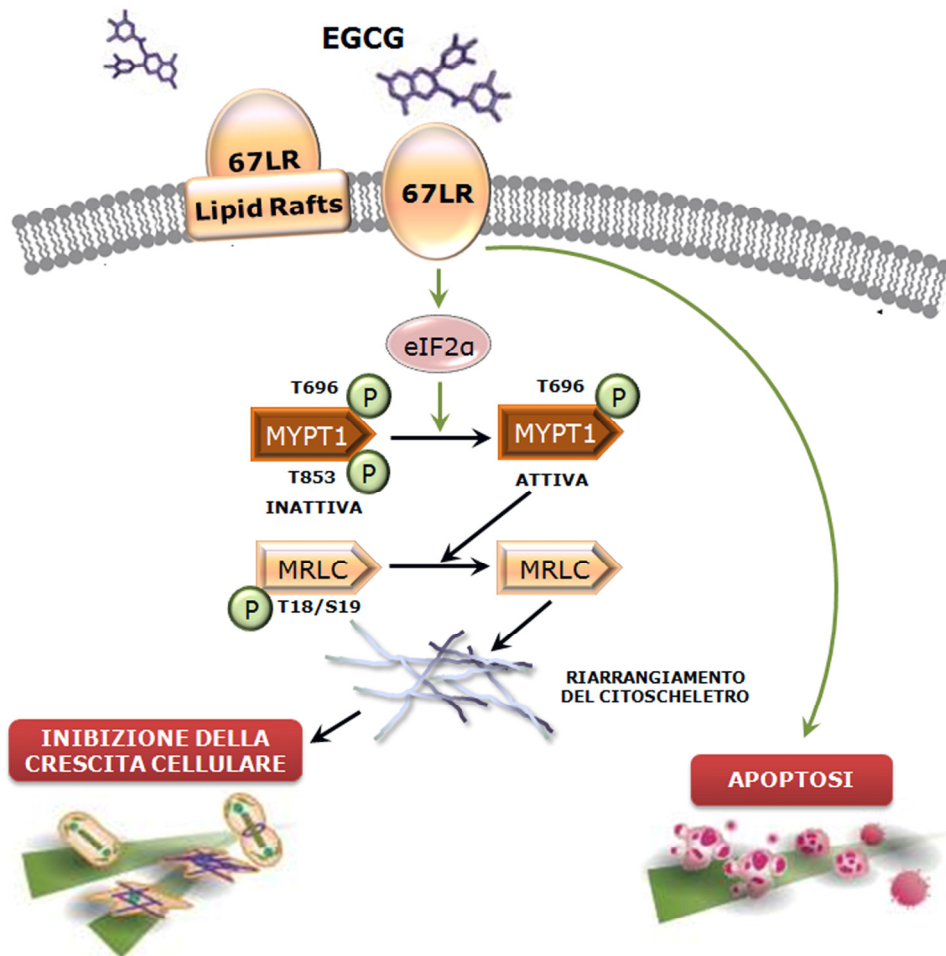
Tra gli elementi genetici posti a protezione delle cellule contro l'inibizione della crescita indotta EGCG è stato isolato un GSE codificante il frammento N-terminale del **Fattore di Allungamento eucariotico 2α (eIF2α)**, componente importante dell'apparato di trascrizione [38].

La mancata trascrizione del gene eIF2α attenua l'effetto inibitorio di EGCG sulla crescita cellulare. Al contrario, la sovra-espressione di eIF2α potenzia gli effetti inibitori della EGCG sulla crescita cellulare ad una concentrazione di 1 μM, simile alla quantità di catechine trovate nel plasma umano dopo aver bevuto due o tre tazze di tè verde.

Come descritto in precedenza, l'inibizione della crescita cellulare indotta da EGCG può derivare dalla riduzione della fosforilazione di MRLC su un residuo di Treonina/Serina attraverso 67LR. Anche l'attività della **Miosina Fosfatasi (MYPT)** può essere inibita dalla fosforilazione della sua subunità MYPT1 su residui di treonina e l'EGCG è in grado di indurre la defosforilazione di MYPT1 sulla Thr696. La riduzione della fosforilazione di MRLC (sempre indotto da EGCG), suggerisce come le catechine attivino la Miosina Fosfatasi, riducendo il livello di fosforilazione della sua subunità MYPT1 [39] e coinvolgendola nell'azione antitumorale della EGCG *in vivo*. Testando l'effetto della somministrazione orale di EGCG sulla crescita tumorale in topi C57BL/6N, sottoposti ad infiltrazione sottocutanea di cellule B16 (cellule di melanoma murino) prive di MYPT1, la crescita del tumore non è stata significativamente ritardata, suggerendo che MYPT1 sia indispensabile per l'attività antitumorale svolta da EGCG.

Inoltre, il riarrangiamento del citoscheletro di actina indotto da EGCG non è più osservabile in cellule HeLa prive di MYPT1 o 67LR. MYPT1 è effettivamente coinvolta a valle del percorso di segnalazione sia di 67LR che eIF2α, innescato da EGCG. A ulteriore dimostrazione di questo è stato scoperto che MYPT1 lega eIF2α e che più della metà del totale di eIF2α (~60%) è complessato all'actina del citoscheletro [39, 40].

Caratterizzare i meccanismi con cui l'EGCG riduce la fosforilazione di MYPT1 e contribuisce alla riorganizzazione del citoscheletro di actina attraverso eIF2α dovrebbe contribuire a una maggiore comprensione della precisa organizzazione del citoscheletro stesso (figura 1.11).



**Figura 1.11. Rappresentazione delle vie di segnalazione attivate da EGCG attraverso 67LR.** Dopo il legame di EGCG a 67LR, a livello dei lipids rafts, si verifica, attraverso eIF2α, la defosforilazione di MYPT1 sulla Thr696 ma non sulla Thr853, che porta all'attivazione della Miosina Fosfatasi. La MYPT defosforila i suoi substrati (ad esempio MRLC), inducendo un riarrangiamento del citoscheletro di actina che potrebbe portare all'inibizione della crescita cellulare. L'EGCG induce anche apoptosi in campioni cellulari prelevati da pazienti affetti da leucemia mieloide con elevata espressione di 67LR rispetto alle normali PBMC. Esperimenti di RNA interference che promuovono l'inibizione dell'espressione di 67LR, conducono al fallimento dell'apoptosi indotta da EGCG, nelle cellule di mieloma, indicando che 67LR svolge un ruolo importante nella mediazione dell'attività di EGCG in cellule di MM, risparmiando le altre PBMCs [37] (*modificato da Tachibana H et al., 2011*).

## Farmacocinetica e farmacodinamica di catechine del tè verde.

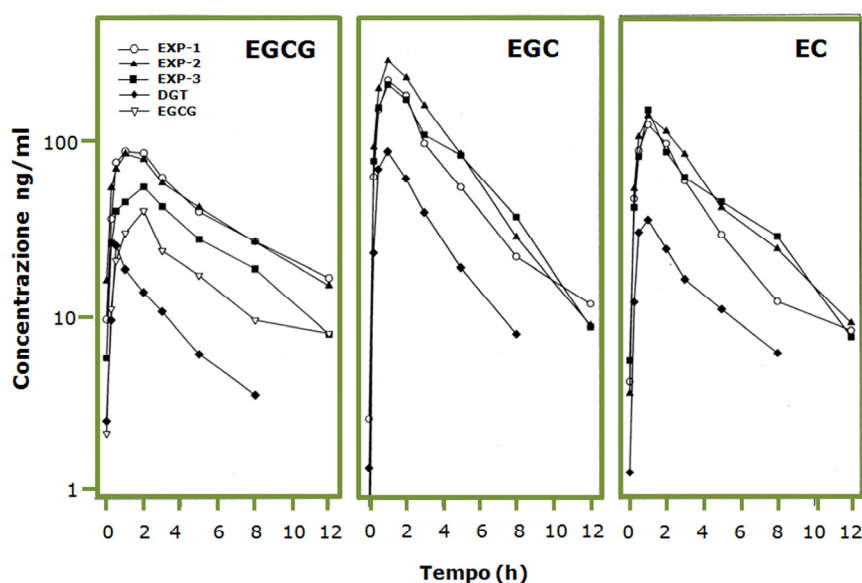
**13**

**Assorbimento.** Studi pre-clinici di farmacocinetica sui componenti del tè verde hanno dimostrato che le catechine del tè sono scarsamente biodisponibili nei roditori, con stime che variano dal 2% al 13% [41]. Più processi possono contribuire alla bassa biodisponibilità del catechine tra i quali:

- bassa solubilità nel fluido intestinale,
- degradazione/metabolismo nel tratto gastrointestinale,
- secrezione intestinale mediata da trasportatori trans-membrana,
- efflusso ed eliminazione epatica pre-sistemica.

I parametri farmacocinetici di EGCG, EGC e EC sono stati analizzati in sistemi animali (roditori) e in volontari umani a seguito di ingestione di una singola dose solida di tè verde (GT), tè verde decaffeinato (DGT) o EGCG. È stato così possibile stimare un tempo, per raggiungere la massima concentrazione nel plasma, variabile da 1,5 a 2,5 ore, mentre i livelli di tutte le catechine decrementano, e non sono più rilevabili, dopo 24 ore [42, 43]. Differenze considerevoli nei parametri farmacocinetici di EGCG, EGC, ed EC sono state osservate tra i singoli soggetti nei ripetuti esperimenti (figura 1.12 e tabella 1.2). Nel complesso

1. il valore di concentrazione (ng/h/mL) di EGCG è simile a quello di EGC ma notevolmente inferiore a quanto osservato per EC;
2. i tempi (in ore) in cui si verifica la massima concentrazione ( $T_{max}$ ) valutata per EGCG, EGC ed EC cadono in un intervallo tra le 1.3 e le 1.6 ore;
3. la biodisponibilità delle catechine del tè appare, nel complesso, mediocre: 0.16%, 0.58% e 1.1%, al  $T_{max}$  delle dosi ingerite di EGCG, EGC ed EC, rispettivamente.



**Figura 1.12. Concentrazione plasmatica rispetto al tempo di EGCG, EGC e EC dopo l'ingestione di GT, DGT, o EGCG puro. I soggetti hanno ricevuto una**



singola dose orale di GT (20 mg/kg), DGT (20 mg/kg) o EGCG (2 mg/kg). I campioni di sangue sono stati raccolti e analizzati. I dati sono il risultato della media di otto soggetti per GT e DGT e sette soggetti per EGCG (*immagine elaborata da Lee M et al. 2002*).

L'assorbimento delle catechine differisce tra le specie con una biodisponibilità paragonabile tra uomo e topi, seguiti dai ratti. La massima concentrazione nel plasma ( $C_{max}$ ) dell'EGCG negli esseri umani appare non superiore a  $0.26 \mu\text{M}$  e può essere accompagnata da un aumento del rischio di tossicità [44, 45]. La scarsa biodisponibilità di catechine del tè verde deve quindi meritare la giusta attenzione nell'ambito di estrapolazione dei risultati ottenuti *in vitro* rispetto a situazioni *in vivo*.

**TABELLA 1.2. Livelli plasmatici di catechine in Uomini, topi e ratti a seguito di ingestione di Tè Verde.**

Catechine	Esseri umani <sup>a</sup> $\mu\text{M}$	Topi <sup>b</sup> $\mu\text{M}$	Ratti <sup>c</sup> $\mu\text{M}$
EGCG	0.26	0.27	0.08
EGC	0.48	0.20	0.18
EC	0.19	0.03	0.07

<sup>a</sup>Somministrazione di 1.5 g di DGT solido (equivalente a 2-3 tazze di tè)

<sup>b</sup>Somministrazione a ratti maschi Sprague-Dawley di DGT solido (9 mg/mL) per 3 settimane

<sup>c</sup>Somministrazione di tè verde (9 mg/mL) a topi femmina SKH-1 per 6 settimane

**14**

**Distribuzione.** I livelli tissutali di catechine del tè verde sono stati stimati in ratti maschi Sprague Dawley che avevano accesso *ad libitum* allo 0,6% di polifenoli del tè verde nella loro acqua potabile per 14 giorni. I livelli di EGC e EC nel plasma di ratto subivano un aumento raggiungendo un picco il quattordicesimo giorno, per poi diminuire (se si consideravano altre due settimane di trattamento).

Le concentrazioni plasmatiche di EGCG erano molto inferiori a quelli di EGC o EC. La più alta concentrazione di EGCG ( $1,1 \mu\text{M}$ ) è stata trovata a livello intestinale, mentre, la più alta concentrazione di EGC, nella vescica ( $2,6 \mu\text{M}$ ). Altri tessuti con significative concentrazioni di EGCG ed EGC includevano rene, polmone e prostata (nella quale è stato rilevato un contenuto di EGC, EC e EGCG rispettivamente pari a  $0,8 \mu\text{M}$ ,  $0,8 \mu\text{M}$  e  $0,1 \mu\text{M}$ ). Basse concentrazioni di catechine del tè sono state osservate in fegato, milza, cuore e tiroide. Alti livelli di EGC e EC sono stati trovati nelle urine mentre nelle feci compariva molta EGCG. I cambiamenti nelle escrezioni urinarie e fecali di catechine del tè non sono in grado di spiegare le sopra descritte variazioni dei livelli plasmatici; le quantità di catechine nei diversi tessuti riflettono pertanto differenti modelli di assorbimento e escrezione [46].

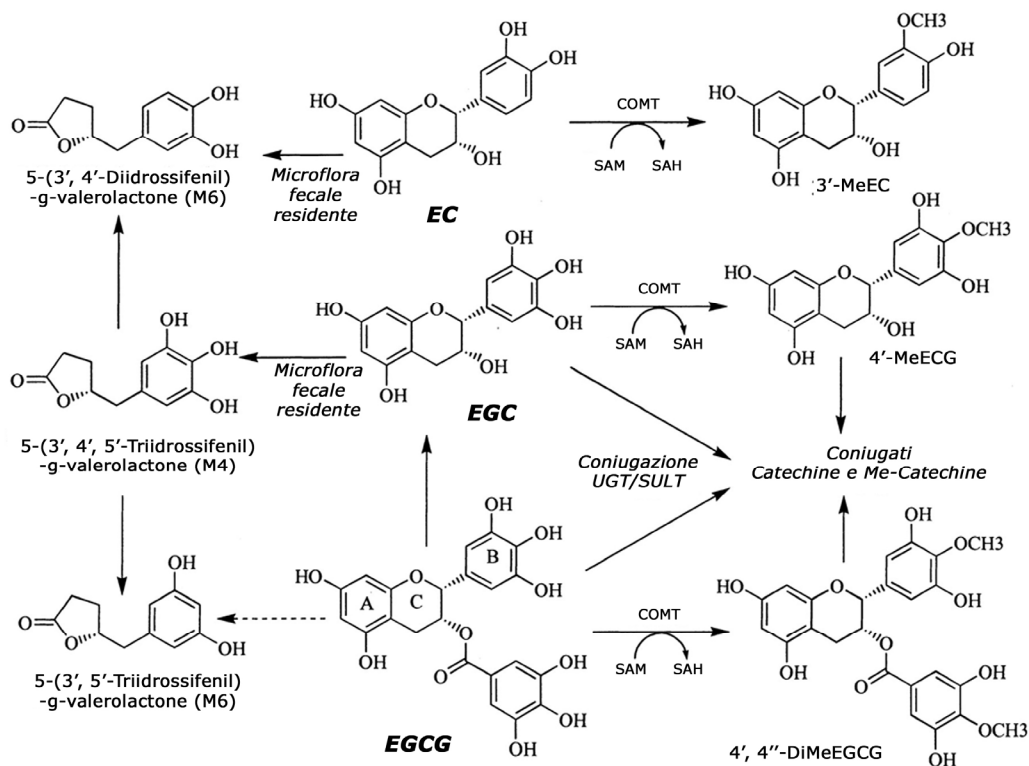
**15**

**Enzimologia e biotrasformazione.** È stata ampiamente caratterizzata la biotrasformazione delle catechine in sistemi umani e animali (roditori).

Nel sangue, il 77% degli EGCG appare in forma libera anche se possibile bersaglio di metilazione. EC, EGC e la restante percentuale di EGCG sono

presenti principalmente in forma coniugata, come glucuronato e coniugati solfati, e questo potrebbe rappresentare un fattore determinante per la biodisponibilità di questi composti negli esseri umani.

Mentre EGCG e ECG non sono stati rilevati nelle urine, il 90% dell'EC e dell'EGC sono escreti entro 8 ore. La maggior parte dell'EGCG ingerito non sembra apparentemente entrare in circolo ed è preferenzialmente eliminato attraverso la bile nel tenue. **Glucuronidazione, solfatazione ed O-metilazione** (altamente dose-dipendente e promossa da una **Catecol-O-metiltransferasi, COMT**, nel citosol degli epatociti) rappresentano i principali percorsi di metabolizzazione delle catechine del tè verde (vedi figura 1.13) [47]



**Figura 1.13. Principali vie metaboliche delle catechine del tè verde.**

- **GLUCORONIDAZIONE.** Reazione di coniugazione in cui la **Uridin 5'-difosfato Glucuronosil Transferasi (UGT)** catalizza il trasferimento di **acido glucuronico** ad anelli aromatici.
- **O-METILAZIONE.** La O-metilazione è catalizzata da un enzima Mg-dipendente, la **Catecolo O-Metil Transferasi (COMT)**, che metila un gruppo idrossilico di anelli aromatici. La COMT mostra una distribuzione ubiquitaria ma è particolarmente attiva nel fegato e nei reni.
- **SOLFATAZIONE.** Le **Sulfo Transferasi (SULT)** sono una famiglia di enzimi che utilizzano la **3-Fosfo Adenosina-S-Fosfo Solfato (PAPS)** come donatore di un gruppo solfato. Si tratta di enzimi citosolici che condividono molte proprietà fisico-chimiche ed hanno una specificità di substrato largamente sovrapposta. I maggiori livelli di espressione delle SULT sono stati trovati nel fegato.

**16** *Metabolismo ed eliminazione.* Il metabolismo epatico pre-sistemico è spesso una spiegazione per la bassa biodisponibilità dei farmaci e sembra intervenire anche nella rimozione di molecole come le catechine.

Un altro possibile meccanismo di eliminazione delle catechine del tè verde è mediata dalla **Proteina 2 Multi Resistente a farmaci (MRP2)**, un trasportatore di efflusso intestinale (valutato utilizzando la linea cellulare di tumore intestinale Caco-2) [48]. Le catechine hanno dimostrato di essere abbastanza stabili a un pH <6,5, tuttavia, EGC e EGCG sono rapidamente degradate a pH >7,4 [49]. Ci si attende che tali composti siano piuttosto stabili nello stomaco mentre, una volta che EGC e EGCG entrano nel tratto gastrointestinale (intervallo di pH 5-8), risultano essere più sensibili alla degradazione, spiegando forse la loro bassa biodisponibilità. È interessante notare come l'EC sia stabile a un intervallo di pH incredibilmente ampio (da 1,8 a 11,2). Il tratto gastrointestinale rappresenta un ambiente reso complesso dalla presenza della flora batterica intestinale e di enzimi in grado di modificare e contribuire a rimuovere composti estranei. Forse per tale motivo, un notevole aumento dei livelli ematici di EGCG, EGC e ECG libero, si è osservato in soggetti ai quali veniva somministrata una miscela standardizzata di catechine a stomaco vuoto da digiuno, rispetto a coloro che avevano ingerito la miscela con il cibo [50]. La presenza di cibo ritarda infatti lo svuotamento gastrico e aumenta il pH dello stomaco facendo così diminuire la stabilità delle catechine del tè verde che divengono più facilmente aggredibili dalla microflora intestinale.

**17** *Sicurezza e tossicità del tè verde e dell'EGCG.* Vi sono scarse segnalazioni di reazioni avverse a seguito dell'uso di polifenoli del tè verde anche nelle popolazioni che non lo consumano abitualmente. L'effetto collaterale più evidente fino ad oggi osservato negli studi clinici sono state segnalazioni di stati di nervosismo, imputabili all'assunzione della caffeina. Le preparazioni farmaceutiche altamente standardizzate e purificate utilizzate in contesti sperimentali, come il Poliphenon-E<sup>®</sup>, contengono pertanto una quantità molto limitata di caffeina (~0,5% w/w). Supplementi dietetici del tè verde mostrano il potenziale per aumentare significativamente la quantità di catechine ingerite su base giornaliera, rispetto al consumo del tè come bevanda, anche se sono stati riportati casi di tossicità epatica [51].

La valutazione della citotossicità di catechine estratte da tè verde in epatociti di ratti è stata inconcludente nel dimostrare che la quantità di EGCG normalmente utilizzata negli esperimenti (dai 100 ai 600 mg/ml) abbia un potenziale effetto tossico, indipendentemente dal fatto che le concentrazioni utilizzate siano significativamente maggiori (superiore a 100 volte circa) rispetto a quanto osservato nel siero umano dopo il consumo di tè verde [52]. Se le catechine del tè verde non sono responsabili dell'epatotossicità una possibile spiegazione può essere che il colpevole sia un altro componente, come un contaminante inglobato durante il processo di produzione dell'estratto o un metabolita secondario.

Studi di tossicità su animali, progettati secondo le linee guida della FDA americana, per valutare la teratogenicità e la tossicità a livello riproduttivo in ratti Wistar, ha permesso di valutare come, nell'arco di due generazioni, la supplementazione di ratti con 1200, 3600, e 12.000 ppm di EGCG non sviluppasse nessun effetto negativo sulla riproduzione o fertilità [53].

La sicurezza di dosi multiple di EGCG e Poliphenon-E® è stata valutata anche in 40 soggetti sani partecipanti ad uno studio di fase I della durata di 4 settimane e monitorati per gli eventi avversi dovuti a esposizione sistemica di catechine del tè verde [54, 55]. Gli eventi avversi riportati comprendevano l'eccesso di gas a livello intestinale, nausea, disturbi di stomaco (bruciori, dolori addominali), vertigini, cefalea e dolori muscolari. Tutti gli eventi segnalati sono stati classificati come eventi miti, per la maggior parte dei quali l'incidenza riportata nei gruppi trattati con polifenoli non era più elevata di quello riscontrato nel gruppo trattato con placebo. Nessun cambiamento significativo è stato osservato nel profilo biochimico del sangue e nella farmacocinetica dell'EGCG dopo ripetuti trattamenti, così come la farmacocinetica dei metaboliti coniugati di epigallocatechina e epicatechina non sembrava modificata.

Risulta dunque sicuro e utile, per persone sane, assumere polifenoli in quantità equivalente al contenuto di EGCG in 8-16 tazze di tè verde durante l'arco della giornata, con un aumento nella biodisponibilità di EGCG libero come appurato dopo somministrazione cronica di polifenoli tè verde ad alte dosi, 800 mg di EGCG o Poliphenon-E®, una volta al giorno.

Il potenziale di interazioni farmacologiche clinicamente rilevanti con catechine del tè verde è stata valutata mediante combinazione di Poliphenon-E® con sonde metaboliche di isoenzimi specifici. Il sistema P450 è responsabile per metabolizzare i farmaci clinicamente importanti attraverso i suoi costituenti elencati in ordine decrescente di attività: CYP3A4 (36%), CYP2D6 (21%), il CYP2C9 (17%), e CYP1A2 (8%). Quattro settimane di continuo consumo di Poliphenon-E® non altera l'attività di CYP1A2, CYP2D6 e CYP2C9 mostrando solo un leggera inibizione del CYP3A4. Si può concludere come il continuo consumo di catechina del tè verde non ha effetti clinicamente rilevanti sugli enzimi che metabolizzano i farmaci [56].

### Riassunto.

**18**

*Gli effetti benefici sulla salute di sostanze fitochimiche commestibili è ormai considerato come un approccio poco costoso, di facile applicazione, accettabile e accessibile per la gestione ed il controllo di vari tipi di tumori, nonostante poco si sappia sul meccanismo dell'azione chemiopreventiva della maggior parte dei composti. Qui è stato descritto il recettore per la laminina 67LR come una molecola sensore fondamentale per rispondere alle EGCG e mediare le attività benefiche di questo nutraceutico. Gli stessi eIF2a e MYPT1 sono molecole sensori per l'EGCG, il quale può agire da inibitore della crescita tumorale a concentrazioni fisiologiche. Ulteriori informazioni sul rapporto tra EGCG, gli effetti benefici della sua*

*somministrazione a soggetti malati ed i percorsi che coinvolgono le sue molecole sensori contribuiranno ad una maggior comprensione sul meccanismo d'azione dell'EGCG stessa.*

## **Polifenoli del tè verde: legami ad alta affinità di bersagli molecolari.**

**19** Gli otto gruppi fenolici dell'EGCG possono servire da donatori di legami idrogeno a molte biomolecole. L'EGCG ha dimostrato di legarsi alle proteine salivari ricche di prolina, alla fibronectina, il fibrinogeno e le glicoproteine ricche di istidina oltre che ad uno specifico recettore transmembrana, il 67LR. Utilizzando la spettroscopia NMR, è stato rivelato come l'EGCG si inserisca direttamente nella tasca del dominio BH3 di proteine anti-apoptotiche della famiglia Bel-2 [57] anche se concentrazioni di EGCG superiori (di almeno due ordini di grandezza) alla costante di inibizione, sono necessarie per indurre apoptosi. Utilizzando tecniche di elettroforesi bidimensionale e spettroscopia di massa si è riusciti ad identificare la **vimentina** [58], il **Recettore del Fattore di Crescita dell'Insulina simile (IGF-1R)** [59], la **Proteina Regolata dal Glucosio da 78 kDa (GRP78)** [60], e la **Proteina 1 che lega il dominio SH3 delle proteine che attivano le Ras-GTPasi (GRBP1)** [61] come molecole ad alta affinità di legame per l'EGCG e dunque importanti nel modulare l'attività inibitoria dei polifenoli in diverse linee cellulari. Studi condotti in numerosi modelli *in vitro* suggeriscono inoltre come l'EGCG si leghi anche al DNA, a livello delle isole GpC [62], modulando l'espressione di determinati geni oltre che inibendo il rimodellamento e la modificazione della cromatina da parte degli enzimi **DNA MetilTransferasi (DNMT)**, telomerasi e topoisomerasi [63]. Tuttavia, concentrazioni di EGCG molto superiori ai valori della costante di dissociazione sono spesso necessari per stimolare una risposta cellulare. La differenza di concentrazioni è probabilmente efficace a causa del legame non specifico tra EGCG e altre proteine che competono con il loro bersaglio molecolare. In generale, se l'effetto biologico di un composto può essere osservato *in vitro* a concentrazioni inferiori o simili a quelli osservabili *in vivo*, allora l'evento è probabile che si verifichi *in vivo*. Pertanto, la scoperta della alta affinità di EGCG per varie proteine risulta importante.

## **Modulazione di apoptosi e arresto del ciclo cellulare da parte di EGCG.**

**20** È stato dimostrato che l'EGCG provoca apoptosi e arresto del ciclo cellulare in cellule tumorali, senza influenzare le cellule normali [64]. Nell'ambito della progressione del ciclo cellulare l'evento primario consiste nella inibizione diretta, da parte dell'EGCG, delle chinasi ciclina-dipendenti (CDK2 e 4 nello specifico) con la conseguente induzione di vari regolatori negativi del ciclo cellulare: quello che si verifica è l'aumentata

espressione di p21 e p27, mentre diminuisce quella della ciclina D1 nonché la fosforilazione della proteina Rb.

Gli eventi primari che invece accadono nel caso di apoptosi indotta da catechine comprendono

- la condensazione nucleare,
- l'attivazione delle caspasi-3,
- la scissione della PARP1.

Inoltre, l'EGCG promuove anche l'oligomerizzazione di Bax e la depolarizzazione delle membrane mitocondriali per facilitare il rilascio del citocromo-*c* nel citosol, mentre il legame di EGCG nella tasca BH3 di proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2, suggerisce un meccanismo diretto di inibizione della funzione anti-apoptotica di queste proteine.

## Modulazione della segnalazione cellulare e dell'attività di trascrizione da parte dell'EGCG.

**21** *L'inibizione della via di segnalazione di NF-κB.* NF-κB è uno dei fattori di trascrizione sensibili allo stress ossidativo che gioca un ruolo critico nella regolazione della trascrizione di un'ampia varietà di geni importanti per molteplici risposte cellulari, tra le quali l'infiammazione, l'immunità innata, la crescita e la morte cellulare. NF-κB è sequestrato nel citoplasma in una forma inattiva attraverso l'interazione con **l'Inibitore di NF-κB (IκB)** (figura 1.14 e 1.15). La fosforilazione di IκB da parte delle **Chinasi di IκB (IKK)** causa l'ubiquitinazione ed il degrado delle IκB, liberando così NF-κB che può traslocare nel nucleo dove lega specifici siti di riconoscimento κB nelle regioni promotrici di più geni. La fosforilazione e l'attivazione delle chinasi IκB è controllata da una NF-κB-chinasi. Molteplici sono gli effetti di disregolazione del percorso NF-κB esercitati dall'EGCG (tabella 1.3, pag. 36) [65].

**22** *L'inibizione del pathways di trasduzione del segnale mediati dal recettore del fattore di crescita epidermico e dal recettore per la laminina.* Il **Recettore del Fattore di Crescita Epidermico (EGFR)** è una glicoproteina di membrana dotata di un dominio di legame extracellulare per il proprio ligando, un singolo dominio transmembrana e un dominio intracellulare che mostra un'attività tirosin-chinasica intrinseca. La sovra-espressione di EGFR è responsabile di un fenotipo neoplastico nelle cellule tumorali.

L'interazione cellula-laminina tramite 67LR risulta invece importante perché in primo luogo coinvolge un'associazione diretta con le integrine attraverso la loro subunità α6 ed, inoltre, media diverse vie di trasduzione del segnale, in particolare le cascate di attivazione di protein chinasi fosfatasi (tabella 1.4, pag. 36).

**TABELLA 1.3 Effetti dell'EGCG sul percorso di NF-κB.**

EFFETTI DELL'EGCG	
<b>PERCORSO DI NF-κB</b>	1. L'EGCG inibisce il legame al DNA, indotto da tPA (l'attivatore tissutale del plasminogeno), di NF-κB e CREB in tessuti epiteliali di topo e sopprime anche la fosforilazione e la successiva degradazione di IκBα (sempre indotta da tPA), impedendo la traslocazione nucleare di p65.
	2. L'EGCG è stata segnalata per esercitare un effetto anti-infiammatorio in cellule endoteliali attraverso il controllo dell'espressione della proteina 1 chemiotattica dei monociti, evento mediato, almeno in parte, attraverso la soppressione di p38α e l'attivazione di NF-κB [66].
	3. EGCG inibisce la degradazione, mediata dalla IL-1β, della chinasi associata al Recettore Chinasi della IL-1β (IRAK) nonché gli eventi di segnalazione innescati a valle dal degrado di IRAK, come l'attivazione di IKK, la degradazione di IκBα e la conseguente attivazione di NF-κB.
	4. EGCG inibisce la fosforilazione della subunità p65 di NF-κB, con conseguente inibizione dell'espressione genica dell'IL-8 [67].

**TABELLA 1.4 Effetti dell'EGCG su EGFR.**

EFFETTI DELL'EGCG	
<b>EGFR e 67LR</b>	1. L'EGCG (10-20 μM) inibisce EGFR, HER2, e molteplici vie di segnalazione a valle in linee di cellule di cancro del colon.
	2. L'azione antitumorale dell'EGCG pare essere mediata dal recettore 67LR il quale permette alla catechina di legarsi sulla superficie della cellula [68]. Recenti risultati suggeriscono il coinvolgimento delle MAPK nella via di segnalazione del laminina, concertata dal 67LR, in cellule di melanoma metastatico umano, nonché il possibile effetto antineoplastico svolto dall'EGCG [69].

**23** *L'inibizione della trasduzione del segnale mediata dal Fattore di Crescita insulina-simile.* Il percorso del **Fattore di Crescita Insulina-simile (IGF)** comprende un complesso insieme di molecole coinvolte nella regolazione di una gamma diversificata di funzioni biologiche normali

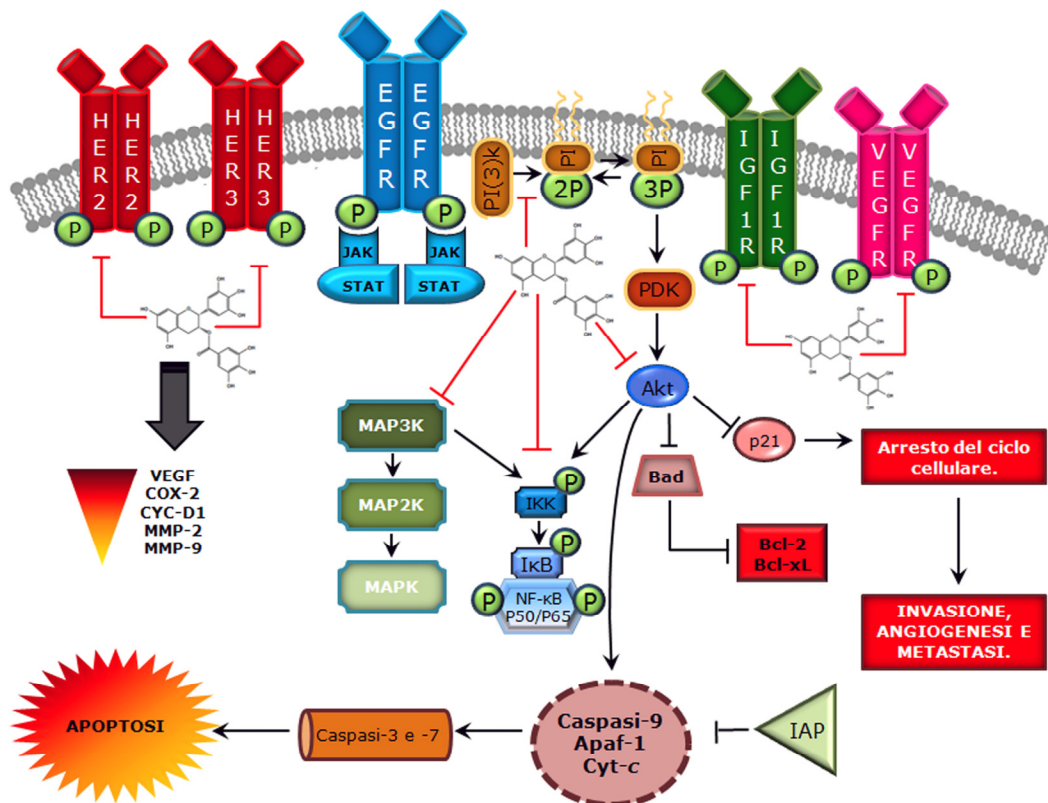
e patologiche. Si tratta di un sistema di ormoni peptidici, recettori di superficie delle cellule circolanti e proteine di legame (IGF-BP). IGF-1 e -2 sono mitogeni che svolgono un ruolo nella regolazione della proliferazione cellulare, differenziamento e apoptosi. I loro effetti sono mediati attraverso il recettore a IGF-R1. Il legame di IGF-BP al recettore IGF-1 comporta l'auto-fosforilazione intra-molecolare dello stesso recettore ed innesca, a valle, una cascata di fosforilazioni di bersagli critici. Questo porta all'attivazione di diverse vie di segnalazione, compreso il percorso della **Fosfatidilinositolo 3-chinasi di classe III** e della **Protein Chinasi serina/treonina (PI(3)K/Akt)** nonché della **Proteina del Sarcoma di Ratto (Ras)**, appartenente alla famiglia delle piccole GTPasi) e della **Protein Chinasi Attivata da Mitogeni (MAPK)**, inducendo così l'attivazione di specifici geni, la sintesi del DNA e la proliferazione cellulare.

La sovra-espressione del recettore IGF-1 è stata collegata allo sviluppo neoplastico. Un fattore incidente sull'attività finale delle IGF-1 e -2 è rappresentatao dalla famiglia di **Proteine Leganti IGF (IGF-BP)** che modulano la biodisponibilità delle IGF-1 e -2 nella circolazione sistemica. Bassi livelli di IGF-BP in circolazione favoriscono un aumento dell'attività mitogenica di IGF [70]. IGF-R2, insieme con la corrispondente IGF-BP, sono coinvolti nel legame, internalizzazione e degradazione di IGF-2. Anche in questo caso l'EGCG interviene con diverse modalità (tabella 1.5 e figura 1.14 e 1.15).

**TABELLA 1.5 Effetti dell'EGCG sul percorso di IGF.**

<b>EFFETTI DELL'EGCG</b>	
<b>IGF-BP e IGF-R</b>	1. L'EGCG riduce i livelli di IGF-1 e aumenta quelli delle IGF-BP3 in topi TRAMP [71].
	2. L'EGCG riduce la crescita tumorale, ancoraggio-dipendente, indotta dalla sovra-espressione di IGF-R1 nonché lo sviluppo del fenotipo tumorale in linee di cellule del cancro al colon e alla cervice, attraverso l'inibizione a valle della segnalazione promossa da IGF-1R [72].
	3. Il trattamento combinato di EGCG e celecoxib, in linee cellulari di carcinoma prostatico porta ad una maggior inibizione della crescita tumorale a seguito dell'abbassamento dei livelli sierici di IGF-1 e l'aumento di IGF-BP3 [73].
	4. EGCG causa una diminuzione dei livelli di mRNA che codificano per le MMP-7 e -9, molecole che proteolizzano IGF-BP3, con un aumento transitorio dell'espressione di TGF- $\beta$ 2, induttore dell'espressione di IGF-BP3, in linee cellulari di cancro al colon HT29 [74].
	5. Lo 0,1% di EGCG (Peso/volume) fornito come unica fonte di liquidi a topi TRAMP di 8-32 settimane di età, porta ad una significativa inibizione dei livelli sierici di IGF-1 ed all'aumento dei livelli di IGF-BP3 nella prostata di topi TRAMP rispetto ai controlli alimentati con normale acqua potabile [75].

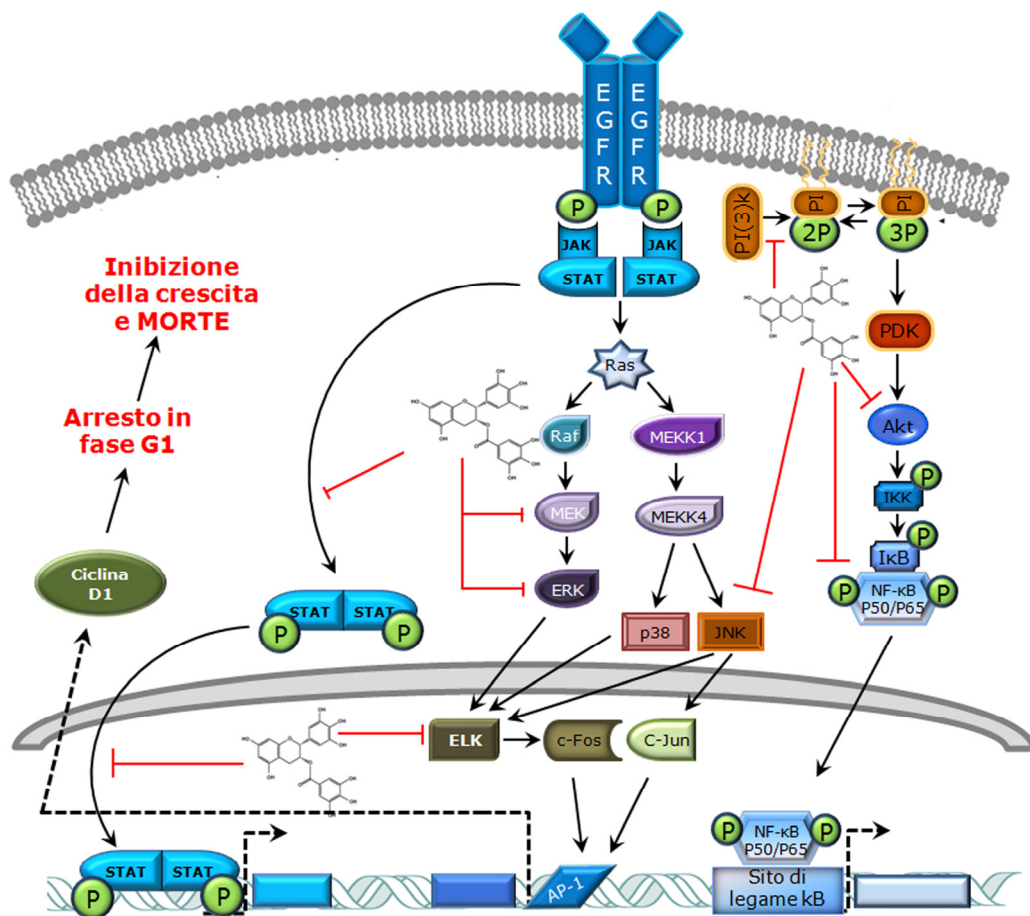




**Figura 1.14. Effetto dell'EGCG su EGFR, MAPK e attivazione dei fattori di trascrizione AP-1 e NF-κB.** L'Attivazione di EGFR o HER-2/neu promuove l'autofosforilazione dei residui di tirosina dei domini citoplasmatici. Questo innesca la fosforilazione di diverse molecole a valle con l'avvio di specifici percorsi di trasduzione del segnale. L'attivazione di Ras, Raf-1 e PI(3)K stimola diversi processi intracellulari. Raf-1 attiva le MAP chinasi e la cascata di segnalazione guidata da MEK1/2 con la conseguente fosforilazione di una proteina MAPK, la ERK1/2. Una volta funzionali, le MAPK, attivano fattori di trascrizione diversi, compresi ELK e c-jun.

Il legame di IGF-BP libera di IGF-1 con la conseguente autofosforilazione intramolecolare del recettore e la fosforilazione di bersagli critici a valle. Questo porta all'attivazione di diverse vie di segnalazione, compreso il percorso PI(3)K/AKT e Ras/MAPK, inducendo così la trascrizione di specifici geni, sintesi del DNA e proliferazione cellulare.

Her3 attiva PI(3)K e questo promuove la sintesi di **Fosfatidilinositolo-3,4,5-triFosfato (PI(3)P)** che attiva a valle tutti i percorsi che coinvolgono Akt. Le chinasi indotte da NF-κB e Akt fosforilano e attivano le IKK le quali, una volta funzionanti, fosforilano IκB, attivando l'ubiquitinazione e la successiva degradazione di IκB. Le **Chinasi Inducenti NF-κB (NIK)** migliorano l'attività di NF-κB attraverso l'attivazione di MEK1/2 ed ERK1/2. L'EGCG blocca la autofosforilazione di EGFR e Her-2/neu così come la cascata delle MAP chinasi ed i percorsi Ras/Raf/MEK/ERK/JNK e di PI(3)K. L'EGCG causa anche una sostanziale riduzione dei livelli di IGF-1 ed un significativo aumento dei livelli di IGF-BP3.



**Figura 1.15. Effetto dell'EGCG sull'attivazione dei fattori di trascrizione AP-1 e NF- $\kappa$ B.** Diverse vie di segnalazione sono inibite dall'EGCG a più livelli. L'EGCG blocca il legame tra EGFR ed il suo ligando nonché la fosforilazione/attivazione del recettore tirosin-chinasi. Inibisce anche diverse vie di segnalazione intracellulare, tra le quali PI(3)K/Akt/mTOR, JAK/STAT, RAF/MEK/ERK/AP-1 e Akt/NF- $\kappa$ B. A livello nucleare, l'EGCG blocca il legame al DNA di fattori di trascrizione come NF- $\kappa$ B e AP-1, nonché di trasduttori del segnale e attivatori della trascrizione. Come conseguenza, si riduce il livello di espressione di molecole coinvolte nella proliferazione cellulare, nell'angiogenesi, nell'invasività e nell'infiammazione.

**Modulazione della segnalazione cellulare associata all'angiogenesi, alla metastatizzazione e alla migrazione.**

**27**

*L'inibizione del fattore di crescita vascolare endoteliale.* Il Fattore di Crescita degli Endoteli Vascolari (VEGF) è un mitogeno per le cellule endoteliali ed è associato all'induzione dell'angiogenesi tumorale. VEGF si lega ai recettori del VEGF-1 e -2, quest'ultimo responsabile per la maggior parte dei suoi effetti mitogenici e chemiotattici. L'inibizione del legame di VEGF al suo recettore, indotta da EGCG, potrebbe contribuire

agli effetti anti-angiogenici e chemiopreventivo del polifenolo (tabella 1.7 e figura 1.14 e 1.15).

**TABELLA 1.6 Effetti dell'EGCG su VGF.**

EFFETTI DELL'EGCG	
<b>VEGF e VEGF -R</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. L'EGCG diminuisce la fosforilazione del recettore VEGF e induce apoptosi nelle cellule B di leucemia linfatica cronica [83].</li> <li>2. Il trattamento con EGCG (5-50 <math>\mu</math>M) porta ad un'inibizione dell'attività mitogenica di cellule umane endoteliali ombelicali (HUAEC). Le vie di trasduzione del segnale di VEGF in HUAEC, tra le quali l'autofosforilazione dei recettori VEGF-1 e -2, la fosforilazione di ERK1/2 e l'espressione dell'mRNA dei più precoci fattore di crescita, risultano inibiti in cellule trattate con EGCG [84].</li> </ol>

**28**

*L'inibizione delle metalloproteinasasi della matrice.* Le

**MetalloProteinasasi della Matrice (MMP)** sono una famiglia di 25 endopeptidasi strutturalmente correlate, dipendenti da zinco, in grado di degradare vari componenti dell'ECM. Svolgono un ruolo fondamentale nel rimodellamento dell'ECM che accompagna diversi processi fisiologici e patologici, compresi situazioni infiammatorie, malattie autoimmuni e tumorigenesi. L'invasione del tumore e la produzione di metastasi è un processo a più fasi che coinvolge la degradazione proteolitica della matrice, l'alterazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-ECM, e la migrazione della cellula tumorale attraverso la membrana basale. Due membri di questa famiglia in particolare, MMP-2 e MMP-9, sembrano giocare un ruolo importante nell'invasività tumorale, promuovendo l'angiogenesi e stimolando la crescita del tumore. La sovra-espressione di MMP nei modelli animali induce proliferazione cellulare e aumenta il rischio di tumorigenesi dopo l'esposizione ad agenti chimici cancerogeni o all'attivazione di oncogeni.

Sebbene alcune di queste attività siano attribuibili alla capacità di degradazione della matrice ad opera delle MMPs, la maggior parte di questi effetti biologici sono mediati dall'attività proteolitica delle MMPs su altri bersagli quali chemochine, molecole di adesione, fattori di crescita, i recettori del fattore di crescita e molecole pro- ed anti-apoptotiche. Nella tabella 1.7 sono riportati gli effetti delle catechine del tè verde su queste molecole.

**29**

*L'inibizione di urochinasasi attivatore del plasminogeno.* L'urochinasasi

**Attivatrice del Plasminogeno (uPA)** è una proteasi tripsina-simile che converte il plasminogeno in plasmina attiva. Tale proteasi mostra non solo la capacità di prevenire l'apoptosi, stimolando l'angiogenesi, la

mitogenesi e la migrazione delle cellule ma, anche, di modulare l'adesione cellulare a specifici substrati. L'inibizione della urochinasi può ridurre le dimensioni della massa tumorale o addirittura promuovere una completa remissione di tumori in modelli sperimentali di topo. Tuttavia, inibitori noti dell'uPA sono inutilizzabili in ambito terapeutico tumorale data la loro debole o elevata tossicità [87]. L'EGCG si mostra un valido e non tossico inibitore dell'attività catalitica dell'uPA (tabella 1.7)

**TABELLA 1.7. Effetti dell'EGCG sulle Metalloproteinasi.**

EFFETTI DELL'EGCG	
<b>MMPs e uPA</b>	1. L'EGCG influenza direttamente e indirettamente l'attività delle MMP. La somministrazione di polifenoli del tè verde (0,1% in acqua potabile) causa una marcata inibizione dell'attività di MMP-2 e MMP-9 nella prostata di Topi TRAMP [71].
	2. L'EGCG (25-100 $\mu$ M) è in grado di inibire la MMP-2 e MMP-9 in cellule endoteliali umane [85].
	3. L'EGCG e l'EGC inibiscono, <i>in vitro</i> , l'attività della collagenasi.
	4. L'EGCG inibisce l'espressione della MMP-9 e la progressione del ciclo cellulare tra la fase G1 e S, attraverso la trascrizione dei fattori NF- $\kappa$ B e AP-1, indotta da TNF- $\alpha$ , in cellule muscolari lisce vascolari [86].
	5. L'EGCG è stata segnalata per inibire la migrazione e l'invasività di cellule di carcinoma oro-faringeo, in parte a causa della diminuita produzione di MMP-2, MMP-9 e di uPA [87]. In cellule di fibrosarcoma umano l'EGCG pare regolare l'espressione di uPA almeno attraverso due meccanismi: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>inibizione dei percorsi di ERK1/2 e p38 MAPK, con conseguente soppressione di attività del promotore di uPA</i></li> <li>• <i>destabilizzazione dell'mRNA di uPA tramite una modalità Erk1/2 e p38 MAPK-indipendente.</i></li> </ul>

### Modulazione di altre molecole da parte dell'EGCG.

**24**

***L'inibizione della sovra-espressione di ciclo ossigenasi-2.*** La Ciclo Ossigenasi 2 (COX-2) è una delle forme isoenzimatiche della prostaglandina-endoperossido sintasi, insieme alle altre forme note denominate COX-1 e, a quella più recentemente scoperta, COX-3. Al contrario della COX-1, che è un'enzima costitutivo, quindi sempre presente nell'organismo e necessario per la produzione di derivati dell'acido arachidonico, la COX-2 è un enzima inducibile ed è presente solo in un ristretto numero di tipi cellulari e, durante i processi infiammatori, viene indotta nei tessuti colpiti da una varietà di fattori quali le citochine e i

fattori di crescita. Una inadeguata attività della COX-2 è stata osservata in molte condizioni patologiche, tra cui il cancro (tabella. L'EGCG

25

**L'inibizione del proteasoma.** Il proteasoma 26S è un enorme complesso multi-enzimatico responsabile della degradazione della maggior parte delle proteine cellulari, ubiquitinate e non. L'ubiquitina, peptide di 76 amminoacidi altamente conservato tanto nei procarioti quanto negli eucarioti, funge da marcatore di tutte quelle proteine da degradare attraverso la via proteasomiale.

Sono stati identificati numerosi substrati del proteasoma, tra i quali inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti, p53, Bcl-2 e IκB. Il percorso di degradazione dipendente da ubiquitina e proteasoma svolge dunque un ruolo essenziale nell'induzione della proliferazione cellulare e lo sviluppo di resistenza ai farmaci in cellule tumorali umane [76] (figura 1.16 e tabella 1.6).

**TABELLA 1.8 Effetti dell'EGCG sull'attività di COX-2 e del Proteasoma.**

EFFETTI DELL'EGCG	
COX-2, PROTEASOMA e UBIQUITINA	1. L'EGCG sopprime l'attività di numerosi fattori angiogenici ed infiammatori, tra i quali la COX-2. Questo si manifesta sia in patologie come la neovascolarizzazione corneale, spesso accompagnata da fenomeni infiammatori e calo della capacità visiva che in modelli <i>in vitro</i> di malattie tumorali, come linee cellulari di carcinoma prostatico [73].
	2. L'EGCG inibisce in maniera specifica l'attività chimotripsina-simile (ma non tripsina-simile) del complesso 20S del proteasoma, sia <i>in vivo</i> che <i>in vitro</i> , alle normali concentrazioni trovate nel siero di bevitori abituali di tè verde. Tale inibizione, in linee cellulari trasformate o cellule tumorali, provoca l'accumulo di due substrati naturali del proteasoma, p27 <sup>Kip1</sup> ed IκBα con inibizione di NF-κB ed arresto del ciclo cellulare in fase G1 [77]. Ciò suggerisce come il proteasoma sia un bersaglio molecolare dell'EGCG e che, l'inibizione della sua attività, possa contribuire ad un effetto chemiopreventivo.

26

**Attività antiossidante e pro-ossidativa e induzione di enzimi disintossicanti.** L'EGCG ed altri polifenoli sono in grado di reagire con la maggior parte delle **Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)** come radicali superossido, ROS idrossilici, ossido nitrico (NO), diossido di sodio e perossinitrite. I polifenoli del tè sono potenti chelanti degli ioni metallici (come ad esempio gli ioni Fe<sup>3+</sup> liberi) prevenendo così la formazione dei ROS per auto-ossidazione di più composti. La vicinanza di strutture diidrossido o

triidrossido contribuisce all'attività antiossidante ma rende altresì questi composti suscettibili all'ossidazione all'aria, sotto condizioni alcaline o anche di pH neutro.

Due sono i problemi che sussistono nell'estrapolazione di risultati osservati, a seguito dell'utilizzo di catechine, in linee cellulari rispetto a modelli animali:

1. le concentrazioni dei composti polifenolici usati in sistemi di linee cellulari sono molto più alte di quelle stimate nel plasma o in tessuti animali o umani [78];
2. la pressione parziale dell'ossigeno in un sistema di coltura di linee cellulari è molto più alta (160 mmHg) che non quella del sangue o i tessuti (meno di 40 mmHg)

Pertanto, nelle condizioni tipiche delle colture cellulari, l'EGCG non è stabile, con un'emivita inferiore alle 2 ore [79]. L'attività antiossidante delle catechine del tè sono chiare *in vitro* [80] mentre le stesse attività *in vivo* sono state osservate solo in talune circostanze, quando dei modelli animali sono posti sotto stress ossidativo [81].

In modelli sperimentali di cancerogenesi, così come la comparsa di ROS, indotta dal trattamento con agenti cancerogeni, funge da evento promotore della carcinogenesi, anche i polifenoli del tè, essendo redox-attivi, possono essere ossidati per generare ROS (come osservato nel mezzo di crescita di colture cellulari) e portare alla morte delle cellule. I ROS sono in grado di avviare il percorso di elementi responsivi agli antiossidanti correlati al **Fattore Nucleare Eritroide 2 (Nrf2)** per l'attivazione di enzimi antiossidanti ed disintossicanti [82]. Sembra che, dosi moderate di polifenoli del tè producano bassi livelli di ROS, i quali sono in grado di attivare Nrf2 per sopprimere lo stress ossidativo mentre, al contrario, alte dosi di polifenoli del tè inducono la produzione di alti livelli di ROS, che promuovono una tossicità letale.

### Riassunto.

**30**

*Come discusso, molti meccanismi sono stati proposti per spiegare l'inibizione della carcinogenesi da parte del tè verde ed i suoi costituenti. Studi di prevenzione del cancro in modelli animali hanno fornito informazioni più rilevanti. Queste includono l'induzione di apoptosi in diversi modelli, l'inibizione della fosforilazione di c-Jun e ERK1/2 in un modello di tumorigenesi del polmone, la soppressione dei livelli di fosforilazione di Akt e dei livelli di  $\beta$ -catenina nucleare in modelli di cancro al colon, e l'inibizione dell'asse IGF/IGF-1R in modelli di cancro al colon e prostata. Non è ancora chiaro se queste molecole siano obiettivi diretti o indiretti per le catechine del tè anche perché, in molti casi, gli effetti osservabili possono essere eventi a valle innescati a seguito del legame dell'EGCG ad un obiettivo primario. Meccanicisticamente, l'attività primaria di EGCG nell'inibizione della carcinogenesi potrebbe riguardare:*

(1) legame diretto a proteine bersaglio, come enzimi o recettori, influenzando i relativi percorsi di trasduzione del segnale o inibendo l'attività enzimatica,

(2) funzioni antiossidanti per estinguere i ROS durante la fase iniziale di promozione o gli stadi successivi di progressione della carcinogenesi,

Altri possibili meccanismi, da evidenze di studi in vivo, potrebbero coinvolgere:

- alterazione delle interazioni tra recettori e ligando, modificando la struttura della membrana plasmatica coinvolta (lipid rafts),
- generazione di ROS per indurre apoptosi delle cellule precancerose o maligne,
- influenzare i livelli di assorbimento degli ormoni che potrebbero avere un effetto sulla tumorigenesi.

La rilevanza e l'importanza relativa di questi meccanismi debbono ancora essere dimostrati in vivo.

## BIBLIOGRAFIA dei paragrafi 1-30.

- 1) Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB.: **Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals.** *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Sep;29(3):405-34.
- 2) Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- 3) Aggarwal BB, Van Kuiken ME, Iyer LH, Harikumar KB, Sung B.: **Molecular targets of nutraceuticals derived from dietary spices: potential role in suppression of inflammation and tumorigenesis.** *Exp Biol Med.* 2009 Aug;234(8):825-49.
- 4) Hardy G, Hardy I, Ball PA. **Nutraceuticals a pharmaceutical viewpoint: part II.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003 Nov;6(6):661-71.
- 5) Chan AT, Giovannucci EL.: **Primary prevention of colorectal cancer.** *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2029-2043. Review.
- 6) Haseen F, Cantwell MM, O'Sullivan JM, Murray LJ. **Is there a benefit from lycopene supplementation in men with prostate cancer? A systematic review.** *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2009;12(4):325-32. Epub 2009 Sep 1. Review.
- 7) Bougnoux P, Hajjaji N, Maheo K, Couet C, Chevalier S.: **Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth.** *Prog Lipid Res.* 2010 Jan;49(1):76-86. Review.
- 8) Cranganu A, Camporeale J.: **Nutrition aspects of lung cancer.** *Nutr Clin Pract.* 2009 Dec;24(6):688-700.
- 9) Goralczyk R.: **Beta-carotene and lung cancer in smokers: review of hypotheses and status of research.** *Nutr Cancer.* 2009;61(6):767-74. Review.
- 10) Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB.: **Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution.** *Cancer Lett.* 2008 Aug 18;267(1):133-64.
- 11) Vogelstein B, Kinzler KW.: **Cancer genes and the pathways they control.** *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):789-99. Review.
- 12) Amin AR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM.: **Perspectives for cancer prevention with natural compounds.** *J Clin Oncol.* 2009 Jun 1;27(16):2712-25.
- 13) Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML.: **The pro- or anti-apoptotic function of NF- $\kappa$ B is determined by the nature of the apoptotic stimulus.** *European Journal of Biochemistry.* 2000;267:3828-3835

- 14) Messina M, McCaskill-Stevens W, Lampe JW.: **Addressing the soy and breast cancer relationship: Review, commentary, and workshop proceedings.** *Journal of the National Cancer Institute.* 2006;98:1275-1284.
- 15) Brakenhielm E, Cao R, Cao Y.: **Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes.** *The FASEB Journal.* 2001;15:1798-1800
- 16) Swain T, Bate-Smith EC.: **Comparative Biochemistry, Vol. 3.** (Eds.: H. S. Mason, A. M. Florkin), *Academic Press, New York*, 1962, pp. 755 – 809.
- 17) Haslam E, Cai Y.: **Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism.** *Nat Prod Rep.* 1994 Jan;11(1):41-66.
- 18) Haslam E.: **Practical Polyphenolics - From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action,** *Cambridge University Press, Cambridge*, 1998.
- 19) Ferreira D, Slade D, Marais J.P.J.: **Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications** (Eds.: Ø. M. Andersen, K. R. Markham), *CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, FL*, 2006, pp. 553 – 616.
- 20) Okuda T, Yoshida T, Hatano T, Ito H.: **Chemistry and Biology of Ellagitannins – An Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols** (Ed.: S. Quideau), *World Scientific, Singapore*, 2009, pp. 1 – 54.
- 21) Sailler B, Glombitza K-V, *Phytochemistry* 1999, 50, 869 – 881.
- 22) Gazák R, Walterová D, Kren V.: **Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine.** *Curr Med Chem.* 2007;14(3):315-38.
- 23) Dangles O, Dufour C.: **Recent Advances on Polyphenol Research, Vol. 1** (Eds.: F. Daayf, V. Lattanzio), *Wiley-Blackwell, Oxford*, 2008, pp. 67 – 87.
- 24) Scalbert A, Mila I, Expert D, Marmolle F, Albrecht AM, Hurrell R, Huneau JF, Tom D.: **Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology** (Eds.: G. G. Gross, R.W. Hemingway, T. Yoshida), *Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York*, 1999, pp. 545 – 554.
- 25) Hatier HB, Gould KS.: **Anthocyanins - Biosynthesis, Functions, and Applications** (Eds.: K. Gould, K. Davies, C. Winefield), *Springer, New York*, 2008, pp. 1 – 20.
- 26) <http://www.teatalk.com/science/chemistry.htm>
- 27) Graham HN: **Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry,** *Prev Med* 1992 May.
- 28) Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K.: **A receptor for green tea polyphenol EGCG.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004.11, 380-381.
- 29) Korade Z, Kenworthy AK.: **Lipid rafts, cholesterol, and the brain.** *Neuropharmacology.* 2008 Dec;55(8):1265-73.
- 30) Rao NC, Barsky SH, Terranova VP, Liotta LA. **Isolation of a tumor cell laminin receptor.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1983 Mar 29;111(3):804-8
- 31) Malinoff HL, Wicha MS.: **Isolation of a cell surface receptor protein for laminin from murine fibrosarcoma cells.** *J Cell Biol.* 1983 May;96(5):1475-9.
- 32) Pike LJ.: **The challenge of lipid rafts.** *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S323-8. Review.
- 33) Fujimura Y, Tachibana H, Yamada K.: **A tea catechin suppresses the expression of the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI in human basophilic KU812 cells.** *J Agric Food Chem.* 2001 May;49(5):2527-31.
- 34) Patra SK, Rizzi F, Silva A, Rugina DO, Bettuzzi S.: **Molecular targets of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG): specificity and interaction with membrane lipid rafts.** *J Physiol Pharmacol.* 2008 Dec;59 Suppl 9:217-35.
- 35) Butò S, Tagliabue E, Ardini E, Magnifico A, Ghirelli C, van den Brùle F, Castronovo V, Colnaghi MI, Sobel ME, Ménard S.: **Formation of the 67-kDa laminin receptor by acylation of the precursor.** *J Cell Biochem.* 1998 Jun 1;69(3):244-51.
- 36) Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA.: **The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9.** *Virology.* 2006 Oct;80(19):9831-6.
- 37) Shamas MA, Neri P, Koley H, Batchu RB, Bertheau RC, Munshi V, Prabhala R, Fulciniti M, Tai YT, Treon SP, Goyal RK, Anderson KC, Munshi NC.: **Specific killing of multiple myeloma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea: biologic activity and therapeutic implications.** *Blood.* 2006 Oct 15;108(8):2804-10.



- 38) Negrutskii BS, El'skaya AV.: **Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998;60:47-78. Review.
- 39) Hartshorne DJ, Ito M, Erdödi F.: **Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase.** *J Biol Chem.* 2004 Sep 3;279(36):37211-4. Review. No abstract available.
- 40) Izawa T, Fukata Y, Kimura T, Iwamatsu A, Dohi K, Kaibuchi K.: **Elongation factor-1 alpha is a novel substrate of rho-associated kinase.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Nov 11;278(1):72-8.
- 41) Zhu M, Chen Y, Li RC.: **Oral absorption and bioavailability of tea catechins.** *Planta Med.* 2000 Jun;66(5):444-7.
- 42) Chow HH, Cai Y, Alberts DS, Hakim I, Dorr R, Shahi F, Crowell JA, Yang CS, Hara Y.: **Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Jan;10(1):53-8.
- 43) Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS.: **Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Oct;11:1025-32.
- 44) Kim S, Lee MJ, Hong J, Li C, Smith TJ, Yang GY, Seril DN, Yang CS.: **Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols.** *Nutr Cancer.* 2000;37(1):41-8.
- 45) Yang CS, Chen L, Lee MJ, Balentine D, Kuo MC, Schantz SP.: **Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Apr;7(4):351-4.
- 46) Lu H, Meng X, Yang CS.: **Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate.** *Drug Metab Dispos.* 2003 May;31(5):572-9.
- 47) Lu H, Meng X, Li C, Sang S, Patten C, Sheng S, Hong J, Bai N, Winnik B, Ho CT, Yang CS.: **Glucuronides of tea catechins: enzymology of biosynthesis and biological activities.** *Drug Metab Dispos.* 2003 Apr;31(4):452-61.
- 48) Zhang L, Zheng Y, Chow MS, Zuo Z.: **Investigation of intestinal absorption and disposition of green tea catechins by Caco-2 monolayer model.** *Int J Pharm.* 2004 Dec 9;287(1-2):1-12.)
- 49) Vaidyanathan JB, Walle T.: **Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2.** *Pharm Res.* 2001 Oct;18(10):1420-5.
- 50) Yoshino K, Suzuki M, Sasaki K, Miyase T, Sano M.J.: **Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma.** *Nutr Biochem.* 1999 Apr;10(4):223-9
- 51) Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Ranger-Moore J, Chew WM, Celaya CA, Rodney SR, Hara Y, Alberts DS.: **Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals.** *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 15;11(12):4627-33.
- 52) Gloro R, Hourmand-Ollivier I, Mosquet B, Mosquet L, Rousselot P, Salamé E, Piquet MA, Dao T.: **Fulminant hepatitis during self-medication with hydroalcoholic extract of green tea.** *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Oct;17(10):1135-7.
- 53) Schmidt M, Schmitz HJ, Baumgart A, Guédon D, Netsch MI, Kreuter MH, Schmidlin CB, Schrenk D.: **Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture.** *Food Chem Toxicol.* 2005 Feb;43(2):307-14.
- 54) Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E, Davidovich A, Bausch J.: **Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 3: teratogenicity and reproductivetoxicity studies in rats.** *Food Chem Toxicol.* 2006 May;44(5):651-61.
- 55) Chow HH, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, Dorr RT, Hara Y, Alberts DS.: **Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals.** *Clin Cancer Res.* 2003 Aug 15;9(9):3312-9.
- 56) Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Cordova CA, Chew WM, Xu MJ, Hsu CH, Ranger-Moore J, Alberts DS.: **Effects of repeated green tea catechin**

- administration on human cytochrome P450 activity.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Dec;15(12):2473-6.
- 57) Leone M, Zhai D, Sareth S, Kitada S, Reed JC, Pellicchia M.: **Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins.** *Cancer Res.* 2003 Dec 1;63(23):8118-21.
- 58) Ermakova S, Choi BY, Choi HS, Kang BS, Bode AM, Dong Z.: **The intermediate filament protein vimentin is a new target for epigallocatechin gallate.** *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):16882-9
- 59) Li M, He Z, Ermakova S, Zheng D, Tang F, Cho YY, Zhu F, Ma WY, Sham Y, Rogozin EA, Bode AM, Cao Y, Dong Z.: **Direct inhibition of insulin-like growth factor-I receptor kinase activity by (-)-epigallocatechin-3-gallate regulates cell transformation.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Mar;16(3):598-605.
- 60) Ermakova SP, Kang BS, Choi BY, Choi HS, Schuster TF, Ma WY, Bode AM, Dong Z.: **(-)-Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78.** *Cancer Res.* 2006 Sep 15;66(18):9260-9
- 61) Shim JH, Su ZY, Chae JI, Kim DJ, Zhu F, Ma WY, Bode AM, Yang CS, Dong Z.: **Epigallocatechin gallate suppresses lung cancer cell growth through Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1.** *Cancer Prev Res (Phila).* 2010 May;3(5):670-9.
- 62) Ghosh KS, Sahoo BK, Jana D, Dasgupta S.: **Studies on the interaction of copper complexes of (-)-epicatechin gallate and (-)-epigallocatechin gallate with calf thymus DNA.** *J Inorg Biochem.* 2008 Sep;102(9):1711-8
- 63) Berletch JB, Liu C, Love WK, Andrews LG, Katiyar SK, Tollefsbol TO.: **Epigenetic and genetic mechanisms contribute to telomerase inhibition by EGCG.** *J Cell Biochem.* 2008 Feb 1;103(2):509-19.
- 64) Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H.: **Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells.** *J Natl Cancer Inst.* 1997 Dec 17;89(24):1881-6
- 65) Aggarwal BB, Shishodia S.: **Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning.** *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1030:434-41. Review.
- 66) Hong MH, Kim MH, Chang HJ, Kim NH, Shin BA, Ahn BW, Jung YD.: **(-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression in endothelial cells via blocking NF-kappaB signaling.** *Life Sci.* 2007 May 1;80(21):1957-65
- 67) Wheeler DS, Catravas JD, Odoms K, Denenberg A, Malhotra V, Wong HR.: **Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 beta-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells.** *J Nutr.* 2004 May;134(5):1039-44.
- 68) Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K.: **A receptor for green tea polyphenol EGCG.** *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Apr;11(4):380-1.
- 69) Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R.: **Laminin-induced signaling in tumor cells: the role of the M(r) 67,000 laminin receptor.** *Cancer Res.* 2004 May 15;64(10):3572-9.
- 70) Adhami VM, Afaq F, Mukhtar H.: **Insulin-like growth factor-I axis as a pathway for cancer chemoprevention.** *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 1;12(19):5611-4. Review.
- 71) Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H.: **Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer.** *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64(23):8715-22.
- 72) Li M, He Z, Ermakova S, Zheng D, Tang F, Cho YY, Zhu F, Ma WY, Sham Y, Rogozin EA, Bode AM, Cao Y, Dong Z.: **Direct inhibition of insulin-like growth factor-I receptor kinase activity by (-)-epigallocatechin-3-gallate regulates cell transformation.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Mar;16(3):598-605.
- 73) Adhami VM, Malik A, Zaman N, Sarfaraz S, Siddiqui IA, Syed DN, Afaq F, Pasha FS, Saleem M, Mukhtar H.: **Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both in vitro and in vivo.** *Clin Cancer Res.* 2007 Mar 1;13(5):1611-9.

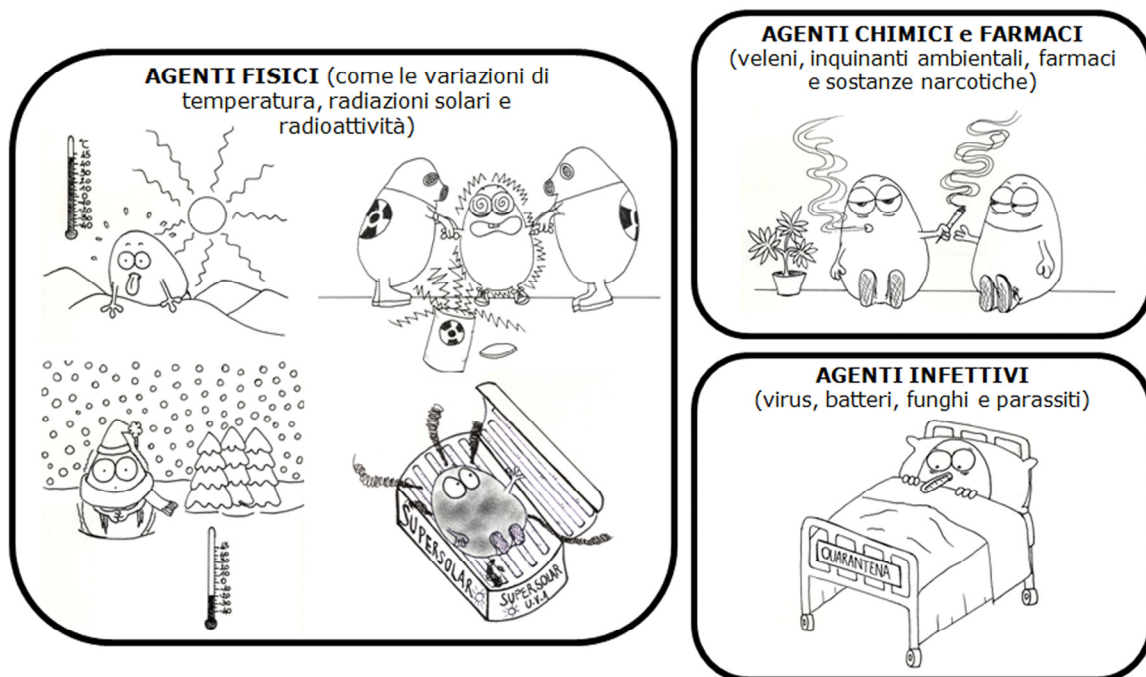
- 74) Shimizu M, Deguchi A, Hara Y, Moriwaki H, Weinstein IB.: **EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor-1 receptor in human colon cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 2;334(3):947-53.
- 75) Gupta S, Hastak K, Ahmad N, Lewin JS, Mukhtar H.: **Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10350-5.
- 76) Kuhn D, Lam WH, Kazi A, Daniel KG, Song S, Chow LM, Chan TH, Dou QP.: **Synthetic peracetate tea polyphenols as potent proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells.** *Front Biosci.* 2005 May 1;10:1010-23.
- 77) Nam S, Smith DM, Dou QP.: **Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo.** *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):13322-30
- 78) Yang CS, Maliakal P, Meng X.: **Inhibition of carcinogenesis by tea.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:25-54. Review
- 79) Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang CS.: **Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells.** *Cancer Res.* 2002 Dec 15;62(24):7241-6.
- 80) Yang CS, Maliakal P, Meng X.: **Inhibition of carcinogenesis by tea.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:25-54. Review.
- 81) Senthil Kumaran V, Arulmathi K, Srividhya R, Kalaiselvi P.: **Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats.** *Exp Gerontol.* 2008 Mar;43(3):176-83.
- 82) Surh YJ, Na HK.: **NF-kappaB and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals.** *Genes Nutr.* 2008 Feb;2(4):313-7.
- 83) Lee YK, Shanafelt TD, Bone ND, Strega AK, Jelinek DF, Kay NE.: **VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance.** *Leukemia.* 2005 Apr;19(4):513-23
- 84) Neuhaus T, Pabst S, Stier S, Weber AA, Schrör K, Sachinidis A, Vetter H, Ko YD.: **Inhibition of the vascular-endothelial growth factor-induced intracellular signaling and mitogenesis of human endothelial cells by epigallocatechin-3 gallate.** *Eur J Pharmacol.* 2004 Jan 12;483(2-3):223-7.
- 85) Fassina G, Venè R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM, Albin A.: **Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate.** *Clin Cancer Res.* 2004 Jul 15;10(14):4865-73.
- 86) Park WH, Kim SH, Kim CH.: **A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of *Euonymus alatus*: isolation and structure determination.** *Toxicology.* 2005 Feb 28;207(3):383-90.
- 87) Ho YC, Yang SF, Peng CY, Chou MY, Chang YC.: **Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator.** *J Oral Pathol Med.* 2007 Nov;36(10):588-93.



## 2

**CELLULE DURE A MORIRE.**

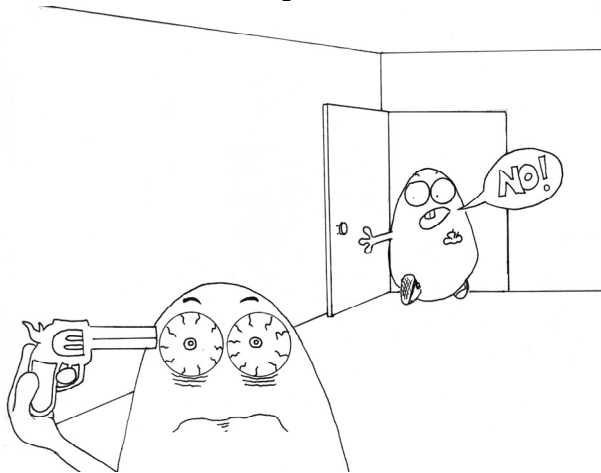
**31** Virtualmente, le modificazioni morfologiche e funzionali che sono alla base di tutte le malattie cominciano con alterazioni molecolari all'interno di una singola cellula. Una cellula normale è limitata ad un ambito di funzioni che regolano il suo metabolismo e la sua specializzazione in modo da soddisfare alle normali richieste metaboliche (stato di omeostasi). Entro certi limiti, alcuni stimoli patologici possono innescare forme di adattamento cellulare. Se i limiti di una risposta adattativa vengono superati o l'adattamento non è possibile, allora si verificano una serie di **danni cellulari**. La maggior parte delle cause di alterazioni può essere raggruppata nelle seguenti categorie:



a cui vanno aggiunte la mancanza di ossigeno, le reazioni anafilattiche contro proteine estranee o farmaci, le alterazioni genetiche e gli squilibri nutrizionali. Il danno cellulare è reversibile sino ad un certo punto poi, se lo stimolo cronicizza o è grave, la cellula raggiunge un punto di non ritorno e va incontro ad un **danno cellulare irreversibile** ed alla successiva **morte cellulare**. Le catechine del tè verde, oltre a causare danni cellulari, sembrano essere correlate all'innescò di specifiche tipologie di morte, quando somministrate a linee cellulari tumorali.

## Apoptosi

**32** In biologia, il termine **apoptosi** (coniato nel 1972 da John F. Kerr, Andrew H. Wyllie e A. R. Currie a partire dal termine greco antico, già utilizzato da Ippocrate, che indica la caduta delle foglie e dei petali dei fiori) indica una forma di **suicidio cellulare** che si verifica normalmente durante lo sviluppo e l'invecchiamento agendo come un meccanismo omeostatico per mantenere popolazioni vitali di cellule nei tessuti. L'apoptosi funge anche da meccanismo difensivo, nel corso delle reazioni immunitarie o quando le cellule sono danneggiate da malattie o agenti



nocivi [88]. Si tratta di un processo finemente regolato che richiede l'uso di energia e comporta l'attivazione di una complessa cascata di eventi molecolari che legano gli stimoli di innesco al destino finale della cellula.

Anche se esistono una varietà di impulsi e condizioni, sia fisiologici che patologici, in grado di scatenare l'apoptosi, non tutte le cellule necessariamente muoiono in risposta allo stesso stimolo.

### Morfologia dell'apoptosi.

**33** Grazie al microscopio ottico ed elettronico è stato possibile identificare i vari cambiamenti morfologici che si verificano durante l'apoptosi. In una fase precoce, appaiono visibili il restringimento delle cellule e la picnosi [89]: le cellule diventano più piccole, il citoplasma è denso e gli organuli più fitti. La **picnosi** è il tratto più caratteristico di apoptosi e comporta la condensazione della cromatina.

Un'estensiva gemmazione, o "**blebbing**", della membrana plasmatica è seguita da **carioressi** (la frammentazione del nucleo) e dalla produzione di corpi apoptotici, consistenti di citoplasma, organelli e con, o senza, un frammento nucleare. L'integrità dell'organello è ancora mantenuta e il tutto racchiuso entro una membrana plasmatica intatta. I corpi apoptotici vengono successivamente fagocitati dai macrofagi, cellule parenchimali o cellule neoplastiche e degradate all'interno dei fagolisosomi.

Non vi è essenzialmente alcuna reazione infiammatoria associata al processo di apoptosi, né con la rimozione dei corpi apoptotici perché:

1. le cellule apoptotiche non rilasciano i loro costituenti cellulari nel tessuto interstiziale circostante,
2. i corpi apoptotici sono rapidamente fagocitati dalle cellule circostanti prevenendo, quindi, probabili inneschi di necrosi secondarie e
3. le cellule fagocitanti non producono citochine anti-infiammatorie [89, 90].

### Meccanismi di apoptosi.

**34** I meccanismi apoptotici, complessi e sofisticati, coinvolgono una cascata di eventi molecolari dipendenti da energia. Sono note due vie principali del processo apoptotico: la **via estrinseca**, tramite i recettori di morte e la **via intrinseca** o mitocondriale. I due percorsi sono collegati e le molecole di una via possono influenzare l'altra. Vi è un ulteriore percorso che coinvolge la citotossicità mediata da cellule T e l'uccisione della cellula attraverso la **via della perforina-granzima A/B**. La via estrinseca, intrinseca e la via del granzima A/B convergono allo stesso terminale, detto anche **percorso di esecuzione**. Questo inizia con il clivaggio della caspasi-3 e si conclude con:

- la frammentazione del DNA,
- la degradazione delle proteine nucleari e del citoscheletro,
- il cross-linking delle proteine,
- la formazione di corpi apoptotici,
- l'espressione dei ligandi per i recettori delle cellule fagocitarie e, infine, l'assorbimento da parte delle cellule fagocitarie.

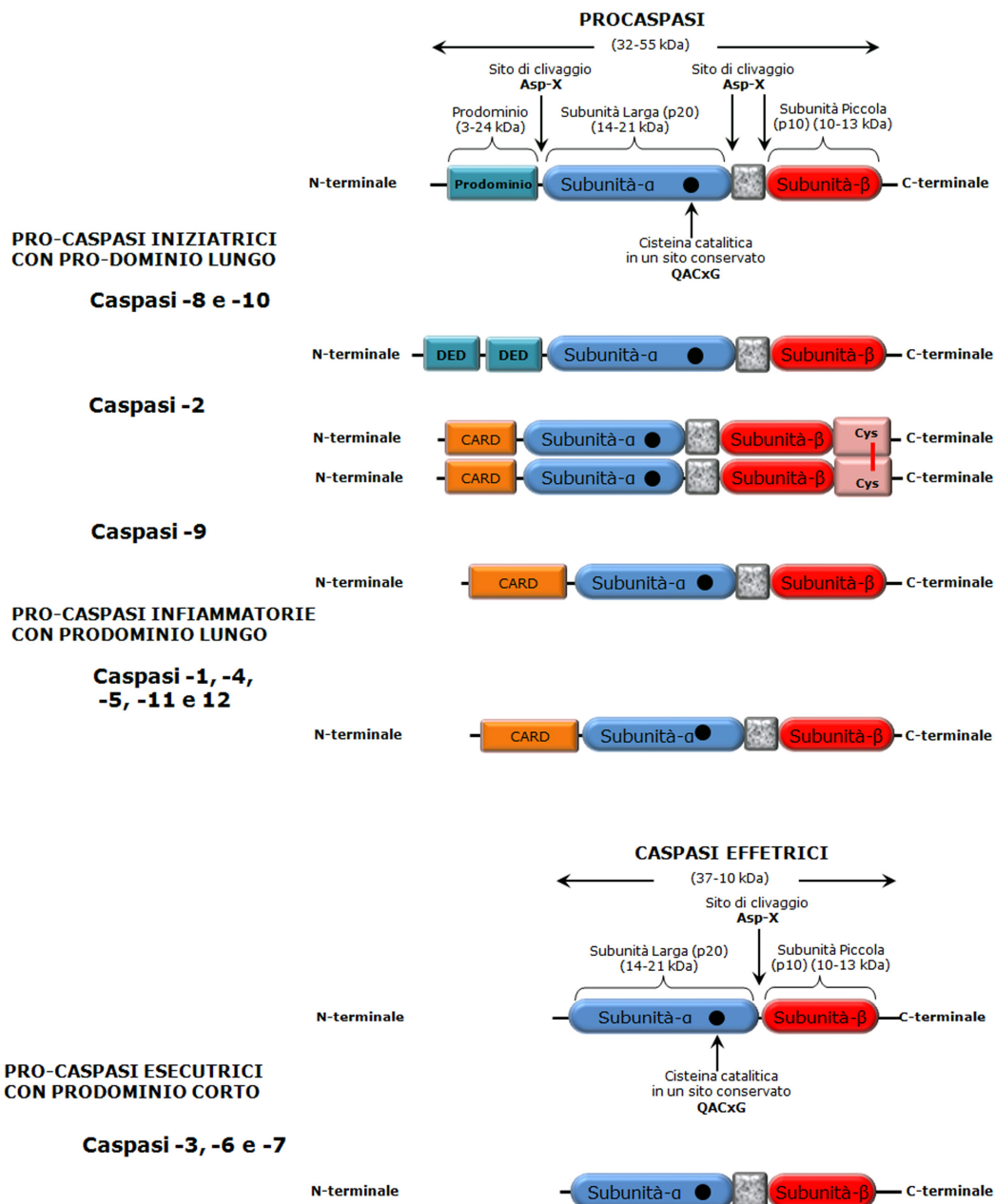
Il granzima A è invece in grado di attivare un percorso di morte parallelo caspasi-indipendente attraverso danni ad un singolo filamento di DNA [91].

### Caratteristiche biochimiche dell'apoptosi.

**35** Le cellule apoptotiche mostrano diverse modificazioni biochimiche la maggior parte delle quali attribuibili all'attività delle caspasi. Le **caspasi** (contrazione di **Cistein-Aspartasi**) sono un gruppo di proteasi con residui di cisteina nel sito attivo; questi enzimi possono tagliare altre proteine dopo un residuo di acido aspartico (Box 2). Queste proteine sono ampiamente espresse sottoforma di pro-enzima inattivo (zimogeno) in tutte le cellule e, una volta funzionali, spesso attivano altre pro-caspasi dando inizio ad una cascata di proteasi. Più pro-caspasi possono aggregarsi e auto-attivarsi amplificando la via apoptotica per indirizzare la cellula verso una rapida morte. Le caspasi identificate sino ad oggi sono state classificate in **caspasi iniziatrici** (caspasi-2, -4, -8, -9, -10, -12) che tagliano pro-forme inattive di altre caspasi dette "**effettrici**" o esecutrici (caspasi-3, -6, -7) attivandole; le **caspasi effettrici**, a loro volta, taglieranno precisi substrati proteici proseguendo il percorso apoptotico (figura 2).

**Box 2.** Sono state identificate 13 caspasi in mammifero le quali hanno controparti omologhe clonate in vari organismi quali

- il nematode ***C. elegans*** (i geni CED),
- la spugna ***G. cynodium***, filogeneticamente la più vecchia del phylum metazoa e negli insetti
- ***D. melanogaster*** (il moscerino della frutta) e ***S. frugiperda*** (una farfalla).



**Figura 2. Struttura e classificazione.** Le caspasi vengono sintetizzate cataliticamente inattive in forma di singola catena aminoacidica di 32-55 kDa. Ogni peptide è composto da 3 domini: un dominio centrale catalitico detto "p20", contenente il sito attivo (17-21 kDa); un dominio C-terminale da 10-13 kDa detto "p10"; un prodominio N-terminale da 3-24 kDa chiamato **Dominio di Morte (DD)**. Alcune caspasi mostrano anche una breve sequenza linker tra p20 e p10 [75]. Il DD si suddivide in 2 sottodomini composti da  $\alpha$ -eliche anfipatiche e aventi funzioni diverse: il **Dominio Effettore di Morte (DED)** e il **Dominio di Reclutamento delle Caspasi (CARD)** la cui funzione è il richiamo delle caspasi iniziatrici nel luogo di formazione dei complessi pro-apoptotici.

Il pro-dominio caspasico può essere lungo (>90 aa) o corto (20-30 aa). Le caspasi con un pro-dominio lungo sono divise in due gruppi: le caspasi-1, -4, -5, -12, -13, -14 controllano la maturazione delle citochine e i processi infiammatori; le caspasi-2, -8, -9, -10 dette **iniziatrici**, contenenti domini DED (caspasi-8 e -10) o CARD



(caspasi-2 e -9). Al contrario, le caspasi con dominio corto sono dette **effettrici, o esecutrici**, dell'apoptosi e sono le caspasi-3, -6, -7. Il sito catalitico conservato ha sequenza consenso QACxG, all'interno della subunità  $\alpha$ . Ogni caspasi attivata è un eterodimero di un omodimero [p20<sub>2</sub>-p10<sub>2</sub>] legati in una struttura quaternaria. Ogni monomero p20-p10 forma un cilindro e i due cilindri interagiscono tra loro testacoda con i siti attivi posizionati agli opposti estremi della molecola [92].

Un ampio cross-linking tra le proteine è un'altra caratteristica di cellule apoptotiche, ottenuta attraverso l'espressione e l'attivazione di transglutaminasi tissutali [93]. A questa si aggiunge la frammentazione del DNA ad opera di endonucleasi dipendenti da Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> con conseguente produzione di frammenti di 180-200 paia di basi [94] detto "DNA-laddering". Un'altra caratteristica biochimica del percorso apoptotico è l'espressione di marcatori di superficie cellulare che consentono il riconoscimento precoce delle cellule apoptotiche da parte di cellule adiacenti, permettendone la fagocitosi con minima compromissione del tessuto circostante. Questo effetto è mediato dalle fosfatidilserine, marcatori lipidici normalmente espressi nel monostrato interno del doppio strato lipidico che, a seguito di stimoli inducenti apoptosi, si spostano nel monostrato esterno, fungendo da ligandi di riconoscimento per i fagociti. Tuttavia, altre proteine possono essere esposte sulla superficie cellulare durante l'eliminazione delle cellule apoptotiche. Queste includono annessina V, calreticulina e trombospondina-1 (Box 2.1).

#### Box 2.1

- **L'annessina V**, una proteina in grado di interagire specificamente con residui di fosfatidilserina, viene utilizzata per la rilevazione di apoptosi soprattutto attraverso la citometria a flusso.
- **La calreticulina** è una proteina che si lega ad un recettore LDL, sulla superficie di cellule deputate alla fagocitosi e si pensa agisca, assieme la fosfatidilserina, da segnale di riconoscimento [95].
- **La glicoproteina adesiva trombospondina-1**, può essere espressa sulla superficie esterna delle cellule endoteliali attivate del microcircolo e, in collaborazione con CD36, caspasi-3 e altre proteine, induce apoptosi mediata da recettori.

#### La via di segnalazione estrinseca.

**36**

La via di segnalazione estrinseca innesca un percorso apoptotico mediato da interazioni con recettori transmembrana.

Questi sono i **Recettori di morte**, membri della superfamiglia di geni per il **Recettore del Fattore di Necrosi Tumorale (TNFR)**. Tutti i membri della famiglia sono dotati di un dominio extracellulare ricco in cisteine ed un dominio citoplasmatico di circa 80 aminoacidi detto **Dominio di Morte (DD)**, omologo a quello delle caspasi, che gioca un ruolo fondamentale nel trasmettere il segnale dalla superficie della cellula alle vie intracellulari. Ad oggi, i ligandi più caratterizzati dei recettori di morte comprendono FasL/FasR e TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5 [96].

La sequenza di eventi, in breve, comporta la trimerizzazione del recettore a seguito del legame con il ligando ed il reclutamento di proteine adattatrici citoplasmatiche come la **proteina con Dominio di Morte Associata al**

**Recettore Fas (FADD)** nel caso del FasR e la **proteina con Dominio di Morte associata al Recettore TNF (TRADD)** nel caso di TNFR1, che possiedono sia un **Dominio Effettore di Morte (DED)**, simile a quello delle caspasi esecutrici che un omologo **Dominio di Morte (DD)** in grado di riconoscere e legare quello del recettore.

La proteina adattatrice FADD recluta ed attiva la caspasi iniziatrice-8 e -10 attraverso un'interazione tra le rispettive regioni DED, per formare il **Complesso di Segnalazione che Induce Morte cellulare (DISC)**. Una volta che la caspasi è attivata il processo di morte è innescato. La via estrinseca può essere inibita da proteine che si legano a FADD e alla procaspasi-8 rendendoli inattivi [97] (figura 2.1).

### Via della Perforina/Granzima.

**37** La citotossicità mediata da cellule T è una variante di ipersensibilità di tipo IV in cui cellule T CD8<sup>+</sup> sensibilizzate uccidono cellule bersaglio presentanti antigeni estranei attraverso l'interazione FasL/FasR [98]. Questi linfociti sono in grado di esercitare i loro effetti citotossici su cellule tumorali e infettate da virus attraverso la secrezione della **Perforina**, molecola in grado di formare pori transmembrana sulla cellula bersaglio con un successivo rilascio, all'interno di questa, di granuli citoplasmatici contenenti la **serina proteasi Granzima A e B (GrA e GrB)** [99]. Il GrB cliva proteine a livello di residui di aspartato e può così attivare la procaspasi-10 (Box 2.2).

Il GrA è altresì importante per l'apoptosi indotta da cellule T citotossiche, attivando percorsi indipendenti dalle caspasi. Una volta nella cellula, il granzima A promuove la scissione del DNA attraverso l'attivazione della DNasi NM23-H1, prodotto di un gene soppressore di tumori. Questa DNasi svolge un importante ruolo di sorveglianza immunitaria, prevenendo la trasformazione neoplastica attraverso l'induzione di apoptosi nelle cellule tumorali. La proteina di assemblaggio del nucleosoma SET normalmente inibisce l'induzione del gene NM23-H1. L'attività proteasica del GrA inattiva SET e promuove un processo apoptotico che contribuisce a minare l'integrità del DNA e della stessa cromatina (Box 2.3 e figura 2.1).

#### Box 2.2

- **FasR** lega FADD direttamente attraverso i propri domini DD mentre, nel caso di TNF-R1, il legame è indiretto ed avviene tramite un'ulteriore proteina adattatrice, TRADD. Questa, recluta la proteina RIP, attraverso l'interazione tra i rispettivi domini di morte. Il complesso si dissocia poi dal TNF-R per legare FADD e la caspasi-8.
- Il **GrB** può anche utilizzare la via mitocondriale per l'amplificazione del segnale di morte attraverso la scissione specifica di Bid e l'induzione del rilascio del citocromo-c. Il granzima B può anche attivare direttamente la caspasi-3, evitando dunque tutte le vie di segnalazione a monte con l'innescò indiretto della fase esecutiva.

**Box 2.3.** Oltre a inibire NM23-H1, il complesso SET svolge altre importanti funzioni. Le proteine che compongono questo complesso (SET, Ape1, PP332 e HMG2) lavorano insieme per proteggere la struttura della cromatina e del DNA [100].

### La via di segnalazione intrinseca.

**38**

I percorsi di segnalazione della via intrinseca comprendono una gamma diversificata di stimoli non mediata da recettori che producono segnali intracellulari in grado di agire direttamente su bersagli proteici all'interno della cellula (Box 2.4).

Tutti questi stimoli causano cambiamenti nella membrana mitocondriale interna che si traducono nell'apertura di pori con una

**Transizione della Permeabilità Mitocondriale (MPT)**, la perdita del potenziale transmembrana e il rilascio di due gruppi di proteine pro-apoptotiche normalmente localizzate nello spazio intermembrana [101].

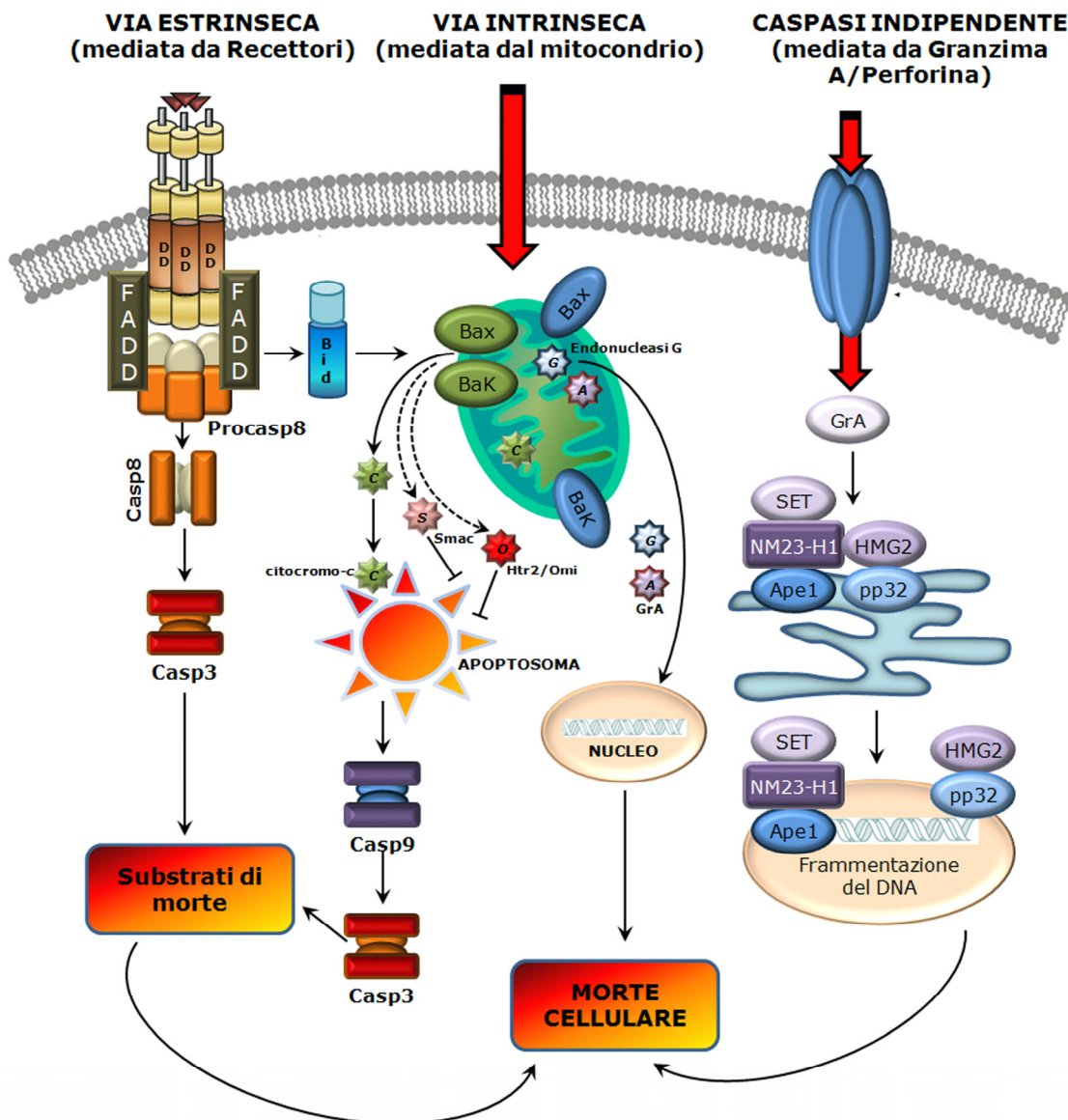
Il primo gruppo è costituito dal **citocromo-c**, **Smac/DIABLO**, e la serina proteasi **HtrA2/Omi** [102]. Queste proteine attivano il pathway di morte mitocondriale dipendente da caspasi. Il citocromo-*c* lega ed attiva il **Fattore 1 Attivante le Proteasi (Apaf-1)**, l'omologo dei mammiferi della proteina CED-4 di *C. elegans*. Oltre al dominio CED-4 la proteina si compone di un dominio CARD ed un **Dominio Ripetuto c-terminale WD-40 (WDR)**. Dal legame tra il citocromo-*c*, dATP o ATP, Apaf-1 subisce una auto-oligomerizzazione formando un complesso attivante la caspasi stessa, con il nome di **Apoptosoma**. L'apoptosoma recluta poi la procaspasi-9 ed attiva le caspasi effettrici -3 e -7. **L'Inibitore di Proteine Apoptotiche X-linked (XIAP)** può altresì associarsi all'apoptosoma inibendo l'attività della caspasi-9, -3 e -7 [103] (figura 2.1).

Il secondo gruppo di proteine pro-apoptotiche, il **Fattore che Induce Apoptosi (AIF)**, **l'Endonucleasi G** e la **DNAsi Attivata dalle Caspasi (CAD)**, viene rilasciato dai mitocondri durante l'apoptosi ma questo è un evento tardivo che si verifica dopo che la cellula è già indirizzata sulla via di morte. AIF trasloca al nucleo e provoca la frammentazione del DNA in pezzi di ~50-300 kb e la condensazione periferica della cromatina nucleare [104] indicata anche come "fase I" di condensazione [105] (figura 2.2). L'Endonucleasi G trasloca anch'essa al nucleo, dove interagisce con la cromatina nucleare per la produzione di frammenti di DNA oligonucleosomiali [106]. Sia AIF che l'Endonucleasi G funzionano in maniera indipendente dalle caspasi.

CAD è rilasciato dai mitocondri solo in seguito e trasloca al nucleo dove, a seguito della attivazione della caspasi-3, promuove la frammentazione del DNA oligonucleosomiale e una condensazione più massiccia della cromatina. Questo ulteriore e più pronunciato evento è indicato come "fase II" di condensazione.

Il controllo e la regolazione di questi eventi apoptotici mitocondriali avviene attraverso i membri della famiglia di proteine Bcl-2, a loro volta sotto il controllo della proteina soppressore del tumore p53 [107].

**Box 2.4.** Gli stimoli che innescano la via intrinseca producono segnali intracellulari che possono agire sia in modo positivo o negativo. L'assenza di alcuni fattori di crescita, ormoni e citochine portano al fallimento della soppressione dei programmi di morte, innescando l'apoptosi. Stimoli che agiscono in modo positivo sono invece radiazioni, tossine, ipossia, ipertermia, infezioni virali e radicali liberi.

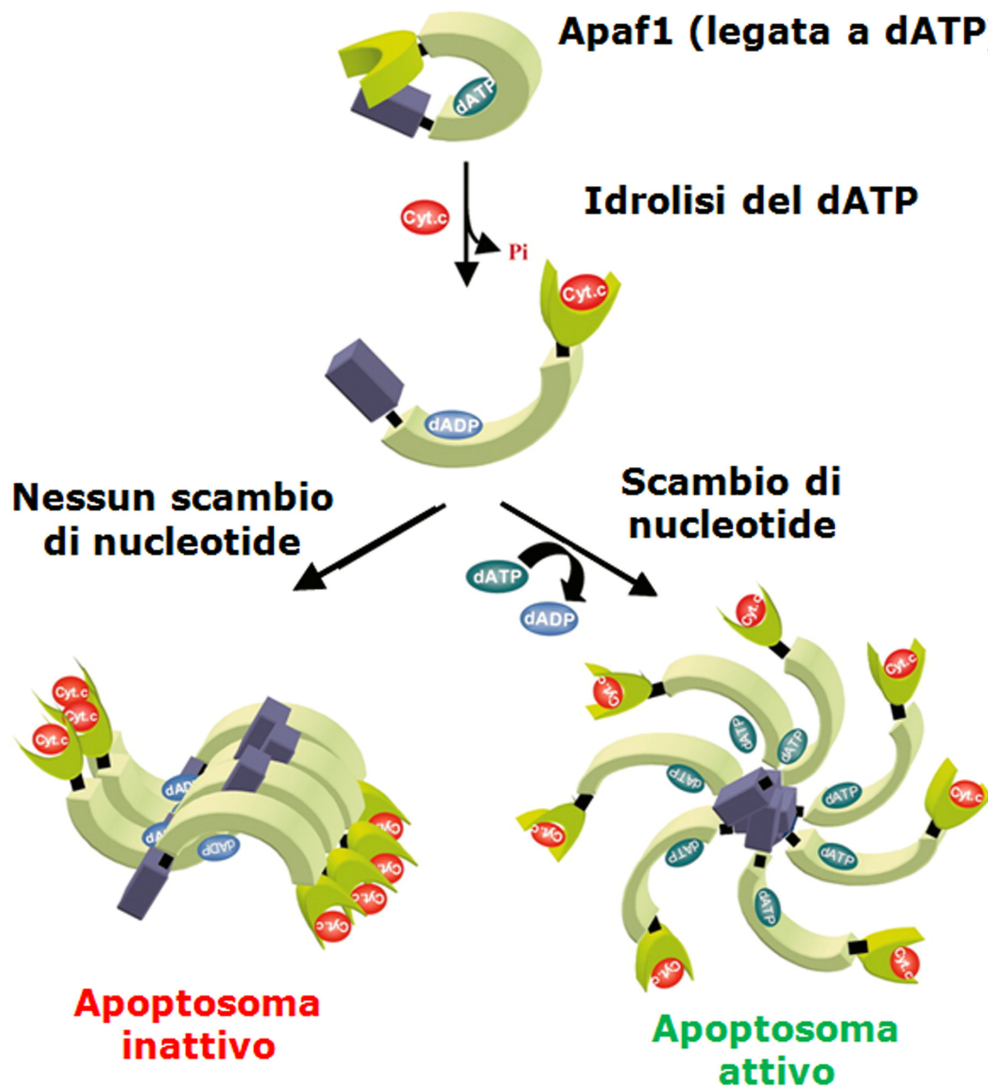


**Figura 2.1. I pathway apoptotici.**

- **Il pathway estrinseco mediato da recettori di morte.** Il legame ai recettori apoptotici è seguito dalla formazione del DISC, che risulta nell'attivazione della caspasi-8 e, quindi, della caspasi-3, portando all'apoptosi oppure al taglio di Bid mediato sempre dalla caspasi-8. A sua volta, la forma troncata di Bid, induce la traslocazione dei fattori pro-apoptotici Bax/Bak sulla membrana mitocondriale. Questo provoca il rilascio di molecole dall'interno dei mitocondri al citoplasma, in particolare del citocromo-c, che partecipa alla formazione del complesso dell'apoptosoma insieme ad Apaf-1 ed alla pro-caspasi-9. L'attivazione della caspasi-9 porta al processamento della caspasi-3 e l'avvio della fase di esecuzione dell'apoptosi.
- **Il pathway intrinseco mediato da mitocondri.** I segnali di morte intervengono in modo diretto o indiretto sui mitocondri con formazione, anche in questo caso, dell'apoptosoma. Nel processo sono coinvolte le proteine della famiglia Bcl-2 per la regolazione del rilascio del citocromo-c, le proteine di inibizione dell'apoptosi e Smac. Il pathway intrinseco funziona anche con

meccanismi indipendenti dalle caspasi, che coinvolgono il rilascio dai mitocondri e la traslocazione nel nucleo di almeno due proteine: AIF e l'Endonucleasi G.

- **Il Pathway mediato dal Granzima-A (GrA).** L'ingresso del GrA nel citosol della cellula è controllato da pori creati dalla perforina, attivati dal Calcio. La **DNasi attivata dal GrA (GADD)**, coinvolta in questo meccanismo, crea tagli a singola filamento nel DNA (*modificato da Orrenius et al., 2003*) [108].



**Figura 2.2. Modello di formazione dell'apoptosoma.** Apaf-1 è associato con dATP. In presenza di citocromo-c, il dATP viene idrolizzato e questo provoca la modificazione conformazionale della molecola. Una nuova sostituzione con di nucleotidi (dADP → dATP) consente l'oligomerizzazione di Apaf-1 per costituire parte dell'apoptosoma attivo. Quando Apaf-1 viene incubato con il citocromo-c, in assenza di dATP/ATP, il dADP rimane legato ad Apaf-1 che, aggregandosi, dà vita ad un apoptosoma inattivo (*modificato da Kim H et al., 2005*)

### La Famiglia di proteine Bcl-2.

**39**

Il membro principale della famiglia Bcl-2, la proteina Bcl-2, è stata scoperta durante l'analisi molecolare della traslocazione cromosomica t14-18 nel linfoma a cellule B. Da allora, la famiglia è cresciuta fino a comprendere circa 20 membri.

Tutte le proteine della famiglia Bcl-2 contengono almeno uno dei quattro motivi  $\alpha$ -elica conservati conosciuti come **Domini di Omologia a Bcl-2 (BH1-4)**. In base alla funzione, la famiglia è ulteriormente suddivisibile in due gruppi, proteine anti-apoptotiche e proteine pro-apoptotiche.

I membri della famiglia di proteine anti-apoptotiche possiedono tutti e quattro i domini BH e comprendono Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, e A1, mentre le proteine pro-apoptotiche sono divisi in due sottogruppi: le proteine multi-dominio contenenti i domini BH1-3, ossia Bax, Bak e Bok (dove l'espressione di quest'ultimo è limitata ai tessuti riproduttivi) e proteine BH3-only che sono Bad, Bid, Bik/NBK, Bim, Bmf, Nix/BNIP3, HRK, noxa, e Puma e che contengono il solo dominio BH3.

La struttura tridimensionale delle proteine Bcl-2 anti-apoptotiche, complessate con un peptide contenente BH3, prevede che i domini BH1, BH2 e BH3 dei membri anti-apoptotici, formino un solco idrofobico in cui l' $\alpha$ -elica anfipatica del dominio BH3 dei membri pro-apoptotici vada ad inserirsi [109]. Questa interazione tra le proteine Bcl-2 anti-apoptotiche e le proteine multidominio pro-apoptotiche neutralizza la loro funzione [110].

Bax e Bak sono componenti essenziali della via apoptotica intrinseca. In risposta a stimoli apoptotici, Bax trasloca sulla membrana mitocondriale esterna dopo di che, sia Bax che Bak, oligomerizzano in un poro-canale transmembrana facilitando il rilascio del citocromo-*c* nel citosol [111].

Le proteine BH3-only sono considerate responsive ai segnali di stress in entrata e mostrano un'attività specifica dipendente sia dal tipo cellulare che dal tipo di stimolo. L'attivazione delle proteine BH3-only durante stress di varia natura può verificarsi a livello trascrizionale (ad esempio, con la sovra-regolazione di Puma e noxa mediata da p53) oppure tramite modifiche post-traduzionali, quali:

- **fosforilazione** (di Bad e Bik),
- **dissociazione dalle proteine sequestranti**, come il rilascio di Bad e di Bim da 14-3-3 e/o dalla catena leggera della dineina 1 e 2 (motore proteico collegato strutturalmente alla miosina), rispettivamente,
- **proteolisi** (clivaggio di Bid da parte della caspasi-8) [112].

Come le proteine BH3-only promuovano l'apoptosi dipende dalla loro affinità relativa per le varie proteine multidominio della famiglia Bcl-2. Gli "agonisti della morte", come Bid, Bim e Puma, interagiscono e migliorano l'attività pro-apoptotica delle proteine multidominio Bcl-2, mentre gli "antagonisti della sopravvivenza", come Bad, Bik, Bmf, HRK e noxa, interagiscono solo con proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2, per abolire il sequestro di Bax e Bak.

È interessante notare come, anche se molte proteine BH3-only (tipo Bid, Bim, e Puma) interagiscono con tutte le proteine anti-apoptotiche della

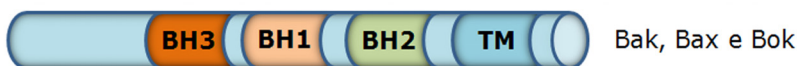
famiglia Bcl-2, altre proteine BH3-only mostrano una marcata selettività di legame, con Bad e Bmf aventi maggiori affinità per Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> e Bcl-w, mentre noxa si lega solo a Mcl-1 e A1 [113]. Allo stesso modo, Bid, Bim, e Puma da soli sono più potenti induttori di apoptosi rispetto ad altre proteine BH3-only che richiedono uno sforzo congiunto per neutralizzare più proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2. Tuttavia, per innescare l'apoptosi, le proteine BH3-only richiedono sia Bax che Bak, indicando come le proteine pro-apoptotiche multidominio funzionano come effettori a valle delle proteine BH3-only [114] (figura 2.3 e tabella 2).

#### a. Proteine Bcl-2 ANTI-APOPTOTICHE

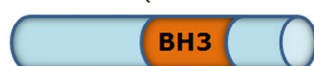


#### Proteine Bcl-2 PRO-APOPTOTICHE

Esecutori

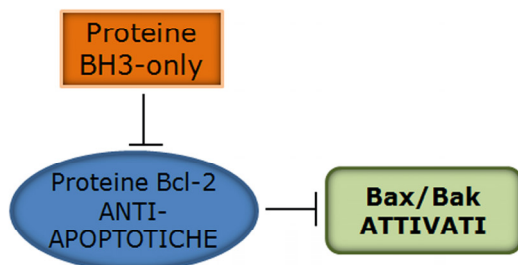


Effettori (Proteine BH3-ONLY)

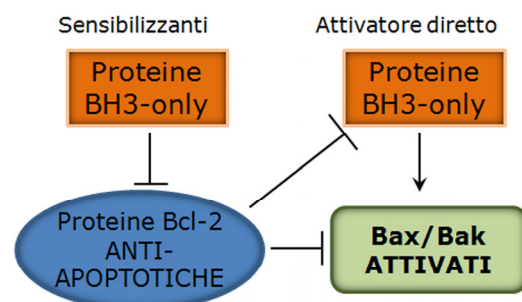


Bim, Bid, Bad, Bid, Bmf, BNIP3 HRH, noxa e PUMA.

#### b. Modello dell'attivatore indiretto



#### Modello del derepressore-attivatore diretto



**Figura 2.3. Organizzazione e modalità di attivazione della famiglia di proteine Bcl-2.** La famiglia di proteine Bcl-2 è divisa in tre gruppi in base all'organizzazione dei domini BH (parte "a"). Le proteine pro-apoptotiche possono essere suddivise in **effettori** (le proteine che causano la Permeabilizzazione della Membrana Mitochondriale Esterna, MOMP) e **BH3-only** (le proteine che inoltrano il segnale apoptotico).

Sono stati proposti due modelli di attivazione, basati sull'attività di Bax e Bak, chiamati **Modello dell'attivatore indiretto** (o di neutralizzazione) e **Modello del derepressore-attivatore diretto** (parte "b"). Il primo modello presuppone che Bax e Bak siano bloccate in uno stato costitutivamente attivo da proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2 e che, interazioni competitive tra proteine BH3-only e membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2, siano sufficienti a liberare Bax e Bak attivati. Nel modello del derepressore-attivatore diretto Bax e Bak sono attivati a seguito dell'interazione con un sottoinsieme di proteine BH3-only, note come **attivatori diretti**, mentre i membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2, quando non neutralizzate da altre proteine BH3-only (i **sensibilizzatori**), inibiscono Bax e Bak attivati (*modificato da Tait SW et al., 2010*)

**TABELLA 2. Proteine Bcl-2 e loro funzioni.**

RUOLI DELLE PRINCIPALI PROTEINE BCL-2	
<b>APOPTOSI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Bid.</b> Il suo clivaggio da parte della caspasi-8 media il danno mitocondriale nella via di Fas (esempio di "contaminazione" tra la via apoptotica estrinseca mediata da recettori e quella mitocondriale intrinseca) [116].</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Bad.</b> Quando fosforilata in un residuo di serina, viene intrappolata da 14-3-3 e sequestrata nel citosol; a seguito di de fosforilazione, Bad trasloca ai mitocondri permettendogli di rilasciare il citocromo-c. Bad può anche eterodimerizzarsi con Bcl-X<sub>L</sub> o Bcl-2, neutralizzando il loro effetto protettivo e promuovendo la morte cellulare.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>.</b> Quando non sequestrate da Bad, sia Bcl-2 che Bcl-X<sub>L</sub> inibiscono il rilascio del citocromo-c dai mitocondri. In primo luogo Bcl-2 e Bcl-xL inibiscono la morte apoptotica, controllando l'attivazione delle caspasi, tuttavia pare che la sovra-espressione di Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> sotto-esprima l'altra, indicando un controllo reciproco tra queste due proteine.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Puma e Bax.</b> Puma gioca un ruolo importante nella apoptosi mediata da p53. <i>in vitro</i>, la sovra-espressione di Puma è accompagnata da un aumento del livello di Bax, il suo cambiamento conformazionale e la traslocazione ai mitocondri, con la conseguente riduzione del potenziale di membrana ed il rilascio del citocromo-c .</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Noxa.</b> Si tratta sempre di un mediatore di apoptosi indotto da p53. Questa proteina è in grado di localizzarsi nei mitocondri e interagire con i membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2, con la conseguente attivazione della caspasi-9. Poiché sia Puma che noxa sono indotti da p53, esse potrebbero mediare l'apoptosi che si manifesta in conseguenza a danni genotossici o a seguito dell'attivazione di oncogeni.</li> </ul>

**40**

**Localizzazione sub-cellulare della famiglia delle proteine Bcl-2.** Le proteine della famiglia Bcl-2 hanno diverse sedi intracellulari.

Le proteine BH3-only sono prevalentemente localizzate nel citosol, mentre gli altri membri della famiglia Bcl-2 contengono una coda idrofobica C-terminale che consente il loro ancoraggio alle membrane intracellulari [98]. Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> sono localizzate sulla superficie della membrana mitocondriale esterna, su quella del reticolo endoplasmatico rugoso e la membrana nucleare, mentre Bak è stato rilevato sulle membrane mitocondriali e del reticolo [115].

Anche se Bax contiene una coda idrofobica C-terminale, la forma inattiva di Bax è una proteina citoplasmatica monomerica perché la sua ancora C-terminale è ancora internalizzata dentro la tasca formata dai domini BH1-3. Tuttavia, a seguito di uno stimolo apoptotico, la conformazione di Bax cambia, determinando l'esposizione della coda C-terminale e la traslocazione di Bax attivo alla membrana mitocondriale esterna. I rappresentanti di tutte e tre le sottoclassi della famiglia Bcl-2 sono stati identificati presso il reticolo endoplasmatico ed è stato proposto che regolino l'induzione di percorsi apoptotici mitocondrio-dipendente in risposta ad un grave o prolungato stress del reticolo [110]. Queste proteine appaiono dunque



importanti nello stabilire se la cellula si impegna a proseguire o interrompere il processo apoptotico.

### La fase di esecuzione.

**41**

I percorsi estrinseci ed intrinseci convergono entrambi nella fase di esecuzione, considerato il punto di non ritorno dell'apoptosi.

L'attivazione delle caspasi esecutrici da inizio a questa fase. Tali caspasi attiverrebbero sia endonucleasi citoplasmatiche (con conseguente degradazione del materiale nucleare) che proteasi, capaci di degradare le proteine nucleari e quelle del citoscheletro.

Le caspasi-3, -6, e -7 funzionano come veri e propri "giustizieri" demolendo vari substrati tra cui citocheratine, PARP, la proteina citoscheletrica della membrana plasmatica  $\alpha$ -fodrina, la proteina nucleare NuMA e altre che, alla fine, producono i cambiamenti morfologici e biochimici osservati nelle cellule apoptotiche [117].

La caspasi-3 è considerato il più importante degli induttori apoptotici. Attivato dalle caspasi iniziatrici -8, -9 o -10 penetra nel nucleo per rendere attive le endonucleasi CAD. Essendo CAD, nelle cellule proliferanti, complessato con il suo **inibitore ICAD**, la caspasi-3 cliverà ICAD per liberare CAD. CAD provvederà poi alla degradazione del DNA cromosomico causando alla condensazione della cromatina.

La caspasi-3 promuove anche la riorganizzazione del citoscheletro e la disintegrazione della cellula in corpi apoptotici. La Gelsolina, una proteina che funge da nucleo di polimerizzazione dei filamenti di actina, è stata identificata come uno dei substrati chiave di attivazione della caspasi-3. Questa degrada la gelsolina ed i frammenti ottenuti clivano a loro volta i filamenti di actina attraverso reazioni dipendenti da  $Ca^{2+}$ . Ciò si traduce in un disassemblaggio del citoscheletro, con conseguente effetti sul trasporto intracellulare, la divisione e i meccanismi di trasduzione del segnale [118].

La fagocitosi di cellule apoptotiche è l'ultimo passaggio di questa fase. Una generale asimmetria dei fosfolipidi componenti la membrana e la localizzazione, nel monostrato esterno superficiale di cellule apoptotiche, della fosfatidilserina ed i suoi frammenti è il segno distintivo di questa fase. Il meccanismo di traslocazione della fosfatidilserina al foglietto esterno della membrana cellulare è stato associato alla perdita di attività di specifiche traslocasi ed a movimenti di passaggio da un monostrato all'altro (flip-flop) dei fosfolipidi di varie classi. L'esposizione delle fosfatidilserine sulla superficie di cellule apoptotiche facilita poi il riconoscimento fagocitico, consentendo l'incorporazione precoce e lo smaltimento [119, 120]. Questo processo di recupero di elementi apoptotici rapido ed efficace, senza rilascio di costituenti cellulari, non si traduce in una risposta infiammatoria.

### Apoptosi fisiologica e patologica.

**42**

Il ruolo dell'apoptosi negli stati fisiologici normali è significativo quanto quella della sua controparte, la mitosi, dimostrando un ruolo complementare ma opposto alla proliferazione. Si stima che, per mantenere

L'omeostasi nel corpo umano adulto, circa 10 bilioni di cellule si originano ogni giorno solo per bilanciare quelle morte per apoptosi [121]. Questo numero può aumentare in modo significativo quando vi è un aumento dell'apoptosi durante lo sviluppo normale e l'invecchiamento oppure durante la malattia (tabelle 2.1 e 2.2).

**TABELLA 2.1 Intervento dell'apoptosi in stati fisiologici normali.**

<b>RUOLI FISIOLGICI:</b>	
<b>APOPTOSI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Morte delle cellule nervose che non riescono a stabilire connessioni sinaptiche funzionali o cellule immunitarie mancanti di specificità nella produzione di antigeni [122].</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rimozione di cellule invase da patogeni e di cellule infiammatorie durante la guarigione delle ferite e nell'evoluzione del tessuto di granulazione in tessuto cicatriziale.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eliminazione di cellule autoimmuni sia durante la maturazione negli organi linfoidi centrali (midollo osseo e timo) che nei tessuti periferici [123].</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rimodellamento tissutale nei mammiferi adulti [124].</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eliminazione di cellule di alcuni tessuti durante l'invecchiamento.</li> </ul>

**TABELLA 2.2: Intervento dell'apoptosi in stati fisiologici alterati.**

<b>RUOLI IN STATI ALTERATI:</b>	
<b>APOPTOSI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alterazione delle vie di segnalazione cellulari varie possono portare a disregolazione del processo apoptotico e allo sviluppo del cancro.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Un insufficiente morte fisiologica per apoptosi delle cellule dirette contro antigeni self o una eccessiva proliferazione delle cellule B, con conseguente produzione di immunoglobuline in eccesso, porta allo sviluppo di malattie autoimmuni e sindromi linfoproliferative.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nel caso del virus HIV questo infetta le cellule T CD4<sup>+</sup> legandosi al recettore CD4. Il virus è poi interiorizzato nella cellula T dove si pensa che la proteina virale Tat aumenti l'espressione del recettore Fas, con conseguente eccessiva apoptosi delle cellule T [125].</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Il morbo di Alzheimer è una malattia neurodegenerativa associata alla deposizione di <math>\beta</math>-amiloide extracellulare in depositi noti come placche amiloidi. La <math>\beta</math>-amiloide, quando si trova aggregata, risulta altamente neurotossica ed induce apoptosi provocando stress ossidativo o innescando un aumento d'espressione del ligando Fas nei neuroni e nelle cellule gliali.</li> </ul>

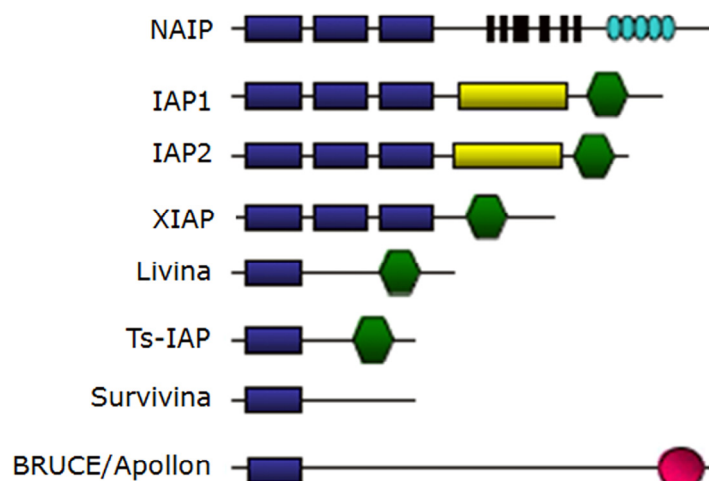
Una mancata regolazione della morte cellulare rappresenta una componente significativa di patologie come il cancro, ma può anche essere una caratteristica di alcune condizioni come malattie virali, malattie neurodegenerative e lesioni associate ad ischemia. Alcune di queste malattie sono caratterizzate da una funzionalità apoptotica insufficiente mentre altre da eccessiva apoptosi.

### Inibizione dell'apoptosi.

**43** Le **Proteine che Inibiscono l'Apoptosi (IAP)** sono una famiglia di molecole che sopprimono efficacemente la morte apoptotica indotta da una serie di stimoli quali l'attivazione dei recettori di morte, la deprivazione dei fattori di crescita, radiazioni ionizzanti, infezioni virali e danni genotossici. I geni IAP sono stati identificati per la prima volta in Baculovirus, dove compensano, con i loro prodotti, la perdita di funzione di p53, un inibitore delle caspasi. Dalla scoperta della prima IAP umana, la **Proteina Inibitrice dell'apoptosi Neuronale (NAIP o BIRC1)**, la famiglia si è ampliata per comprendere altri sette membri: **La Proteina Inibitrice dell'Apoptosi X-linked (XIAP o BIRC4)**, **IAP1 (BIRC2)**, **IAP2 (BIRC3)**, **IAP testicolo-specifica (Ts-IAP o BIRC8)**, **l'Enzima che Coniuga l'Ubiquitina Contenente BIR (BRUCE/Apollon o BIRC6)**, la **Survivina (BIRC5)** e la **Livina (BIRC7)**.

Tutte le IAP contengono almeno un **Dominio Inibitore di Apoptosi**, chiamato anche **Ripetizione IAP** o **Ripetizione delle proteine di Baculovirus che Inibiscono l'Apoptosi (BIR)**. Si tratta di un motivo strutturale a dita di zinco con un numero di residui amminoacidici invariati, inclusi tre cisteine e un istidina conservate, che coordinano uno ione zinco. Proprio attraverso il loro dominio BIR, le IAP sono le uniche proteine endogene conosciute in grado di inibire l'attività sia delle caspasi iniziatrici che effettrici [126] (figura 2.4).

Come detto, ci sono più condizioni patologiche che portano ad una eccessiva apoptosi e traggono beneficio da essa pertanto, l'esplorazione e l'identificazione di nuovi target anti-apoptotici rimane un considerevole focus di attenzione.



**Figura 2.4 Struttura delle proteine della famiglia IAP.**

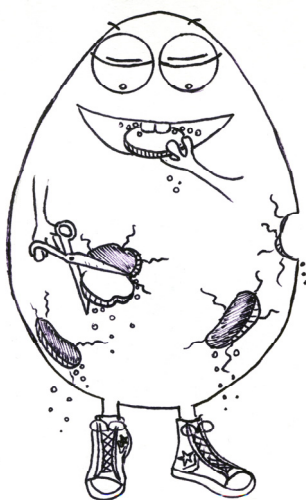
Caratteristica distintiva di tutte le proteine IAP è la presenza di almeno un dominio BIR (rettangolo viola). Survivina, Livina, Ts-IAP e BRUCE ne contengono uno mentre XIAP, IAP1, IAP2 e NAIP sono contraddistinte dalla ripetizione in tandem di domini BIR. Oltre alle regioni BIR, diverse IAP contengono un dominio RING-finger all'estremo C-terminale (l'esagono verde) mentre le IAP1/2 sono in possesso di un

dominio CARD (indicato dal riquadro giallo) nella regione di collegamento tra i domini BIR ed il dominio RING. NAIP mostra un dominio di legame ai nucleotidi (le strisce nere) così come una regione ricca in ripetizioni di leucina (ovali azzurri). In BRUCE è presente un dominio di coniugazione all'ubiquitina (cerchio rosso) (*modificato da Hunter AM et al., 2007*).

Un breve elenco di potenziali metodi di terapia anti-apoptotica comprende la stimolazione delle proteine della famiglia IAP, l'inibizione delle caspasi e della PARP (poli [ADP-ribosio] polimerasi), la stimolazione del percorso PKB/Akt e l'inibizione delle proteine Bcl-2. Altri studi condotti in modelli animali transgenici di ischemia cardiaca e ischemia cerebrale indicano che, inibendo l'espressione e/o la funzione di Bax si può impedire il rilascio del citocromo-*c* dai mitocondri, bloccando la diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale e proteggendo così le cellule dalla morte per apoptosi [127, 128]. I potenziali trattamenti terapeutici con le molecole sopra citate rappresentano solo alcuni degli sforzi di ricerca passati e presenti in questo campo. A seguito dei continui chiarimenti sulla complessità molecolare e biochimica del processo apoptotico, nuove e migliori strategie terapeutiche saranno messe a punto.

### Riassunto.

**44** *L'apoptosi è considerata come un processo energia-dipendente ben regolato, con specifiche caratteristiche morfologiche e biochimiche tra le quali l'attivazione delle caspasi risulta importante. Sebbene molte delle proteine chiave attivate nei percorsi apoptotici siano state identificate, i meccanismi molecolari di azione o la modalità di attivazione di queste proteine non sono pienamente compresi e tuttora al centro della ricerca scientifica. La comprensione del meccanismo di apoptosi è importante, essendo la morte cellulare programmata un elemento coinvolto sia nella salute che nelle patologie poichè avviato da vari stimoli fisiologici e patologici. Inoltre, l'ampia partecipazione dei percorsi apoptotici nella fisiopatologia di una malattia si può prestare ad un intervento terapeutico in diversi punti di controllo.*



### Autofagia: cos'è?

**45** L'omeostasi cellulare eucariotica è mantenuta da un bilancio finemente regolato tra sintesi e degradazione dei componenti cellulari. Per quanto riguarda le proteine esse sono dinamicamente sintetizzate e degradate. Circa 200 g di proteine sono eliminate nel nostro organismo ogni giorno, una quantità significativamente più grande di quella assunta attraverso la dieta (circa 60-80g) e che sottolinea l'importanza fisiologica di questo processo. Esistono potenti meccanismi omeostatici di natura

idrolitica che operano nella cellula e che possono essere approssimativamente suddivisi in due gruppi: **selettivi e non selettivi**.

Il primo gruppo comprende l'attività del **complesso Ubiquitina-Proteasoma** con l'intervento della calpaina, presenti nel citoplasma, mentre il secondo gruppo coinvolge i **lisosomi** [129]. La maggior parte delle proteine e degli organelli citoplasmatici sono degradati all'interno del compartimento lisosomiale. A tal proposito esistono tre differenti percorsi di degradazione:

1. **Percorso di degradazione dal Citosol al Vacuolo** (nome dato ai lisosomi nei lieviti) o percorso **CVT** [130].
2. **Percorso di Degradazione ad importo Vacuolare (VID)** [131]
3. **AUTOFAGIA** [132].

L'autofagia è un processo catabolico altamente conservato negli eucarioti superiori, ATP-dipendente, essenziale per l'omeostasi e la vitalità cellulare in quanto risulta coinvolta

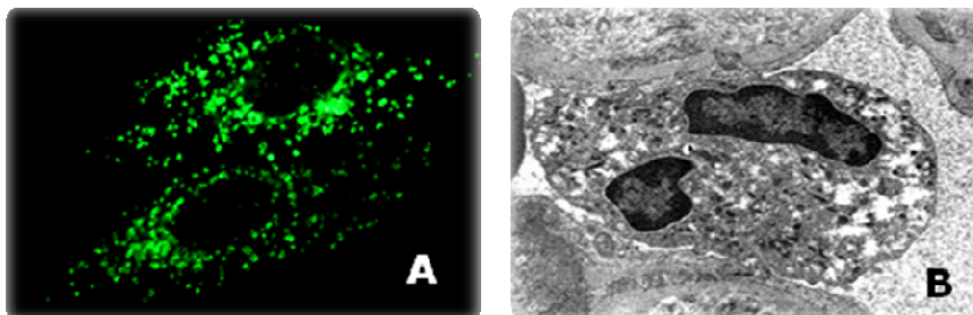
- nel rimodellamento durante lo sviluppo e il differenziamento cellulare [133];
- nella degradazione delle proteine intracellulari [134];
- nella produzione di aminoacidi quando si presenta un calo di nutrienti;
- nel meccanismo di ricambio di citomembrane e di organuli come i mitocondri e i perossisomi [135];
- nel controllo del meccanismo di morte cellulare programmata non-apoptotica [136].

L'autofagia è regolata dalla famiglia di **Geni correlati all'Autofagia (ATG)** che codificano per proteine Atg necessarie all'induzione dell'autofagia nonché alla generazione, maturazione e riciclo degli autofagolisosomi. Queste sono vescicole citoplasmatiche con una doppia membrana circondante un carico. In seguito, gli autofagosomi si fondono con i lisosomi per formare gli autofagolisosomi in cui le idrolasi lisosomiali digeriscono il carico; i metaboliti ottenuti sono restituiti al citosol per essere riciclati [137].

### I lisosomi.

**46**

I lisosomi possono essere considerati l'apparato digerente della cellula eucariotica (figura 2.5). Questi organelli vescicolari intracellulari sono delimitati da una sola membrana e spesso contengono materiale di deposito visibile attraverso tecniche di microscopia elettronica.



**Figura 2.5.** Lisosomi evidenziati in due cellule mediante analisi al microscopio a fluorescenza dopo marcatura con una proteina che localizza

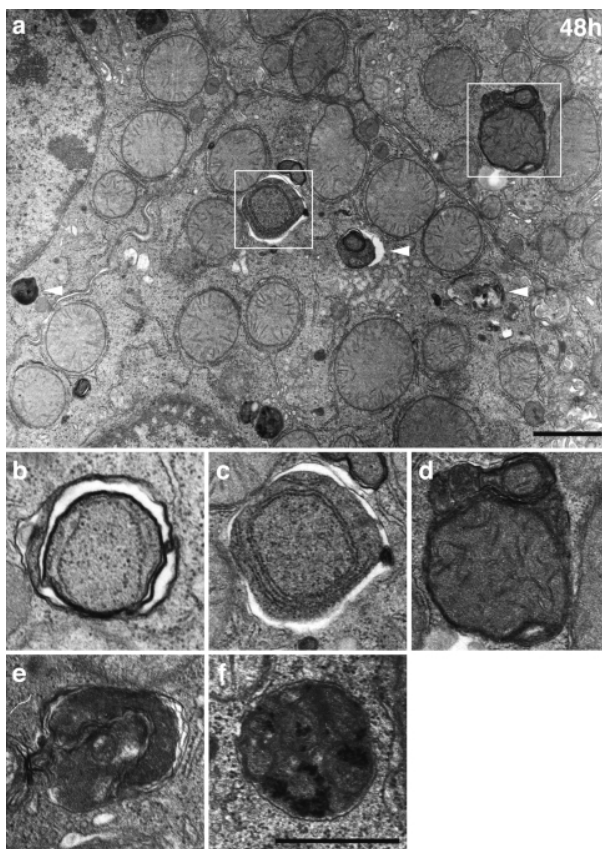
**specificatamente in questi organelli. A)** È evidente, al centro, l'esclusione nucleare dovuta alla distribuzione esclusivamente citoplasmatica dei lisosomi (*per gentile concessione della Prof.ssa Maria Vittoria Schiaffino, DIBIT*). **B)** Macrofago tra i setti alveolari con granuli di materiale elettron-denso all'interno dei lisosomi (*analisi al Microscopio elettronico a Trasmissione, T.E.M. X14500*).

Per lo più localizzati a livello perinucleare, le loro caratteristiche principali sono:

- un ambiente intravesicolare acido (pH attorno a 3.5-5).
- la presenza di enzimi con attività ottimale a pH acido. La principale classe di enzimi contenuti in questi organelli sono le **idrolasi lisosomiali**, in grado di rompere un legame covalente utilizzando una molecola di acqua. Questi enzimi sono coinvolti nella degradazione delle glicoproteine e dei glicolipidi.

I lisosomi costituiscono una popolazione eterogenea di vescicole, sia per le dimensioni che per il contenuto, caratterizzata da un flusso che tende verso i lisosomi maturi (detti anche lisosomi secondari), senza discontinuità di componenti e di gradiente di pH. Grazie a queste caratteristiche essi rappresentano un comparto molto dinamico. Questi organelli sono coinvolti in più processi che vanno dalla degradazione di molecole esterne alla cellula, internalizzate attraverso l'endocitosi di recettori cellulari di superficie riconosciuti da un ligando (endosomi primari), alla eterofagocitosi di

materiale extracellulare di varie dimensioni (come cellule morte e batteri, con produzioni di eterofagosomi) senza dimenticare la degradazione di componenti cellulari ormai senescenti e l'autodigestione della cellula stessa (autofagosomi) (figura 2.6).



**Figura 2.6. Autofagosomi in epatociti di ratto.** Come dimostrato dalla microscopia elettronica, gli autofagosomi sono indotti a formarsi in epatociti di topi adulti dopo privazione di nutrienti per 48 ore, mentre è piuttosto difficile osservare autofagosomi negli epatociti in normali condizioni fisiologiche. Tipicamente, gli autofagosomi rilevati con microscopia elettronica negli epatociti sono relativamente piccoli (<0,5  $\mu\text{m}$  di diametro) e spesso appaiono nei pressi dei canalicoli biliari (punte di freccia, a). Gli autofagosomi nascenti avvolti dalla membrana di isolamento ER-

simile possiedono una parte del citoplasma (b). Organelli come mitocondri e perossisomi si trovano raramente all'interno 24 ore dopo l'inizio della deprivazione da nutrienti mentre autofagosomi relativamente grandi (circa 1 a 1,5  $\mu\text{m}$  di

diametro), che contengono ER ruvido e mitocondri, compaiono negli epatociti dopo 48 ore (c). Avvenuta la fusione con i lisosomi, si possono notare vescicole con organuli e materiale citoplasmatico in vari stadi di degradazione (e-f). Le barre indicano 1 e 0,5  $\mu\text{m}$  rispettivamente in b ed f (da Uchiyama Y et al, 2008).

I lisosomi non sono solo depositi di rifiuti ottenuti dalla degradazione dei prodotti idrolizzati, una volta completata la loro attività, poichè parte delle molecole vengono riciclate e trasportate ai compartimenti dove sono necessarie per la sintesi di nuovi prodotti. Alcune cellule sono particolarmente ricche di questi organelli per motivi funzionali, come ad esempio i macrofagi, in cui la fagocitosi rappresenta una delle funzioni principali. Gli endosomi primari, gli eterofagosomi e gli autofagosomi, una volta fusi con i lisosomi o vescicole di trasporto del **Network Trans-Golgi (TNG)** si tramutano rispettivamente in endolisosomi, eterofagolisosomi e autofagolisosomi, ricevendo le idrolasi lisosomiali indispensabili per l'attività catalitica di degradazione.

### Tipologie di autofagia.

**47** Le vie autofagiche meglio caratterizzate sono l'**Autofagia Chaperone-Mediata, la macroautofagia e la microautofagia**. Questi percorsi si differenziano per la loro regolazione, il tipo di materiale da degradare e il modo in cui questo materiale viene trasportato all'interno del lume lisosomiale [138].

**48** **Autofagia chaperone-mediata**. Molti tipi di cellule possono degradare proteine citosoliche attraverso la forma di **Autofagia Chaperone-Mediata (CMA)**. Fatto distintivo della CMA è la sua selettività per un particolare gruppo di proteine citoplasmatiche e per il fatto che, questi substrati, sono direttamente traslocati attraverso la membrana lisosomiale senza richiedere la formazione di vacuoli o la deformazione di membrane.

Tutti i substrati della CMA contengono una sequenza biochimicamente legata al pentapeptide KFERQ; il motivo è riconosciuto da chaperones molecolari, tra le quali **proteina heat-shock di 70 kDa (hsc70)**. Il complesso chaperone-proteina così ottenuto si lega sulla membrana lisosomiale interagendo con i **recettori LAMP 1 e 2 (famiglia di proteine transmembrana endo/lisosomiale fortemente glicosilate)** [139]. LAMP-2a media il trasporto all'interno dell'organulo assistito dalla hsc70 lisosomiale (lys-hsc70). I livelli di LAMP-2a, in parte regolati da variazioni della sua degradazione, possono essere importanti nella modulazione della CMA [138].

Il carattere selettivo della CMA fa sì che, questa forma di autofagia, sia attivata quando la discriminazione tra le proteine da degradare è importante. Durante condizioni di stress, come per esempio la mancanza di nutrienti, l'attività della CMA aumenta dopo che la macroautofagia, anch'essa attivata, comincia a calare [140]. Questa attivazione sequenziale prima di una via autofagica non-selettiva poi di quella selettiva può essere

finalizzata ad evitare la degradazione di componenti cellulari essenziali in caso di un digiuno prolungato [141] (figura 2.7).

**49** *Microautofagia.* La microautofagia è coinvolta nell'inglobamento e degradazione di regioni complete di citosol, incluse proteine e organuli citoplasmatici, direttamente da parte dei lisosomi, senza richiedere la formazione di vacuoli autofagici intermedi [142]. Il lisosoma, infatti, per invaginamento o protusione, avvolge il citoplasma e in seguito si chiude a formare una vescicola interna che contiene il materiale da degradare [143]. La microautofagia è stata tradizionalmente considerata come una forma di autofagia attiva per garantire il turnover delle proteine a lunga vita in condizioni basali ma, studi recenti [142], la ritengono in parte responsabile della degradazione dei perossisomi (figura 2.7).

**50** *La macroautofagia: meccanismi molecolari e aspetti morfologici.* È la principale forma di autofagia responsabile, in condizioni di stress, sia della degradazione di proteine solubili a lunga vita che di organuli [144]. Comporta la formazione di vacuoli a doppia membrana che sequestrano porzioni di citoplasma e le trasportano ai lisosomi [145].

Una struttura detta **membrana di isolamento** o **Struttura Pre-Autofagosoma (PAS)**, inizialmente, avvolge una porzione di citoplasma che poi, chiudendosi, forma un vacuolo delimitato da una o più membrane e chiamato **autofagosoma** [146]. Numerose membrane sono state proposte per essere coinvolte nell'origine di questo vacuolo, in particolare le membrane del reticolo endoplasmatico (ER) e le cisterne del Golgi. Benché una parte dei vacuoli autofagici iniziali contenga delle proteine reticolari, una restante parte di essi è di diversa origine. Sono state proposte due teorie:

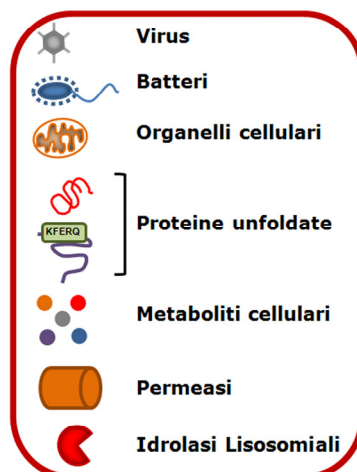
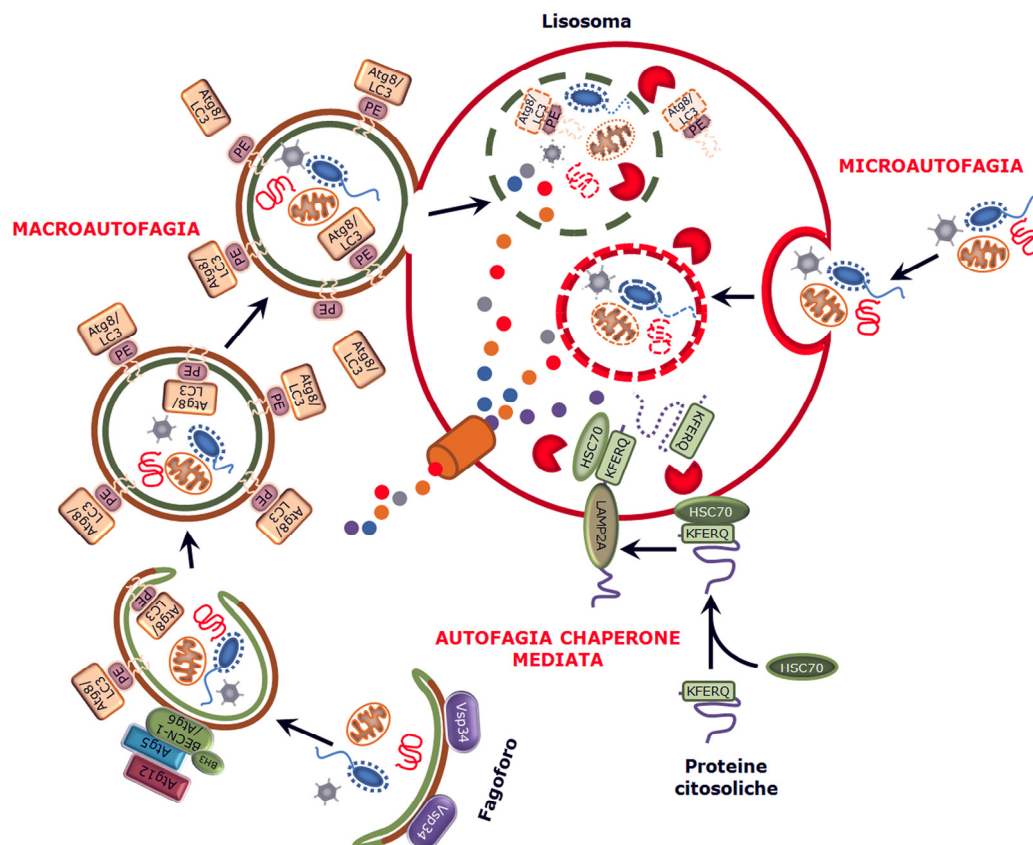
1. L'origine delle membrane coinvolte nella formazione degli autofagosomi avverrebbe da una piccola struttura precursore a forma di coppa e ricca in **Fosfatidilinositol-3-Fosfato (PI(3)P)** conosciuta come **omegasoma** (dalla forma simile alla lettera greca), dinamicamente collegato all'ER; recenti analisi di tomografia ad elettroni avrebbero dimostrato un collegamento diretto tra il reticolo e la nascita della vescicola [147].
2. Gli autofagosomi possono avere origine da una struttura membranosa condensata pre-esistente denominata **fagoforo**, posizionata nel citosol e ricca di materiale osmolipidico. Nella maturazione del fagoforo ad autofagosoma, questo acquisirebbe proteine della membrana lisosomiale, come LGP10 e la pompa protonica ATPasica responsabile dell'acidificazione del vacuolo.

Sono stati identificati come **amfisomi**, i vacuoli autofagici successivi agli autofagosomi iniziali. L'amfisoma è una struttura capace di ricevere materiale proveniente sia dal processo d'endocitosi che da quello autofagico. In un terzo passaggio, l'amfisoma si fonde con i lisosomi. La fusione porta il materiale autofagocitato in contatto con gli enzimi lisosomiali, causandone la degradazione. Il volume del vacuolo si riduce e l'aspetto finale è quello di una struttura elettrondensa composta da materiale amorfo; in questa fase il



vacuolo viene definito **corpo denso**. Una volta degradate, le sostanze molecolari semplici contenute nel corpo denso sono riassorbite e utilizzate dalle cellule o messe a disposizione dell'organismo. Il materiale non digerito viene di solito eliminato tramite esocitosi, oppure rimane all'interno del corpo denso andando ad acquisire, con il tempo, le caratteristiche biochimiche dei pigmenti da usura o **lipofuscine** [148] (figura 2.7).

Il termine generico autofagia è spesso sinonimo di macroautofagia, per questo, d'ora in avanti, verranno utilizzati i due termini in maniera indifferente.



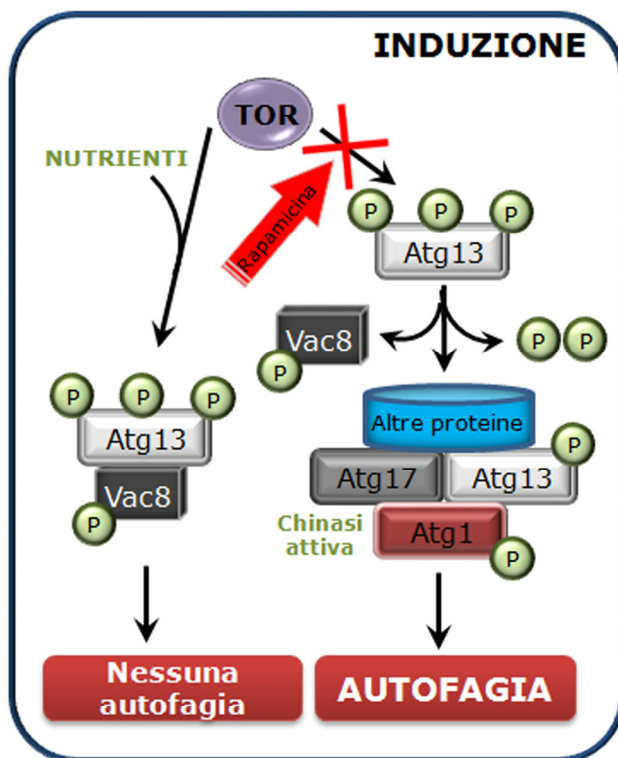
**Figura 2.7. I tre diversi percorsi autofagici descritti nel testo: Macroautofagia, Microautofagia e Autofagia Chaperone-Mediata.** A seconda della specificità dei carichi, l'autofagia può essere un processo selettivo o non selettivo. Durante l'autofagia non selettiva una porzione del citoplasma è sequestrato assieme al materiale da degradare all'interno della doppia membrana di un autofagosoma che fonde con un vacuolo (nel caso dei lieviti per il CVT) o con un lisosoma. Esiste anche un degrado specifico di determinati organuli, come i perossisomi e i mitocondri, sempre attraverso modalità macroautofagiche.

### Formazione dell'autofagosoma.

**51** I processi autofagici sono eventi dinamici che si è deciso di suddividere nelle seguenti fasi discrete:

1. induzione,
2. formazione di vescicole di nucleazione;
3. ampliamento e completamento della vescicola;
4. recupero;
5. maturazione e fusione della vescicola con il lisosoma/vacuolo;
6. acidificazione, degrado ed efflusso lisosomiale.

**52** **Induzione.** In cellule di mammifero, quando la proteina **Target della Rapamicina (TOR)** è inibita dalla deprivazione di nutrienti, si verifica la defosforilazione di Atg13 il quale si associa agli omologhi di mammifero di Atg1, ossia le **Chinasi-1 e -2 Simile a Unc-51 (ULK-1 e -2)**.



#### LIEVITO

- Atg1p
- Atg13p
- Atg 17p
- Altre proteine

#### UOMO

- ULK-1,2 Chinasi
  - ATG13
  - RB1CC1
  - ATG101
- Regolatori

Questo consente il reclutamento della **Proteina Interagente con la famiglia di Chinasi delle Adesioni Focali da 200 kDa (FIP200)**, ortologo nel lievito di Atg17. Il complesso **ULK:Atg13:FIP200** partecipa all'allungamento della membrana di isolamento e la progressione verso l'autofagosoma [149, 150] (figura 2.8).

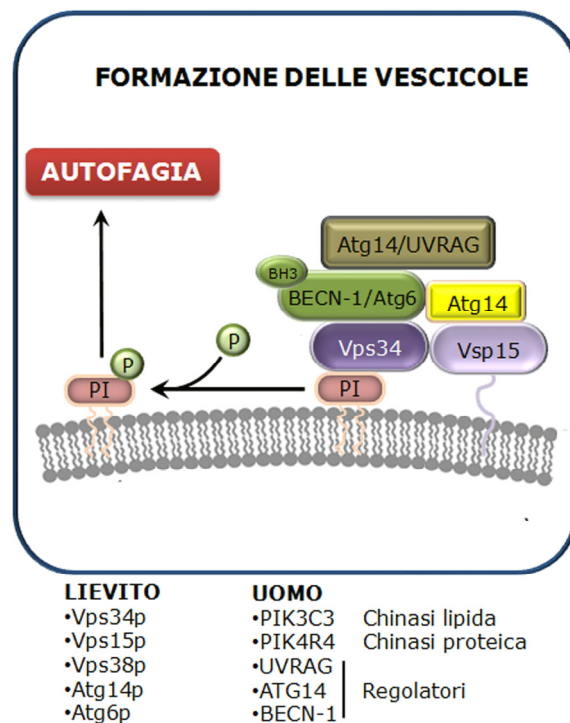
**Figura 2.8. INDUZIONE.** Proteina chiave dell'induzione è Atg1, una serin/treonina chinasi che forma complessi proteici con differenti proteine regolatorie che controllano lo switch tra il pathway autofagico e il CVT. La composizione di questi complessi è dinamica e varia in base alle condizioni nutrizionali. In normali stati nutrizionali, Atg13 è iperfosforilata e questo blocca la sua associazione con Atg1. Vac8, è una fosfoproteina che agisce durante il CVT e, facilitando la fosforilazione di Atg13, inibisce l'attivazione dell'autofagia. Atg1 interagisce anche con altre due proteine. Una di queste

è Cvt9, con la quale complessa in una struttura altamente ordinata in normali condizioni nutrizionali impedendo l'avvio del processo autofagico. L'altra è Atg17, che gioca un ruolo importante nella interazione tra Atg1 e Atg13. In condizioni di scarsità di nutrienti o presenza di rapamicina, Atg13 è parzialmente defosforilata e questo consente l'interazione con Atg1 attraverso Atg17 e il seguente avvio della nucleazione del fagoforo (invece di vescicole del percorso CVT) con l'attivazione dell'autofagia.

**53** **Formazione delle vescicole.** Per questo passaggio è richiesta l'attività di una **Fosfatidilinositolo 3-Chinasi di classe III (PI(3)K)** o Vps34, a sua volta regolata dalla protein chinasi p150 o hVps15 la quale forma, in condizioni normali, un complesso stabile associata alla membrana citoplasmatica che lega Vps34. Il complesso Vps34/hVps15 recluta quindi la Beclina-1 (Atg6 nel lievito) nonché l'omologo, recentemente scoperto nei mammiferi, di Atg14, noto come Atg14L o **Regolatore Chiave Correlato all'Autofagia associato a Beclin-1 (Barkor)**. Il complesso Beclina-1/hVps34 più le componenti accessorie svolge un ruolo di controllo sull'innesco del processo autofagico nella formazione delle PAS (figura 2.9).

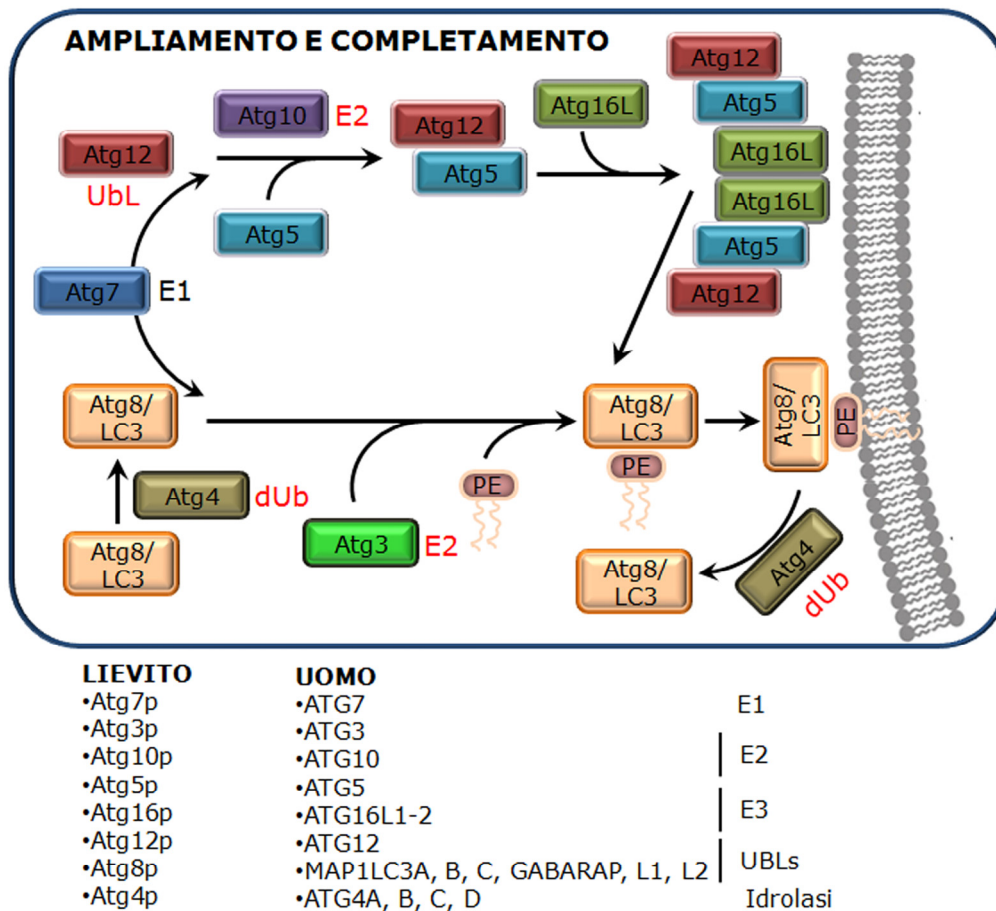
**Figura 2.9. FORMAZIONE DELLE VESCICOLE.**

La nucleazione e l'assemblaggio della membrana di isolamento (o la chiusura del fagoforo che dir si voglia) dipende da un complesso proteico che si compone delle PI(3)K hVps34 (di seguito riportate come hVps34), la sua proteina chinasi regolatoria p150 o hVps15, la Beclina-1 (Atg6 nel lievito) nonché l'omologo di Atg14 noto come Atg14L o Barkor [151, 152]. L'attività di questo complesso è strettamente controllata da regolatori positivi e negativi. L'attività chinastica sui lipidi esercitata da hVps34 si pensa possa creare dei "patches" lipidici di PI(3)P, il prodotto di reazione principale delle PI(3)K i quali possono intervenire nello smistamento delle proteine in vescicole che viaggiano dal Golgi al complesso di endosomi. La Beclina-1 è il primo gene soppressore dei tumori correlato all'autofagia identificato sinora.



**54** **Ampliamento e completamento della vescicola.** Il complesso Beclina-1:hVps34:Atg14L ed altre proteine ATG reclutano il complesso multimerico Atg12-Atg5:Atg16L e la forma di Atg8 (o LC3) coniugata con la **FosfatidilEtanolammia (PE)** [153, 154]. Queste ultime due componenti sono essenziali per consentire l'espansione dell'autofagosoma, agendo in modo sequenziale, e sono il risultato della coniugazione di due sistemi ubiquitina simili.

Quando l'autofagosoma si è formato, il complesso Atg12-Atg5:Atg16L si distacca mentre il pool LC3 associato alla superficie citosolica della vescicola è scissa dal PE dalla proteasi Atg4 e riciclato. La posizione del complesso Atg16L sul fagoforo determina la posizione della reazione di coniugazione dell'LC3 [155] (vedi figura 2.10).



**Figura 2.10. AMPLIAMENTO E COMPLETAMENTO DELLE VESCICOLA.** Atg12, piccola proteina idrofila senza nessuna apparente omologia con l'ubiquitina, può legarsi covalentemente ad un'unica proteina, Atg5, con una modalità di legame simile a quello di ubiquitinazione. Atg12 è, prima attivata in maniera ATP-dipendente da Atg7 (omologa all'enzima attivante l'ubiquitina, E1) e poi coniugata ad Atg5 da Atg10 (omologa all'enzima attivante l'ubiquitina, E2). La formazione del complesso Atg12-Atg5 è un processo costitutivo, indipendente dallo stato nutrizionale o altre condizioni inducenti autofagia. Atg12-Atg5 mostra una distribuzione asimmetrica localizzandosi presso le superfici convesse della membrana in allungo. Esso, inoltre, non è presente nell'autofagosoma maturo poichè si dissocia dalla membrana una volta completato il processo [156]. Il secondo sistema ubiquitina simile essenziale per l'autofagia è il complesso Atg8-PE. Atg8 è una proteina a distribuzione ubiquitaria nelle membrane dei fagofori, autofagosomi e corpi autofagici. **La proteina della Catena Leggera 3 associata ai microtubuli (LC3)**, ortologo nei mammiferi di Atg8, lega le membrane autofagosomiali in un modo Atg5-dipendente rimanendovi anche dopo la dissociazione del complesso Atg12-Atg5 e rappresentando un valido marker di presenza di vescicole autofagiche. In cellule normali, LC3 è rilevabile in due forme: LC3-I (18 kDa) ed LC3-II (16 kDa). Dopo la sintesi del precursore, Atg4 cliva l'estremo C-terminale producendo la forma citosolica di LC3-I. In risposta alla induzione di autofagia, LC3-I è rapidamente convertita in LC3-II quando una molecola di PE si lega in maniera covalente all'estremo C-terminale a seguito reazioni simili ad ubiquitinazioni condotte da hAtg7 e hAtg3 (le quali fungono rispettivamente da enzimi E1- ed E2- simili) e dal complesso Atg12-Atg5: Atg16L (E3-like). La forma lipidata di LC3 è associata con l'esterno e la membrana interna

dell'autofagosoma, mentre LC3 non coniugata è citosolica ed è la forma principale di LC3 presente in condizioni normali [157].

**55** **Recupero.** Si tratta di un processo per il recupero di alcuni componenti del macchinario autofagico, in modo che possano essere riutilizzati. In altri casi, il recupero è fondamentale per riavere componenti che determinano l'identità o la funzione di un compartimento.

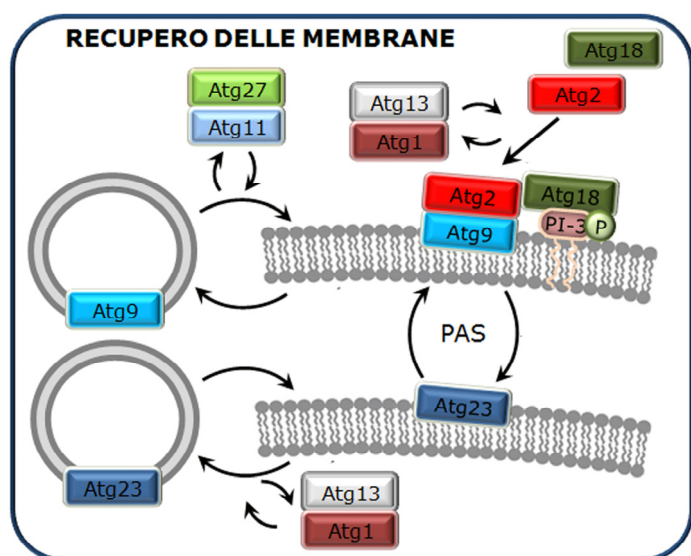
Delle oltre 20 proteine con ruoli diretti nel percorso autofagico o CVT, solo due sono note per rimanere associate all'autofagosoma o le vescicole CVT, ossia Atg8-PE ed Atg19. La maggior parte delle proteine Atg sono solubili e possono abbandonare la vescicola espletata la loro funzione, a qualunque stadio essa si trovi. Tuttavia Atg9, pur essendo una proteina trans membrana, non sembra essere parte del autofagosoma completato [158]. Di conseguenza deve esistere qualche meccanismo per il riciclaggio di questa proteina dal PAS. In modo simile si comporta Atg23, nel caso del percorso CVT (figura 2.11).

**Figura 2.11. RECUPERO.** Il riciclaggio di Atg9 e Atg23 dal PAS richiede l'intervento di Atg18, Atg1, Atg2 e PI(3)P. Solo per il recupero di Atg23 sono necessari alti livelli di attività chinasi dell'Atg1 che dunque si dimostra cruciale per la via CVT piuttosto che per l'autofagia. In condizioni normali, Atg9L1 si sposta tra il TGN e gli endosomi tardivi; in lievito, Atg2 interagisce fisicamente con Atg9 e questo pare indispensabile per la formazione di autofagosomi. La localizzazione di Atg2 nelle PAS

richiede l'attività di più proteine, come Atg1 e Atg9, ma è l'attività chinasi di Atg1 ad essere essenziale per questo posizionamento [159]. In risposta alla deprivazione di nutrienti, Atg9L1 si localizza in un pool periferico dove co-localizza con la proteina LC3 e rab7: la localizzazione e gli spostamenti di Atg9L1 paiono dipendere anche dalla **Proteina Chinasi 38 Attivata da Mitogeni (p38 MAPK)** e la proteina ad essa legata, p38IP [160].

**56** **Maturazione della vescicola.** Dopo la loro formazione, gli autofagosomi possono unirsi a scomparti endocitici (endosomi tardivi o precoci o **Corpi Multi Vescicolari (MVB)** prima di fondersi con il comparto lisosomiale.

L'ultima fase dell'autofagia dipende perciò da molecole che regolano la maturazione degli autofagosomi, compresa la loro fusione con endosomi e



#### LIEVITO

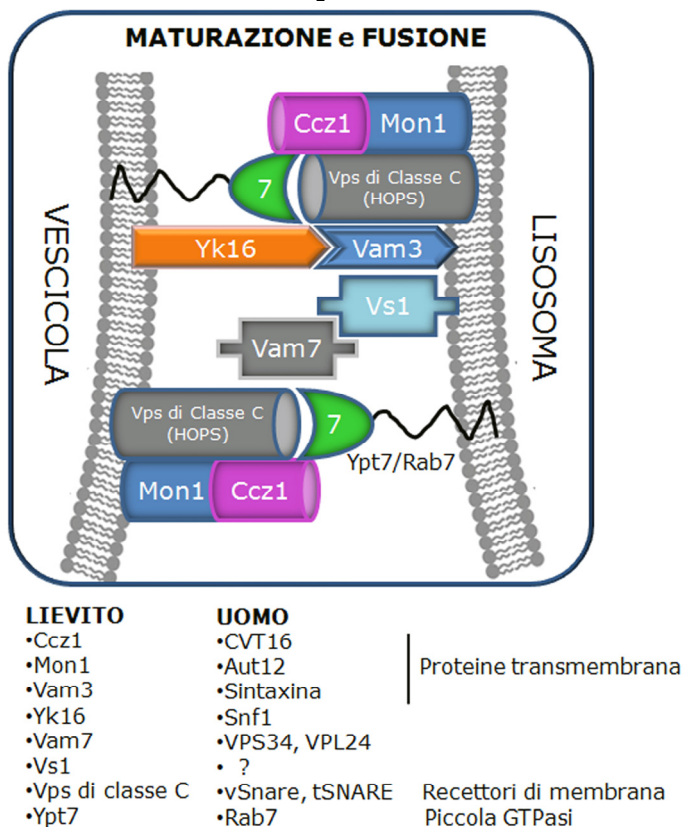
- Atg9p
- Atg2p
- Atg18p
- Atg21p
- Atg11p
- Atg23p
- Atg27p

#### UOMO

- ATG9A, B Proteina transmembrana
- ATG2A, B ?
- WIPI1 WD40
- ? ?
- RB1CC1? Dominio di regolazione di Atg11p
- ? ?
- ? ?

lisosomi, nonché l'acidificazione degli scomparti autofagici e il riciclaggio dei metaboliti dal compartimento lisosomiale. Questi passaggi sono di fondamentale importanza per il flusso di materiale attraverso la via autofagica. Ogni blocco nella maturazione degli autofagosomi, nella fusione con il compartimento lisosomiale o la compromissione della sua funzione porterebbe ad un accumulo di vescicole che, inevitabilmente, rallenterebbero o interromperebbero il flusso autofagico [161, 162]

**57** **Fusione.** I tempi di fusione delle vescicole con i lisosomi/vacuoli necessita di attenta regolazione poiché, se il processo di fusione ha inizio prima del completamento della vescicola, il carico rimarrà nel citosol. Il rivestimento putativo composto da Atg12-Atg5/Atg16 potrebbe impedire la fusione prematura così come la presenza di Atg8-PE, localizzato sulla superficie esterna della vescicola autofagosomiale. Almeno nel lievito, Atg8-PE viene rimosso prima della fusione, a seguito di un secondo clivaggio operato da Atg4. L'Atg8 liberato può essere riutilizzato (figura 2.12).



**Figura 2.12. MATURAZIONE e FUSIONE.** Vam3, Vam7, Vti1 e Ykt6, Vps di classe C sono membri della famiglia SNARE, proteine che intervengono nella fusione delle membrane plasmatiche in un'ampia varietà di contesti cellulari. Ypt7 è invece un membro della famiglia Rab di piccole GTPasi. In aggiunta, le proteine SNF, i membri Vps di classe C/complesso HOPS e due proteine di recente individuazione, Ccz1 e MON1, hanno altresì dimostrato di svolgere un ruolo nel processo di fusione [163].

Studi di genetica molecolare hanno indicato che i macchinari proteici necessari

per la fusione di una vescicola trasportatrice omotipica sono necessari anche per la fusione degli autofagosomi e le vescicole CVT con i lisosomi. Questo macchinario comprende i **Recettori solubili per l'Adesione Sensibili alla N-Etilmalemide (SNARE)**. Le SNARE sono coinvolte nei processi di trasporto vescicolare e possono essere divise in due categorie: **v-SNARE**, incorporate nelle membrane delle vescicole di trasporto durante il processo di formazione, e **t-SNARE**, situate nella membrana del compartimento bersaglio. Nei mammiferi, la t-SNARE Vti1b, sembra essere coinvolta in una fase avanzata del processo autofagico, in quanto la maturazione dei

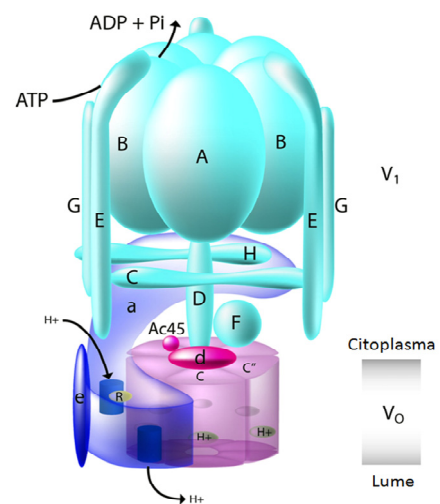
vacuoli autofagici è in ritardo negli epatociti isolati da topi in cui Vti1b è stato eliminato [164]. VAMP3 e VAMP7, due v-SNARE, controllano invece la fusione tra autofagosomi e MVBs e la fusione di amfiosomi con lisosomi, rispettivamente.

**58** *L'acidificazione e il degrado.* Le ATPasi, una classe di enzimi che catalizza la decomposizione di ATP in ADP e ione fosfato libero, rilasciando energia che l'enzima sfrutta per guidare altre reazioni, sono importanti elementi del percorso autofagico. Due sono le classi di ATPasi importanti in tale contesto:

1. Le ATPasi vacuolari (v-ATPasi), proteine multi-subunità altamente conservate, in grado di acidificare una vasta gamma di organelli intracellulari agendo come pompa protonica transmembrana. Le v-ATPasi accoppiano l'energia di idrolisi dell'ATP per trasportare protoni attraverso le membrane intracellulari di specifici organelli delle cellule eucariotiche.
2. Le ATPasi associate a varie proteine con attività cellulare (ATPasi AAA), una famiglia di proteine implicate in funzioni cellulari diverse (fusione di membrane, degradazione di proteine e replicazione del DNA) e con motivi strutturali altamente conservati. Questi includono sequenze importanti per l'attività ATPasica e altri due motivi che non contribuiscono direttamente all'attività ATPasica ma costituiscono il dominio AAA [165] (figura 2.13).

Il **Fattore Sensibile all'N-etilmaleimide (NSF)** è una ATPasi AAA che si lega ai complessi SNARE e utilizza l'idrolisi dell'ATP per disassemblarli, facilitando così il loro riciclaggio. Non è noto se l'attività ATPasica delle NSF abbia un ruolo in una o più fasi successive del processo autofagico in cellule di mammifero. L'attività di NSF è attenuata durante la deprivazione di nutrienti, fornendo una possibile spiegazione per la lenta fusione tra autofagosomi e lisosomi osservata nell'autofagia indotta per fame [166].

**59** *Degrado ed efflusso lisosomiale.* In virtù della degradazione all'interno dei lisosomi, l'autofagia contribuisce a regolare il metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine. Difetti di acidificazione nel



**Figura 2.13 Complesso V-ATPasi.** Un complesso V-ATPasi funzionale consiste in due subunità: V<sub>0</sub> (subunità associata alla membrana) e V<sub>1</sub> (subunità periferica).

La V<sub>1</sub> comprende 8 subunità, A-H, con tre copie della subunità catalitiche A e B e le subunità D e F che formano l'asse centrale del rotore. Il dominio V<sub>0</sub> contiene 6 subunità differenti, a, d, c, c', c'' ed e, ed è responsabile per l'idrolisi dell'ATP, mentre il dominio V<sub>1</sub> si occupa della traslocazione protonica.

comparto endo/lisosomiale, nel trasporto o nell'espressione di enzimi lisosomiali possono indurre un blocco dell'autofagia caratterizzato da un accumulo di vacuoli autofagici [167]. La fase finale dell'autofagia riguarda l'efflusso di metaboliti generati dalla degradazione lisosomiale nel citosol. Atg22 è stato recentemente identificato come una permeasi che ricicla gli aminoacidi dal vacuolo in *S. cerevisiae*.

### Regolazione citoplasmatica e nucleare dell'autofagia nei mammiferi.

**60** Di notevole importanza risultano sia le vie di segnalazione (tabella 2.3) che il ruolo svolto da fattori di trascrizione nella regolazione dell'espressione dei geni coinvolti nel controllo dell'autofagia. Tra questi ultimi ricordiamo:

- l'attivazione della **Chinasi c-Jun N-terminale (JNK)** e l'aumento di fosforilazione di c-Jun, il quale controllerebbe la trascrizione di *Becn1* (nomenclatura adottata per indicare il gene codificante la Beclina-1) e dunque l'induzione della morte autofagica [168];
- la presenza di un sito di legame conservato di NF- $\kappa$ B nel promotore del gene murino e umano che codifica per la Beclina-1;
- la famiglia di **fattori di trascrizione FOXO (Proteine Forkhead box)**, regolati dalla fosforilazione di Akt in risposta a fattori di crescita o stimolazione insulinica. Quando Akt è repressa, le proteine FOXO traslocano nel nucleo, si legano al DNA e attivano l'espressione di più geni autofagici tra cui *Atg12*, *Becn1*, *Atg4b*, *Ulk1*, *Pik3c3* (dove *Pik3c3* è la nomenclatura adottata per il gene che codifica *hVps34*) [169] e, quindi, incrementano il processo autofagico.

**TABELLA 2.3** Regolazione citoplasmatica dell'autofagia

Molecole	Effetti
mTORC1 e mTORC2	L'induzione di autofagia a seguito dell'inibizione di TOR è una risposta conservata in condizioni di deprivazione di nutrienti dal lievito ai mammiferi [167]. Il percorso coinvolge due complessi funzionali di mTOR: mTORC1 e mTORC2. mTORC1 è incorporato nel complesso ULK1:Atg13:FIP200 tramite ULK1 in un modo dipendente dallo stato nutrizionale. In condizioni di digiuno o in risposta al trattamento con rapamicina, mTORC1 si dissocia dal complesso ULK1 attivato, si autofosforila e fosforila anche Atg13 e FIP200, dando inizio al processo autofagico.
Complesso Beclina-1:hVps34	Il trimero Beclina-1:hVps34:hVps15 può interagire con vari partner per controllare la formazione e la maturazione degli autofagosomi. Ulteriori dettagli sul coinvolgimento di tale complesso in autofagia ed altre vie di morte programmata saranno chiariti nei capitoli successivi.
Recettore (IP3).	Il recettore dell'Inositolo 3-Fosfato (IP3) è noto per essere collocato nelle membrane del reticolo endoplasmatico così come nei siti di contatto tra reticolo e mitocondrio; il suo blocco, sia a livello mitocondriale che del reticolo endoplasmatico, innesca il processo autofagico.



**RIASSUNTO.**

**61** *L'autofagia rappresenta il maggior percorso di degradazione di proteine e organelli citoplasmatici in cellule eucariotiche. Numerosi stimoli intra- ed extra-cellulari (quali deprivazione di nutrienti ed invasioni di microorganismi) sono in grado di indurre una risposta autofagica nelle cellule.*

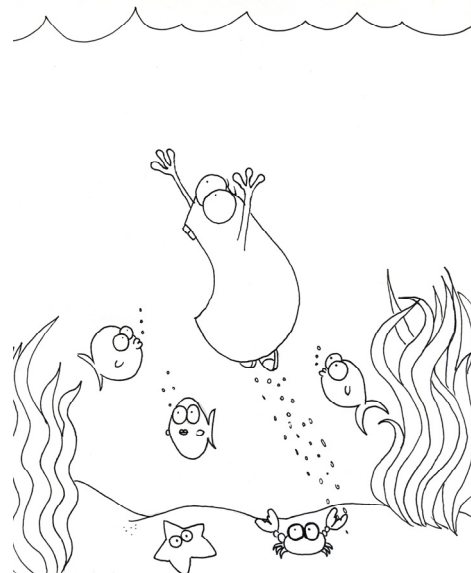
*Tra i vari percorsi autofagici, la macroautofagia è una via di degradazione che termina nel comparto lisosomiale ed è di fondamentale importanza per l'omeostasi dei tessuti. Alla luce dei recenti progressi sulla comprensione della formazione degli autofagosomi, vescicole a doppia membrana che sequestrano carichi citoplasmatici per consegnarli ai lisosomi, i passaggi della via autofagica risultano più chiari nei dettagli molecolari. La scoperta di geni associati all'autofagia (ATG) ha notevolmente aumentato le conoscenze sia sul meccanismo responsabile della formazione di vescicole autofagosomiali che la comprensione degli aspetti molecolari di maturazione e fusione con i lisosomi.*

*Nella maggior parte dei casi, il passaggio finale è preceduto da una fase di maturazione durante la quale l'autofagosoma interagisce con il percorso endocitico. Infine, la regolamentazione del percorso autofagico è ora meglio compresa grazie alla scoperta che l'attività dei complessi Atg viene gestita sia da protein-chinasi che da una regolazione nucleare, attraverso fattori di trascrizione che promuovono l'espressione di specifici geni autofagici.*

**Introduzione all'Anoikis.**

**62** L'anoikis è la morte cellulare programmata che si verifica in seguito al distacco di cellule dalla **Matrice Extra Cellulare (ECM)**. L'anoikis, dovuta ad un'interruzione tra le interazioni integrina-ligando, è un meccanismo fondamentale nel prevenire la crescita o l'attaccamento delle cellule ad una superficie inappropriata ed è quindi essenziale per mantenere l'organizzazione dei tessuti. La mancanza di legami con le integrine porta ad una diminuzione delle chinasi di adesione focale e della loro attività chinastica che compromette la

trasduzione di specifici segnali a valle. Inoltre, i due principali meccanismi di morte delle cellule coinvolti nell'induzione dell'anoikis sono l'apoptosi e l'autofagia; numerose evidenze suggeriscono un'ampia integrazione



funzionale tra i due eventi di morte così come la cooperazione o l'antagonismo, dipendenti dal contesto e dall'intervento di molecole chiave. Individuare nello specifico il meccanismo della risposta cellulare potrebbe essere di grande rilevanza clinica per identificare gli approcci più efficaci adatti a invertire la resistenza all'anoikis nelle cellule tumorali primarie e, di conseguenza, compromettere la loro capacità di metastatizzare.

### L'anoikis.

**63** “Anoikis” è un termine greco che significa “perdita della casa” intesa come un fenomeno unico di morte cellulare dovuta ad insufficienti interazioni tra cellula e **Matrice ExtraCellulare (ECM)**. Nonostante da molti decenni sia infatti noto come le cellule dei tessuti richiedano specifici collegamenti proteici all'ECM per garantire loro vitalità e sopravvivenza, l'anoikis intesa come meccanismo di morte è stato descritto solo verso i primi anni del 1990. Studi quasi simultanei dei gruppi di Martin Schwartz e Steve Frisch hanno dimostrato come le cellule prive di aggancio all'ECM vanno incontro a morte per apoptosi [170].

Tali studi misero in evidenza come:

- 1) segnali provenienti dall'ECM sono riconosciuti essenziali per impedire attivamente alle cellule di innescare percorsi di morte programmata;
- 2) alcuni fondamentali aspetti della anoikis:
  - in primo luogo, i recettori della famiglia delle integrine sono essenziali per sopprimere l'anoikis;
  - in secondo luogo, l'anoikis è inibita dalla sovra-espressione di Bcl-2, indicando la necessità di un evento di permeabilizzazione della membrana mitocondriale affinché si verifichi;
  - in terzo luogo, non tutti i tipi cellulari sono ugualmente suscettibili ad anoikis. Le cellule epiteliali ed endoteliali sono risultate essere più sensibili dei fibroblasti, quest'ultimi in grado di sopravvivere anche in assenza di ECM, se adeguati fattori di crescita sono presenti nel siero. Inoltre, le cellule epiteliali possono essere commutate in anoikis-insensibili a seguito della presenza di fattori oncogenici che conferiscono alle cellule capacità migratorie.

Questa modalità unica di morte cellulare è stata successivamente riconosciuta come un attore significativo nell'angiogenesi e metastatizzazione di un tumore. Dopo il distacco, le cellule epiteliali e endoteliali vanno incontro ad anoikis, la quale sopprime l'espansione delle cellule trasformate: l'acquisizione di resistenza a questo processo da parte delle cellule tumorali facilita la loro capacità migratoria verso i siti secondari, dove daranno vita a lesioni metastatiche. Durante la progressione metastatica, le cellule sono in una sorta di stato quiescente dovuto alla mancanza di adesione all'ECM e, pertanto, suscettibili di anoikis. Nel corso del processo di anoikis, sia i recettori di morte che la via mitocondriale appaiono attivati [171, 172].

Tuttavia, una sottopopolazione di cellule tumorali può divenire resistente al distacco dall'ECM indotto da stimoli pro-apoptotici e, dopo aver raggiunto il

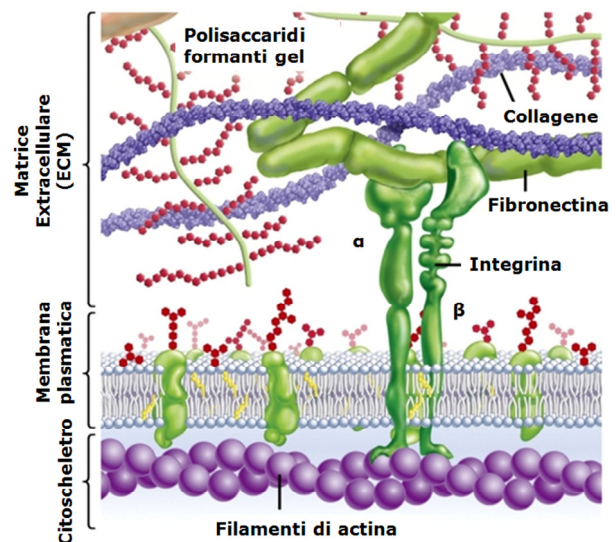
flusso sanguigno, dare vita a lesioni metastatiche in luoghi distanti dal sito primario del tumore.

### Ruolo delle integrine nell'anoikis.

**64** I recettori di adesione ed ancoraggio non solo forniscono un collegamento fisico delle cellule epiteliali e endoteliali all'ECM, ma creano anche una struttura di ancoraggio contenente un ampio numero di proteine adattatrici e di chinasi, il tutto essenziale per la regolazione della proliferazione, sopravvivenza e migrazione cellulare. Il contributo funzionale dato dalle integrine è essenziale per questi processi. Oltre a riconoscere alcuni dei componenti principali dell'ECM, come **fibronectina** e **laminina** [173], la funzione delle integrine è analoga a quella dei **Recettori dei Fattori di Crescita (GFRs)**: possono attivare le stesse vie di segnalazione o collaborano direttamente con i GFRs consentendo alle cellule di rispondere in modo ottimale a citochine solubili (figura 2.14).

La specificità per particolari tipi di ECM avviene attraverso un'ampia gamma di **integrine** espresse sulla superficie delle cellule. Gli esseri umani producono 24 integrine diverse, tutte proteine transmembrana e, anche se alcune sono espresse sulle stesse cellule e possono riconoscere i medesimi componenti dell'ECM, molte svolgono compiti essenziali in tessuti specifici. Oltre ad avere un ruolo primario nell'interazione tra cellule ed ECM, le integrine sono funzionalmente coinvolte nel determinare una risposta angiogenica del tumore durante la progressione del cancro a malattia metastatica [174, 175]. Quali percorsi regolano l'anoikis dipende dal tipo di cellula con specifiche integrine che attivano distinte cascate di segnalazione. Le integrine possono così attivare:

- la via di segnalazione della PI(3)K,
- il classico percorso di ERK,
- il percorso delle MAP chinasi attivate da stress [176].



**Figura 2.14. Integrine e connessioni vitali.** Le integrine sono eterodimeri proteici transmembrana costituiti da due subunità,  $\alpha$  e  $\beta$ . Il loro compito principale è quello di collegare i filamenti di actina del citoscheletro con la matrice extracellulare, agendo da struttura di supporto. Questo contatto è indiretto poiché, sia nell'ambiente intracellulare che extra-cellulare, intervengono ulteriori molecole-ponte come Talina (che lega le integrine  $\beta$ ), paxillina e vinculina (connesse alle  $\alpha$ -actinine).

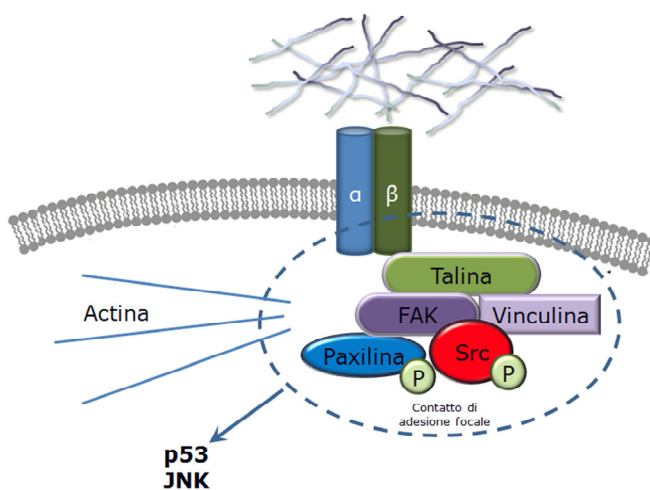
Questi percorsi possono essere intrapresi in modi specifici da integrine diverse e servono per regolare la proliferazione cellulare, la migrazione e l'anoikis indotta da apoptosi nelle cellule.

**65**

**Associazione tra Integrine e FAK.** Alcune integrine sono in grado di reclutare la **Chinasi di Adesione Focale pp125 (pp125FAK)**, una chinasi non recettoriale attivata in risposta all'adesione [177]. pp125FAK interagisce con un ampio range di molecole di segnalazione e proteine adattatrici come Src, PI3-K, paxilina, p130CAS ed è collegata all'attivazione di numerosi percorsi di segnalazione che controllano migrazione, proliferazione ed apoptosi.

Le FAK regolano le vie di segnalazione attivate da PI(3)K, MAPK, piccole GTPasi e altre **tirosin-chinasi non recettoriali** quali quelle della famiglia **Src**, che possono influenzare la sopravvivenza cellulare.

Un altro collegamento funzionale tra recettori FAK e la morte è stato stabilito attraverso la capacità di FAK di mediare un segnale di sopravvivenza tramite il legame al dominio chinasi di morte della proteina RIP e inibendo la sua interazione con DISC [178]. Inoltre, recenti evidenze indicano un ruolo critico per RIP nella mediazione dell'anoikis, fungendo da "molecola di scambio" tra la morte mediata da CD95/Fas e la segnalazione di sopravvivenza indotta dal complesso FAK/integrina (figura 2.15).

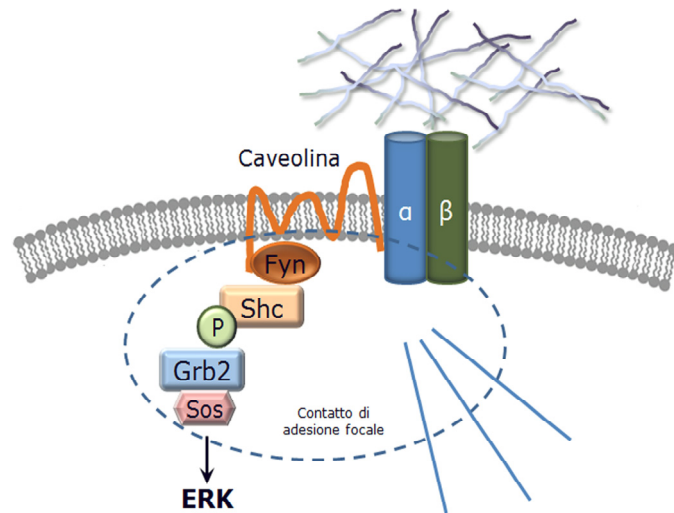


**Figura 2.15. Rappresentazione schematica di alcune delle connessioni molecolari nei complessi di adesione focale coinvolte nella segnalazione di sopravvivenza.**

L'integrità dei complessi di adesione dipende non solo dalle interazioni tra integrine e la sottostante ECM, ma anche sulle connessioni con il citoscheletro. L'attivazione della segnalazione mediata da integrina è, quindi, più complessa di una semplice interazione recettore/ligando. La maggior parte delle interazioni tra le subunità di integrina reclutano

FAK attraverso l'intervento di proteine come la Talina. Talina, vinculina e altre proteine di adesione focale agiscono sia come ponte tra le integrine e il citoscheletro di actina che come impalcatura per il richiamo di molecole di segnalazione, come FAK e paxillina.

**66** *Associazione tra integrine ed Src.* Src è il membro della **Famiglia di chinasi SRC (SKF)** più ampiamente studiato poiché gioca un ruolo significativo durante la progressione del cancro. Più integrine ( $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ), attraverso l'interazione con la caveolina-1, possono reclutare le chinasi Fyn e Yes, membri della famiglia Src, le quali, tramite Shc, Grb2 e Sos, attivano il classico percorso ERK. Una versione virale altamente attivata di Src (v-Src) è stato il primo oncogene ad essere scoperto nonché responsabile delle proprietà di trasformazione del virus oncogeno del sarcoma di Rous [179]. Nel complesso di adesione focale, l'attivazione di Src è mediata principalmente dall'integrina  $\beta_1$  e comporta la propagazione del segnale del percorso PI(3)K/Akt. La perdita di aderenza è responsabile di una precoce inattivazione di Src con induzione di anoikis (vedi figura 2.15a) [180, 181].



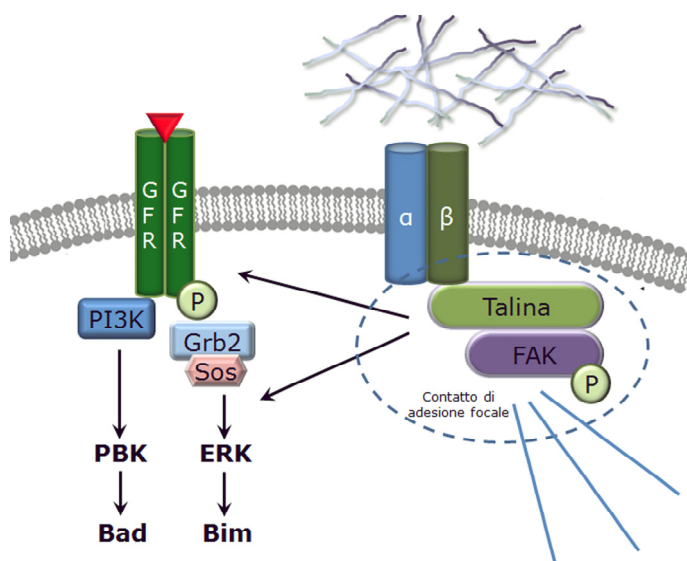
**Figura 2.15a.** Alcune subunità delle integrine possono reclutare le chinasi Fyn e Yes della famiglia Src attraverso le interazioni con la caveolina, per poi attivare la via classica di ERK.

**67** *Associazioni tra integrine e recettori di fattori di crescita.* L'adesione corretta all'ECM da sola non è sufficiente a fornire un segnale di sopravvivenza e il ruolo del citoscheletro, sotto questo aspetto, è critico. La forma delle cellule è controllata anche dal citoscheletro e le sue connessioni alle integrine a livello sia dell'ECM che delle giunzioni cellulari. Cambiamenti in queste forze meccaniche possono alterare le vie di segnalazione associate con l'adesione, influenzando così la sopravvivenza cellulare [183]. Un'ulteriore complicazione sorge quando si considerano le associazioni tra integrine e GFRs. L'attività dei GFRs è influenzata dall'adesione all'ECM consentendo, ad esempio, il controllo della proliferazione ancoraggio-dipendente. La via di segnalazione di pp125FAK può condizionare

**Box 2.5.** La linea cellulare MCF10 richiede, per la propria sopravvivenza, il **Fattore di Crescita Epidermico (EGF)** e il corrispettivo recettore (EGFR). In assenza di adesione, nelle cellule MCF10, si verifica un'inibizione dell'espressione dell'EGFR sulla superficie, che comporta una inibizione del percorso di sopravvivenza attivato da ERK con una sovra-regolazione della proteina pro-poptotica Bim. Linee di cellule tumorali del seno non mostrano questo distacco indotto dalla bassa espressione di EGFR bensì un'iper-espressione di EGFR che inibisce l'anoikis. È interessante notare come diverse linee cellulari mostrano differenze nel modo in cui realizzano le interazioni tra integrine e GFRs per controllare l'anoikis [182]. Per questo, chiarire il confine tra integrine e fattori di crescita nella regolazione dell'apoptosi non appare semplice.

direttamente la capacità dei GFRs di controllare l'attivazione di ERK e la transizione G1-M durante il ciclo cellulare. Non sorprende, quindi, che questi incroci possano influire sull'anoikis. Le cellule epiteliali dipendono sia da fattori di crescita che dall'adesione per la sopravvivenza e l'assenza di entrambi innesca il meccanismo apoptotico. Ad esempio, cellule epiteliali mammarie dipendono, per un corretto sviluppo del tessuto, dall'adesione dell'ECM alla laminina unitamente al segnale di IGF-1 [184].

L'attivazione del recettore IGF-1 sopprime l'apoptosi attraverso la segnalazione PI(3)K e la presenza di laminina sembra essere un requisito essenziale; infatti, cellule primarie di epitelio ghiandolare mammario MCF10 coltivate solo su collagene non sono capaci di attivare efficacemente le PI(3)K in risposta a IGF-1 e muoiono per apoptosi (Box 2.5 e figura 2.15b).



**Figura 2.15b.** L'adesione alla matrice e la segnalazione GFR sono intimamente legate con una regolazione in grado di avvenire a diversi livelli. L'adesione all'ECM è capace di controllare l'espressione dei GFRs ma non la loro attivazione. Sarà il legame con i rispettivi ligandi extracellulari a consentire l'innescamento, da parte dei GFRs, di vie effettrici come il percorso di ERK e la via di PI(3)K.

### Regolazione dell'anoikis.

**68**

L'anoikis risulta regolata sia attraverso la via intrinseca che estrinseca dell'apoptosi.

**69**

**Anoikis e via estrinseca.** La via estrinseca si innesca tramite il legame di uno specifico ligando al proprio recettore di morte, con conseguente formazione a valle del complesso DISC, la cui funzione è di reclutare (tramite la molecola adattatrice FADD), attivandola, la caspasi-8. [184]. Per le cellule non trasformate, il distacco dall'ECM induce una sotto-regolazione di Bcl-X<sub>L</sub> e stimola il rilascio mitocondriale di Omi/HtrA2 mediando la morte per anoikis. Tuttavia, in cellule Ras trasformate, il distacco non riesce a inibire Bcl-X<sub>L</sub> ma porta ad una ipo-regolazione di Bak che blocca il rilascio di Omi/HtrA2 con conseguente resistenza all'anoikis.

Altri studi condotti in cellule epiteliali hanno suggerito come l'evento iniziale sia l'attivazione di un recettore di morte (Fas o TRAIL), seguito

dalla sovra-espressione di una forma dominante negativa di FADD, che blocca la caspasi-8 nel complesso DISC e inibisce l'anoikis [185, 186].

Nelle cellule endoteliali, l'adesione all'ECM sembra sopprimere l'attivazione dei FasR attraverso c-Flip, un antagonista non catalitico della caspasi-8, la cui espressione è regolata dall'attivazione, dipendente dall'adesione, di ERK [187].

Le proteine BH3-only tra cui Bid, Bad, Bim, Bmf e noxa sono essenziali durante l'apoptosi innescata dalla via mitocondriale. Bim, una delle più potenti proteine pro-apoptotiche, agisce sulla via intrinseca, attivata dalla carenza di fattori di crescita [188, 189] o l'esposizione ad altri segnali pro-apoptotici [190, 191]. Quando le cellule epiteliali perdono aderenza, Bim trasloca sui mitocondri, dove l'interazione con Bcl-X<sub>L</sub>, blocca ulteriormente la sua funzione pro-sopravvivenza, promuovendo l'attivazione di Bax. Dopo l'aggancio all'ECM, segnali mediati dalle integrine promuovono l'attivazione di ERK e la fosforilazione di Bim mediata da PI(3)K/Akt, portando così alla sua stessa degradazione per opera del proteasoma.

L'inizio dell'anoikis è seguita dall'inibizione di ERK ed i segnali PI(3)K/Akt a valle con il contemporaneo blocco della fosforilazione di Bim che ne impedisce la degradazione, facilitandone l'accumulo intracellulare e, successivamente, l'insuccesso dell'anoikis [180, 181, 191].

La famiglia degli inibitori delle proteine apoptotiche impedisce l'attivazione delle caspasi-3, -7 e -9 con conseguente diminuzione del rallentamento del percorso apoptotico. Mentre tutte sembrano in grado di inibire le caspasi effettrici, IAP1 e IAP2 possono direttamente sovra-regolare l'espressione di NF-κB.

**70**

***Anoikis e via intrinseca.*** Nella via intrinseca, l'attivazione delle caspasi si verifica come conseguenza della permeabilizzazione mitocondriale, regolata dalla famiglia di proteine Bcl-2 che controlla la formazione di pori nella membrana mitocondriale esterna dai quali verranno rilasciati fattori pro-apoptotici [192, 193].

Altri studi indicano come l'anoikis si inneschi e proceda attraverso la via intrinseca. Le proteine pro-apoptotiche Bax e Bak si attivano a seguito di distacco delle cellule dall'ECM. In cellule epiteliali mammarie, Bax trasloca dal citosol alla membrana mitocondriale esterna entro 30 minuti dalla perdita di adesione. Questo evento si accompagna all'esposizione di epitopi N-terminali, indicativi del passaggio dalla forma inattiva alla conformazione pro-apoptotica [194].

La questione di come cascate di segnalazione regolate dall'adesione cellula/ECM attivino Bax e Bak non risulta chiara. I dati indicano che solo i membri BH3-only della famiglia di proteine Bcl-2 sono suscettibili ad essere coinvolte. Questi agirebbero come sentinelle in risposta ai diversi segnali apoptotici per poi regolare la funzione delle proteine Bcl-2 multidominio, come Bcl-X<sub>L</sub> e Bax. È interessante notare come un certo numero di proteine BH3-only sembrano essere controllate da vie di segnalazione implicate nell'anoikis in uno o più tipi di cellule [195].

**71**

**Specie reattive di ossigeno.** Le specie reattive dell'ossigeno non sono solo sottoprodotti accidentali del metabolismo cellulare ma partecipano attivamente a percorsi di segnalazione, che vanno dalla morfogenesi alla proliferazione. Il modo preciso in cui i ROS sono regolati durante i fenomeni di stress e se contribuiscono alla morte o alla sopravvivenza delle cellule, sono argomenti controversi. In alcuni modelli *in vitro*, l'aumento dei ROS provoca il distacco della cellula e contribuisce alla sua morte.

Tuttavia, quando cellule ECV304 (cellule endoteliali derivate da cordone ombelicale) sono collegate all'ECM, la stimolazione delle integrine conduce ad una produzione di ROS dipendente da Rac-1 e, a sua volta, all'attivazione di Src e del pathways EGFR/ERK in maniera ligando-indipendente con degradazione di Bim e promozione della sopravvivenza. Questo effetto anti-anoikis può essere invertito con la somministrazione di antiossidanti [181] (Box 2.6).

**Box 2.6.** Nelle cellule primarie della prostata, i ROS hanno dimostrato di inibire la segnalazione EGFR indotta da integrina e promuovere la morte cellulare. Ma, in quelle stesse cellule, le integrine possono anche stimolare l'autofagia che impedisce poi l'attivazione di caspasi ed apoptosi.

Inoltre, è da notare che il distacco dall'ECM è stato recentemente dimostrato esser causa di produzione di ROS, ridotto assorbimento del glucosio e deplezione di ATP. Questo processo può essere evitato attraverso l'attivazione dei recettori tirosin chinasi sulla via dei pentoso fosfati, che producono equivalenti di riduzione di NADPH. Il trattamento esogeno con antiossidanti contrasta l'anoikis, suggerendo come la morte cellulare mediata da tale processo dipende anche da un elevato quantitativo di ROS [196].

Le implicazioni sono significative nel contesto che, sebbene gli antiossidanti possano essere utili nella prevenzione del cancro, una volta attivato lo stato di cellule maligne, la somministrazione di antiossidanti potrebbe aumentare la resistenza all'anoikis e, di conseguenza, la probabilità di diffusione metastatica. Tuttavia, come discusso in precedenza, non si può respingere l'evidenza che il trattamento antiossidante ha, in alcuni casi, ripristinato la sensibilità all'anoikis [197].

**72**

**ERK: Cross-Talk Propagato.** ERK è una serina/treonina chinasi che partecipa a una varietà di percorsi di trasduzione del segnale che regolano la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. In risposta ai ROS, ERK1/2 attivato interviene sull'omeostasi mitocondriale

- promuovendo l'attività dell'ATP sintasi,
- mantenendo il potenziale della membrana mitocondriale,
- riducendo il rilascio del citocromo-*c*,
- inattivando Bad.



Durante la perdita di segnalazione delle integrine nelle cellule normali, i livelli di EGFR diminuiscono, ERK è inattivato, aumenta Bim e s'innescano il processo apoptotico [198] (Box 2.7). Mentre la maggior parte degli studi mostrano come ERK sia un fattore pro-sopravvivenza, ci sono prove controverse per suggerire che ciò vale solo se l'attivazione di ERK è persistentemente elevata. Se ERK è attivato solo moderatamente o a intermittenza, può esercitare un effetto pro-apoptotico durante l'anoikis [200].

**Box 2.7.** Cellule di carcinoma del colon, al contrario, mostrano resistenza all'anoikis in parte attraverso l'attivazione persistente di ERK.

In carcinomi a cellule squamose, le cellule endoteliali neoplastiche sono anche in grado di secernere interleuchina-6 e fattori di crescita epidermica che stimolano Akt e ERK. Il risultato è che tali stimoli, derivati dall'endotelio, promuovono l'aumento di migrazione riducendo l'anoikis [199].

Per quanto riguarda l'autofagia, sia in neoplasie che in risposta agli esteri del forbolo, ERK può inattivare i **Complessi di Sclerosi Tuberosa (TSC1/2)**, a sua volta rimuovendo l'inibizione di mTOR. Al contrario l'attivazione, da parte del complesso ERK e delle **Chinasi delle Chinasi attivate da Mitogeni (MEKK)**, della p38 MAPK, inibisce mTOR via TSC, migliorando così l'autofagia mediata dalla Beclina-1.

L'attivazione di ERK1/2 sembra innescare l'autofagia dei mitocondri danneggiati e può anche esercitare effetti di segnalazione all'interno degli organelli cellulari. Come per l'apoptosi, l'effetto netto di ERK nell'autofagia dipende dal grado di attività e delle sue variazioni nel tempo in quanto solo l'attivazione sostenuta di ERK provoca la sua traslocazione ai mitocondri, l'aumento dell'autofagia (in particolare mitofagia) e la morte piuttosto che la sopravvivenza delle cellule [201]. Lo scenario che emerge è intrigante: a seconda del livello e dei tempi di attivazione, ERK può promuovere o bloccare l'autofagia e/o l'apoptosi, fungendo probabilmente da interruttore pro-anoikis.

**73**

***p53: un legame tra sorveglianza del genoma e anoikis?*** Dato il forte impatto di p53 nel cancro, è un po' sorprendente che il "guardiano del genoma" possa avere solo un ruolo limitato nell'interscambio apoptosi/autofagia durante l'anoikis. Il percorso ben conosciuto di apoptosi guidato da p53 procede tramite una sovra-regolazione di proteine pro-apoptotiche, tra cui Bax, PUMA, e noxa, come pure l'inibizione di Bcl-2.

Eppure, come per ERK, la funzione di p53 in autofagia è molto più complessa, non solo a livello di espressione ma anche attraverso la sua localizzazione intracellulare. Per esempio, in risposta al danno al DNA, p53 attivata trasloca nel nucleo e attiva il complesso TSC1/TSC2 attraverso le **Protein Chinasi Attivate da AMP (AMPK)** inibendo, in ultima analisi, mTOR e l'avvio dell'autofagia [202]. Al contrario, p53 citoplasmatica blocca le forme di autofagia a basso livello di attivazione che consentono alle cellule di produrre ATP e resistere alla deprivazione di energia.

Le cellule neoplastiche possono quindi beneficiare della repressione p53 attraverso una resistenza all'apoptosi ed in condizioni di privazione di

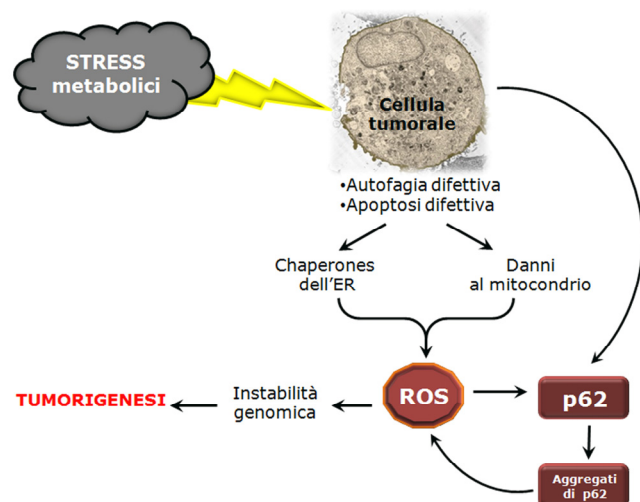
energia e nutrienti, ancora una volta prevenendo l'anoikis e facilitando il processo di metastatizzazione [203, 204].

**74** *Protein Chinasi Associate alla Morte.* La Proteina Chinasi Associata alla Morte (DAPK) è una serina-treonina chinasi che si accompagna al citoscheletro e sensibilizza la cellula a una varietà di segnali che inducono l'apoptosi, inclusa l'attivazione di p53 e il sequestro di ERK, oltre a bloccare la sopravvivenza cellulare dipendente dal complesso integrina/FAK. Questa proteina promuove anche un'autofagia letale in risposta a stress cellulari almeno in parte attraverso la diretta fosforilazione della Beclina-1, liberandola da Bcl-X<sub>L</sub> [206] (Box 2.8).

**Box 2.8.** DAPK lega e distrugge il complesso TSC1/TSC2, con conseguente attivazione di mTOR e la riduzione di autofagia a seguito dell'esposizione di linee cellulari HEK293 a certi fattori di crescita [205]. Cellule di carcinoma del colon possono sovra-regolare la  $\beta$ -catenina, dopo il distacco dalla ECM, abbattendo l'espressione di DAPK. Quindi, anche se DAPK promuove l'anoikis attraverso l'apoptosi e un'autofagia letale, può anche bloccare il processo autofagico, quando la cellula è in un ambiente che favorisce la crescita.

#### Quando autofagia e apoptosi convergono nell'anoikis.

**75** L'apoptosi ha come unico obiettivo l'eliminazione della cellula attraverso l'attivazione di specifici programmi di suicidio molecolare. Al contrario, l'autofagia è molto più diversificata nei suoi effetti, dipendenti dal bersaglio che viene degradato e con possibilità, qualora occorra, di estensione del processo. Come detto sopra, anche se l'apoptosi evolve in anoikis, l'autofagia può intervenire per promuovere sia la morte che la sopravvivenza cellulare. Ad esempio, sebbene l'autofagia possa facilitare l'apoptosi generando abbastanza ATP per alimentare il "blebbing" della membrana, può anche prevenire l'apoptosi, distruggendo i mitocondri danneggiati e limitando così l'esposizione ai ROS e il rilascio del citocromo-*c*. [207]. Difetti nel meccanismo autofagico potrebbero teoricamente favorire l'oncogenesi permettendo, l'accumulo di prodotti proteici mutati non eliminabili. L'aploinsufficienza di Beclina-1 e l'inibizione dell'autofagia identificata in molti carcinomi umani e topi transgenici [208] provoca l'accumulo di p62, elevati livelli di ROS e una maggiore instabilità cromosomica, con conseguente promozione dell'oncogenesi [209].



**Figura 2.16. p62 e il suo ruolo nella tumori genesi.** una proteina multi dominio implicata nell'attivazione della via apoptosi estrinseca, nella modulazione del percorso autofagico nonché un regolatore tumorigenesi. p62 è infatti localizzata in punti di decisione critici per il controllo della morte e sopravvivenza cellulare. In cellule tumorali con un macchinario apoptotici e autofagico difettivo, infatti, si verifica un accumulo di aggregati di p62. Questo innesca un ciclo di feedback positivo per la generazione di specie reattive dell'ossigeno, l'instabilità genomica avanzata e la tumori genesi.

Molte situazioni documentano l'interazione dinamica e spesso contraddittoria che esiste tra autofagia e apoptosi in cellule morenti.

La resistenza alla morte delle cellule tumorali tramite anoikis garantisce una base molecolare per il bersagliamento terapeutico del tumore metastatico. Non si può, tuttavia, considerare l'autofagia come unico fattore pro- o anti-sopravvivenza, anche nel contesto dell'anoikis. La Beclina-1, ROS, ERK e DAPK sono molecole chiave responsabili dell'integrazione tra i percorsi di autofagia e apoptosi, i cui effetti possono variare notevolmente da una situazione all'altra (tabella 2.4). In presenza di eventi critici di segnalazione accesi sia dal macchinario apoptotico che da quello autofagico dopo il distacco dall'ECM, l'esito non potrà che essere l'induzione di anoikis e l'inibizione della sopravvivenza cellulare con un efficace alterazione, nelle cellule tumorali, delle loro capacità invasive e di creare lesioni metastatiche.

**TABELLA 2.3. Interazione tra i percorsi autofagicie apoptotici**

LINEA CELLULARE	CROSS-TALK TRA AUTOFAGIA E APOPTOSI
Caki-2, SW839, ACHN, G401 e SK-NEP-1 (Cellule di carcinoma colon rettale)	Nelle cellule tumorali del colon, inibendo l'autofagia con la cloroquina, si permette al Vorinostat® (inibitore dell'istone deacetilasi) di indurre apoptosi [210]
HF2355 e HF2359 (Cellule di glioma CD133 positive staminali simili)	Si tratta di cellule resistenti all'apoptosi indotta da radiazioni, almeno in parte a causa di un aumentata autofagia [211]
HuH7 (Cellule di carcinoma epatico)	Richiedono l'attivazione del processo autofagico per indurre apoptosi stimolata dal TGFβ [212]
SiHa (Cellule di carcinoma del collo dell'utero)	Una sovra-regolazione dell'autofagia sensibilizza tali cellule al trattamento con carboplatino e, dunque, allo sviluppo di apoptosi.

## RIASSUNTO.

**76**

*L'Anoikis è la modalità attraverso la quale le cellule che perdono l'interazione con la ECM decidono di uccidere sé stesse piuttosto che avvantaggiare la diffusione e la crescita tumorale. Finora, i principali meccanismi effettori dell'anoikis sembrano essere l'autofagia e l'apoptosi. L'anoikis è regolata dalle vie di segnalazione apoptotiche. In alcune circostanze, tuttavia, la soppressione dell'apoptosi non è sufficiente ad*

*abrogare la morte cellulare per anoikis e dunque emerge l'autofagia come evento di esecuzione per l'apoptosi. Questo processo non è sempre a beneficio dell'organismo e, come l'autofagia è capace di promuovere o inibire l'apoptosi, i percorsi apoptotici possono a loro volta modulare l'autofagia, spingendo le cellule verso la sopravvivenza. Esiste quindi una grande complessità nell'interazione funzionale tra le vie di segnalazione dell'apoptosi e quelle autofagiche nell'innescò dell'anoikis.*

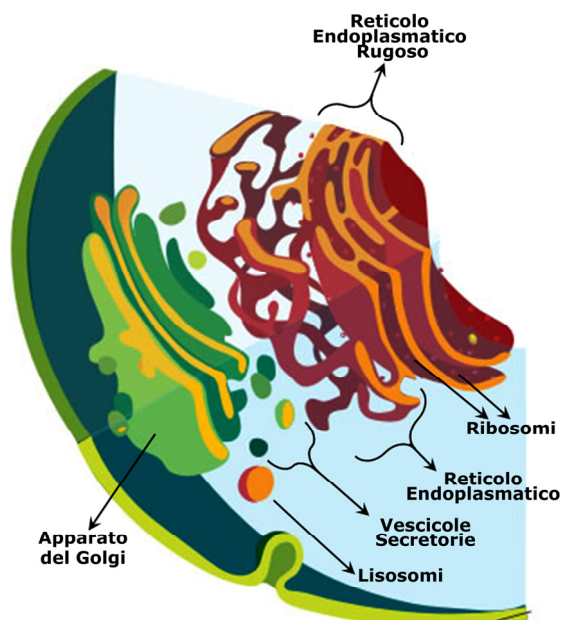
## Organelli sull'orlo di una crisi di nervi.

**77** L'efficiente funzionamento del reticolo endoplasmatico è essenziale per la maggior parte delle attività cellulari e la sopravvivenza della cellula stessa. Condizioni che interferiscono con le funzione dell'ER determinano un accumulo e l'aggregazione di proteine non ripiegate, causa di stress. Specifici recettori transmembrana del reticolo rilevano il principio di stress e avviano la risposta da proteine mal ripiegate per ripristinare la normale omeostasi. Tuttavia, se lo stress è prolungato o la risposta adattativa fallisce, sopraggiunge la morte cellulare.

### Il Reticolo endoplasmatico rugoso.

**78** Il reticolo endoplasmatico (ER) è l'organello cellulare deputato alla sintesi dei lipidi e alla modificazione delle proteine cellulari (in particolare di quelle secrete all'esterno della cellula come ormoni e proteine dell'ECM, delle proteine integrali di membrana (come i recettori) e delle proteine che si localizzano in specifici organelli (Golgi e lisosomi). Il reticolo può assumere una struttura sia tubulare che a sacche appiattite, dette cisterne, separate dal citoplasma da una singola membrana (figura 2.16). Il reticolo si distingue in liscio o rugoso:

- il reticolo endoplasmatico liscio (ERL), è privo di ribosomi e questo indica come non sintetizzi proteine ma sia adibito ad altri scopi come la sintesi di lipidi o la



**Figura 2.16.** Diagramma del sistema di endomembrane e organuli da esso derivati.

detossificazione di composti organici;

- il reticolo endoplasmatico rugoso (ERR) possiede molti ribosomi associati alla membrana (che gli conferiscono un aspetto ruvido in microscopia elettronica) e rappresenta il primo organello della via secretoria.

Tipi diversi di cellule hanno una quantità molto differente di un tipo di ER o dell'altro, a seconda della loro attività prevalente. Il lume dell'ER rappresenta l'unico compartimento cellulare ottimizzato per effettuare tre compiti essenziali:

1. lo stoccaggio del calcio ed il suo rilascio,
2. la biogenesi dei lipidi,
3. la sintesi e il folding di proteine secrete e legate alla membrana. Più fattori sono richiesti per un ottimale folding delle proteine, inclusi l'ATP e lo ione calcio  $Ca^{2+}$  nonché un'ossidazione dell'ambiente per consentire la formazione di ponti disolfuro [213].

Come conseguenza di questa estrema specializzazione l'ER è altamente sensibile a stress che perturbano il livello cellulare di energia, lo stato redox o l'omeostasi del calcio con effetti dannosi sull'attività delle chaperones molecolari residenti e dipendenti da calcio [214]. Tutto questo, unitamente a mutazioni puntiformi in proteine secrete (che impediscono la loro capacità di ripiegamento) ed a infezioni di virus (con un sovraccarico per l'ER causa produzione di proteine virali), porta ad un accumulo ed a una aggregazione di proteine mal ripiegate, condizione nota come **Stress del Reticolo Endoplasmatico (ERS)**. L'accumulo di proteine malripiegate è tossico per le cellule e, conseguentemente, numerose condizioni pato-fisiologiche sono associate ad ERS, incluse malattie neurodegenerative, ischemia e diabete [215]. Per contrastare gli effetti deleteri dell'ERS la cellula ha evoluto varie strategie protettive collettivamente chiamate **Risposta alle Proteine Unfolded (UPR)**. Questa concertata e complessa risposta cellulare è mediata da tre recettori transmembrana del ER:

1. la **Chinasi ER** simile alla **Chinasi del ER Pancreatica (PERK)**,
2. il **Fattore 6 Attivante la Trascrizione (ATF6)**,
3. l'**Enzima 1 Richiedente Inositolo (IRE1)**.

Questi recettori avvisano la cellula della presenza di proteine malripiegate nell'ER tentando di ripristinare l'omeostasi dell'organello attraverso

- l'incremento della biogenesi di membrane dell'ER,
- il decremento dell'affluenza di nuove proteine nel lume dell'ER,
- la promozione del trasporto di proteine danneggiate dal lume dell'ER al citosol per la loro degradazione,
- la sovra-espressione di chaperones molecolari per il folding delle proteine.

Tuttavia, se questa risposta adattativa fallisce per un eccessivo e prolungato stress dell'ER a causa di una persistente aggregazione di proteine allora l'UPR induce morte cellulare. I pathway di morte cellulare attivati dalla UPR includono sia apoptosi caspasi-dipendente che indipendente o la necrosi. Sebbene la maggior parte dei dettagli rimanga sconosciuta è stato

chiarito quando lo stress dell'ER è irreparabile e comunica questa informazione al macchinario di morte cellulare.

### I recettori dell'UPR e la risposta allo stress.

**79** In cellule sane e quiescenti, i recettori PERK, IRE1 ed ATF6 sono mantenuti in uno stato inattivo attraverso la loro associazione ad una chaperone dell'ER, GRP78/BiP. A seguito dell'accumulo di proteine mal ripiegate, GRP78/BiP si dissocia dai tre recettori permettendo la loro attivazione e l'inizio della UPR.

**PERK.** Si tratta di una proteina transmembrana residente nel reticolo, il cui dominio luminale è sensibile all'ERS. La dissociazione di GRP78/BiP da PERK avvia la dimerizzazione e l'autofosforilazione del dominio citosolico chinasi con attivazione di PERK. Una volta attivato, PERK fosforila il **Fattore 2α di inizio eucariotico della traduzione (eIF2α)** che, in tal modo, diventa incapace di una efficiente trascrizione diminuendo il carico di proteine nascenti nell'ER ed aumentando così la sopravvivenza cellulare.

Tuttavia, questa attenuazione della traduzione non è assoluta; geni dotati di determinate sequenze di regolazione nelle loro regioni 5' non tradotte (ad esempio, il sito interno di ingresso ribosomiale IRES) possono ignorare il blocco traduzionale eIF2α-dipendente. Il più studiato di questi geni è ATF4, che codifica per un fattore di trascrizione legante un elemento di risposta al cAMP (C/EBP) (Box 2.9). In più, la fosforilazione e la conseguente attenuazione della traduzione proteica mediata da eIF2α, attiverrebbe NF-κB a seguito della mancata traduzione del suo inibitore IκB, portando ad un potenziale cambiamento nell'espressione genica. Non tutti i tipi di cellule sono protette dall'ERS attraverso la fosforilazione di eIF2α indicando come il percorso PERK/eIF2α svolga un ruolo nel controllo traduzionale delle proteine in modo tipo cellule specifico [216, 217] (figura 2.17). L'inibizione transitoria (farmacologica o meno) della traduzione attraverso PERK contribuirebbe alla sopravvivenza delle cellule, reprimendo l'espressione della ciclina D e di p53, con conseguente arresto del ciclo cellulare.

**Box 2.9** La traduzione attiva di ATF4 induce la trascrizione di specifici geni in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare e coinvolti nel metabolismo di aminoacidi, reazioni redox, risposta allo stress e la secrezione delle proteine.

**ATF6.** Esistono due isoforme di ATF6 nelle cellule di mammifero (ATF6a e b) che sono distribuite in modo ubiquitario in tutti i tessuti. Il pathway di attivazione di ATF6 coinvolge un inusuale meccanismo detto **Proteolisi Intramembrana Regolata (RIP)**. A seguito della dissociazione di GRP78/BiP dal suo dominio luminale durante lo stress, vengono scoperti due segnali di localizzazione per il Golgi che consentono ad ATF6 di separarsi dall'ER e traslocare nel Golgi. Lo stato redox di ATF6 pare essere importante per la sua funzione, tanto che la presenza di ponti disolfuro si pensa mantengano la molecola in uno stato inattivo, impedendogli di fuggire dal reticolo rugoso.

Anche se la riduzione dei legami disolfuro è necessaria per l'attivazione ATF6, non è sufficiente, suggerendo come sia lo stato redox che il legame di GRP78/BiP siano coinvolti nel rilevamento dello stress del reticolo e l'attivazione di ATF6 [218]. Giunto nel Golgi, ATF6 è proteoliticamente scisso da due enzimi residenti nell'organello: la **Proteasi del Sito-1 e del Sito-2 (S1P e S2P)** con il rilascio di un prodotto di 50 kDa (**ATF6N**) che trasloca nel nucleo dove, come fattore di trascrizione, si lega ai promotori di diversi geni in corrispondenza di **Elementi di risposta allo Stress del Reticolo Endoplasmatico (ERSE)** promuovendone la trascrizione. Finora i geni bersaglio identificati di ATF6(N) includono le chaperone dell'ER GRP78/BiP e GRP94, delle **Proteine Disolfuro Isomerasi (PDI)** e l'mRNA della **Proteina 1 che Lega l'X box (XBP-1)** (figura 2.17), oltre che l'attivazione sinergica (insieme al fattore di trascrizione CREB) di geni della risposta infiammatoria acuta durante lo stress dell'ER in fegato. L'attività trascrizionale di ATF6 può essere migliorata tramite fosforilazione.

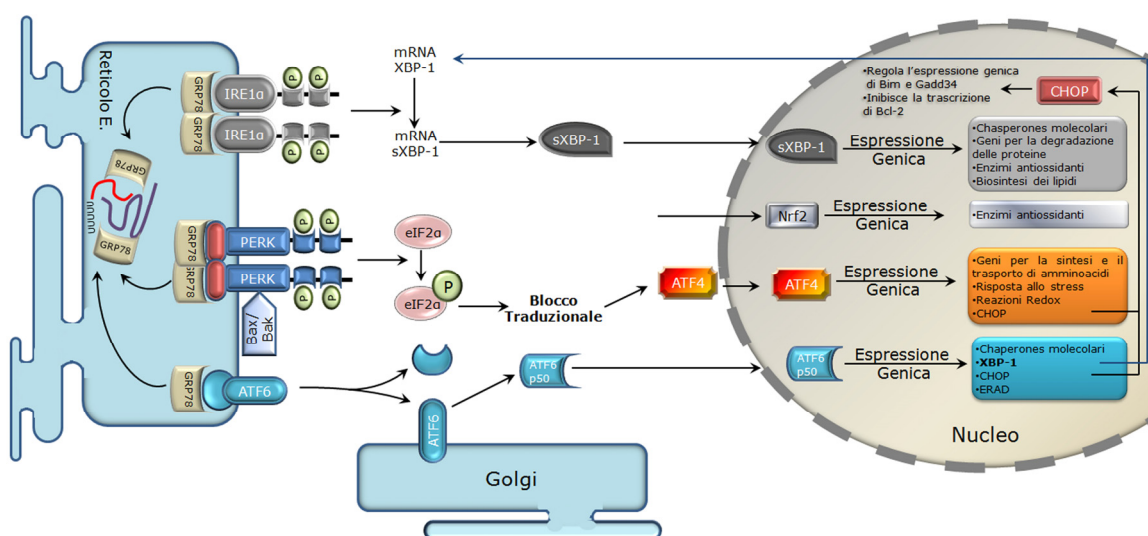
**IRE1 $\alpha$ .** IRE1 $\alpha$ , il più conservato dei sensori per lo stress dell'ER, contiene un dominio nel lume dell'ER, un dominio citosolico chinasi ed un dominio citosolico ad attività RNAsica. Come IRE1 $\alpha$  venga attivato dall'ERS è attualmente una delle domande più interessanti poiché irrisolta. I primi studi biochimici individuarono la proteina GRP78/BiP come regolatore potenziale indiretto dell'attivazione di IRE1 $\alpha$ . In condizioni omeostatiche, GRP78/BiP lega il dominio lumenale monomero inattivo di IRE1 $\alpha$ . Al superamento del livello di soglia fisiologicamente tollerato di concentrazioni di proteine un- o mis-folded all'interno dell'ER (a cui è capace di far fronte GRP78/BiP), GRP78/BiP si dissocia da IRE1 $\alpha$ , permettendo al recettore di dimerizzare e attivarsi [219], autofosforilando il proprio dominio endoribonucleasico presente sul lato citosolico. All'interno del citoplasma è ubiquitariamente presente l'mRNA *unspliced* della **Proteina di mammifero 1 Legante l'X-Box e omologa ad HAC1 (XBP)**. L'attività endonucleasica del dominio C-terminale di IRE1 $\alpha$  rimuove un introne in 3' di 26 nucleotidi dall'mRNA di XBP-1 (precedentemente trascritto ad opera di ATF6(N)) che, normalmente, inibisce la traduzione proteica. La variante di splicing così generata, sXBP-1, codifica per la proteina XBP-1, la quale agisce come fattore di trascrizione e promuove in particolare l'espressione di geni che potenziano la degradazione proteica e l'UPR. Tra questi geni target compare p58<sup>IPK</sup>, membro della famiglia HSP40 [218]. p58<sup>IPK</sup> lega e inibisce PERK, dando vita così ad un circuito negativo che riduce il blocco traduzionale mediato da PERK stesso.

La sovra-regolazione di p58<sup>IPK</sup> non è un evento immediato ma si verifica molte ore dopo l'attivazione di PERK e la fosforilazione di eIF2 $\alpha$ . È possibile che l'attenuazione del blocco traduzionale da parte di p58<sup>IPK</sup> rappresenti il termine dell'UPR. A questo punto, se l'UPR ha avuto successo, l'ER ritorna a funzionare normalmente e la cellula sopravvive.

Insieme, questi eventi trascrizionali (splicing di XBP-1, sovra-regolazione di p58<sup>IPK</sup> e attivazione di ATF4) agiscono dunque come un circuito omeostatico

per ridurre l'ammontare di proteine non ripiegate ed attenuare l'UPR. Tuttavia, quando queste risposte adattative si rivelano insufficienti l'UPR si indirizza su una via alternativa che promuove la morte cellulare (figura 2.17).

È di recente stato evidenziato come alcune proteine della famiglia Bcl-2 (Bax e Bak) interagiscano direttamente con il dominio citosolico di IRE1, e questa interazione aumenta in risposta allo stress dell'ER. Fibroblasti embrionali di topo doppi knockout per Bax e Bak mostrano risposte anomale allo stress dell'ER e una diminuita espressione di XBP-1. Così Bax e Bak, nonostante siano coinvolti nell'apoptosi indotta da stress dell'ER appaiono anche necessari per la normale segnalazione del complesso IRE1.



**Figura. 2.17. La risposta allo stress del reticolo endoplasmatico.** In caso di accumulo di proteine malripiegate, GRP78 si dissocia da tre recettori dello stress sulla membrana del ER; PERK, ATF6 e IRE1, permettendo la loro attivazione. L'attivazione dei recettori avviene in modo sequenziale, con PERK ad essere il primo, subito seguito da ATF6, mentre IRE1 risulta l'ultimo.

PERK attivata blocca la sintesi proteica generale attraverso la fosforilazione di eIF2α. Questo permette comunque la traduzione di ATF4, che avviene attraverso un percorso alternativo, indipendente da eIF2α. ATF4, essendo un fattore di trascrizione, trasloca nel nucleo e induce la trascrizione dei geni necessari per ripristinare l'omeostasi dell'ER.

ATF6 viene attivato mediante proteolisi limitata dopo la sua traslocazione dal reticolo all'apparato del Golgi. ATF6 attivo è anch'esso un fattore di trascrizione capace di regolare l'espressione di proteine chaperones e di XBP-1, un altro fattore di trascrizione. Per raggiungere la sua forma attiva, l'mRNA di XBP-1 deve essere sottoposto a splicing. Il frammento attivo che ne deriva è tradotto in una proteina (sXBP-1) che trasloca al nucleo e controlla la trascrizione sia di chaperones molecolari varie che dell'inibitore di PERK, p58<sup>IPK</sup>, così come tutti quei geni coinvolti nella degradazione delle proteine.



### La risposta dei recettori in condizioni di stress severo e prolungato.

**80** In condizione di stress irrimediabile dell'ER la via di PERK induce la trascrizione, dipendente da ATF4, della **Proteina Omologa a C/EBP (CHOP/GADD153)** che inibisce la trascrizione dei geni della famiglia di proteine anti-apoptotiche Bcl-2 mentre sovra-regola l'espressione dell'ossidasi ERO1 $\alpha$ , inducendo danni ossidativi al reticolo, e della **Proteina 34 indotta da Danno al DNA e Arresto della Crescita (GADD34)**, subunità regolatrice delle **Protein Fosfatasi 1 (PP1)** che defosforila eIF2 $\alpha$ .

Oltre al gene target XBP-1, ATF(6N) è in grado di indurre anche l'espressione dell'mRNA di CHOP mentre non è stata ancora identificata una connessione tra ATF6 e apoptosi indotta da stress dell'ER. Sembra quindi che il percorso di segnalazione mediata da ATF6 sia puramente a favore della sopravvivenza cellulare, mirando a contrastare lo stress del reticolo endoplasmatico.

IRE1 $\alpha$  attivata recluta invece il **Fattore 2 Associato al Recettore TNF (TRAF2)**; il complesso IRE1 $\alpha$ -TRAF2 così formato richiama la **Chinasi 1 che regola i segnali di Apoptosi (ASK1)**

attivando i suoi bersagli a valle, ossia p38 MAPK e JNK. Piccole molecole modulatrici di ASK1 proteggono le colture cellulari contro l'apoptosi indotta da stress dell'ER, enfatizzando l'importanza del complesso IRE1 $\alpha$ -ASK1-JNK come segnale di morte in questo percorso [220]. In risposta alla massiva oligomerizzazione, il dominio ad attività RNasica di IRE1 $\alpha$  causa la frammentazione di centinaia di mRNA localizzati nell'ER [221]. Privando l'ER delle componenti per il carico e il folding delle proteine, la frammentazione dell'mRNA mediata da IRE1 $\alpha$  può peggiorare lo stress del reticolo, ponendosi come esecutore di un programma pro-apoptotico (Box 2.10)

**Box 2.10.** Come possono convivere nella stessa molecola IRE1 $\alpha$  due opposte funzioni, pro- ed anti-apoptotiche? Screening con il sistema del doppio ibrido in lievito per cercare proteine interagenti con IRE1 $\alpha$  hanno identificato la molecola **Chinasi c-Jun inibitrice N-terminale (JIK)** e la **Proteina Legante il dominio di Attivazione di Jun (JAB1)**; l'abilità di JIK di legare sia TRAF2 che IRE1 $\alpha$  indica un suo ruolo nel regolare il reclutamento di TRAF2 e l'attivazione del percorso di MAPK. L'altra molecola partner di IRE1 $\alpha$ , JAB1, lega IRE1 $\alpha$  durante condizioni di quiete. Stress dell'ER di media importanza incrementano l'affinità di legame mentre stress severi hanno l'effetto opposto. Così, JAB1 può regolare la scelta tra UPR e morte cellulare attraverso il legame o la sua dissociazione da IRE1 $\alpha$ .

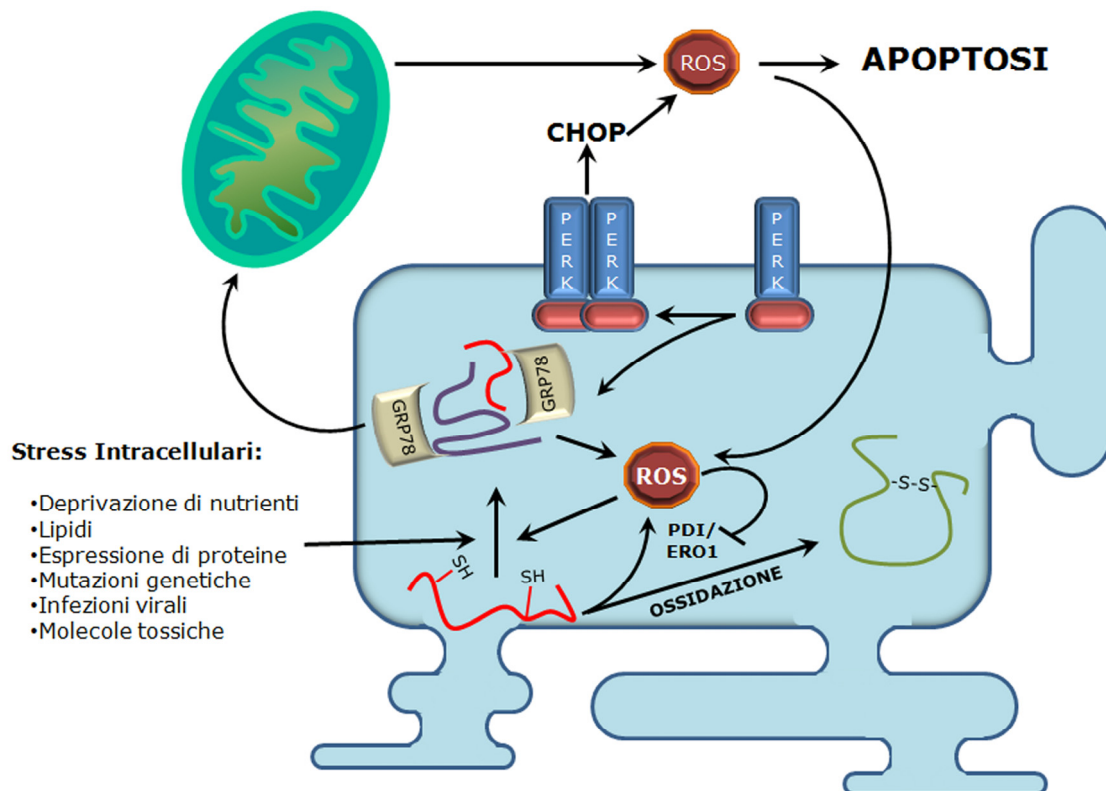
### Vivere o morire?

**81** Sotto condizioni di stress forte o cronico, al momento di decidere se innescare la morte apoptotica, le cellule possono utilizzare uno o più percorsi, per indicare se la UPR debba rimanere continuamente attiva. Per esempio, una sostenuta attività di PERK così come alti livelli di CHOP comporta una protratta attenuazione traduzionale incompatibile con la sopravvivenza. Similmente, alti livelli di degradazione di mRNA mediati da IRE1 $\alpha$  possono inibire il ripiegamento corretto delle proteine da parte dell'ER e, insieme all'attivazione di JNK, indirizzare le cellule verso la morte apoptotica [223].

Così, la continua attivazione dei sensori IRE1 $\alpha$  e PERK accendono un percorso capace di innescare un irreversibile stress dell'ER. Concludendo, IRE1 $\alpha$  sembra essere importante per l'inizio delle segnalazioni pro-morte, nonostante rappresenti l'ultima arma della UPR ad essere attivata, con PERK che diventa il primo percorso, seguito da vicino da ATF6 (Box 2.11).

L'accumulo di proteine *unfolded* nel lume dell'ER, inoltre, innesca la produzione di ROS e, sia i ROS che le proteine *unfolded*, cooperano per attivare l'ERS e la morte cellulare. Sono noti diversi meccanismi per spiegare l'accumulo di ROS da parte di proteine non correttamente ripiegate.

**Box 2.11.** I percorsi mediati da PERK e ATF rappresentano un tentativo di risolvere la condizione di stress prima dell'attivazione di IRE1 $\alpha$ . Quando attivata, IRE1 $\alpha$  inizialmente incrementa la UPR attraverso lo splicing di XBP-1 ma finisce, in ultima analisi, per ridurre l'inibizione traduzionale tramite l'attività di p58<sup>IPK</sup>. A questo punto, o le cellule tornano alle loro normali funzioni o, se lo stress persiste, IRE1 $\alpha$  innesca il processo di morte reclutando ASK1 [222].



**Figura 2.18. Il misfolding e lo stress ossidativo creano un circolo vizioso che porta a stress del reticolo e morte cellulare.** I ROS sono generati da esposizione a stress multipli e anche come sottoprodotto della respirazione mitocondriale. La presenza di proteine *unfolded* può aumentare la comparsa di ROS attraverso i cambiamenti nella fosforilazione ossidativa, come conseguenza della perdita di energia o di rilascio del Ca<sup>2+</sup> dal lume dell'ER. Inoltre, il GSH, può essere consumato per ridurre impropriamente i ponti disolfuro all'interno di proteine non

correttamente ripiegate. La produzione di ROS può interferire con il ripiegamento delle proteine inattivando le reazioni di scambio promosse da PDI/ERO1 e/o provocando un'aberrante formazione di legami disolfuro. Lo stress dell'ER attiva l'espressione di CHOP, che può portare alla produzione di ROS attraverso l'induzione di Ero1 o GADD34. In questo modello, ROS può causare misfolding, attivazione di ERS e induzione di CHOP (*modificato da Malhotra JD et al., 2008*).

In primo luogo, proteine *unfolded* legano le chaperon, come GRP78/BiP, che utilizzano ATP in grado di stimolare la fosforilazione ossidativa mitocondriale e sintetizzare ROS come sottoprodotto. In secondo luogo, i ROS possono essere prodotti come conseguenza della formazione di ponti disolfuro nell'ER, durante il trasferimento di elettroni, tramite la **Fosfodisolfuro Isomerasi (PDI)** ed l'**Ossidoreduttina residente nell'ER (ERO1)**, da gruppi tiolici ad ossigeno molecolare, per produrre perossido di idrogeno.

In alternativa, può verificare un consumo di **Glutathione (GSH)** durante la riduzione dei legami disolfuro instabili e/o impropri di proteine *unfolded*. Infine, un *misfolding* proteico nel lume dell'ER può causare la perdita di  $Ca^{2+}$ , assorbito dai mitocondri con conseguente interruzione della catena di trasporto degli elettroni.

Lo stress ossidativo è implicato in molte malattie causate da aggregati proteici, comprese le malattie da prioni, il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson, così come il diabete, malattie metaboliche, l'infiammazione e l'aterosclerosi. L'utilizzo di antiossidanti e la modificazione della dieta possono alleviare lo stress ossidativo e rivelarsi utile in questi stati patologici, probabilmente migliorando il ripiegamento delle proteine nell'ER.

## RIASSUNTO.

**82**

*Lo stress dell'ER è una condizione potenzialmente deleteria che deve essere contrastata quando diventa patologica, attivando l'UPR. Attraverso la UPR la cellula rileva la gravità della propria condizione di stress e la situazione dell'ambiente circostante, in modo da produrre una risposta adeguata. Anche se le vie di segnalazione generale attivate nel corso della UPR sono ben definite, non è molto chiaro il meccanismo di induzione di apoptosi indotto da ERS ma, soprattutto, il o i segnali che inviano la cellula lungo il percorso apoptotico quando la risposta protettiva dell'UPR non riesce a ripristinare condizioni di normale omeostasi. Condizioni di ERS e conseguente morte cellulare sono state osservate in numerose malattie, indicando come l'eliminazione di cellule indotta da stress dell'ER, sia un fattore importante in condizioni fisiopatologiche. La ricerca finora ha identificato molti candidati molecolari coinvolti nel mediare il passaggio dalla segnalazione citoprotettiva della UPR a quella pro-apoptotica. Alcuni di queste proteine, come GADD34, sono coinvolte nel disattivare il meccanismo protettivo alimentato da PERK.*

*Altre due potenti molecole pro-apoptotiche vengono attivate durante la UPR: CHOP e ASK1. Entrambe le molecole possono agire contro i membri della famiglia Bcl2 e sono in grado di avviare il macchinario di morte apoptotico. Inoltre, l'attivazione di ASK1 potrebbe essere regolata da proteine adattatrici sensibili allo stress, come JAB1, offrendo un altro meccanismo possibile per passare da una risposta adattativa alla morte. Un prolungato stress dell'ER induce quindi l'attivazione di vari percorsi apoptotici e quello predominante differisce da tipologia a tipologia di cellula. Molte domande senza risposta rimangono circa le modalità di induzione dell'apoptosi indotta dall'UPR. Esiste un evento pro-apoptotico che controlla, in ultima analisi, tutti gli altri, o diversi percorsi pro-apoptotici agiscono contemporaneamente per portare la cellula alla morte? Esiste un punto di non ritorno oltre il quale la cellula è destinata a morire? L'apoptosi indotta da ERS è un nuovo percorso il cui pieno impatto, soprattutto nella patologia delle malattie, rimane indeterminato.*

#### **BIBLIOGRAFIA dei paragrafi da 31 a 82**

- 88) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57. Review.
- 89) Kurosaka K, Takahashi M, Kobayashi Y.: **Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 is involved in production of CXC-chemokine by macrophages during phagocytosis of late apoptotic cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jul 11;306(4):1070-4.
- 90) Savill J, Fadok V.: **Corps clearance defines the meaning of cell death.** *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):784-8. Review.
- 91) Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J.: **Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis.** *Immunity.* 2005 Mar;22(3):355-70.
- 92) Chowdury et al, 2008
- 93) Nemes Z Jr, Friis RR, Aeschlimann D, Saurer S, Paulsson M, Fésüs L.: **Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue.** *Eur J Cell Biol.* 1996 Jun;70(2):125-33.
- 94) Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA.: **The role of DNA fragmentation in apoptosis.** *Trends Cell Biol.* 1995 Jan;5(1):21-6.
- 95) Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenburg PA, Michalak M, Henson PM.: **Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte.** *Cell.* 2005 Oct 21;123(2):321-34.
- 96) Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, de Leeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA.: **Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes.** *Blood.* 2005 Nov 1;106(9):3214-22.
- 97) Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME.: **The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis.** *J Biol Chem.* 1999 Jan 15;274(3):1541-8.

- 98) Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N.: **Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology.** *Semin Immunol.* 2003 Jun;15(3):167-76. Review.
- 99) Trapani JA, Smyth MJ.: **Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway.** *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct;2(10):735-47. Review.
- 100) Lieberman J, Fan Z.: **Nuclear war: the granzyme A-bomb.** *Curr Opin Immunol.* 2003 Oct;15(5):553-9. Review.
- 101) Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P.: **Toxic proteins released from mitochondria in cell death.** *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2861-74. Review.
- 102) Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G.: **Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria.** *Cell Death Differ.* 2006 Sep;13(9):1423-33.
- 103) Van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P.: **The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.** *Cell Death Differ.* 2002 Oct;9(10):1031-42. Review.
- 104) Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM.: **Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death.** *Nature.* 2001 Mar 29;410(6828):549-54.
- 105) Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G.: **Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis.** *J Exp Med.* 2000 Aug 21;192(4):571-80.
- 106) Li LY, Luo X, Wang X.: **Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria.** *Nature.* 2001 Jul 5;412(6842):95-9.
- 107) Schuler M, Green DR.: **Mechanisms of p53-dependent apoptosis.** *Biochem Soc Trans.* 2001 Nov;29(Pt 6):684-8. Review.
- 108) Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P.: **Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):552-65. Review.
- 109) Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW.: **X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death.** *Nature.* 1996 May 23;381(6580):335-41.
- 110) Zhu W, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW.: **Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types.** *EMBO J.* 1996 Aug 15;15(16):4130-41.
- 111) Xu C, Xu W, Palmer AE, Reed JC.: **BI-1 regulates endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> homeostasis downstream of Bcl-2 family proteins.** *J Biol Chem.* 2008 Apr 25;283(17):11477-84.
- 112) Szegezdi E, Macdonald DC, Ní Chonghaile T, Gupta S, Samali A.: **Bcl-2 family on guard at the ER.** *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009 May;296(5):C941-53.
- 113) Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC.: **Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function.** *Mol Cell.* 2005 Feb 4;17(3):393-403.
- 114) Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, Mac Gregor GR, Thompson CB.: **BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak.** *Genes Dev.* 2001 Jun 15;15(12):1481-6.
- 115) Tanaka S, Saito K, Reed JC.: **Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival.** *J Biol Chem.* 1993 May 25;268(15):10920-6.
- 116) Wei H, Wei W, Bredesen DE, Perry DC.: **Bcl-2 protects against apoptosis in neuronal cell line caused by thapsigargin-induced depletion of intracellular calcium stores.** *J Neurochem.* 1998 Jun;70(6):2305-14.
- 117) Igney FH, Krammer PH.: **Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.** *Nat Rev Cancer.* 2002 Apr;2(4):277-88. Review.
- 118) Slee EA, Adrain C, Martin SJ.: **Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis.** *J Biol Chem.*

- 2001 Mar 9;276(10):7320-6.
- 119) Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, Mc Garry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT.: **Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis.** *Science*. 1997 Oct 10;278(5336):294-8.
- 120) Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL.: **Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts.** *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1071-7.
- 121) Renahan AG, Booth C, Potten CS.: **What is apoptosis, and why is it important?** *BMJ*. 2001 Jun 23;322(7301):1536-8.
- 122) Opferman JT, Korsmeyer SJ.: **Apoptosis in the development and maintenance of the immune system.** *Nat Immunol*. 2003 May;4(5):410-5. Review.
- 123) Osborne BA.: **Cell death in vertebrates: lessons from the worm.** *Trends Genet*. 1996 Dec;12(12):489-91. No abstract available.
- 124) Lund LR, Rømer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Danø K, Werb Z.: **Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways.** *Development*. 1996 Jan;122(1):181-93.
- 125) Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB.: **Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein.** *Science*. 1995 Apr 21;268(5209):429-31.
- 126) Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG.: **The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets.** *Apoptosis*. 2007 Sep;12(9):1543-68.
- 127) Hochhauser E, Kivity S, Offen D, Maulik N, Otani H, Barhum Y, Pannet H, Shneyvays V, Shainberg A, Goldshtaub V, Tobar A, Vidne BA.: **Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Jun;284(6):H2351-9.
- 128) Hetz C, Vitte PA, Bombrun A, Rostovtseva TK, Montessuit S, Hiver A, Schwarz MK, Church DJ, Korsmeyer SJ, Martinou JC, Antonsson B.: **Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia.** *J Biol Chem*. 2005 Dec 30;280(52):42960-70.
- 129) Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow T, Peters C, von Figura K, Mizushima N, Saftig P, Uchiyama Y.: **Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease).** *Am J Pathol*. 2005 Dec;167(6):1713-28.
- 130) Scott SV, Hefner-Gravink A, Morano KA, Noda T, Ohsumi Y, Klionsky DJ.: **Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12304-8.
- 131) Shieh HL, Chiang HL.: **In vitro reconstitution of glucose-induced targeting of fructose-1, 6-bisphosphatase into the vacuole in semi-intact yeast cells.** *J Biol Chem*. 1998 Feb 6;273(6):3381-7.
- 132) Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Schulte-Hermann R.: **Autophagocytosis and programmed cell death.** In : Klionsky DJ Editor. *Autophagy*. Georgetown, TX: Landes Bioscience; 2004. p287-303.
- 133) Klionsky DJ (Ed) 2004. **Autophagy**. Georgetown, TX: Landes Bioscience
- 134) Yoshimori T.: **Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 9;313(2):453-8. Review
- 135) Klionsky DJ, Emr SD.: **Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation.** *Science*. 2000 Dec 1;290(5497):1717-21.
- 136) Shintani T, Klionsky DJ.: **Autophagy in health and disease: a double-edged sword.** *Science*. 2004 Nov 5;306(5698):990-5. Review.
- 137) Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P.: **Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells.** *Cell Res*. 2010 Jul;20(7):748-62.
- 138) Majeski AE, Dice JF.: **Mechanisms of chaperone-mediated autophagy.** *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Dec;36(12):2435-44.
- 139) Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P.: **At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins.** *Trends Cell Biol*. 2003 Mar;13(3):137-45. Review.
- 140) Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D.: **Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy.** *Science*. 2004 Aug 27;305(5688):1292-5.

- 141) Martinez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM.: **Protein degradation and aging.** *Exp Gerontol.* 2005 Aug-Sep;40(8-9):622-33. Review.
- 142) Farré JC, Subramani S.: **Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process.** *Trends Cell Biol.* 2004 Sep;14(9):515-23.
- 143) Glaumann H, Ahlberg J, Berkenstam A, Henell F.: **Rapid isolation of rat liver secondary lysosomes-autophagic vacuoles-following chloroquine administration.** *Exp Cell Res.* 1986 Mar;163(1):151-8.
- 144) Seglen PO, Bohley P.: **Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms.** *Experientia.* 1992 Feb 15;48(2):158-72. Review.
- 145) Ohsumi Y, Mizushima N.: **Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy.** *Semin Cell Dev Biol.* 2004 Apr;15(2):231-6. Review. No abstract available.
- 146) Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A.: **A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation.** *Nat Cell Biol.* 2009 Dec;11(12):1433-7.
- 147) Dunn WA Jr.: **Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole.** *J Cell Biol.* 1990 Jun;110(6):1935-45.
- 148) Glaumann H, Ericsson JL, Marzella L.: **Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles.** *Int Rev Cytol.* 1981;73:149-82. Review. No abstract available.
- 149) Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N.: **Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy.** *Mol Biol Cell.* 2009 Apr;20(7):1981-91
- 150) Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH.: **ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery.** *Mol Biol Cell.* 2009 Apr;20(7):1992-2003.
- 151) Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N.: **Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG.** *Mol Biol Cell.* 2008 Dec;19(12):5360-72
- 152) Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S, Zhong Q.: **Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 9;105(49):19211-6.
- 153) Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T.: **LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.** *EMBO J.* 2000 Nov 1;19(21):5720-8. Erratum in: *EMBO J.* 2003 Sep 1;22(17):4577.
- 154) Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T.: **Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate.** *J Cell Sci.* 2003 May 1;116 (Pt 9):1679-88.
- 155) Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T.: **The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy.** *Mol Biol Cell.* 2008 May;19(5):2092-100.
- 156) Ravikumar B, Imarisio S, Sarkar S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC.: **Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease.** *J Cell Sci.* 2008 May 15;121(Pt 10):1649-60.
- 157) George MD, Baba M, Scott SV, Mizushima N, Garrison BS, Ohsumi Y, Klionsky DJ.: **Apg5p functions in the sequestration step in the cytoplasm-to-vacuole targeting and macroautophagy pathways.** *Mol Biol Cell.* 2000 Mar;11(3):969-82.
- 158) Noda T, Kim J, Huang WP, Baba M, Tokunaga C, Ohsumi Y, Klionsky DJ.: **Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways.** *J Cell Biol.* 2000 Feb 7;148(3):465-80.
- 159) Guan J, Stromhaug PE, George MD, Habibzadegah-Tari P, Bevan A, Dunn WA Jr, Klionsky DJ.: **Cvt18/Gsa12 is required for cytoplasm-to-vacuole transport, pexophagy, and autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.** *Mol Biol Cell.* 2001 Dec;12(12):3821-38.

- 160) Webber JL, Tooze SA.: **Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP.** *EMBO J.* 2010 Jan 6;29(1):27-40.
- 161) Codogno P, Meijer AJ.: **Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death.** *Cell Death Differ.* 2005 Nov;12 Suppl 2:1509-18. Review.
- 162) Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S, Klionsky DJ.: **In search of an "autophagometer".** *Autophagy.* 2009 Jul;5(5):585-9.
- 163) Atlashkin V, Kreykenbohm V, Eskelinen EL, Wenzel D, Fayyazi A, Fischer von Mollard G.: **Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8.** *Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(15):5198-207.
- 164) Wang CW, Stromhaug PE, Shima J, Klionsky DJ.: **The Ccz1-Mon1 protein complex is required for the late step of multiple vacuole delivery pathways.** *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):47917-27.
- 165) Smith GR, Contreras-Moreira B, Zhang X, Bates PA.: **A link between sequence conservation and domain motion within the AAA+ family.** *J Struct Biol.* 2004 Apr-May;146(1-2):189-204.
- 166) Yogalingam G, Pendergast AM.: **Abl kinases regulate autophagy by promoting the trafficking and function of lysosomal components.** *J Biol Chem.* 2008 Dec 19;283(51):35941-53.
- 167) Noda T, Ohsumi Y.: **TOR, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast.** *J Biol Chem.* 1998 Feb 13;273(7):3963-6.
- 168) Pattingre S, Bauvy C, Levade T, Levine B, Codogno P.: **Ceramide-induced autophagy: to junk or to protect cells?** *Autophagy.* 2009 May;5(4):558-60.
- 169) Li DD, Wang LL, Deng R, Tang J, Shen Y, Guo JF, Wang Y, Xia LP, Feng GK, Liu QQ, Huang WL, Zeng YX, Zhu XF.: **The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells.** *Oncogene.* 2009 Feb 12;28(6):886-98.
- 170) Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL.: **FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells.** *Cell Metab.* 2007 Dec;6(6):472-83.
- 171) Frisch SM, Francis H.: **Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis.** *J Cell Biol.* 1994 Feb;124(4):619-26.
- 172) Frisch SM, Ruoslahti E.: **Integrins and anoikis.** *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Oct;9(5):701-6.
- 173) Frisch SM, Screaton RA.: **Anoikis mechanisms.** *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Oct;13(5):555-62.
- 174) Goel HL, Moro L, Murphy-Ullrich JE, Hsieh CC, Wu CL, Jiang Z, Languino LR.: **Beta1 integrin cytoplasmic variants differentially regulate expression of the antiangiogenic extracellular matrix protein thrombospondin 1.** *Cancer Res.* 2009 Jul 1;69(13):5374-82.
- 175) Goel HL, Languino LR.: **Integrin signaling in cancer.** *Cancer Treat Res.* 2004;119:15-31.
- 176) Goel HL, Li J, Kogan S, Languino LR.: **Integrins in prostate cancer progression.** *Endocr Relat Cancer.* 2008 Sep;15(3):657-64.
- 177) Giancotti FG.: **Complexity and specificity of integrin signalling.** *Nat Cell Biol.* 2000 Jan;2(1):E13-4.
- 178) Parsons JT.: **Focal adhesion kinase: the first ten years.** *J Cell Sci.* 2003 Apr 15;116(Pt 8):1409-16. Review.
- 179) Kurenova E, Xu LH, Yang X, Baldwin AS Jr, Craven RJ, Hanks SK, Liu ZG, Cance WG.: **Focal adhesion kinase suppresses apoptosis by binding to the death domain of receptor-interacting protein.** *Mol Cell Biol.* 2004 May;24(10):4361-71.
- 180) Yeatman TJ.: **A renaissance for SRC.** *Nat Rev Cancer.* 2004 Jun;4(6):470-80. Review. No abstract available
- 181) Giannoni E, Buricchi F, Grimaldi G, Parri M, Cialdai F, Taddei ML, Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P.: **Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival.** *Cell Death Differ.* 2008 May;15(5):867-78.
- 182) Giannoni E, Fiaschi T, Ramponi G, Chiarugi P.: **Redox regulation of anoikis resistance of metastatic prostate cancer cells: key role for Src and EGFR-mediated pro-survival signals.** *Oncogene.* 2009 May 21;28(20):2074-86.



- 183) Martin SS, Leder P.: **Human MCF10A mammary epithelial cells undergo apoptosis following actin depolymerization that is independent of attachment and rescued by Bcl-2.** *Mol Cell Biol.* 2001 Oct;21(19):6529-36.
- 184) Lee YJ, Streuli CH.: **Extracellular matrix selectively modulates the response of mammary epithelial cells to different soluble signaling ligands.** *J Biol Chem.* 1999 Aug 6;274(32):22401-8.
- 185) Wang P, Gilmore AP, Streuli CH.: **Bim is an apoptosis sensor that responds to loss of survival signals delivered by epidermal growth factor but not those provided by integrins.** *J Biol Chem.* 2004 Oct 1;279(40):41280-5
- 186) Wajant H.: **The Fas signaling pathway: more than a paradigm.** *Science.* 2002 May 31;296(5573):1635-6.
- 187) Frisch SM.: **Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis.** *Curr Biol.* 1999 Sep 23;9(18):1047-9.
- 188) Rytömaa M, Martins LM, Downward J.: **Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis.** *Curr Biol.* 1999 Sep 23;9(18):1043-6.
- 189) Aoudjit F, Vuori K.: **Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis.** *J Cell Biol.* 2001 Feb 5;152(3):633-43.
- 190) Gilley J, Coffey PJ, Ham J.: **FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons.** *J Cell Biol.* 2003 Aug 18;162(4):613-22.
- 191) Zhu W, Bijur GN, Styles NA, Li X.: **Regulation of FOXO3a by brain-derived neurotrophic factor in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells.** *Brain Res Mol Brain Res.* 2004 Jul 5;126(1):45-56.
- 192) Enders A, Bouillet P, Puthalakath H, Xu Y, Tarlinton DM, Strasser A.: **Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells.** *J Exp Med.* 2003 Oct 6;198(7):1119-26.
- 193) Green DR.: **Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors.** *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):1-4. Review. No abstract available
- 194) Martinou JC, Green DR.: **Breaking the mitochondrial barrier.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jan;2(1):63-7.
- 195) Valentijn AJ, Metcalfe AD, Kott J, Streuli CH, Gilmore AP.: **Spatial and temporal changes in Bax subcellular localization during anoikis.** *J Cell Biol.* 2003 Aug 18;162(4):599-612.
- 196) Bouillet P, Strasser A.: **BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death.** *J Cell Sci.* 2002 Apr 15;115(Pt 8):1567-74.
- 197) Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY, Gao S, Puigserver P, Brugge JS.: **Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment.** *Nature.* 2009 Sep 3;461(7260):109-13.
- 198) Chuang HC, Kardosh A, Gaffney KJ, Petasis NA, Schönthal AH.: **COX-2 inhibition is neither necessary nor sufficient for celecoxib to suppress tumor cell proliferation and focus formation *in vitro*.** *Mol Cancer.* 2008 May 16;7:38.
- 199) Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS.: **Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis.** *Nat Cell Biol.* 2003 Aug;5(8):733-40.
- 200) Neiva KG, Zhang Z, Miyazawa M, Warner KA, Karl E, Nör JE.: **Cross talk initiated by endothelial cells enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling.** *Neoplasia.* 2009 Jun;11(6):583-93.
- 201) Rul W, Zugasti O, Roux P, Peyssonnaud C, Eychene A, Franke TF, Lenormand P, Fort P, Hibner U.: **Activation of ERK, controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, is required for anoikis.** *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Nov;973:145-8.
- 202) Kulich SM, Horbinski C, Patel M, Chu CT.: **6-Hydroxydopamine induces mitochondrial ERK activation.** *Free Radic Biol Med.* 2007 Aug 1;43(3):372-83.
- 203) Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S.: **The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 7;102(23):8204-9

- 204) Tasdemir E, Maiuri MC, Orhon I, Kepp O, Morselli E, Criollo A, Kroemer G.: **p53 represses autophagy in a cell cycle-dependent fashion.** *Cell Cycle*. 2008 Oct;7(19):3006-11
- 205) Stevens C, Lin Y, Harrison B, Burch L, Ridgway RA, Sansom O, Hupp T.: **Peptide combinatorial libraries identify TSC2 as a death-associated protein kinase (DAPK) death domain-binding protein and reveal a stimulatory role for DAPK in mTORC1 signaling.** *J Biol Chem*. 2009 Jan 2;284(1):334-44.
- 206) Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, Kimchi A.: **Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL.** *Autophagy*. 2009 Jul;5(5):720-2
- 207) Rodríguez-Hernández A, Cordero MD, Salviati L, Artuch R, Pineda M, Briones P, Gómez Izquierdo L, Cotán D, Navas P, Sánchez-Alcázar JA.: **Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy.** *Autophagy*. 2009 Jan;5(1):19-32.
- 208) Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B.: **Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1.** *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):672-6.
- 209) Moscat J, Diaz-Meco MT.: **p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer.** *Cell*. 2009 Jun 12;137(6):1001-4. Review.
- 210) Carew JS, Medina EC, Esquivel JA 2nd, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, Zhang H, Huang P, Mita AC, Mita MM, Giles FJ, Nawrocki ST.: **Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation.** *J Cell Mol Med*. 2010 Oct;14(10):2448-59.
- 211) Lomonaco SL, Finniss S, Xiang C, Decarvalho A, Umansky F, Kalkanis SN, Mikkelsen T, Brodie C.: **The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells.** *Int J Cancer*. 2009 Aug 1;125(3):717-22.
- 212) Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama H, Morishita Y, Komuro A, Kano MR, Sugimoto K, Miyazono K.: **Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells.** *Cancer Res*. 2009 Dec 1;69(23):8844-52
- 213) Gaut JR, Hendershot LM.: **The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum.** *Curr Opin Cell Biol*. 1993 Aug;5(4):589-95. Review.
- 214) Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M.: **Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes.** *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(4):525-32.
- 215) Kaufman RJ, Scheuner D, Schröder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM.: **The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Jun;3(6):411-21. Review.
- 216) Ron D, Walter P.: **Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jul;8(7):519-29.
- 217) Cnop M, Ladriere L, Hekerman P, Ortis F, Cardozo AK, Dogusan Z, Flamez D, Boyce M, Yuan J, Eizirik DL.: **Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis.** *J Biol Chem*. 2007 Feb 9;282(6):3989-97.
- 218) Nadanaka S, Okada T, Yoshida H, Mori K.: **Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress.** *Mol Cell Biol*. 2007 Feb;27(3):1027-43.
- 219) Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D.: **Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response.** *Nat Cell Biol*. 2000 Jun;2(6):326-32.
- 220) Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH.: **XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response.** *Mol Cell Biol*. 2003 Nov;23(21):7448-59.
- 221) Kim I, Shu CW, Xu W, Shiau CW, Grant D, Vasile S, Cosford ND, Reed JC.: **Chemical biology investigation of cell death pathways activated by endoplasmic reticulum stress reveals cytoprotective modulators of ASK1.** *J Biol Chem*. 2009 Jan 16;284(3):1593-603.
- 222) Hollien J, Weissman JS.: **Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response.** *Science*. 2006 Jul 7;313(5783):104-7.

- 223) Lisbona F, Rojas-Rivera D, Thielen P, Zamorano S, Todd D, Martinon F, Glavic A, Kress C, Lin JH, Walter P, Reed JC, Glimcher LH, Hetz C.: **BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha.** *Mol Cell.* 2009 Mar 27;33(6):679-91.



# 3

## LE RELAZIONI PERICOLOSE.

### Apoptosi, autofagia ed ERS.

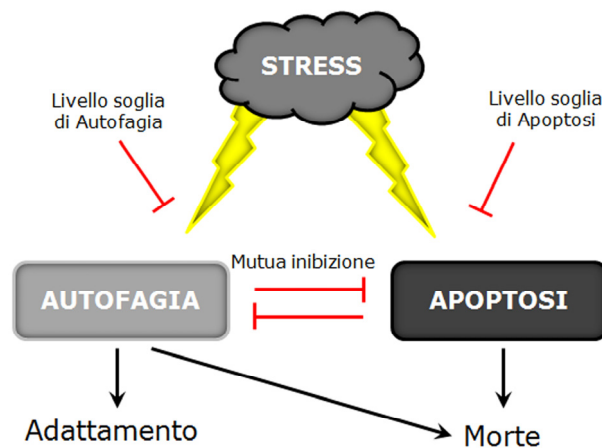
**83** I due processi auto-distruttivi che le cellule sono in grado di attivare, ossia l'autofagia e l'apoptosi, hanno da sempre catturato l'immaginazione degli scienziati. L'apoptosi rimane la forma di morte cellulare programmata meglio descritta e coinvolge l'attivazione di enzimi catabolici, soprattutto proteasi, in cascate di segnalazione che portano ad una rapida demolizione di organelli e strutture cellulari [224]. Durante l'autofagia invece, parti del citoplasma e organelli intracellulari sono sequestrate all'interno di caratteristici vacuoli autofagici (gli autofagosomi) e consegnati ai lisosomi per la degradazione. L'autofagia è un processo altamente regolato che può coinvolgere il turnover di vecchi organelli e proteine mal funzionanti in modo generalizzato oppure agire selettivamente su specifiche strutture bersaglio. Eventi molecolari che portano alla degradazione di mitocondri (mitofagia), perossisomi (pexofagia) e ribosomi sono stati identificati in lievito e questa selettività è conservata in cellule di mammifero, dove sono stati segnalati persino bersagli costituiti da molecole ad attività enzimatica (catalasi), aggregati proteici e porzioni di ER [225].

Così, apoptosi e autofagia costituiscono processi attraverso i quali tutto il superfluo, ossia organelli e cellule danneggiati o invecchiati, sono rimossi. Al di là di questa funzione omeostatica l'autofagia è anche utilizzata dalle cellule per adattare il loro metabolismo in condizioni di carenza di nutrienti extracellulari o in seguito ad una diminuita concentrazione intracellulare di metaboliti, che derivano dalla perdita di segnalazione di un fattore di crescita (spesso a governare l'assorbimento dei nutrienti). Dal catabolismo delle macromolecole, l'autofagia genera substrati metabolici in grado di soddisfare le esigenze bioenergetiche delle cellule e, quindi, permettere la sintesi proteica [226].



La relazione funzionale tra apoptosi e autofagia è complessa nel senso che, in diversi scenari, l'autofagia rappresenta un adattamento che evita la morte cellulare (e di fatto sopprime l'apoptosi) mentre in altri contesti cellulari, l'autofagia rappresenta una via alternativa alla morte cellulare apoptotica: è per questo **definita morte cellulare autofagica (o morte cellulare di tipo II)** [227]. In termini generali, sembra che stimoli simili possano indurre sia apoptosi che autofagia.

Una combinazione dei percorsi autofagici e apoptotici può a volte essere rilevata, in risposta a stimoli comuni, anche se, in molti altri casi, i due percorsi si escludono a vicenda, forse per la presenza di soglie variabili per entrambi i processi o come risultato di una "decisione" della cellula (figura 3). Alcuni percorsi che collegano il macchinario apoptotico e quello autofagico sono stati decifrati a livello molecolare.



**Figura 3. La relazione tra apoptosi e autofagia.**

Fattori di stress simili possono indurre sia apoptosi che autofagia in una maniera dipendente dal contesto. È possibile che soglie di sensibilità diverse, la cui esatta natura rimane da stabilire, possano indicare se uno dei processi andrà a compimento. In alternativa, la scelta tra apoptosi e autofagia è influenzata dal fatto che i due processi catabolici presentano un certo grado di inibizione reciproca. In alcuni casi, un fenotipo misto di apoptosi e autofagia può

essere rilevato a livello di singola cellula. Anche se la maggior parte dei processi autofagici permettono alle cellule di adattarsi a situazioni di stress, un'autofagia massiccia può anche ucciderle.

### L'autofagia quando l'apoptosi viene inibita.

**84**

La via intrinseca dell'apoptosi ha inizio con la **Permeabilizzazione della Membrana Mitocondriale Esterna (MOMP)**. Se la MOMP è limitata a una frazione dei mitocondri questo si tradurrà nella rimozione autofagica selettiva dei mitocondri depolarizzati, evitando la morte cellulare. L'efficacia del percorso autofagico potrebbe modificare il livello soglia, superato il quale la MOMP costituirebbe un evento irreparabile, dunque letale.

Bax e Bak sono due membri multidominio della famiglia Bcl-2 necessari per la formazione di pori responsabili della transizione di permeabilità della membrana mitocondriale. Questo implica come la famiglia di proteine Bcl-2 (in particolare Bax e Bak) possa avere ruolo diretto o indiretto nella regolazione autofagica che è indipendente dal suo ruolo nel modulare l'apoptosi.

In altri contesti cellulari, diversi tipi di perturbazioni nel meccanismo apoptotico sono state riportati per indurre autofagia di tipo selettivo.

L'inibizione chimica delle caspasi con Z-VAD-FMK in cellule L929 di topo promuove il degrado autofagico selettivo dell'enzima detossificante catalasi, con un accumulo drammatico di ROS, perossidazione dei lipidi, perdita di integrità della membrana cellulare e morte. Il tutto può essere inibito dalla deplezione di ATG7 e Beclina-1 [228, 229]. Quando le cellule sono esposte a segnali di stress che causano una diminuzione intracellulare delle concentrazioni di metaboliti, l'autofagia che si sviluppa dall'inibizione dell'apoptosi protegge le cellule dalla morte. Attraverso il degrado macromolecolare, infatti, l'autofagia reintegra le riserve energetiche della cellula e, quindi, previene una catastrofe bioenergetica la quale, altrimenti, culminerebbe nella morte [230].

85

***Apoptosi a seguito di inibizione dell'autofagia.*** Quando cellule HeLa o cellule tumorali HCT116 sono coltivate in assenza di sostanze nutritive, l'autofagia viene rapidamente indotta per riciclare metaboliti essenziali, come lipidi e aminoacidi, e alimentare così il macchinario bioenergetico. In queste circostanze, l'inibizione del processo autofagico, comporta l'innescare di un programma di una morte cellulare accelerata, che si manifesta con le caratteristiche di un'apoptosi (condensazione della cromatina, MOMP e attivazione delle caspasi [231]). Questa morte cellulare può essere ritardata dalla deplezione di Bax e Bak o dall'inibizione delle caspasi, indicando che si tratta indiscutibilmente di morte apoptotica. Il fenotipo delle cellule è profondamente influenzato dalla fase di inibizione dell'autofagia:

- quando l'autofagia è bloccata in una fase iniziale, a seguito di inibizione della Beclina-1 o di hVps34, nessun vacuolo autofagico si ritrova nelle cellule che subiscono una tipica morte di tipo I;
- al contrario, quando viene bloccata la fusione tra fagosomi e lisosomi con l'aggiunta di inibitori lisosomiali (come la cloroquina o l'inibitore delle ATPasi vacuolare bafilomicina A) allora si assiste ad un accumulo di vacuoli autofagici e le cellule manifestano una morfologia mista tra la morte di tipo I e II, prima di soccombere definitivamente [231].

Questo dimostra che l'inibizione dell'autofagia, sia in fasi precoci o tardive del processo, può portare ad apoptosi, a causa della incapacità delle cellule di adattarsi alla deprivazione di nutrienti. Inoltre, dimostra come la vacuolizzazione autofagica non è sempre il risultato di una maggiore attività autofagica ma può anche derivare dal fallimento nel recupero dei nutrienti.

Esperimenti *in vivo* hanno confermato che l'inattivazione di geni Atg può causare la morte cellulare. La delezione neurone-specifica di Atg5 o Atg7 comporta l'accumulo di aggregati proteici nel cervello con l'induzione di morte apoptotica dei neuroni in varie aree cerebrali e una rapida neurodegenerazione. Nei modelli animali di Malattia di Huntington, la stimolazione del percorso autofagico ha dimostrato di proteggere le cellule contro l'apoptosi indotta da aggregati proteici attraverso l'intervento delle proteine LC3, NBR1 e p62 [232]. I meccanismi attraverso i quali l'inibizione di autofagia può favorire la morte delle cellule, non sono del tutto chiari. In

modo sottile, l'inibizione dell'autofagia potrebbe sovvertire la capacità delle cellule di rimuovere organelli danneggiati o proteine *unfolded* che, a sua volta, favorirebbe l'apoptosi o anche altri tipi di morte cellulare. Per esempio, cellule tumorali in cui sia l'apoptosi che i programmi autofagici sono soppressi, muoiono per necrosi [233].

### Citoprotezione indotta da autofagia.

**86** La citoprotezione indotta da autofagia è il risultato delle funzioni di un'autofagia selettiva in cellule eucariotiche, combinate agli effetti inibitori che l'autofagia esercita sull'apoptosi in condizioni di stress.

**87** *La rimozione di aggregati proteici mediata da autofagia.* L'autofagia basale tipica delle cellule non sottoposte a stress è di fondamentale importanza per i neuroni, perché queste cellule non si replicano e non possono ridistribuire la quantità di rifiuti cellulari che si verifica normalmente durante la divisione cellulare. Infatti, topi mutanti in cui ATG5 o ATG7 è deletato, sviluppano neurodegenerazione, con accumulo di aggregati proteici [234]. Tra i substrati proteici intracellulari eliminati dal percorso autofagico ricordiamo:

- la **huntingtina** mutante (responsabile della malattia di Huntington), proteine mutate in alcune atassie spinocerebellari,
- isoforme di  **$\alpha$ -sinucleina**, che sono mutate in forme familiari della malattia di Parkinson.

La stimolazione dell'autofagia da parte di rapamicina o il suo analogo CCI-779 (due inibitori di mTOR) riduce i livelli di aggregati solubili attenuando la loro tossicità nelle cellule, così come accade in modelli transgenici di topo e *D. melanogaster* per la malattia di Huntington [235].

**88** *Rimozione di organelli dannosi mediata da autofagia.* L'induzione di autofagia può avere un generale effetto inibitorio apoptotico dopo la rimozione di aggregati proteici potenzialmente dannosi (e quindi apoptogenici). Per esempio, il pre-trattamento di cellule tumorali con rapamicina (che induce autofagia) può causare una diminuzione della massa mitocondriale di ~50%, riducendo la suscettibilità delle cellule a stimoli apoptotici MOMP-dipendente. In questo sistema, l'inibizione di autofagia per perdita di funzione di ATG7 sopprime l'azione citoprotettiva della rapamicina *in vitro* [236]. Dati simili sono stati ottenuti *in vivo* in *D. melanogaster*. Mentre il pre-trattamento con rapamicina riduce l'effetto letale della sovrapproduzione di ROS e il danno mitocondriale a seguito di somministrazione di un insetticida (paraquat), presumibilmente diminuendo la massa mitocondriale, una mutazione con perdita di funzione di ATG1 abolisce l'effetto benefico della rapamicina [236].

La mitofagia può essere particolarmente importante per inibire la morte cellulare. Questo si verifica in modelli cellulari a seguito del trattamento con agenti quali actinomicina D o staurosporina ed in presenza di inibitori delle



caspasi, condizione in cui i mitocondri che subiscono una MOMP (e sono irreversibilmente danneggiati), vengono rimossi dall'attività autofagica.

**89** *Autofagia e arresto del ciclo cellulare durante l'inibizione della morte cellulare.* L'inibitore della chinasi ciclina-dipendente p27 ha dimostrato di svolgere un ruolo critico tra l'induzione di autofagia e l'inibizione della apoptosi in risposta all'esaurimento degli elementi nutritivi. Lo stress metabolico risultante dalla riduzione del rapporto ATP:ADP, con conseguente aumento delle concentrazioni di AMP, stimolano l'attività di un importante sensore energetico, le AMPK, tra le quali la **Serina/Treonina Chinasi B1 di Fegato (LKB1)**. La fosforilazione di p27 dipendente dall'attività di LKB1, ne inibisce l'attività, permettendo alle cellule di sopravvivere alla deprivazione di nutrienti e agli stress metabolici attraverso l'autofagia [237].

### Il suicidio cellulare mediato dalla Autofagia.

**90** L'autofagia può proteggere le cellule ma anche mediare la morte cellulare in specifiche circostanze. Come l'autofagia riesca ad uccidere una cellula può essere spiegato o con il diretto potenziale autodistruttivo di una massiccia attivazione autofagica o, in alternativa, dalla realizzazione di collegamenti tra il processo autofagico e segnali pro-apoptotici.

**91** *L'autofagia come killer.* Come descritto finora, l'autofagia può eliminare gran parte del citoplasma e degli organelli in una cellula. Questo, oltre una certa soglia, potrebbe causare un'irreversibile atrofia cellulare con un conseguente crollo delle funzioni vitali. In effetti, durante un'autofagia conclamata, il volume occupato dai vacuoli autofagici può essere paragonabile a quello del citoplasma "libero" e degli organelli in esso dislocati [238]: è quindi plausibile che, una tale situazione di degenerazione, possa condurre alla morte cellulare.

Nelle ghiandole salivari di *D. melanogaster* è stato riscontrato un tipico fenotipo autofagico, seguito dalla frammentazione apoptotica del DNA. In questo modello, l'espressione dell'inibitore di caspasi p35 o mutazioni con perdita di funzione di una caspasi o di Apaf1, impedisce parzialmente l'innescamento del processo apoptotico. Questo suggerisce che, anche se l'apoptosi è parte dei meccanismi attraverso i quali le cellule sono infine distrutte, l'autofagia può mediare la morte cellulare come un vero e proprio meccanismo effettore.

L'uccisione delle cellule attraverso l'autofagia è stata documentata in alcuni sistemi modello *in vivo*. La sovra-espressione transgenica di ATG1 in *D. melanogaster* causa una riduzione in dimensioni della cellula che può essere bloccata dalla delezione di ATG3 o ATG8a [239].

92

***L'autofagia come innesco di apoptosi o necrosi.***

In altri scenari, l'autofagia si sviluppa come risposta primaria a stimoli di stress e poi innesca l'apoptosi o una morte cellulare necrotica. Per esempio, le glicoproteine del capsido del virus HIV-1 che interagiscono con cellule T esprimenti CD4/CXCR4, inducono prima una risposta autofagica e poi apoptosi [240].

L'induzione di autofagia può anche causare morte delle cellule per necrosi come accade, nell'esempio già citato, di degradazione della catalasi. La catalasi, un enzima chiave del meccanismo di difesa cellulare contro gli stress ossidativi, è selettivamente eliminata durante la morte

autofagica innescata da vari stimoli stressogeni (tranne la deprivazione di nutrienti). Tuttavia, la progressiva deplezione della catalasi, reindirizza il percorso di morte delle cellule verso la necrosi, che potrebbe essere prevenuta sia con l'inibizione dell'autofagia che con l'uso di antiossidanti.

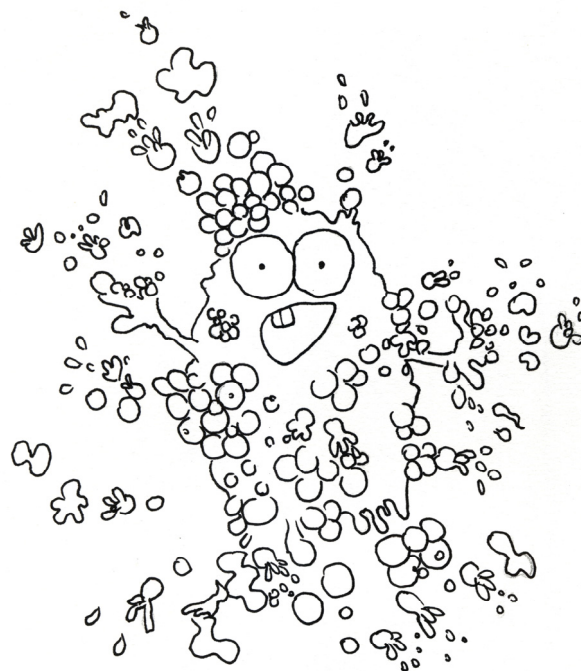
Così, la catalasi potrebbe essere paragonabile ad un citoprotettore essenziale, l'eliminazione del quale per autofagia causerebbe un irreversibile danno cellulare e, quindi, la morte. È interessante notare come nello stesso sistema, l'autofagia indotta da deprivazione di nutrienti, non porta all'eliminazione della catalasi né alla morte cellulare, indicando che il degrado di catalasi è fortemente legato alla morte cellulare e dipendente dal segnale a monte che ha innescato l'autofagia [229].

93

***L'autofagia come un guardiano del genoma?***

La scoperta che la Beclina-1 è un gene soppressore dei tumori aploinsufficiente non implica necessariamente che una perdita di funzione di tale gene comporti una mancata morte cellulare a causa di un processo autofagico compromesso. Piuttosto, la funzione soppressiva della Beclina-1 potrebbe essere legata alla capacità del meccanismo autofagico di proteggere le cellule da un danno al DNA. Quindi, una ridotta autofagia potrebbe innescare:

- **eventi oncogenici**, come aberrazioni cromosomiche e mancata regolazione del turnover dei centrosomi (che si traduce in una instabilità cromosomica);
- **compromettere la funzionalità dei mitocondri** (con aumento della produzione di ROS e conseguente danno al DNA mediato dai ROS).



**Cellula in necrosi**

In entrambi i casi si tratta di eventi che potrebbero sì indirizzare una cellula verso la morte ma, paradossalmente, promuovere anche una trasformazione maligna. Infatti, la delezione di un allele di BECN1 o la perdita di funzione di ATG5 non consente alla cellula di riparare i danni al DNA dopo uno stress metabolico, con conseguente instabilità cromosomica sia numerica che strutturale [241].

Quindi, l'inattivazione di uno o più geni autofagici, con soppressione dei meccanismi citoprotettivi, può promuovere la resistenza alla morte cellulare.

### Apoptosi e Autofagia: comuni bersagli a monte.

**94** Diverse vie di trasduzione del segnale, attivate da comuni stress cellulari e più specifiche vie di segnalazione, possono innescare sia l'autofagia che l'apoptosi.

**95** *Mediatori generali di stress: ROS, cèramide e Ca<sup>2+</sup>.* I ROS possono favorire la transizione della permeabilità mitocondriale a carattere pro-apoptotico nonché stimolare l'attività proteolitica di Atg4, innescando l'autofagia [242].

Le cèramidi (degli sfingolipidi) sono importanti induttori di apoptosi che agiscono attraverso la via intrinseca, ma possono anche stimolare l'autofagia [243]. È interessante notare che un altro sfingolipide, la sfingosina-1 fosfato, è un potente inibitore dell'apoptosi indotta da cèramide, ma è in grado di innescare il macchinario autofagico, indicando come le caratteristiche dell'ambiente intracellulare possano contribuire alla scelta tra i due processi.

Incrementi delle concentrazioni di ioni Ca<sup>2+</sup> nel citosol, l'efflusso di Ca<sup>2+</sup> dal reticolo rugoso e il sovraccarico di Ca<sup>2+</sup> nei mitocondri, costituiscono importanti segnali pro-apoptotici. Inoltre, aumenti delle concentrazioni citosoliche di calcio possono innescare l'autofagia, presumibilmente attivando la **Chinasi-β della Chinasi Calcio Calmodulina-dipendente (CaMKKβ)**. Tale chinasi attiva la AMPK, che inibisce mTOR, in modo da innescare l'autofagia. L'aumento di ioni calcio nel citosol è anche un forte stimolatore della calpaina, la cui attività contribuisce sia all'apoptosi che all'autofagia [244]. Dunque, percorsi che inducono la morte apoptotica delle cellule e l'autofagia possono intersecarsi a livello di segnali intracellulari comuni.

**96** *Giunzioni tra reticolo endoplasmatico e mitocondri.* Per decenni i microscopisti elettronici hanno osservato che organelli come il reticolo endoplasmatico (ER) ed i mitocondri sono fisicamente collegati, individuando nelle zone di contatto strutture elettrondense [226]. Recentemente è stato identificato un complesso proteico a cui ci si riferisce con il nome di **Struttura di Incontro tra ER e Mitocondri (ERMES)**. Nel lievito, ERMES è un complesso proteico che funge da cerniera tra i due organelli. Rispetto ai lieviti, le cellule di mammifero sembrano avere un

interfaccia di connessione ER-mitocondri più complicato, mediato da complessi proteici diversi. L'interazione chaperone-mediata tra la **Porina Canale 1 mitocondriale Voltaggio-Dipendente e Anione-selettiva (VDAC1)** e l'IP(3)R, così come la dimerizzazione omotipica di **Mitofusina 2 (MFN2)**, una GTPasi principalmente localizzata sulla membrana mitocondriale esterna, stabilizza l'interazione tra i mitocondri adiacenti, favorendo la loro fusione. MFN2 si localizza anche sull'ER, regolandone morfologia e omeostasi del calcio luminale, nonché il legame tra ER e mitocondri [245, 246].

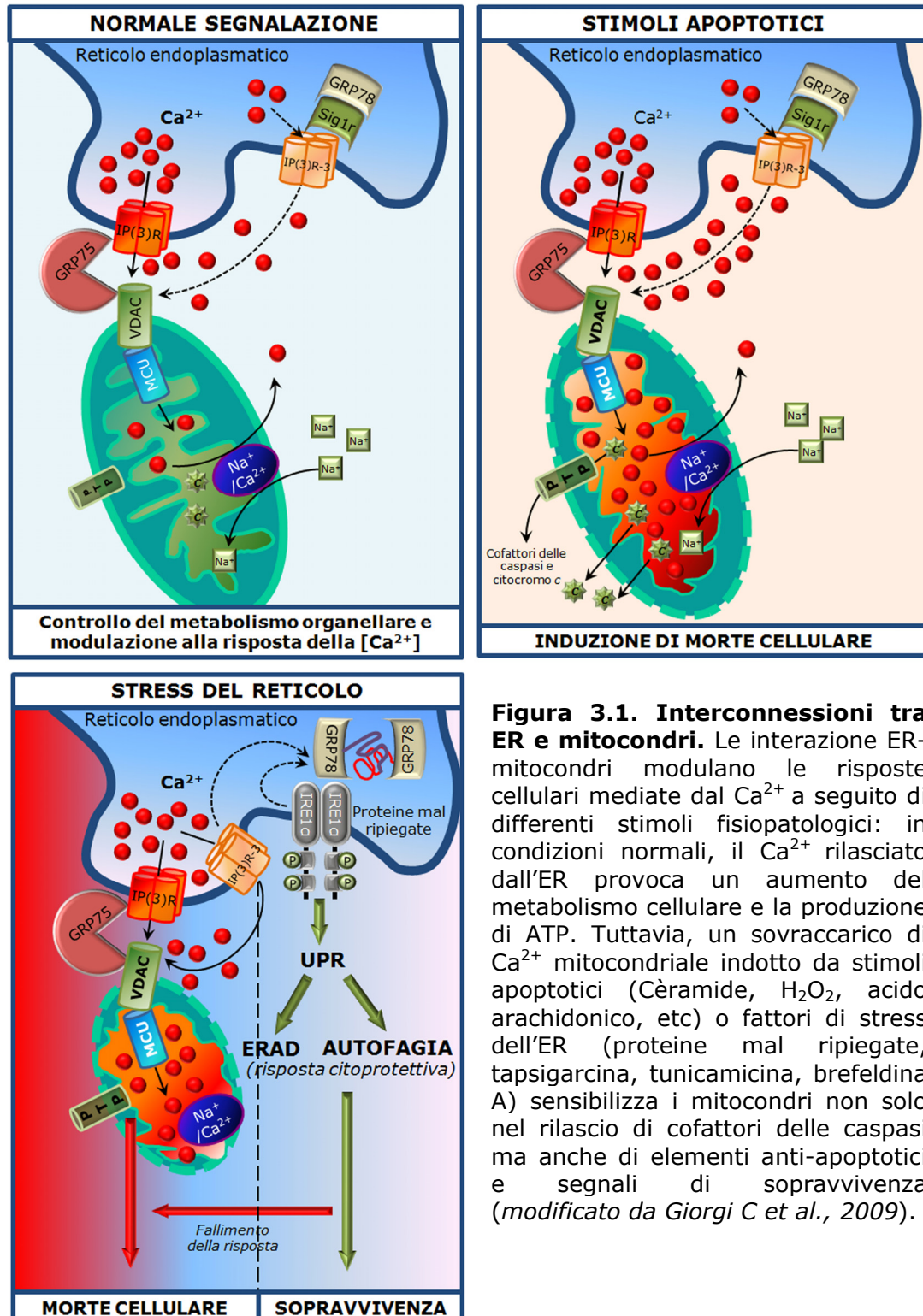
Componenti aggiuntivi, come ad esempio la **Proteina 2 implicata nel Carico-Smistamento (PACS2)** e la **Proteina 1 correlata alla Dinamina (Drp1)** possono regolare questo collegamento in maniera indiretta [247] (figura 3.1). In uno scenario estremo, la trasmissione massiccia di  $\text{Ca}^{2+}$  nei mitocondri comporta un sovraccarico per l'organello e l'innescò della morte cellulare sia caspasi-dipendente che caspasi-indipendente. Una più raffinata trasmissione, regolata dalla famiglia Bcl-2, può influenzare dimensione e lunghezza delle giunzioni ERMES e la disponibilità di citocromo-*c* per il suo rilascio attraverso la membrana esterna mitocondriale [248].

In risposta agli agenti apoptotici e la regolazione di Bcl-2, la distanza tra l'ER e mitocondri si restringe, indicando una regolazione dinamica delle giunzioni inter-organellari. In cellule sane, il contatto ER-mitocondri assicura la propagazione di segnali connessi al  $\text{Ca}^{2+}$  dall'IP(3)R ai mitocondri, per coordinare la produzione di ATP. Un accoppiamento lasso tra ER e mitocondri (quando il divario tra gli organelli diviene sufficientemente ampio per isolare i mitocondri dalla lenta migrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  in uscita dal reticolo) sopprime la propagazione del segnale  $\text{Ca}^{2+}$ , mettendo a rischio il controllo del metabolismo mitocondriale dipendente da questo ione.

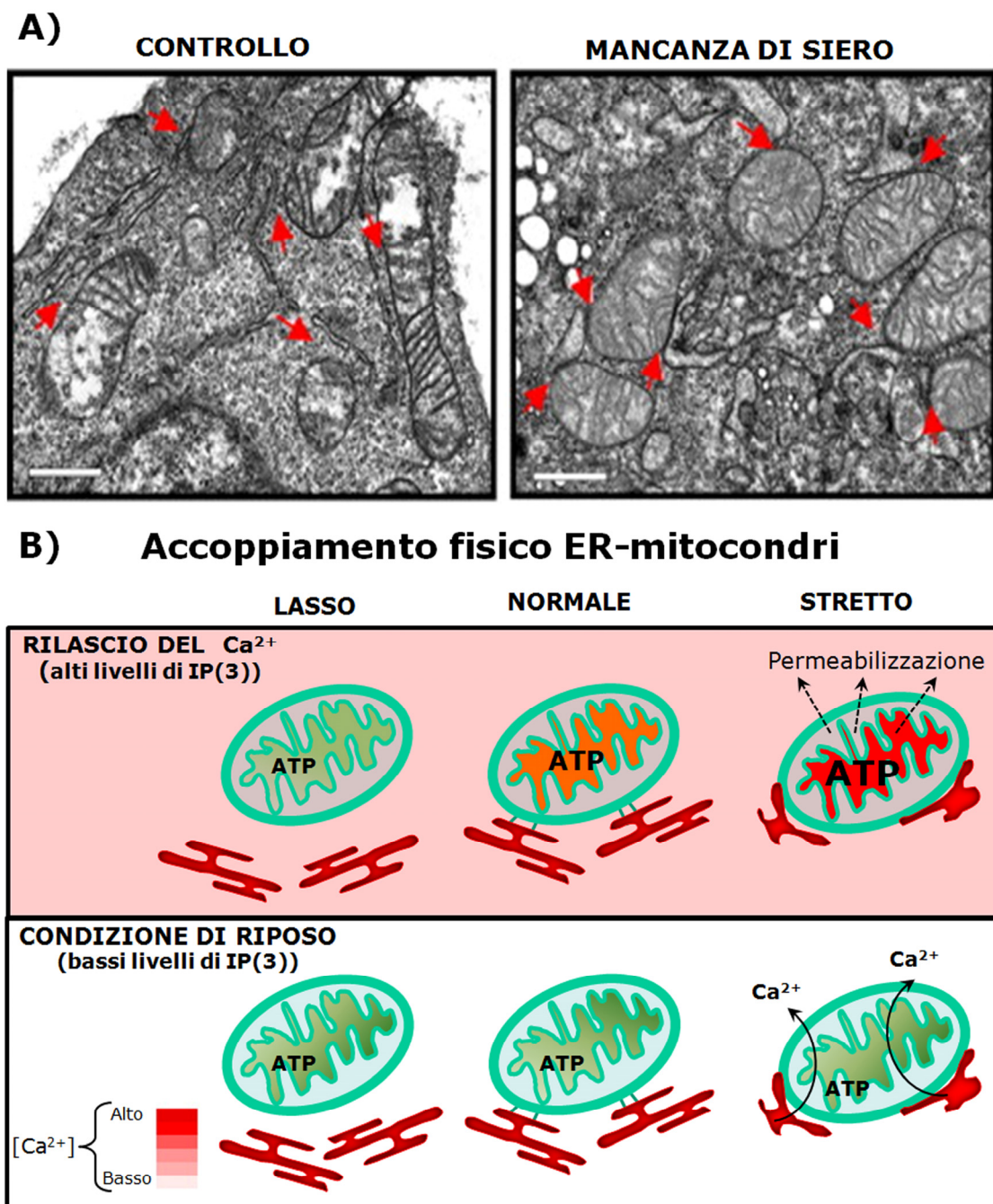
Al contrario, una stretta giunzione stimola i mitocondri nella gestione del  $\text{Ca}^{2+}$  verso una sensibilizzazione dell'organelli al sovraccarico per consentire la successiva permeabilizzazione delle membrane, indirizzando le cellule verso un percorso di morte cellulare. La formazione di giunzioni serrate sembra dunque essere rilevante per l'innescò di meccanismi di morte mentre, la trasmissione regolata di  $\text{Ca}^{2+}$ , è un elemento determinante della bioenergetica mitocondriale, legata, non solo a potenziali risposte apoptotiche, ma anche a meccanismi di sopravvivenza/morte dipendenti dalla macroautofagia (figura 3.2) [249].

**97** *Il ruolo di p53.* Il fattore di trascrizione p53 è la quintessenza dei soppressori tumorali e induttore di apoptosi. Le evidenze accumulate suggeriscono che p53 abbia un ruolo positivo anche nella sopravvivenza delle cellule in risposta a stress di natura fisiologica come possono essere i percorsi di segnalazione antiossidante e l'autofagia basale [250]. p53 è legato all'autofagia attraverso l'inibizione mTOR tramite l'attivazione di AMPK e di TSC1 e -2. Inoltre, p53 **transattiva il Modulatore di Autofagia Regolato da Danni (DRAM)** una proteina lisosomiale in grado di stimolare l'accumulo di vacuoli autofagici. La perdita di funzione di

DRAM abolisce l'accumulo di vacuoli autofagici promosso da p53 e riduce anche l'induzione di apoptosi [251].



**Figura 3.1. Interconnessioni tra ER e mitocondri.** Le interazioni ER-mitocondri modulano le risposte cellulari mediate dal  $Ca^{2+}$  a seguito di differenti stimoli fisiopatologici: in condizioni normali, il  $Ca^{2+}$  rilasciato dall'ER provoca un aumento del metabolismo cellulare e la produzione di ATP. Tuttavia, un sovraccarico di  $Ca^{2+}$  mitocondriale indotto da stimoli apoptotici (Ceramide,  $H_2O_2$ , acido arachidonico, etc) o fattori di stress dell'ER (proteine mal ripiegate, taspigarcina, tunicamicina, brefeldina A) sensibilizza i mitocondri non solo nel rilascio di cofattori delle caspasi ma anche di elementi anti-apoptotici e segnali di sopravvivenza (modificato da Giorgi C et al., 2009).



**Figura 3.2 Rilevanza delle strette giunzioni ER-mitocondri nella sopravvivenza delle cellule.** A) Immagini di microscopia elettronica dell'interfaccia tra ER-mitocondri in cellule esposte a condizioni pro-morte (privazione di siero). B) Dipendenza della funzione mitocondriale dall'ampiezza del divario tra ER e mitocondri. Nello schema, gli effetti sulla [ $Ca^{2+}$ ], la produzione di ATP e la permeabilizzazione della membrana mitocondriale sono mostrati in funzione di un accoppiamento fisico normale (al centro), lasso (a sinistra) e stretto (a destra) tra ER e mitocondri (*modificato da Csordás G et al., 2006*).

**98**

***Le proteine BH-3 only.*** I Domini 3 di Omologia a Bcl-2 (BH3), presenti in tutti i membri della famiglia Bcl-2, possono inibire l'attività anti-apoptotica di Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> o promuovere l'attivazione dei componenti pro-apoptotici appartenenti alla stessa famiglia, quali Bax e Bak [252].

Farmaci BH3-mimetici come ABT737 e HA14-1 possono indurre autofagia in cellule che non subiscono apoptosi o prima che venga innescata apoptosi. Anche le proteine BH3-only endogene sono in grado di indurre autofagia. Bad, ad esempio, nota per essere attivata dalla mancanza di fattori di crescita (tramite defosforilazione), è coinvolta nella induzione di autofagia a seguito di deprivazione di siero e altri nutrienti. La perdita di funzione di Bad, infatti, diminuisce l'intensità della risposta autofagica in sistemi cellulari mantenuti in mezzi di crescita privi di siero [253].

I peptidi BH3-only possono innescare l'apoptosi sia attivando la MOMP, grazie alla formazione di canali intramembrana da parte di Bax e Bak o inibendo l'attività anti-apoptotica di Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> ed i loro omologhi [252]. La Beclina-1 è stata recentemente identificata come una nuova proteina BH3-only [253].

**99**

***L'inibizione di autofagia da parte dei complessi Beclina-1:Bcl-2 /Bcl-X<sub>L</sub>.*** Come altre proteine BH3-only, la Beclina-1 interagisce con proteine multidominio anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2 (in particolare Bcl-2 e il suo omologo Bcl-X<sub>L</sub>), attraverso il suo dominio BH3, un  $\alpha$ -elica anfipatica che si adatta nella tasca idrofobica formata dagli altri domini BH di Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>. Le mutazioni del dominio BH3 nella Beclina-1 o nel sito di legame per BH3 all'interno di Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>, interrompono la formazione del complesso Beclina-1/Bcl-2 con conseguente stimolazione dell'autofagia.

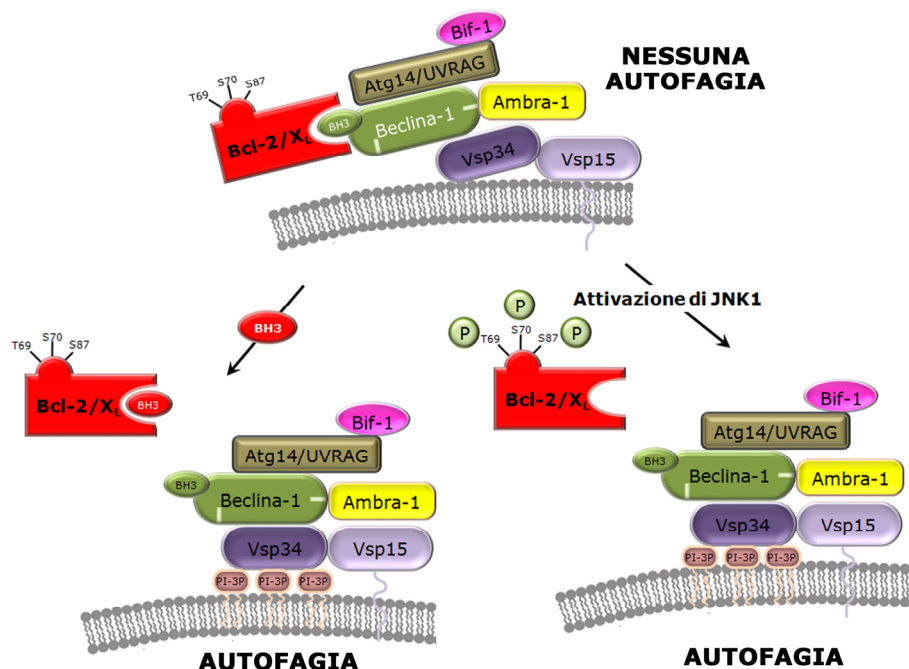
Il rapporto tra Beclina-1 e Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> è complicato. La Beclina-1 può neutralizzare la funzione anti-apoptotica di Bcl-2, esercitata a livello delle membrane mitocondriali. Al contrario, Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> riducono l'attività pro-autofagica della Beclina-1.

È interessante notare come la proteina Bcl-2, localizzata sulla membrana del reticolo ma non su quella del mitocondrio, possa inibire l'autofagia, mentre la Beclina-1 co-localizza con Bcl-X<sub>L</sub> all'interno dei mitocondri, attraverso il suo dominio BH3, suggerendo un differente ruolo del complesso Beclina-1/Bcl-X<sub>L</sub> se confrontato con Bcl-2 [253] (figura 3.3).

Esistono diversi percorsi che regolano la dissociazione della Beclina-1 da Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> durante l'autofagia in cellule di mammifero. Questi includono

- 1) **lo spostamento competitivo del dominio BH3 della Beclina-1** da parte di altre proteine della famiglia Bcl-2, quali i membri anti-apoptotici tBid, Bad e BNIP3, ma non da Bax e Bak. Inoltre, le proteine BH3 only pro-apoptotiche, come BNIP3, Bad, noxa, Puma, Bim<sub>EL</sub> e Bik sono tutte in grado di indurre autofagia;
- 2) **lo spostamento competitivo di Bcl-2** da parte di altre proteine che legano la Beclina-1, come HMGB1, UVRAG o Atg14L/Barkor, con probabile avvio di un accentuato programma anti-apoptotico. Questo

- stato promuove l'autofagia e protegge la cellula, in ultima analisi, durante eventi di stress [255];
- 3) **auto-interazione della Beclina-1.** La Beclina-1 può formare grandi omo-oligomeri, che possono fornire una piattaforma per ulteriori interazioni proteina-proteina e lo spostamento di Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub>. In generale, il legame anti-autofagico di Bcl-2 promuove la omo-dimerizzazione della Beclina-1 e questo impedisce la sua etero-dimerizzazione con Atg14L o UVRAG;
  - 4) **la fosforilazione, mediata da JNK1 o ERK, di Bcl-2** [256] o la fosforilazione, mediata da DAPK, della Beclina-1. La fosforilazione di DAPK a livello della Ser735 da parte di ERK aumenta l'attività di DAPK sia *in vitro* che *in vivo*. Al contrario, DAPK promuove la ritenzione citoplasmatica di ERK, inibendo così la cascata di segnalazione innescata da questa proteina fino al nucleo [257].



**Figura 3.3 L'interattoma Beclina-1 nelle cellule umane e possibili meccanismi alla base della sua funzione nella regolazione dell'autofagia.** La Beclina-1 si lega alla hVps34, che si associa alla chinasi Vps15, agganciata alla membrana attraverso un'ancora lipidica. L'attività chinasi lipidica del complesso multiproteico Beclina-1/Vps34 converte il **FosfatidilInositolo (PI)** in FosfatidilInositolo-3-fosfato (PI(3)P) coinvolto nella nucleazione delle strutture pre-autofagosomiali. La Beclina-1 interagisce con co-attivatori diversi, tra cui UVRAG, Ambra1 e Bif-1, così come con gli inibitori Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>. In figura sono mostrati due meccanismi in grado di interrompere l'interazione tra la Beclina-1 e Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> attivando l'autofagia;

- (1) le proteine che contengono domini BH3 o piccole molecole che mimano domini BH3 possono legarsi in maniera competitiva al solco di Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> e interrompono l'interazione tra queste e la Beclina-1. Ciò porta alla de-inibizione dell'attività della chinasi-lipidica della Vps34 e l'induzione del processo autofagico;



- (2) la fosforilazione di Bcl-2, mediata da JNK1, durante la deprivazione di siero, può disturbare la sua interazione con Beclina-1 e attivare il processo autofagico (modificato da Levine B et al., 2008)

**100** *La famiglia delle proteina chinasi associata alla morte.*

**La Protein chinasi 1 Associata alla Morte (DAPK1)** è un membro di una famiglia di serin-treonina chinasi che promuovono eventi di morte regolati dai complessi calcio/calmodulina. DAPK1 controlla sia la morte cellulare di tipi I che quella di tipo II (autofagica) in risposta a vari

stimoli tra cui l'interferone- $\gamma$ , attivazione dei recettori Fas/CD95, **Fattore- $\alpha$  di Necrosi Tumorale (TNF $\alpha$ )**, il **Fattore di Crescita Trasformante- $\beta$  (TGF $\beta$ )** e il distacco dall'ECM [258] (Box 3). DAPK1 è un soppressore tumorale e la sua espressione si perde in molti tumori, soprattutto a causa della metilazione del DNA [259]. DAPK1 può indurre l'apoptosi tramite:

- attivazione di p19ARF, che inibisce il regolatore negativo di p53, MDM2, in cellule MEFs [258];
- inibizione dell'adesione mediata da integrine in cellule NIH/3T3;
- stimolazione di apoptosi p53-indipendente, che coinvolge la via mitocondriale, nelle cellule di epatoma Hep3B.

Il controllo del processo autofagico è invece ottenuto attraverso la fosforilazione, da parte di DAPK, del dominio BH3-only della Beclina-1, impedendo la sua interazione con i membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2. DAPK, la **Proteina Chinasi-1 correlata a DAPK1 (DRP1, nota anche come DAPK2)** e la **Chinasi ZIP (o DAPK3)** sono membri di una stessa famiglia che possono partecipare al controllo sia dell'apoptosi che della morte autofagica cellulare: interazioni fisiche tra i membri DAPK e connessioni tra questi e complesse cascate di segnalazione da loro innescate sono in grado di amplificare entrambi i processi, dipendenti anche dalla diversa localizzazione cellulare delle chinasi, dove:

- DAPK1 è principalmente associata al citoscheletro di actina,
- DRP1 è concentrata nel lume delle vescicole autofagiche.

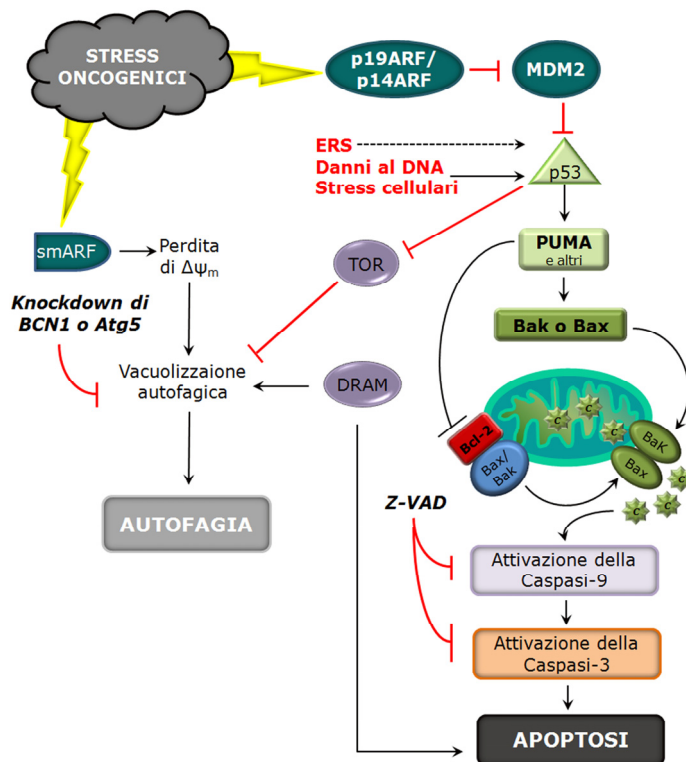
Così, la famiglia DAPK di proteine rappresenta un insieme di chinasi attivate da stress in grado di connettere differenti percorsi che portano a morte cellulare sia di tipo I che II [259].

**101** *p19ARF/p14ARF e le loro isoforme.*

La proteina murina nucleolare p19ARF e il suo ortologo umano p14ARF, sono potenti induttori apoptotici che si legano e inibiscono MDM2, attivando così le funzioni di p53 e la morte cellulare. Una isoforma più breve di p19ARF/p14ARF, smARF, si localizza nei mitocondri e rappresenta una variante traduzionale priva di un particolare dominio. L'espressione ectopica di smARF può provocare la dissipazione del potenziale transmembrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) senza

**Box. 3.** L'attivazione di DAPK, nel caso di stress dell'ER, avviene a seguito della defosforilazione di un sito inibitorio della chinasi da parte di una fosfatasi, PP2A suggerendo come l'attivazione di ulteriori segnali di ERS, oltre il rilascio del  $Ca^{2+}$ , siano necessari per stimolare l'attività pro-autofagica di DAPK.

MOMP, seguita da autofagia e morte cellulare caspasi-indipendente, che è parzialmente inibita dall'abbattimento di funzione di ATG5 e BECN1 [260] (figura 3.4).



### Figura 3.4 Regolazione di autofagia e di apoptosi da parte di p53 e p19ARF/p14ARF.

Stress di natura oncogenica possono attivare due isoforme di ARF: la p19ARF (e l'ortologo umano p14ARF), corrispondente alla proteina completa ed una forma troncata, smARF. Mentre smARF trasloca ai mitocondri, riduce il potenziale transmembrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) e stimola la morte cellulare per autofagia, p19ARF/p14ARF attiva p53 attraverso il legame e l'inibizione del suo regolatore negativo MDM2. p53 innesca la morte apoptotica delle cellule caspasi-dipendente attraverso l'induzione di più proteine pro-apoptotiche, molte delle quali agiscono lungo la via intrinseca. Considerando che il percorso di

p53 è inibito da Z-VAD, mentre quello di smARF è bloccato dalla perdita di funzione della Beclina-1 o Atg5, in alcuni contesti cellulari, p53 attiva un programma trascrizionale che favorisce l'accumulo di vacuoli autofagici attraverso l'induzione della proteina lisosomiale DRAM (che può essere essenziale anche per il processo apoptotico) (modificata da Maiuri MC et al., 2007).

### Organelli sotto stress in apoptosi e autofagia.

**102** L'autofagia può mediare la rimozione specifica di organelli citoplasmatici stressati o danneggiato, tra cui i mitocondri e il reticolo rugoso.

**103** *Lo stress mitocondriale.* I mitocondri possono subire la cosiddetta **Transizione di Permeabilità (PT)**, un improvviso aumento della permeabilità della membrana interna che causa la dissipazione di potenziale  $\Delta\Psi_m$  e, successivamente, MOMP. I mitocondri che subiscono PT sono solitamente rimossi da un processo autofagico selettivo (mitofagia), a condizione che la PT riguardi solo una frazione di mitocondri. Questo accade quando lo stimolo induttore (come un sovraccarico di  $Ca^{2+}$ ) si manifesta a bassa intensità, sub-apoptotica. Se la PT colpisce invece una larga parte dei mitocondri, essa attiverà la morte cellulare.

Questo è stato inizialmente documentato in epatociti, nei quali la mitofagia serve come meccanismo che limita il danno cellulare indotto dall'apertura di

pori durante la transizione di permeabilità mitocondriale. Tuttavia, in altri sistemi, la mitofagia può avere conseguenze letali.

**Lo stress dell'ER.** Lo stress che colpisce il reticolo rugoso è ampiamente noto per indurre apoptosi attraverso la via intrinseca oltre che rappresentare uno stimolo efficiente di autofagia selettiva che porta ad eliminazione di porzioni di reticolo (reticulofagia) [261].

La segnalazione attraverso PERK, ATF6 e IRE1, a seguito di accumulo di proteine ripiegate in modo errato nel lume dell'ER, possono innescare segnali pro-apoptotici durante uno stress prolungato. Tuttavia, essi non agiscono direttamente, ma piuttosto avviano l'induzione e l'attivazione di molecole a valle, come CHOP e JNK, che spingono la cellula verso il percorso di morte.

Durante lo stress del reticolo i percorsi innescati da PERK, ATF6 e IRE1 inducono la trascrizione di CHOP tuttavia, per sovra-regolare la sua espressione proteica, è essenziale l'attivazione del percorso PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4. Oltre ad essere controllato a livello di trascrizione e traduzione, CHOP è disciplinato anche da fosforilazioni post-traduzionali su residui di serina da parte di p38 MAPK, che aumenta la sua attività. Questo è interessante, dato che p38 è un substrato di ASK1, reclutato dal complesso IRE1 $\alpha$ -TRAF2. Così, durante uno stress prolungato, PERK ed IRE1 $\alpha$  potrebbero convergere su CHOP, probabilmente incrementando l'uno l'effetto dell'altro. Studi condotti sul meccanismo di apoptosi indotta da CHOP hanno permesso di individuare numerosi geni bersaglio tra cui Bcl-2, GADD34 ed ERO1 $\alpha$  [262].

L'espressione di GADD34 correla con l'apoptosi indotta da vari segnali e la sua sovra-espressione può avviare o migliorare il processo. Il meccanismo con il quale GADD34 promuove l'apoptosi è sconosciuto, sebbene esistano alcune teorie basate sull'interazione di questa molecola con la **Proteina Fosfatasi 1 (PP1)** la cui funzione è quella di defosforilare eIF2 $\alpha$  e, quindi, rilasciare il blocco traduzionale [263]. Il ripristino della sintesi proteica, indotta da GADD34 attraverso il blocco delle funzioni di PP1, potrebbe consentire la produzione di proteine pro-apoptotiche. Infatti, rispetto ai topi wild-type, topi GADD34<sup>ACAC</sup> (carenti dell'attività fosfatasica di eIF2 $\alpha$ ) mostrano una minor tossicità renale dopo iniezione di tunicamicina, che causa l'ERS attraverso l'inibizione della glicosilazione delle proteine.

Lo stress del reticolo rugoso può essere indotto da sovra-espressione di proteine che contengono poligluttammine o da farmaci quali tunicamicina (un inibitore della N-glicosilazione), taspigargina (un inibitore della Ca<sup>2+</sup> ATPasi del reticolo) o brefeldina A (che interrompe il traffico dall'ER verso il Golgi) [264].

### Quando l'autofagia esclude l'apoptosi e viceversa.

**104**

Come discusso in precedenza autofagia e apoptosi condividono molte induttori in comune. In molti casi, interazioni tra inibitori collettivi può causare la prevalenza di un processo rispetto un altro. Il tipo

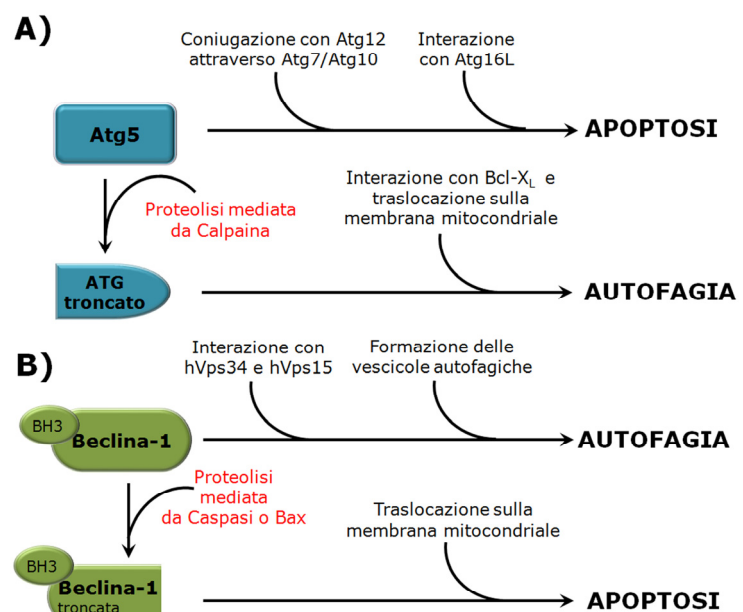
di stimolo iniziale determina quale processo dominerà. Per esempio, durante la privazione di nutrienti, il percorso di default sarebbe l'autofagia, che crea uno stato metabolico con elevato aumento di ATP. La rimozione degli organelli danneggiati ed il conseguente adattamento consentirebbe la sopravvivenza, mentre il mancato ripristino dell'omeostasi si tradurrebbe in una apoptosi tardiva.

Al contrario, il percorso predefinito innescato da segnali come danni al DNA o attivazione dei recettori di morte, conduce ad una immediata apoptosi con l'attivazione di un rapido processo di auto-amplificazione che preclude simultanee risposte autofagiche. Inoltre, precisi e diversi eventi molecolari possono spiegare quando i segnali autofagici ed apoptotici convergeranno insieme per uccidere le cellule.

**105** *ATG5 in autofagia e apoptosi.* La sovra-espressione di Atg5 può indurre autofagia e migliorare la suscettibilità delle cellule tumorali ad attivare il percorso intrinseco di morte cellulare apoptotica, ad esempio dopo esposizione delle cellule a ceramide o agenti che danneggiano il DNA. L'eliminazione delle funzioni di Atg5 abolisce l'autofagia e riduce l'incidenza di eventi apoptotici nelle cellule tumorali umane trattate con staurosporina o con doxorubicina [243]. Infatti, Atg5, possiede il duplice ruolo di sensore autofagico e apoptotico, una funzione regolata da eventi proteolitici. A seguito di sollecitazioni letali, la proteina Atg5 full-length da 33-kDa viene scissa dalla calpaina o dalle caspasi che rimuovono l'estremità C-terminale generando un frammento di 24-kDa. Questo frammento perde la capacità di indurre autofagia ed acquisisce attività pro-apoptotica. Il frammento di Atg5 (ma non Atg5 full-length) trasloca ai mitocondri dove promuove la MOMP, probabilmente grazie alla sua capacità di interagire con (ed inibire) la proteina Bcl-X<sub>L</sub> [243] (figura 3.5 A).

### Figura 3.5. Interruttori molecolari tra apoptosi e autofagia.

**A)** La forma full-length di ATG5 partecipa alle fasi iniziali del percorso autofagico. Con l'intervento del sistema ubiquitina-simile Atg7-Atg10, Atg5 (attivata da Atg7 e poi trasferita a Atg10) è coniugata ad un gruppo ε-amminico di un residuo di lisina che consente il legame ad Atg16. Il risultante complesso Atg12-Atg5-Atg16 dirige la curvatura del fagoforo in formazione, reclutando LC3



attivato per l'allungamento della membrana. La proteolisi da parte della calpaina può originare una forma troncata di Atg5 che trasloca nei mitocondri ed induce

MOMP. **B)** Destino analogo può subire la Beclina-1. Clivata dalle Caspasi-3, -8 e fattori di stress la forma troncata perde ogni funzione pro-autofagica, facilitando il percorso apoptotico (*modificata da Maiuri MC et al., 2007*).

In un altro scenario, ATG5 può interagire direttamente con i recettori di morte attraverso FADD, stimolando così l'apoptosi caspasi-dipendente. L'interazione con FADD sarebbe necessario per la morte apoptotica delle cellule ma non per indurre vacuolizzazione [265]. Così, oltre ad innescare l'apoptosi attraverso vari meccanismi, Atg5 potrebbe far parte dei meccanismi molecolari che governano il *crossstalk* inibitorio tra apoptosi e autofagia.

**106**

**L'interazione tra Bcl-2 e Beclina-1.** L'interazione tra la Beclina-1 e i suoi partners molecolari regolano le prime fasi dell'autofagia. L'associazione di Beclina-1, hVps34 e UVRAG nei mammiferi è essenziale per l'induzione di autofagia, con la proteina UVRAG che stimola sia l'interazione tra hVps34 e la Beclina-1, così come l'attività chinasi sui lipidi di hVps34 [266]. Sia la Beclina-1 che UVRAG possono agire come soppressori tumorali, sebbene non sia noto se, anche questa attività, sia veramente legata alla modulazione del macchinario autofagico o a funzioni indipendenti. Anche Ambra-1 è un altro stimolatore autofagico che interagisce con la Beclina-1 e ne aumenta la capacità di attivare hVps34. È interessante notare come le caspasi possono scindere la Beclina-1 durante l'apoptosi; la scissione della Beclina-1 mediata dalla caspasi-3, -7 e -8 genera complessi N- ed C-terminale che perdono la loro capacità di indurre l'autofagia (figura 3.5 B).

Il frammento C-terminale può traslocare nei mitocondri e sensibilizzare le cellule ai segnali apoptotici. Questo processo può essere paragonato ad un evento di amplificazione per indurre massiccia morte apoptotica delle cellule. L'apoptosi indotta dalla proteina pro-apoptotica Bax, riduce l'attività autofagica, migliorando la scissione caspasi-mediata della Beclina-1 in corrispondenza di un residuo di acido aspartico (D149) [267].

Anche la **Proteina Inducibile Apoptosi Correlata a TNF (TRAIL)**, un ligando del recettore di morte, fa scattare la scissione mediata da caspasi, della Beclina-1, almeno in cellule HeLa. Tuttavia, la caspasi-8 attiva può essere degradata durante il percorso autofagico, suggerendo come esista un meccanismo di feedback che regola autofagia e apoptosi [268].

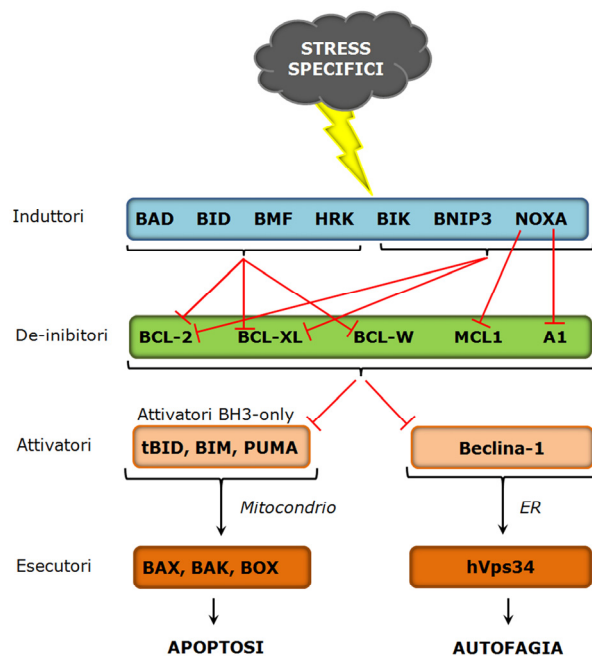
La capacità di indurre l'autofagia da parte della Beclina-1 viene inibita dalle proteine multidominio della famiglia Bcl-2, tra le quali Bcl-2 stesso, Bcl-X<sub>L</sub> e MCL1. Bcl-2 ed i suoi omologhi possono inibire l'autofagia attraverso un'interazione fisica diretta con la Beclina-1. Mutazioni nella Beclina-1 che aboliscono il legame con Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> conferiscono un guadagno di funzione rispetto alla forma normale, con incremento del processo autofagico.

Gli effetti inibitori di Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> dipendono dalla loro localizzazione subcellulare. Solo le molecole Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> presenti sulla membrana del reticolo rugoso (ma non su quella mitocondriale), bloccano l'autofagia

indotta da deprivazione di nutrienti, inibizione del IR(3)P, presenza di molecole BH3-mimetiche o stimolatori del flusso del  $Ca^{2+}$ . Questo suggerisce come i complessi Beclina-1-Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>, in grado di controllare il percorso autofagico, si localizzino a livello del reticolo rugoso, punto ottimale per una regolazione organello-specifica del macchinario autofagico [269].

Esiste dunque una precisa organizzazione spaziale nel controllo di autofagia e apoptosi nella quale le proteine BH3-only esercitano funzioni separate, a seconda del bersaglio molecolare, in seguito a modificazioni post-traduzionali che le indirizzano verso una precisa localizzazione subcellulare:

- a livello mitocondriale, dove inducono direttamente o indirettamente, apoptosi, con l'attivazione della MOMP,
- sulla membrana dell'ER, dove possono attivare l'autofagia liberando la Beclina-1 da Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub>. In più, le proteine BH3-only che agiscono



solo contro i membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2 promuovono l'apoptosi attraverso l'innescò della MOMP, mentre le proteine BH-only i cui bersagli sono sia membri anti-apoptotici che anti-autofagici della famiglia Bcl-2, possono indurre sia apoptosi che autofagia (figura 3.6).

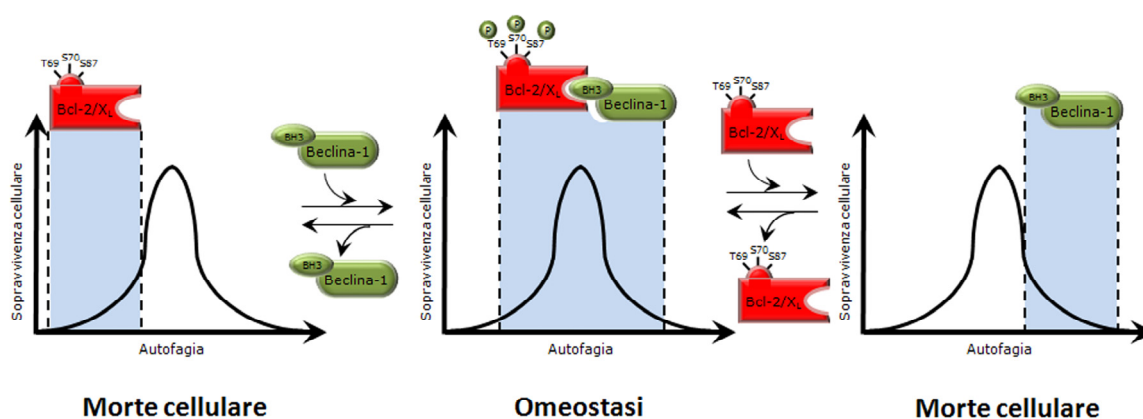
**Figura 3.6. Proteine BH3-only come induttori di apoptosi e autofagia.** A seconda della loro specificità (per proteine pro- o anti-apoptotiche e proteine inibitrici di autofagia che contengono recettori BH3), nonché la loro localizzazione subcellulare (mitocondri o reticolo

endoplasmatico), le proteine BH3-only possono attivare sia l'apoptosi che l'autofagia. Una specifica classe di inattivatori BH3-only interagisce con le proteine multidominio anti-apoptotiche e anti-autofagiche della famiglia Bcl-2 (le frecce rosse simboleggiano il blocco preferenziale per affinità), liberando in tal modo gli attivatori BH3-only che attivano allostericamente Bax e Bak (per l'induzione di apoptosi). In alternativa, rilasciano la Beclina-1 dalla sua interazione con le proteine inibitrici multidominio della famiglia Bcl-2, permettendo così di innescare l'attività chinasi sui lipidi di hVps34 e, quindi, l'autofagia (*modificata da Maiuri MC et al., 2007*).

**107**

**Il reostato Beclina-1/Bcl-2.** Sulla base di quanto detto è stato proposto un modello concettuale per la comprensione della interrelazione tra autofagia, sopravvivenza e morte delle cellule. Secondo questo modello, l'autofagia è necessaria in quanto risposta adattativa alla deprivazione di nutrienti e altre forme di stress cellulare; la sua assenza aumenta la suscettibilità alla morte quando le cellule affrontano stimoli

stressogeni. Tuttavia, se i livelli di autofagia sono indotti oltre un range fisiologico, il percorso autofagico può contribuire alla morte. Per tale motivo, il complesso Beclina-1/Bcl-2 può funzionare come reostato che assicura come i livelli di autofagia rimangano all'interno di un intervallo omeostatico piuttosto che in una gamma di intervalli non fisiologici in grado di causare la morte cellulare. Quando la Beclina-1 è legata a Bcl-2 (o, potenzialmente, ad altri membri della famiglia Bcl-2), le cellule rispondono inducendo stimoli autofagici in modo regolamentato. Tuttavia, quando la funzione ed i livelli di Beclina-1 sono fuori controllo, l'eccessiva autofagia può promuovere la morte cellulare. Così, in modo simile alla teoria che le concentrazioni relative dei membri pro- e anti-apoptotici della famiglia Bcl-2 governino la soglia per l'attivazione dell'apoptosi in una cellula, è possibile che la concentrazione relativa (o l'associazione) tra Bcl-2 e Beclina-1 governi la soglia per l'attivazione dell'autofagia delle cellule e la morte autofagica genericamente indotta [270] (figura 3.7).



**Figura 3.7. Modello di reostato Beclina-1/Bcl-2 come complesso di regolamentazione autofagico.** Livelli fisiologici di autofagia (regione ombreggiata del grafico al centro) sono essenziali per la normale omeostasi cellulare, mentre l'assenza di espressione di geni autofagici (regione ombreggiata del grafico a sinistra) aumenta la morte delle cellule durante la privazione di nutrienti ed altre forme di stress. Al contrario, eccessivi livelli non fisiologici di autofagia (regione ombreggiata del grafico a destra) promuovono l'innescò del percorso autofagico e la morte delle cellule. Le quantità relative di Beclina-1 e Bcl-2 (e altri membri della famiglia Bcl-2) complessati l'uno con l'altro all'interno di una cellula, discriminano la soglia per il passaggio dall'omeostasi cellulare (centro del grafico) alla morte (modificato da Pattingre S et al., 2005).

### La famiglia Bcl-2, ERS e apoptosi.

**108**

I membri della famiglia di proteine Bcl-2 sono importanti regolatori di morte apoptotica nelle cellule e, fino a poco tempo fa, si riteneva che disciplinassero esclusivamente la via apoptotica intrinseca.

I primi studi che collegarono la morte delle cellule indotta da ERS alla famiglia di proteine Bcl-2, mostrarono come la sovra-espressione di Bcl-2, o la carenza di Bax e Bak, conferivano una protezione contro lo stress letale dell'ER [271]. La sovrapproduzione di proteine Bcl-2 legate alla membrana del reticolo rugoso (Bcl-2/cb5) bloccano lo stress, l'apoptosi ed il rilascio del

citocromo-*c* indotto da ERS. Al contrario, l'espressione di Bak legata alla membrana dell'ER (Bak/cb5) in topi mutanti doppio knockout per Bax/Bak, induce apoptosi. Questo indica come i segnali di stress vengono inoltrati dall'ER ai mitocondri e che l'apoptosi indotta da ERS, in modo simile all'apoptosi mediata dalla via mitocondriale, è regolata dalla famiglia di proteine Bcl-2 [271].

Anche se il coinvolgimento di proteine Bcl-2 nella morte cellulare indotta da ERS è chiaro, come esse siano regolate rimane dubbioso. Finora è stato dimostrato il coinvolgimento dell'attivazione di CHOP e JNK mediata da UPR. CHOP è noto per reprimere l'espressione di determinati geni Bcl-2, aumentando la proporzione di proteine Bcl-2 pro-apoptotiche nelle cellule e consentendone l'attivazione. La sovra-espressione di CHOP ha dimostrato di innescare il percorso apoptotico associato con l'attivazione e la traslocazione mitocondriale di Bax. In questo modello, la sovra-espressione di Bcl-2 potrebbe bloccare l'apoptosi indotta da CHOP [272].

Come già discusso nella sezione relativa alla fase di iniziazione dell'apoptosi, JNK è attivato dal percorso IRE1-TRAF2-ASK1 dell'UPR ed è noto per regolare la fosforilazione delle proteine Bcl-2. Prima di tutto, JNK è in grado di fosforilare le proteine Bcl-2 legate alla membrana dell'ER (Bcl-2/cb5) con un potente effetto pro-apoptotico; Bcl-2/cb5 fosforilata non è capace di sequestrare e di inibire i membri pro-apoptotici BH3-only della famiglia Bcl-2 e non può controllare i flussi di Ca<sup>2+</sup> attraverso il reticolo rugoso. JNK può avere come bersagli molecolari anche gli stessi membri BH3-only della famiglia Bcl-2. L'induzione e/o la modificazione post-traduzionale di proteine BH3-only svolge un ruolo centrale nella regolazione della cascata apoptotica.

Della sottofamiglia BH3 only, PUMA, noxa e Bim, sono stati identificati per avere un ruolo nell'ERS. Tra queste, Bim esiste in diverse isoforme, inclusa una forma troncata (BIMs) e due forme complete, Bim<sub>L</sub> e Bim<sub>EL</sub>, costitutivamente espresse. La fosforilazione di Bim da parte di JNK permette la dissociazione della proteina dai suoi inibitori che gli consente di esercitare effetti pro-apoptotici [273]. Nel complesso, questi dati suggeriscono che JNK, attivata dallo stress dell'ER, esercita le sue funzioni su bersagli molecolari appartenenti alla famiglia Bcl-2. Questo consentirebbe l'attivazione finale di Bax e Bak con la conclusione del percorso apoptotico.

Altri due proteine BH3-only sono regolate dall'ERS. Analisi di microarray in cellule SH-SY5Y di neuroblastoma trattate con tunicamicina hanno rivelato una sovra-espressione di PUMA. Allo stesso modo, un altro studio che prendeva in esame l'espressione di proteine BH3-only in risposta a taspigargina o tunicamicina, ha mostrato una sovra-regolazione, p53-dipendente, sia di PUMA che noxa [274]. La questione di come p53 sia attivato durante l'UPR è ancora senza una risposta.

Collettivamente, la regolazione dell'espressione e dell'attività dei componenti della famiglia di proteine Bcl-2, sia attraverso JNK che CHOP, o la sovra-regolazione delle proteine BH3-only, porta all'attivazione di Bax e, in ultima analisi, alla morte cellulare.



**109*****La fase di esecuzione dell'apoptosi indotta da ERS e la risposta chemioterapica.*** Tutti i segnali a monte, come l'attivazione di fattori

di trascrizione, i percorsi mediati dalle chinasi e la regolazione dei membri della famiglia Bcl-2 conducono, in ultima analisi, all'attivazione delle caspasi ed una ordinata e sequenziale distruzione della cellula. Sia la via apoptotica intrinseca che estrinseca sono processi ben caratterizzati e associati all'attività di specifici sottoinsiemi di caspasi. La coorte delle caspasi, legate all'apoptosi indotta da ERS, non è stata ancora del tutto stabilita sebbene il clivaggio delle caspasi-12, -3, -6, -7, -8 e -9 sia stato osservato in diversi casi. Nonostante l'attivazione delle caspasi sia richiesta per il processo apoptotico, l'identità della caspasi iniziatrice è tuttora oggetto di dibattito. La caspasi-12 è stata proposta come mediatore chiave dell'apoptosi indotta da ERS [275].

La caspasi-12, localizzata sul lato citoplasmatico della membrana esterna dell'ER, è attivata da differenti tipi di stress ma non da segnali apoptotici propagati dalla membrana plasmatica o da quella mitocondriale. La caspasi-12, come altri membri della famiglia di caspasi, richiede il clivaggio di un prodominio per l'attivazione della forma proapoptotica. Sono noti diversi meccanismi molecolari per il processamento della caspasi-12 e questi prevedono l'intervento di proteine come la Calpaina e Apaf-1 (figura 3.8 e Box 3.2). Tuttavia, al contrario dei roditori, una caspasi-12 funzionale manca nell'uomo. In luogo della caspasi-12, altre caspasi possono agire nel corso della morte cellulare indotta da ERS. Le candidate principali appaiono essere le caspasi-4 e -5 (Box 3.3). È stato dimostrato che la caspasi-4 si localizza sulla membrana del reticolo endoplasmatico in risposta a ERS e potrebbe dunque essere coinvolta nella morte cellulare indotta da stress del reticolo rugoso in cellule umane. In effetti, la caspasi-4 gioca un ruolo critico nell'apoptosi indotta da ERS nelle cellule dell'epitelio pigmentato retinico, nella linea cellulare di carcinoma umano HeLa e nella linea cellulare di neuroblastoma umano SK-N-SH [277].

**Box 3.2.**

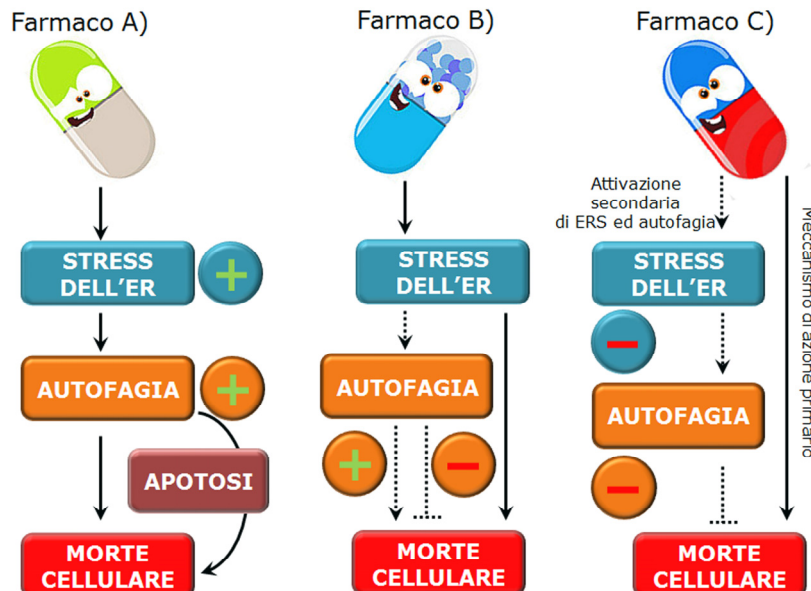
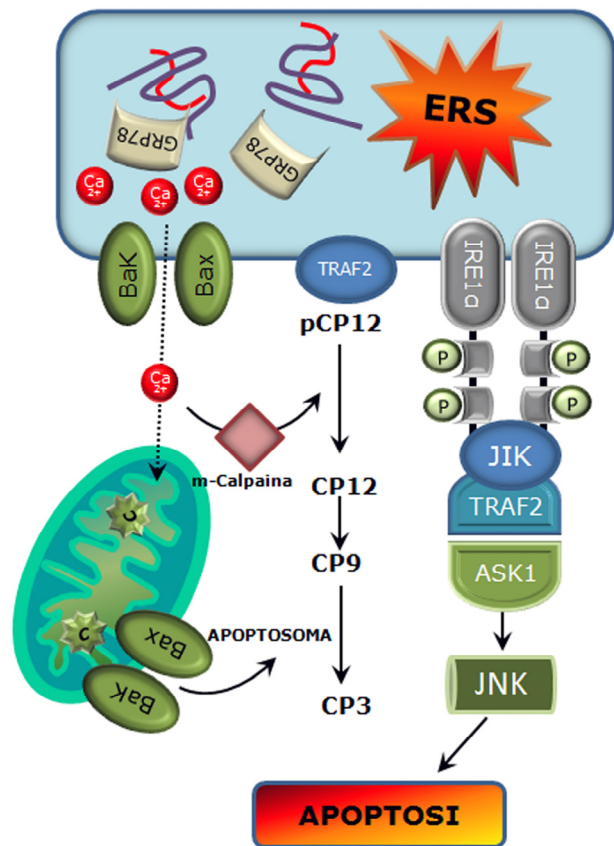
- **m-calpaina:** è una cisteina proteasi responsabile del clivaggio della procaspasi-12, per generare la forma attiva. L'attivazione della calpaina da ERS elimina la regione N-terminale della caspasi che completa la sua attivazione mediante un'auto-processazione al residuo D318. Così, il rilascio di calcio dall'ER può attivare un nuovo pathway apoptotico coinvolgente l'attivazione, mediata dal calcio, della calpaina e l'intreccio tra calpaina e famiglia delle caspasi [276].
- **Apaf-1:** La caspasi-12 possiede un dominio CARD attraverso il quale la caspasi-8 interagisce con Apaf-1 per formare l'apoptosoma. È dunque possibile che la caspasi-12 possa essere attivata attraverso la sua interazione con proteine Apaf-1 simili.

**Box 3.3.** Il trattamento di cellule umane e murine con gli stessi agenti di stress dell'ER ha portato alla scissione di un substrato fluorogenico della caspasi-4, il LEVD-7-amino-4-trifluorometilumarina, in presenza o in assenza dell'espressione di caspasi-12 o della stessa caspasi-4 mentre la sovra-espressione di Bcl-X<sub>L</sub> o di una forma dominante negativa della caspasi-9, inibiva la scissione di tale substrato. Di conseguenza, sia la caspasi-12 che la caspasi-4, non appaiono necessarie per l'induzione apoptosi innescata da ERS e l'attività della caspasi-4 non è sempre associata all'inizio di evento di morte.

**FIGURA 3.8. Percorsi di ERS implicati nel mediare l'apoptosi delle cellule.**

**Fase I:** IRE1 attivato recluta TRAF2 e lega JIK che porta all'attivazione di JNK e ASK1. JNK fosforila Bcl-2 e la proteina BH3-only Bim, avviando l'apoptosi mediata dalla via mitocondriale.

**Fase II:** il reclutamento di TRAF2 da partedi IRE1 permette la dissociazione della pro-caspasi-12 (pCP12), residente sul lato citoplasmatico della membrana dell'ER, e la sua conseguente attivazione. Durante l'ERS, infatti, Bax e Bak, presenti sulla membrana dell'ER, oligomerizzano in un poro canale che consente il rilascio di  $Ca^{2+}$  dall'ER al citosol, dove attiva la m-Calpaina che cliva la pCP12. La caspasi-12 attivata (CP12) opererà il taglio della pro-caspasi-9 la quale, a sua volta, attiverà le caspasi escutrici del programma apoptotico, quali la caspasi-3. Inoltre, il  $Ca^{2+}$  liberato dall'ER penetra nel mitocondrio e causa una depolarizzazione della membrana mitocondriale con rilascio di citocromo-c nel citoplasma. Questo permette la formazione dell'apoptosoma (costituito da Apaf-1, citocromo-c, ATP e procaspasi-9), l'attivazione della pro-caspasi-9 e delle successive caspasi a valle, con innesco del processo apoptotico.



**Figura 3.9. Ipotetiche strategie terapeutiche basate sulla modulazione dell'ERS e l'autofagia.** Differenti strategie che coinvolgono la modulazione dell'ERS e dell'autofagia potrebbero essere utilizzate come terapie antitumorali. A) Agenti antitumorali quali il Tetraidrocannabinolo (THC), attivano l'ERS e l'autofagia

come meccanismo per promuovere la morte delle cellule tumorali. B) Altre terapie antitumorali (ad esempio, Terapia Fotodinamica e cloroquina) attivano l'ERS come parte di meccanismi attraverso i quali promuovere la morte delle cellule tumorali. Il conseguente innesco di autofagia indotta da ERS può contribuire, a sua volta, alla morte cellulare (in cellule incapaci di avviare il percorso apoptotico) o alla sopravvivenza (in cellule apoptosi-competenti). Pertanto, a seconda del fenotipo tumorale, gli inibitori o gli induttori di autofagia (indicati con il simbolo + e - in figura) potrebbero essere somministrati per migliorare l'attività dei farmaci antitumorali. C) Un terzo tipo di agenti antitumorali, quali terapie ormonali (trastuzumab), inibitori del proteasoma, inibitori delle istone deacetilasi, etc, attiva una risposta protettiva nei confronti dell'ERS/autofagia, secondariamente al loro meccanismo d'azione primario antitumorale. L'inibizione dell'ERS/autofagia contribuirebbe a ridurre la resistenza delle cellule tumorali a questi tipi di terapia (modificato da Verfaillie T et al., 2010).

Diversi fattori, come l'intensità dello stress, la simultanea attivazione di differenti percorsi molecolari, il tipo di cellula possono così integrarsi per produrre una specifica risposta autofagica. Considerando che la resistenza ai trattamenti farmacologici rappresenta uno degli ostacoli principali della terapia anti-cancro, una migliore comprensione del ruolo svolto da questi processi nelle cellule tumorali in risposta alla chemioterapia, aiuterebbe ad elaborare nuove e più efficienti opportunità terapeutiche, basate su inibitori o attivatori di queste vie di stress dell'ER (figura 3.9).

#### Riassunto.

**110**

*La relazione funzionale tra apoptosi e autofagia è complessa, nel senso che, in determinate circostanze, l'autofagia costituisce un adattamento agli stress che evita la morte cellulare (e sopprime l'apoptosi), mentre in altri contesti cellulari, rappresenta un'alternativa al classico percorso apoptotico. Autofagia e apoptosi possono essere innescati da comuni segnali a monte e, a volte, questo si traduce in un intreccio dei due meccanismi mentre, in altri casi e a seconda del contesto, una delle due vie alternative viene scelta in modo reciprocamente esclusivo. A livello molecolare questo significa che i macchinari autofagici e apoptotici condividono percorsi comuni che connettono o incrementano le risposte cellulari. Anche le proteine della famiglia Bcl-2 sono importanti inibitori o induttori di autofagia in nematodi, cellule murine e umane. Il controllo del sistema autofagia/apoptosi può essere disciplinato da percorsi distinti. L'attivazione di proteine BH3-only a basso livello (che non riesce a innescare l'attivazione di proteine pro-apoptiche multidominio come Bax e Bak) indurrebbe autofagia come stimolo di morte. Solo quando l'effetto anti-apoptotico delle proteine Bcl-2 si esaurisce, allora sarebbe la piena attivazione delle proteine BH3-only a stimolare Bax o Bak e, quindi, indurre la morte cellulare. In secondo luogo, si potrebbe ipotizzare che le proteine pro-apoptiche della famiglia Bcl-2 siano state progettate per innescare reazioni cataboliche in risposta allo stress, per la mobilitazione delle riserve energetiche e/o l'eliminazione delle macromolecole danneggiate*

*dall'organismo. Tali reazioni cataboliche sarebbe state concepite all'inizio dell'evoluzione unicellulare, nei confronti di porzioni danneggiate della cellula e, più tardi, sarebbe stata adattata come strategia per l'eliminazione di cellule intere. Un'altra implicazione importante, nell'ambito della sovrapposizione tra autofagia e apoptosi riguarda il ruolo delle proteine pro-apoptotiche della famiglia Bcl-2 come soppressori tumorali e quella di proteine anti-apoptotiche come oncogeni. Il potenziale oncogeno dei membri della famiglia Bcl-2 è stato attribuito ad un'apoptosi non funzionale che è uno dei tratti distintivi della progressione tumorale. Tuttavia, l'autofagia, che pure risulta essere regolata da proteine Bcl-2, è emersa come una via cellulare essenziale per il mantenimento della stabilità genomica e la soppressione tumorale. Così, la sovra-espressione di Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> (o la perdita delle proteine BH3-only) possono non solo partecipare all'oncogenesi inibendo l'apoptosi, con un conseguente miglioramento della sopravvivenza delle cellule tumorali in condizioni avverse di natura endogena (metabolica) o esogena (associata alla chemioterapia) ma anche nell'inibizione dell'autofagia, causando una maggior instabilità genomica e la progressione del tumore.*

#### **BIBLIOGRAFIA dei paragrafi da 83 a 110.**

- 1) Green DR.: **Apoptotic pathways: ten minutes to dead.** *Cell* 121, 671–674 (2005).
- 224) Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ.: **Potential therapeutic applications of autophagy.** *Nature Rev. Drug Discov.* 6, 304–312 (2007).
- 225) Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB.: **Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty.** *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 439–448 (2005).
- 226) Gozuacik D, Kimchi A.: **Autophagy and cell death.** *Curr. Top. Dev. Biol.* 78, 217–245 (2007).
- 227) Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ.: **Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8.** *Science.* 2004 Jun 4;304(5676):1500-2.
- 228) Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M.: **Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 28;103(13):4952-7..
- 229) Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB.: **Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis.** *Cell.* 2005 Jan 28;120(2):237-48.
- 230) González-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquère S, Eskelinen EL, Pierron G, Saftig P, Kroemer G.: **The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death.** *J Cell Sci.* 2005 Jul 15;118(Pt 14):3091-102.
- 231) Komatsu M, Ueno T, Waguri S, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K.: **Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons.** *Cell Death Differ.* 2007 May;14(5):887-94.
- 232) Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S.: **Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis.** *Cancer Cell.* 2006 Jul;10(1):51-64.
- 233) Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC.: **Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease.** *Nat Genet.* 2004 Jun;36(6):585-95.

- 234) Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, O'Kane CJ, Rubinsztein DC.: **Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis.** *Hum. Mol. Genet.* 15, 1209–1216 (2006).
- 235) Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB.: **The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis.** *Nat Cell Biol.* 2007 Feb;9(2):218-24.
- 236) Clarke PG.: **Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms.** *Anat. Embryol.* (Berl.) 181, 195–213 (1990).
- 237) Scott RC, Juhasz G, Neufeld TP.: **Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death.** *Curr. Biol.* 17, 1–11 (2007).
- 238) Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M.: **Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4.** *J Clin Invest.* 2006 Aug;116(8):2161-72.
- 239) Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E.: **Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability.** *Genes Dev.* 2007 Jun 1;21(11):1367-81.
- 240) Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z.: **Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4.** *EMBO J.* 2007 Apr 4;26(7):1749-60.
- 241) Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Carpentier S, Levade T, Ghidoni R, Botti J, Codogno P.: **Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation.** *J Biol Chem.* 2006 Mar 31;281(13):8518-27.
- 242) Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU.: **Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis.** *Nat Cell Biol.* 2006 Oct;8(10):1124-32.
- 243) Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajnóczky G.: **Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria.** *J Cell Biol.* 2006 Sep 25;174(7):915-21.
- 244) Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC.: **Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development.** *J Cell Biol.* 2003 Jan 20;160(2):189-200.
- 245) Oakes SA, Korsmeyer SJ.: **Untangling the web: mitochondrial fission and apoptosis.** *Dev Cell.* 2004 Oct;7(4):460-2.
- 246) Roderick HL, Lechleiter JD, Camacho P.: **Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations via an interaction with SERCA2b.** *J Cell Biol.* 2000 Jun 12;149(6):1235-48.
- 247) Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P.: **Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why.** *Biochim Biophys Acta.* 2009 Nov;1787(11):1342-51
- 248) Cárdenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgó J, Müller M, Vais H, Cheung KH, Yang J, Parker I, Thompson CB, Birnbaum MJ, Hallows KR, Foscett JK.: **Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InSP3 receptor Ca<sup>2+</sup> transfer to mitochondria.** *Cell.* 2010 Jul 23;142(2):270-83.
- 249) Zeng X, Yan T, Schupp JE, Seo Y, Kinsella TJ.: **DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine-induced autophagy through p53 activation in human tumor cells.** *Clin. Cancer Res.* 13, 1315–1321 (2007)
- 250) Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM.: **DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis.** *Cell.* 2006 Jul 14;126(1):121-34.
- 251) Adams JM, Cory S.: **The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy.** *Oncogene* 26, 1324–1337 (2007).
- 252) Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G.: **Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1.** *EMBO J.* 2007 May 16;26(10):2527-39.
- 253) Noble CG, Dong JM, Manser E, Song H.: **Bcl-xL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in Beclin1.** *J Biol Chem.* 2008 Sep 19;283(38):26274-82.

- 254) Eisenberg-Lerner A, Kimchi A.: **DAP kinase regulates JNK signaling by binding and activating protein kinase D under oxidative stress.** *Cell Death Differ.* 2007 Nov;14(11):1908-15.
- 255) Li DD, Wang LL, Deng R, Tang J, Shen Y, Guo JF, Wang Y, Xia LP, Feng GK, Liu QQ, Huang WL, Zeng YX, Zhu XF.: **The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells.** *Oncogene.* 2009 Feb 12;28(6):886-98.
- 256) Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, Kimchi A.: **Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>.** *Autophagy.* 2009 Jul;5(5):720-2
- 257) Bialik S, Kimchi A.: **The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond.** *Annu. Rev. Biochem.* 75, 189–210 (2006).
- 258) Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A.: **DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation.** *Nature Cell Biol.* 3, 1–7 (2001).
- 259) Reef S, Zalckvar E, Shifman O, Bialik S, Sabanay H, Oren M, Kimchi A.: **A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death.** *Mol Cell.* 2006 May 19;22(4):463-75.
- 260) Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ.: **Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy.** *J. Biol. Chem.* 281, 30299–30304 (2006).
- 261) Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D.: **CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum.** *Genes Dev.* 1998 Apr 1;12(7):982-95.
- 262) Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S.: **Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2.** *Mol Cell Biol.* 2003 Feb;23(4):1292-303.
- 263) Criollo A, Maiuri MC, Tasdemir E, Vitale I, Fiebig AA, Andrews D, Molgó J, Díaz J, Lavandro S, Harper F, Pierron G, di Stefano D, Rizzuto R, Szabadkai G, Kroemer G.: **Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor.** *Cell Death Differ.* 2007 May;14(5):1029-39.
- 264) Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi B, Lee H, Kim JH, Mizushima N, Oshumi Y, Jung YK.: **Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death.** *J Biol Chem.* 2005 May 27;280(21):20722-9.
- 265) Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU.: **Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG.** *Nat Cell Biol.* 2006 Jul;8(7):688-99.
- 266) Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G.: **Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1.** *Oncogene.* 2010 Mar 25;29(12):1717-9.
- 267) Hou W, Han J, Lu C, Goldstein LA, Rabinowich H.: **Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis.** *Autophagy.* 2010 Oct;6(7):891-900.
- 268) Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ.: **Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.** *Science.* 2001 Apr 27;292(5517):727-30.
- 269) Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B.: **Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy.** *Cell.* 2005 Sep 23;122(6):927-39.
- 270) Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B, Brandt GS, Iwakoshi NN, Schinzel A, Glimcher LH, Korsmeyer SJ.: **Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha.** *Science.* 2006 Apr 28;312(5773):572-6.
- 271) McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ.: **Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state.** *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(4):1249-59.
- 272) Lei K, Davis RJ.: **JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4;100(5):2432-7.

- 273) Li J, Lee B, Lee AS.: **Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53.** *J Biol Chem.* 2006 Mar 17;281(11):7260-70.
- 274) Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A.: **Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far.** *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Dec;1010:186-94. Review.
- 275) Bian ZM, Elnér SG, Elnér VM.: **Dual involvement of caspase-4 in inflammatory and ER stress-induced apoptotic responses in human retinal pigment epithelial cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Dec;50(12):6006-14.
- 276) Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, López-Otín C.: **Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3.** *J Biol Chem.* 2007 Jun 22;282(25):18573-83.



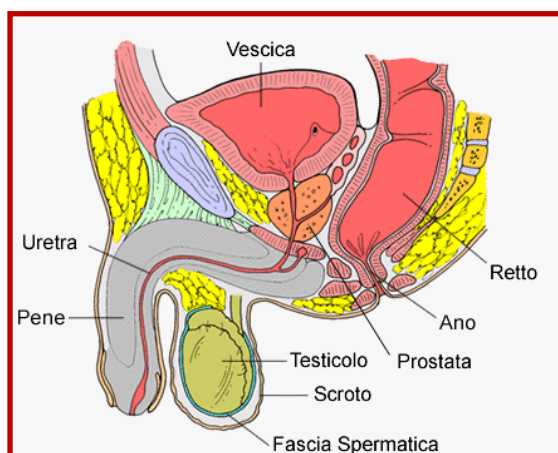


# 4

## IL CARCINOMA DELLA PROSTATA: Dr. JEKYLL E MR. HIDE.

### La prostata: cenni di anatomia e fisiologia.

**111** La prostata è un organo ghiandolare e fibromuscolare che circonda la porzione prossimale dell'uretra; è localizzata nella pelvi, al di sotto della vescica e anteriormente al retto [278]. A causa della sua posizione, le malattie della prostata spesso interferiscono con la minzione, l'eiaculazione o la defecazione. La prostata differisce considerevolmente tra le varie specie di mammiferi per le caratteristiche anatomiche, chimiche e fisiologiche. In un uomo adulto essa ha la forma di una castagna e pesa circa 10-20 g.



**Figura 4.** Localizzazione anatomica della prostata e interazioni con organi confinanti.

Possiede una base, un apice, una faccia anteriore, una faccia posteriore e due facce infero-laterali. La base è appiattita e superiormente in rapporto con il collo della vescica, mentre l'apice è la porzione inferiore della ghiandola e segna il passaggio dalla porzione prostatica a quella

membranosa dell'uretra la quale emerge dalla faccia anteriore. Nella prostata la porzione anteriore è generalmente povera di tessuto ghiandolare e costituita per lo più da tessuto fibromuscolare. La faccia posteriore è trasversalmente concava e convessa verticalmente ed è separata dal retto da tessuto adiposo pre-rettale (figura 4).

La prostata, con le vescicole seminali, rappresenta l'organo sessuale secondario più importante nel maschio secernendo numerosi prodotti. La secrezione prostato-vescicolare costituisce quantitativamente e qualitativamente la principale porzione del plasma seminale. Oltre ad un ruolo nella produzione dell'eiaculato, per la prostata e per le sue secrezioni

viene supposta un'importante funzione di barriera nei confronti di agenti patogeni infettanti.

Dal punto di vista istologico la prostata è costituita principalmente da un tessuto ghiandolare, formato da un numero variabile (da 30 a 50) di ghiandole tubulo-alveolari ramificate, immerse in uno stroma fibromuscolare (Box 4).

Lo stroma è più abbondante nella parte anteriore della prostata dove forma lo stroma fibro-muscolare anteriore, privo di ghiandole.

L'acino ghiandolare, l'unità funzionale della prostata è composto dal compartimento epiteliale cilindrico, semplice o stratificato e da quello

stromale; il compartimento epiteliale è costituito da cellule basali, secretorie e neuroendocrine [279].

1. **Le cellule basali** possiedono grossi nuclei basali rotondi e un citoplasma debolmente colorabile in Ematossilina-Eosina. Tali cellule esprimono cheratina 5, cheratina 14 e p63 [280], sono separate dallo stroma tramite una membrana basale e sono avvolte da un plesso di capillari; esse comprendono anche cellule staminali capaci di dare origine a tutti i tipi cellulari del parenchima epiteliale. Le cellule epiteliali basali non esprimono il recettore degli androgeni, se non a bassi livelli.
2. **Le cellule epiteliali secretorie** esprimono cheratina 8, cheratina 18, il recettore per l'antigene prostatico specifico (PSA) e quello per gli androgeni (AR) necessario per mantenere il loro fenotipo differenziato [281].
3. Inframmezzate alle cellule secernenti sono state individuate **cellule neuroendocrine** che contengono enolasi neurone-specifica, cromogranina A e serotonina.

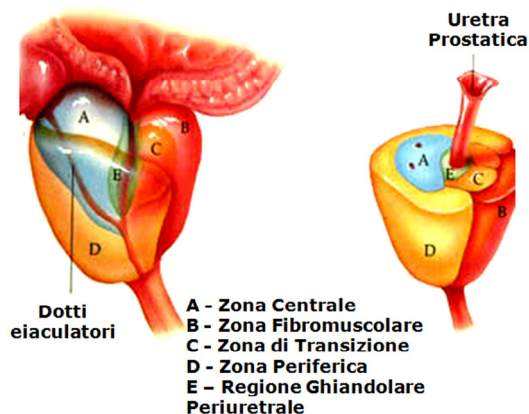
Lo stroma prostatico è costituito da cellule muscolari lisce, fibroblasti, vasi sanguigni, nervi e matrice extracellulare. Ci sono evidenze che un'alterazione delle normali interazioni stroma-epitelio possa contribuire allo sviluppo dell'iperplasia, della neoplasia e della progressione tumorale nella prostata [282]. Studi recenti condotti su modelli *in vitro* hanno dimostrato come lo stroma isolato da zone peri-tumorali possa modulare la morfologia ed il differenziamento delle cellule epiteliali [283].

Macroscopicamente, la ghiandola normale può essere suddivisa in tre diverse zone (figura 4.1) dalle quali si ritiene originino differenti patologie:

- **zona periferica**, costituita prevalentemente da tessuto ghiandolare (circa il 75% del tessuto ghiandolare totale) è la zona in cui si originano i carcinomi;

**Box 4.** Ciascuna ghiandola è costituita da numerosi acini che riversano il loro secreto in piccoli condotti che si uniscono a formare un dotto per ciascuna ghiandola, per un totale di 12-20 dotti. Ognuno di essi decorre all'interno del parenchima sino a raggiungere l'uretra prostatica. I dotti variano in lunghezza a seconda della collocazione delle ghiandole, i più lunghi sono quelli posti nella zona periferica che possiede anche le ghiandole dalla struttura più complessa, i più corti nella zona transizionale che possiede ghiandole semplici e ghiandole mucose. Le ghiandole mucose sono più facilmente riscontrabili in soggetti giovani, dato che tendono a scomparire con l'età.

- **zona centrale**, formata da raggruppamenti di ghiandole (circa il 20-25% del tessuto ghiandolare) organizzate intorno ai dotti eiaculatori;
- **zona di transizione**, costituita da rare ghiandole che rappresentano circa il 5% dell'intera massa ghiandolare, site in prossimità dello sbocco dei dotti eiaculatori nell'uretra prostatica. Da questa zona trae origine l'**Iperplasia Prostatica Benigna (IBP)**.



**Figura 4.1** Zone della prostata.

dotti eiaculatori nell'uretra prostatica. Da questa zona trae origine l'**Iperplasia Prostatica Benigna (IBP)**.

In più abbiamo lo

- **stroma fibromuscolare anteriore** che costituisce in gran parte della porzione anteriore (e dalla faccia anteriore) della prostata e racchiude la parete antero-superiore dell'uretra preprostatica. La sua forma è assimilabile ad un cuneo o ad un cono rovesciato [284].

### Epidemiologia ed eziologia del tumore della prostata

**112**

Il tumore della prostata (PCa) rappresenta in Italia la neoplasia più frequentemente diagnosticata nel maschio adulto ed è la seconda causa di morte dopo il tumore del polmone. L'incidenza del PCa ha mostrato in questi anni una crescita notevole che è da mettere in relazione a due fattori rilevanti: l'invecchiamento progressivo della popolazione e l'aumento della pressione diagnostica che hanno portato i tassi di incidenza a raddoppiare nel giro degli ultimi 10 anni. Le stime per l'Italia (fonte: Istituto Superiore di Sanità ed Associazione Italiana Registro Tumori) indicano un totale di 23.518 nuovi casi diagnosticati ogni anno, mentre per quanto riguarda la mortalità, nel 2002 si sono verificati 7.105 decessi per PCa.

Il rischio cumulativo (calcolato nel corso di tutta la vita fra 0 e 74 anni) è pari al 62,0% (1 caso ogni 16 uomini), mentre il rischio di morire è pari all'8,2%. Non vi è dubbio tuttavia che l'eziologia del carcinoma prostatico sia multifattoriale, essendo il risultato di una complessa interazione tra fattori genetici ed ambientali con l'età e lo stato ormonale dei soggetti a rischio. Sono stati riconosciuti come fattori di rischio indipendenti l'età, la razza, le abitudini alimentari e il livello di androgeni circolanti. Si tratta di una patologia fortemente correlata all'età, di conseguenza il numero assoluto dei casi di carcinoma prostatico aumenta in relazione con l'aumento della prospettiva media di vita della popolazione.

Il PCa presenta una notevole variabilità di incidenza nelle diverse aree geografiche e nelle diverse razze: l'incidenza è alta nella popolazione afro-americana che vive negli Stati Uniti mentre in alcuni paesi del Sud-Est asiatico si riscontrano tassi d'incidenza molto bassi, inferiori di dieci volte al tasso d'incidenza dell'America del Nord e di molti paesi dell'Europa [285]. Differenze nel tipo di dieta, nello stato socio-economico e nei livelli di ormoni

attivi circolanti (DHT), possono contribuire alle variazioni razziali del tasso di incidenza. L'aumento delle aspettative di vita delle popolazioni occidentali e la legittima aspirazione a standard di benessere e qualità di vita elevati hanno fatto sì che il PCa abbia acquisito maggiore rilevanza fino a divenire un problema medico e socio-economico prioritario nelle società industrializzate.

### Diagnosi e classificazione istologica del tumore prostatico

**113** Attualmente la diagnosi del carcinoma prostatico si basa essenzialmente sulle seguenti indagini:

**TABELLA 4. INDAGINI A FINI DIAGNOSTICI**

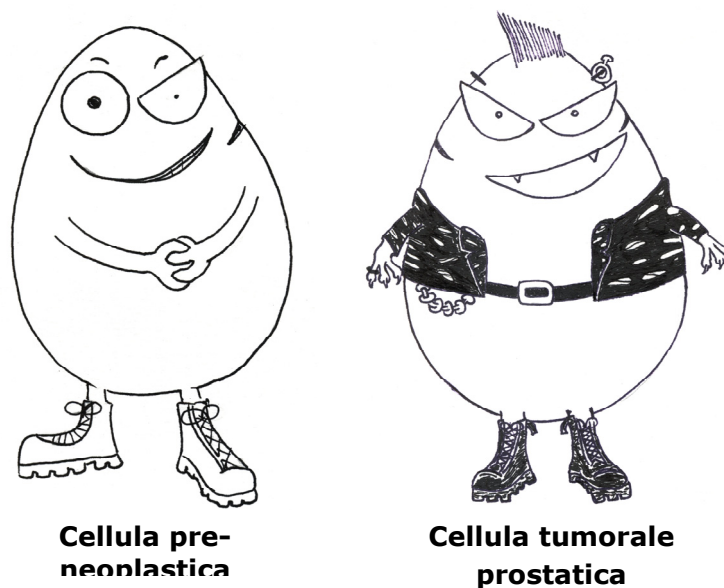
TIPO DI INDAGINE	NOTE
<b>Esplorazione digito-rettale (DRE)</b>	Consigliata annualmente al raggiungimento del 50° anno di età, insieme al dosaggio sierico dell'Antigene Prostatico Specifico (PSA). La scoperta di un innalzamento dei valori di PSA non rappresenta una prova definitiva della presenza di cancro alla prostata ma è la condizione che determina l'attivazione delle procedure di secondo livello, finalizzate alla diagnosi di PCa.
<b>Ecografia prostatica transrettale (TRUS)</b>	Eseguita in caso di DRE e PSA sospetto
<b>Agobiopsia prostatica</b>	Eseguita in tutti i casi in cui vi sia il sospetto di neoplasia prostatica alla DRE, alla TRUS o nei casi in cui il livello plasmatico del PSA superi i 4 ng/mL, seguita da esame istologico.

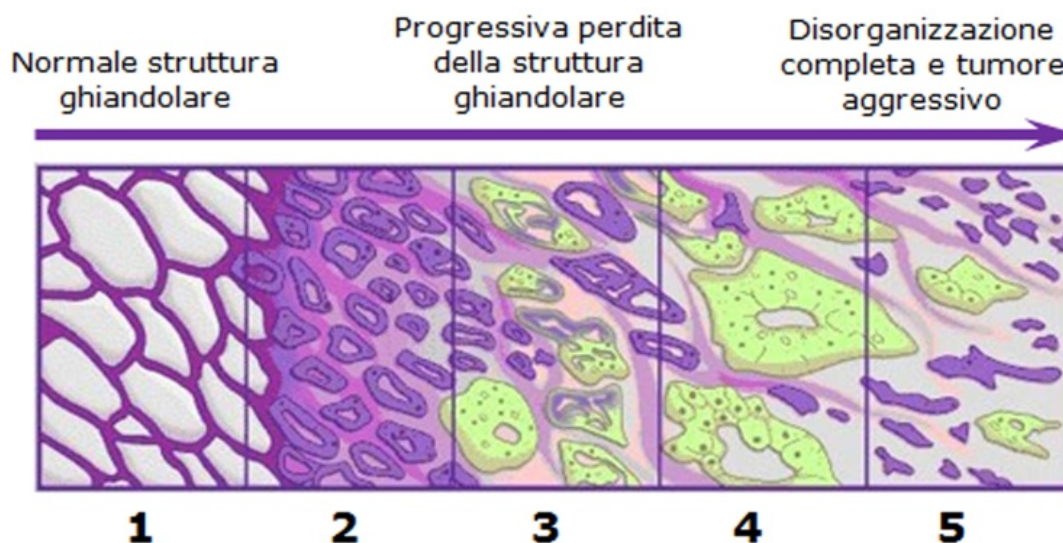
Sebbene ampiamente utilizzato nella pratica clinica, il PSA rappresenta un parametro poco specifico per la diagnosi di carcinoma prostatico. Infatti in circa il 30% dei pazienti il rialzo del PSA è dovuto ad eventi non correlati al tumore (infiammazione prostatica, iperplasia prostatica benigna, infezioni in corso, età dell'individuo) e, pertanto, questa proteina rappresenta in modo più corretto un marcatore tessuto specifico, piuttosto che un marker di neoplasia [286].

Con l'inizio della proliferazione di cellule pre-cancerose vi è un graduale cambiamento nel profilo di espressione e della morfologia delle cellule epiteliali prostatiche che si avviano alla trasformazione cancerosa, tra cui lo spegnimento di alcuni geni oncosoppressori e geni responsabili della produzione di determinati marcatori epiteliali e l'attivazione di proto-oncogeni e geni marcatori di cellule mesenchimali. Ciò può avvenire sia a livello trascrizionale così come a livello traduzionale. Molto spesso il silenziamento trascrizionale di determinati geni è secondario a modificazioni epigenetiche che risultano in un fenotipo tumorale.

I geni identificati come epigeneticamente silenziati nel PCa includono i **Recettori degli Androgeni (AR)**, la **Glutatione-S-Transferasi P1 (GSTP1)**, l'**E-caderina**, il **gene del Retinoblastoma (pRB)** e la **Famiglia 1 del dominio di Associazione di Ras (RASSF1)**; il silenziamento di questi geni svolge un ruolo critico durante l'avvio e la progressione del tumore della prostata.

Il carcinoma della prostata si origina in circa l'80% dei casi dalla zona periferica o caudale della ghiandola, per il restante 20% dalla zona centrale o dalla zona di transizione. Inizialmente la neoplasia si sviluppa all'interno della ghiandola, mentre le diffusionsi per contiguità linfatica ed ematica sono generalmente più tardive. La storia naturale di questo tumore è estremamente imprevedibile, infatti, non sempre le due possibili forme di progressione e cioè, l'invasione locale organo-confinata e la formazione di metastasi, si verificano consecutivamente e progressivamente in relazione alle dimensioni del tumore, ma possono essere indipendenti l'una dall'altra. Si ritiene che la gran parte dei tumori allo stato latente, ovvero non clinicamente manifesto, abbia un comportamento biologicamente poco aggressivo e che solo una ristretta porzione possa progredire verso la forma metastatica invasiva. Purtroppo le neoplasie dotate di comportamento aggressivo non sono attualmente distinguibili da quelle indolenti al momento della diagnosi e questo crea difficoltà nella gestione clinica del paziente. La refertazione istopatologica del tumore prostatico è necessaria per definirne il *grading*, o differenza istologica, rispetto al tessuto normale e la stadiazione, ossia l'estensione intra- ed extra-ghiandolare della patologia tumorale. Il sistema di riferimento internazionale utilizzato per la definizione del grado istologico del tumore è la classificazione secondo Gleason, che si basa sull'osservazione dell'architettura ghiandolare per valutare il grado di differenziamento e di crescita della neoplasia rispetto alla matrice stromale ed al tessuto sano [287].





**Gleason 1:** Tumore composto da noduli di ghiandole ben delimitati, strettamente ravvicinate, uniformi, singole e separate l'una dall'altra.

**Gleason 2:** Tumore ancora abbastanza circoscritto, ma con eventuale minima estensione delle ghiandole neoplastiche alla periferia del nodulo tumorale, nel tessuto prostatico non-neoplastico.

**Gleason 3:** Tumore che infiltra il tessuto prostatico non-tumorale; le ghiandole presentano notevole variabilità di forma e dimensione.

**Gleason 4:** Ghiandole tumorali con contorni mal definiti e fuse fra loro; possono essere presenti ghiandole cribriformi con bordi irregolari.

**Gleason 5:** Tumore che non presenta differenziazione ghiandolare, ma è composto da cordoni solidi o da singole cellule.

**Figura 4.2. Adenocarcinoma della Prostata umana.** Quadri istologici secondo il Grado Gleason. Tratto da Dawson, 2003.

moderatamente differenziati, ed hanno una evoluzione per lo più imprevedibile, mentre quelli con punteggio compreso fra 8 e 10 sono indifferenziati ed hanno un comportamento molto aggressivo. La stadiazione

La classificazione secondo Gleason prevede l'assegnazione di cinque gradi principali, numerati progressivamente da 1 a 5, che identificano altrettanti diversi profili istologici (figura 4.2). L'architettura prostatica, l'organizzazione e la differenziazione ghiandolare, vengono progressivamente persi passando dal grado 1 al grado 5. Nel corso della refertazione anatomicopatologica i gradi sono assegnati al profilo istologico più frequente nel pezzo osservato (grado primario) ed al secondo più frequente (grado secondario). Dalla somma dei gradi assegnati alle due condizioni istologiche più frequenti si ottiene il punteggio complessivo, denominato *Gleason score*, il cui valore è compreso tra 2 e 10. I carcinomi con *score* basso, ovvero compreso fra 2 e 4, sono di solito a crescita lenta e hanno una minore tendenza a metastatizzare; quelli con un punteggio compreso fra 5 e 7 sono

fornisce un'indicazione convenzionale sulle dimensioni del tumore e se questo si è diffuso al di fuori del sito primario. La stadiazione patologica si basa sulla refertazione istologica dell'intera prostata dopo asportazione chirurgica. Il sistema "TNM" è il sistema internazionale di stadiazione di un tumore, che considera tre parametri: il volume del tumore e la sua estensione locale (T), l'interessamento o meno dei linfonodi loco-regionali (N) e l'esistenza o meno di metastasi a distanza (M).

Il cancro della prostata è associata a diversi stadi di lesioni pre-neoplastiche e cioè:

**TABELLA 4.1. Stadi di lesione pre-neoplastiche**

TIPO DI LESIONE	CARATTERISTICHE
<b>Atrofia Infiammatoria Proliferativa (PIA)</b>	È il risultato di lesioni degenerative o lesioni proliferative <i>de novo</i> dopo infiammazioni croniche, che porta ad una riduzione del volume delle ghiandole preesistenti e può essere un fattore di rischio significativo per lo sviluppo di adenocarcinoma prostatico [288]
<b>Neoplasia Prostatica Intraepiteliale (PIN)</b>	La proliferazione neoplastica non invasiva delle cellule epiteliali, nella zona periferica della prostata, è ampiamente considerata come un precursore di adenocarcinoma invasivo. In caso di PIN, la proliferazione cellulare avviene all'interno di dotti e ghiandole pre-esistenti, con la conservazione della loro architettura ma con progressiva distruzione dello strato di cellule basali; tuttavia, non sembra essere contemplata l'invasione stromale.
<b>Neoplasia Prostatica Intraepiteliale ad Alto Grado (HG-PIN).</b>	L'intervento di altre alterazioni istologiche o biologiche, come perdita di differenziazione neuroendocrina e secretoria, anomalie nucleari e nucleolari, neovascolarizzazione, maggior potenziale proliferativo, instabilità genetica con variazione di contenuto in DNA consente l'evoluzione della PINad HG-PIN. La HG-PIN sembra predire la comparsa di adenocarcinoma prostatico dopo circa 5 anni. In questo periodo, la tendenza è quella dello sviluppo di un tumore di notevole eterogeneità istologica, spesso multi-focale [289].

#### Adenocarcinoma prostatico e androgeni.

**114** La neoplasia prostatica è un tumore androgeno-dipendente, almeno nella sua fase iniziale. Il tessuto ghiandolare prostatico è sensibile al diidrotestosterone (DHT), che si forma a partire dal testosterone per azione della 5- $\alpha$ -riduttasi, enzima presente a livello della membrana plasmatica delle cellule prostatiche [290]. In seguito alla deprivazione di questi ormoni, mediante somministrazione di antagonisti degli androgeni, si ottiene un forte decremento del volume dei tumori primari e delle metastasi nell'80% dei pazienti trattati, dovuto all'instaurarsi di un processo selettivo di morte cellulare programmata (apoptosi) nelle cellule androgeno-

dipendenti. Tuttavia, dopo un periodo di risposta alla terapia, nella maggior parte dei casi il carcinoma prostatico riprende la sua crescita, nonostante i bassi livelli di androgeni circolanti, a causa della proliferazione di cellule prostatiche caratterizzate da un fenotipo androgeno-indipendente. Secondo Isaacs e collaboratori, lo sviluppo del tumore androgeno-indipendente è frutto di una selezione clonale: in pratica, entrambe le popolazioni cellulari, quella androgeno-dipendente e quella androgeno-indipendente, sarebbero compresenti sin dall'inizio nel tumore, ma la deplezione della popolazione androgeno-dipendente, per effetto del blocco androgenico, favorirebbe la crescita selettiva di quella androgeno-indipendente [291]. Pertanto la deprivazione androgenica, seppure al momento rappresenti l'unica opzione terapeutica in caso di tumore non organo-confinato, dovrebbe essere considerata, a tutti gli effetti, un trattamento palliativo.

### Riassunto

**115** *La prostata è una ghiandola che fa parte dell'apparato genitale maschile dei mammiferi. La sua funzione principale è quella di produrre ed emettere il liquido seminale, costituente dello sperma, contenente gli elementi necessari a nutrire e veicolare gli spermatozoi. La prostata differisce considerevolmente tra le varie specie di mammiferi, per le caratteristiche anatomiche, chimiche e fisiologiche.*

*I carcinomi prostatici annoverano le neoplasie maligne che si originano dalle cellule epiteliali della prostata e possono dare luogo a metastasi, con predilezione per le ossa e i linfonodi.*

*Il tumore alla prostata si sviluppa più frequentemente negli ultracinquantenni; è il secondo più comune tipo di tumore negli Stati Uniti, dove è responsabile del maggior numero di morti da tumore, dopo quello del polmone. Molti fattori, compresa la genetica e la dieta, concorrono allo sviluppo del carcinoma prostatico. Il tumore prostatico viene più spesso scoperto all'esame clinico o tramite esami ematici, attraverso la misurazione del PSA. Un sospetto tumore alla prostata è tipicamente confermato tramite l'asportazione (biopsia) di un frammento di tessuto e il successivo esame istologico. Il tumore prostatico si può trattare con la chirurgia, la radioterapia, la terapia ormonale, occasionalmente la chemioterapia o combinazioni di queste. L'età e lo stato di salute del paziente, così come la diffusione del tumore, l'aspetto microscopico e la risposta al trattamento iniziale, sono importanti per determinare la prognosi. Poiché il tumore della prostata è una malattia tipica degli uomini anziani, molti di essi vanno incontro a morte, prima che il tumore possa espandersi o causare sintomi; ciò rende difficoltosa una selezione del trattamento. La decisione se trattare o meno un tumore localizzato (ossia completamente confinato all'interno della prostata) implica un bilancio tra i benefici attesi e gli effetti negativi in termini di sopravvivenza del paziente e della sua qualità della vita.*



## PCa e molecole target.

**116** Il cancro della prostata rimane una delle principali cause di morte negli esseri umani di sesso maschile, nonostante la possibilità di una precoce diagnosi. Esso può essere causato da mutazioni e perdita di regolazione dei prodotti di vari geni coinvolti nella trasduzione del segnale intracellulare e nella progressione del ciclo cellulare.

**117** *Ruolo centrale del Pathway PI(3)K/PTEN/Akt/mTOR nel cancro alla prostata.* Nelle lesioni prostatiche il Cromosoma 10q è spesso perso (50-80%); la **Proteina Omologa a Fosfatasi e Tensina (PTEN)** che si trova all'interno del locus 10q23, è un regolatore negativo della cascata di trasduzione del segnale PI(3)K/Akt. La via di segnalazione PI(3)K/Akt è nota per il suo ruolo nella mediazione della sopravvivenza cellulare, così come la progressione del ciclo cellulare e la trasformazione neoplastica. Di conseguenza, la mutazione di PTEN intensificherebbe questa cascata, che potrebbe conferire una serie di proprietà tipiche della cellula del PCa, tra le quali una maggior sopravvivenza in condizioni ostili.

La PI(3)K serve a fosforilare una serie di fosfolipidi di membrana per la formazione di secondi messaggeri lipidici. La principale molecola effettrice a valle della cascata di segnalazione di PI(3)K è Akt/PKB (**Protein Chinasi B**). Akt contiene un dominio N-terminale omologo alla Pleckstrina (PH) che serve per indirizzare la proteina alla membrana per la sua attivazione [292]. Le chinasi dipendenti da fosfatidilinositide (PKDs) sono responsabili per l'attivazione di Akt. Akt può anche essere fosforilato dal complesso mTOR/Rictor e defosforilata da p70S6K [293]. Una volta attivata, Akt abbandona la membrana cellulare per intervenire sull'attivazione di specifici substrati intracellulari. In seguito, Akt è in grado di traslocare al nucleo ove influenza l'attività di un certo numero di regolatori trascrizionali quali: la **Proteina che Lega l'Elemento di Risposta all'AMPc (CREB)**, il **Fattore 2 di trascrizione Eucariotico (E2F)**, NF-κB (via IκK) e FOXO, tutti substrati diretti o indiretti di Akt, ciascuno in grado di promuovere la proliferazione cellulare o la sopravvivenza [294, 295, 296]. Oltre ai fattori di trascrizione, Akt è in grado di modulare l'attività di una serie di altre molecole capaci di influenzare lo stato di sopravvivenza della cellula comprese la caspasi-9 [297], la molecola pro-apoptotica Bad [298] e la **Glicogeno Sintasi Chinasi-3β (GSK-3β)** [299]. Quando questi obiettivi sono fosforilati da Akt, possono essere attivati o disattivati, ma il risultato finale è quello di promuovere la sopravvivenza della cellula.

Come accennato in precedenza, la perdita di funzione di PTEN nel PCa avanzato è abbastanza comune (50-80% dei pazienti) [300]. Di conseguenza, il risultato di una sovrabbondanza di secondi messaggeri lipidici può causare l'attivazione costitutiva delle proteine contenenti un dominio PH, come Akt. È per questo motivo che Akt si trova ad essere altamente attivata in casi avanzati di PCa [301] ed in grado di influenzare la sopravvivenza delle cellule di PCa, attraverso una serie di meccanismi diversi. Quindi,

l'inibizione Akt o il ripristino delle attività di PTEN, sono potenziali bersagli terapeutici nel PCa.

p27<sup>Kip1</sup> è un mediatore centrale della progressione del ciclo cellulare il cui ruolo di inibitore delle **Chinasi Ciclina-Dipendenti (CDK)** è perso in molti casi di PCa [302]. Akt sembra influire sull'espressione di p27<sup>Kip1</sup> attraverso la molecola intermedia FKHR. **FKHR (FOXO1)** è un membro della **Famiglia di Fattori di Trascrizione Forkhead/FOXO**, noti per stimolare la trascrizione di p27<sup>Kip1</sup>. Dopo l'attivazione, Akt fosforila FKHR causando una sua inattivazione ed una diminuzione dell'espressione di p27<sup>Kip1</sup>. Questa serie di eventi porta ad un fenotipo in cui le cellule di PCa perdono restrizioni sulla progressione del ciclo cellulare, promuovendo in tal modo una divisione non regolamentata.

Akt regola anche la risposta apoptotica attraverso la sua capacità di interagire con una serie di importanti attori del processo apoptotico (vedi tabella 4.2).

**TABELLA 4.2. Attività regolatoria di Akt.**

<b>BERSAGLI MOLECOLARI</b>	<b>ATTIVITA' DI AKT</b>
<b>Citocromo-c</b>	Inibizione del rilascio dai mitocondri
<b>Pro-caspasi-9</b>	Fosforilazione ed impedimento della sua scissione in caspasi-9, iniziatrice del programma di morte cellulare [297]
<b>FKHR</b>	Fosforilazione e sovra-regolazione dei ligandi di Fas e Bim, due molecole potenti induttori di apoptosi [303].
<b>Bad</b>	Fosforilazione e perdita della capacità di interagire con i membri della famiglia anti-apoptotica Bcl-2.
<b>Bim</b>	Fosforilazione ed inibizione della sua attività pro-apoptotica.

Akt gioca anche un ruolo importante nella traduzione di proteine coinvolte nella crescita e nella sopravvivenza cellulare. Un obiettivo specifico è mTOR che è in grado di indurre la fosforilazione della **Proteina 1 che lega eIF-4E (4E-BP1)** permettendogli di interagire con il complesso di inizio della traduzione per avviare la sintesi proteica. Un altro obiettivo di Akt è **p70S6K**, un noto fattore di trascrizione che incrementa la sintesi della proteina mTOR [304], come sappiamo estremamente importante nei processi autofagici.

L'attivazione di mTOR mediata da Akt consente la traduzione sproporzionata di mRNA di proto-oncogeni caratterizzati da lunghe sequenze ricche di GC nel 5'-UTR che, spesso, può ostacolare la capacità del complesso eIF-4E di avviare la traduzione in modo efficiente al codone di inizio. Proteine chiave sovra-esprese come conseguenza di questo evento sono c-myc [305], ciclina D1 [306] e VEGF [307].

La ciclina D1 è stata segnalata per essere sovra-espressa in xenotrapianti di PCa e metastasi, mentre i primi stadi delle lesioni prostatiche possiedono livelli bassi della proteina [308]. Inibitori di mTOR, come la rapamicina, possono risultare efficaci nella terapia del cancro alla prostata.

**118**

***Ruolo di segnalazione MAPK nel carcinoma della prostata.*** La cascata di segnalazione PI(3)K/Akt è associata principalmente con la sopravvivenza delle cellule e, per contro, il percorso Raf/MEK/ERK è associato con la crescita, proliferazione e differenziazione [309] (figura 4.3). Nonostante la ricchezza di informazioni riguardo il ruolo della segnalazione mediata da PI(3)K in PCa, molto meno si sa circa la funzione del percorso Raf/MEK/ERK. In modo simile a PI(3)K, l'attivazione di Raf/MEK/ERK è iniziata da un recettore di due subunità che legano dei mitogeni sulla superficie cellulare, seguita dall'autofosforilazione di una subunità del recettore che agisce come una tirosin-chinasi, mentre l'altra subunità funge da substrato per una successiva fosforilazione dopo la quale il recettore oligomerizza. I residui fosforilati di tirosina servono come siti di attracco per le proteine citoplasmatiche che contengono domini SH2. Dopo questo evento, un complesso di proteine è in grado di avviare una serie di eventi fosforilativi che possono alterare, in ultima analisi, l'espressione genica.

Ras è descritta come una proteina G monomerica da 21 kDa localizzata sulla membrana e considerata come la molecola iniziatrice della via di trasduzione del segnale mediata da Raf. Le mutazioni nel gene Ras sono relativamente rare in PCa [310] rispetto ad altri tipi di tumore (~30%). Dopo il legame e l'attivazione dei recettori, le proteine contenenti i domini SH2, come Grb2, sono attivate dal residuo fosforilato di tirosina nel dominio citosolico del recettore. Grb2 contiene anche un dominio SH3, la cui funzione principale è quella di legarsi a regioni ricche di prolina di altre molecole, tipo SOS. SOS è uno stimolatore della dissociazione di nucleotidi guanidinici che si lega al Ras dopo l'attivazione del recettore. A seguito del legame con SOS, Ras subisce un cambiamento conformazionale che causa la sua dissociazione dal GDP, permettendole di associarsi con i GTP. Nella forma legata al GTP, Ras è nel suo stato attivo ed in grado di reclutare le chinasi Raf alla membrana plasmatica per la loro attivazione [311].

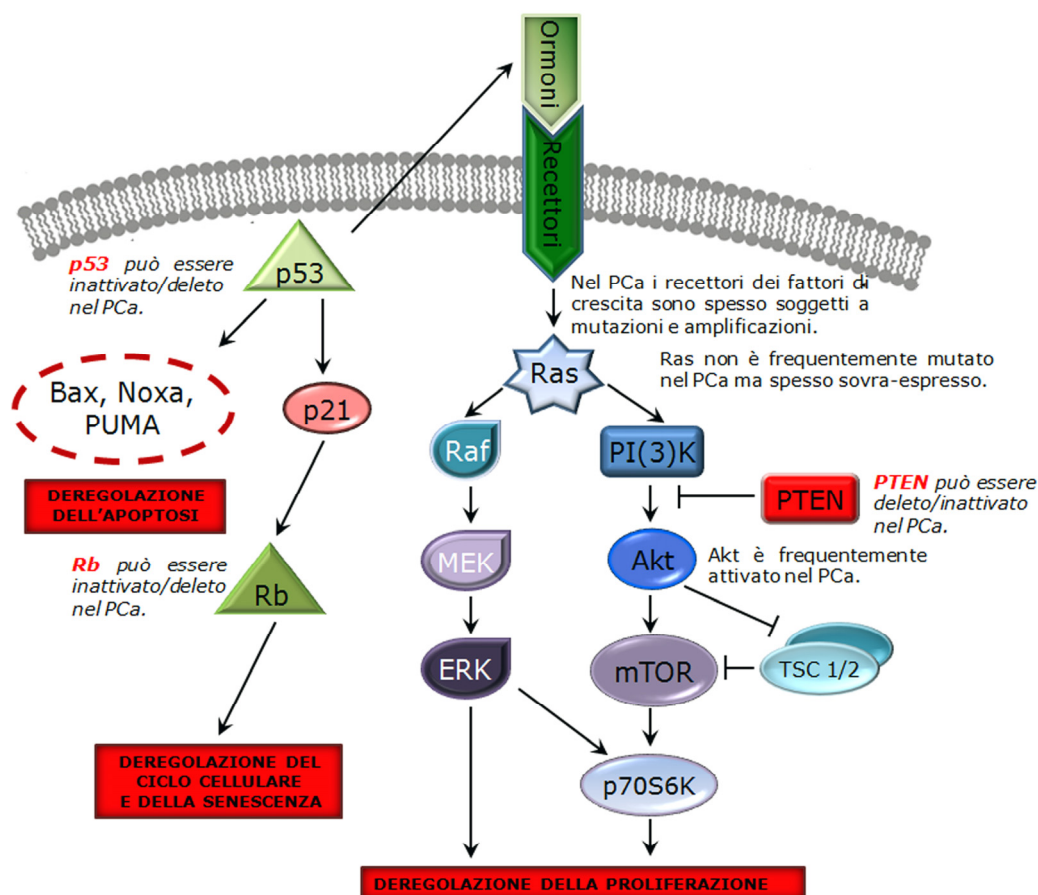
Per regolare negativamente questo processo, esistono numerose **Proteine Attivatrici delle GTPasi (GAP)** capaci di stimolare l'attività GTPasica di Ras al fine di convertirla alla sua forma originale, lo stato inattivo legante il GDP.

Immediatamente a valle di Ras compare la tirosin chinasi non recettoriale Raf. Attualmente, sono note tre isoforme di Raf: Raf-1 (c-Raf), A e B-Raf [312], la cui regolazione dell'attivazione è molto più complessa. In breve, Raf-1 è mantenuta in uno stato inattivo quando fosforilata su residui di serina, legandosi alla proteina 14-3-3. L'attivazione di Raf-1 inizia quando Ras sposta la proteina 14-3-3, permettendo alla **Fosfatasi 2A (PP2A)** di accedere e rimuovere il gruppo fosfato dalla serina 259 e permettere così l'attivazione della proteina. Dopo l'attivazione, i bersagli substrato a valle,

MEK-1 e MEK-2 sono fosforilati sulle serine 218 e 222 dalle proteine Raf [314]: la fosforilazione su questi due residui aumenta l'attività di MEK-1/2 di oltre 7000 volte. La presenza della **proteina Soppressore della Chinasi Ras (KSR)** che media l'interazione tra Raf e MEK1/2, consente una fosforilazione efficiente [315].

L'associazione di Raf, MEK1/2 e KSR sembra essere mediata da modulatori dell'attività di KSR, tra i quali alcuni partner di MEK-1 (come MP1) e degli **Inibitori della Chinasi Raf (RKIP)** che distruggono il legame tra Raf-1, MEK e KSR: diminuzioni dei livelli di RKIP sono associati ad una progressione del PCa e, pertanto, è stato proposto come RKIP possa essere una nuova proteina onco-soppressore [316].

ERK-1 e -2 sono chinasi poste direttamente a valle delle proteina MEK. La fosforilazione, da parte di MEK, di ERK-2, comporta la sua omodimerizzazione e la traslocazione del complesso nel nucleo dove, si pensa, sia in grado di attivare la topoisomerasi II- $\alpha$  e promuovere in tal modo un rimodellamento della cromatina durante la mitosi [317]. Esiste anche un certo numero di obiettivi citoplasmatici di ERK, il primo dei quali è la **Protein Chinasi S6 p90 ribosomiale (p90RSK)** e la **Proteina Attivatrice-1 (AP-1)**, membro della famiglia dei fattori di trascrizione. La modulazione dell'attività di questi bersagli promuove un ambiente che favorisce la trasduzione del segnale proliferativo (figura 4.3).



**Figura 4.3. I percorsi PI(3)K/PTEN/Akt/mTOR e Raf/MEK/ERK nelle cellule tumorali prostatiche.** Nel PCa, mutazioni e delezioni sono state rilevate in p53, PTEN, Rb, AR e molti altri geni. Alcune di queste mutazioni sono traslocazioni cromosomiche che causano l'attivazione o l'inattivazione dei percorsi Raf/MEK/ERK e PI(3)K/PTEN/Akt/mTOR così come le vie che controllano la progressione del ciclo cellulare e l'apoptosi. I geni più frequentemente mutati nelle cellule tumorali prostatiche risultano essere sono PTEN, Rb, e p53 (indicati in rosso nella figura) (modificato da Lee JT et al., 2007).

MAPK non è stato ampiamente studiato nella prostata ed esistono anche pochi dettagli, e tra loro discordanti, circa il coinvolgimento del percorso Raf/MEK/ERK nella progressione della malattia tumorale. Mentre un'attività aberrante di MAPK è comune in molti tumori, ci sono poche prove che suggeriscono come l'attività di MAPK sia aumentata nel PCa.

Alcuni studi dimostrano che il trattamento di cellule di PCa con isotiocianato di resveratrolo o feniletile, due composti che inducono morte apoptotica in una varietà di tumori, possono indurre apoptosi in cellule di origine prostatica in una maniera ERK-dipendente [318]. L'uso di ERK attivato come indicatore prognostico della malattia è quindi diventato uno strumento utile per determinare lo stadio di progressione del PCa. Tuttavia, mentre alcuni studi riportano un'attivazione aumentata di ERK in tessuti rimossi da pazienti sottoposti a prostatectomia radicale, in altri si afferma come l'attivazione di ERK diminuisce il progredire della malattia da tessuto normale a PIN [319]. Nel loro insieme, questi dati non sono conclusivi, ma suggeriscono che l'attività di ERK possa essere un mezzo indicativo per una corretta prognosi del paziente [320].

**119** *Ruoli delle proteine del ciclo cellulare nel PCa.* La complessa rete di proteine che disciplinano la progressione del ciclo cellulare, possono anche svolgere il ruolo di regolatori delle vie di segnalazione PI(3)K/PTEN/Akt e Raf/MEK/ERK.

Numerose proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare sono spesso mutate nel PCa, con conseguente attivazione di oncogeni e perdita di proteine soppressore del tumore. Non vi è alcun profilo molecolare dominante che avvia o mantiene la carcinogenesi della prostata ma, piuttosto, una miscela complessa di mutazioni che interrompono il controllo del ciclo cellulare e i percorsi morte. Le proteine del ciclo cellulare comunemente mutate negli stadi precoci o tardivi di progressione del cancro alla prostata includono Rb, p14, p16, p53 e p27 [321-323]. Mutazioni di queste proteine comportano un controllo difettoso dei checkpoint del ciclo cellulare, portando ad ulteriore instabilità cromosomica ed all'inattivazione di meccanismi molecolari preventivi per la protezione dai tumori, come la senescenza.

I percorsi PI(3)K/PTEN/Akt e Raf/MEK/ERK sono anche comunemente bersaglio di mutazioni che promuovono la proliferazione cellulare e il blocco apoptotico. Mutazioni combinate all'interno e tra queste vie, possono alterare il successo della radio e chemioterapia. La conoscenza delle vie

alterate, prima di iniziare la terapia potrebbe, in campo medico, ottimizzare le strategie di sensibilizzazione e le combinazioni di trattamenti sulla base del profilo individuale. Sebbene la frequenza di mutazioni di p53 nel PCa ai primi stadi sia basso, mutazioni eterozigoti con perdita della funzione, spesso accompagnano la fase avanzata del PCa [324]. p53 è posto all'incrocio di risposte allo stress in diversi percorsi critici per mantenere l'integrità del

**Box 4.1.** p53 attiva funziona come regolatore trascrizionale all'interno di una rete complessa che coinvolge la trans-attivazione e la trans-repressione selettiva di più geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi. p53 funziona come un fattore di trascrizione tetrameric. L'etero-oligomerizzazione tra un allele mutante eterozigote e proteine wild-type di p53 può essere sufficiente ad alterare la funzione dei tetrameri di p53.

genoma, compreso l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA, la catastrofe mitotica, l'apoptosi e la senescenza cellulare (Box 4.1) [325, 326]. Siccome la funzione di p53 è fondamentale per coordinare la risposta del danno al DNA esistono, a monte, numerosi percorsi di controllo per l'attivazione di p53. Mentre l'elenco dei segnali di stress che attivano p53 continua a crescere, le vie principali sembrano essere stress di natura oncogenica e danni al DNA. È interessante notare che vari segnali di stress utilizzano diversi meccanismi per l'attivazione di p53. In condizioni di riposo, la via di degradazione ubiquitina-dipendente mantiene un alto tasso di turnover di p53, che dipende dall'ubiquitina ligasi E3 ed MDM2 [327].

MDM2 ipofosforilata lega il l'estremità C-terminale della proteina p53 la quale diventa un obiettivo per la degradazione proteasomiale. Inoltre, il dominio di legame di p53 a MDM2 si sovrappone al dominio di legame al DNA, compromettendo l'attività della proteina. La proteina p53 è regolata anche da MDMX, un omologo di MDM2, che si lega a MDM2 attraverso il suo dominio RING C-terminale e stimola l'ubiquitinazione di p53 dipendente da MDM2 [328].

Tuttavia, una terapia che induce danni al DNA innesca una cascata di fosforilazioni che coinvolgono la proteina **ATM (Atassia Teleangetasia Mutato)** e proteine **ATM-correlate (ATR)** le quali, attraverso eventi multipli di fosforilazione su MDM2 e MDMX e loro conseguente inattivazione [329], impediscono che p53 venga eliminata, preservandone la funzione.

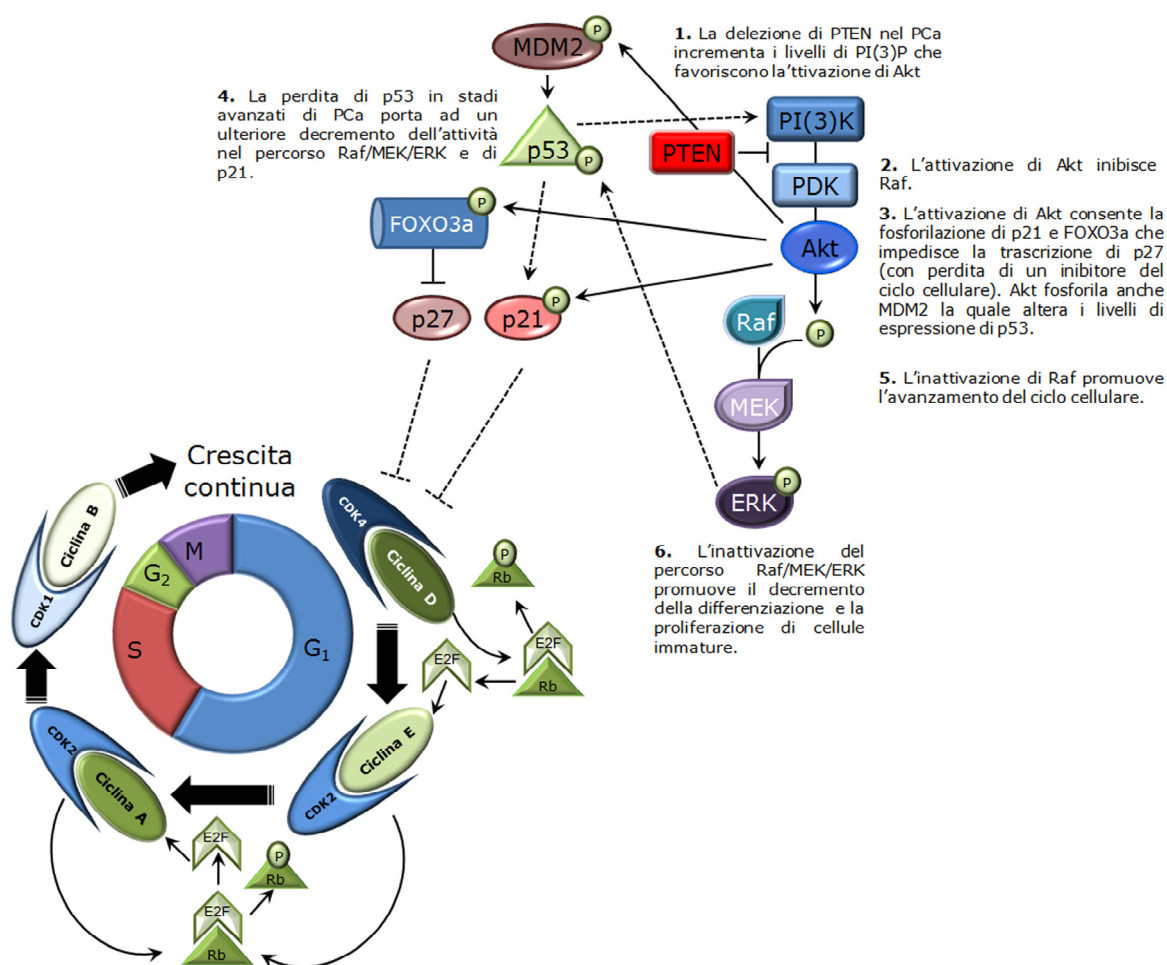
p53 può attivare il percorso Raf/MEK/ERK con ERK capace di fosforilare p53, stabilizzando la proteina nella sua forma attiva. Lo stesso percorso PI(3)K/PTEN/Akt serve a regolare l'attività di p53 attraverso la fosforilazione, mediata da Akt, di MDM2 che ne aumenta l'attività e destabilizza p53 [330] (figura 4.4).

In alcuni studi di sensibilità del PCa *in vitro*, si è fatto uso di saggi di valutazione dell'attività apoptotica per stimare l'efficacia della morte cellulare, utilizzando sia linee di PCa esprimenti una proteina p53 funzionale (LNCaP) sia quelle linee cellulari, derivanti da lesioni metastatiche, caratterizzate da mutazioni di p53 (raramente osservate in un tumore organo-confinato) quali PC-3 e DU145. Queste linee sono portatrici di coppie di alleli p53 delete o inattivate, con conseguente perdita della

funzione di p53, condizione spesso associata ad una diminuzione della radiosensibilità.

In colture di cellule di PCa (LNCaP e 22Rv1), con una proteina p53 funzionale la senescenza cellulare rappresenta la forma dominante di morte. Le risposte controllate da questo soppressore del tumore, tra cui l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del danno al DNA, la catastrofe mitotica e l'apoptosi, danno un contributo significativamente inferiore rispetto alla morte indotta da radiazione. Nel contesto di linee cellulari PC-3 e DU145, l'autofagia rappresenterebbe un ulteriore forma di morte cellulare, recentemente segnalata, per aumentare la sensibilità terapeutica [331]. Ricordando che nessuna di queste due linee cellulari esprime una p53 funzionale, nel contesto di una diagnosi precoce in cui l'inattivazione di p53 è rara, l'induzione di arresto della crescita potrebbe rappresentare una modalità di morte clonogenica attuabile con la radioterapia. La regressione del tumore dopo la terapia potrebbe coinvolgere la fagocitosi delle cellule senescenti da parte dei macrofagi o l'autocannibalismo delle stesse cellule senescenti. Alterazioni pronunciate nel percorso endosomiale/lisosomiale sono evidenti in cellule senescenti (identificabile dall'accumulo di lipofuscina a livello dei vacuoli autofagici). L'autofagia è un percorso altamente conservato per il mantenimento omeostatico dei componenti intracellulari e per l'acquisizione di elementi nutritivi durante il digiuno e lo stress. Recentemente, p53 ha mostrato di regolare positivamente l'autofagia dipendente DRAM [332]. Così, in una terapia che induce l'attivazione di p53, l'autofagia e la senescenza cellulare possono contribuire alla regressione del tumore come già osservata *in vivo*, a seguito di "riaccensione" sperimentale del gene p53 in xenotrapianti di tessuto tumorale in topo [333].

Oltre p53, anche i soppressori tumorali p21 e Rb sono importanti regolatori di senescenza. p53, p21 e Rb sono temporaneamente attivate in risposta a fattori di stress che inducono una prematura senescenza nelle cellule tumorali. La trans-attivazione di p21, inibitore delle CDK, appare più rilevante come mediatore a valle dell'arresto della crescita dipendente da p53. L'inattivazione di Rb è comune nel PCa e precede, generalmente, le alterazioni somatiche riguardanti i geni di p53 e PTEN. Interazioni tra questi tre grandi geni soppressori tumorali, sembrano influenzare direttamente lo sviluppo del PCa nel topo [334]. Ad esempio, l'eliminazione mirata di un allele Rb nell'epitelio prostatico comporta uno sviluppo di iperplasia focale, ma non di tumorigenesi, mentre l'inattivazione di PTEN da sola induce senescenza cellulare p53-dipendente. Al contrario, combinando l'inattivazione delle proteine della famiglia Rb (Rb/p107/p130) o p53, con una perdita di PTEN si ottiene, rispettivamente, un tasso accelerato di progressione del tumore o lo sviluppo di adenocarcinoma invasivo nei topi [335, 336]. Questi studi transgenici stabiliscono che una senescenza p53-mediata, limita la proliferazione cellulare solo dopo la perdita di PTEN nella prostata di topo e che, la perdita concomitante di Rb o p53, è sufficiente per ostacolare la progressione tumorale (figura 4.4).



**Figura 4.4. Effetti di PTEN e dell'inattivazione di p53 sull'attivazione dei percorsi PI(3)K/PTEN/Akt/mTOR e Raf/MEK/ERK nel PCa.** In figura sono presentate alcune delle complesse interazioni tra le cascate di segnalazione PI(3)K/PTEN/Akt/mTOR e Raf/MEK/ERK con p53 e PTEN e come viene influenzata la progressione del ciclo cellulare nel PCa. L'inibizione del percorso Raf/MEK/ERK a seguito dell'inattivazione di p53 e PTEN e la sovra-attivazione di Akt nel PCa avanzato comportano la continua proliferazione di cellule cancerose androgeno-indipendenti, che proseguono in un ciclo proliferativo invece di differenziarsi (modificato da Lee JT et al., 2007).

**120** *La famiglia Bcl-2 e gli inibitori delle caspasi nel PCa.* Numerose dati in letteratura indicano come, in tumori scarsamente differenziati della prostata, Bcl-2 e altri membri anti-apoptotici della sua famiglia sono significativamente sovra-regolati. La sovra-espressione di Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> è stata correlata ad una resistenza sia alla chemio che alla radioterapia [337]. La famiglia Bcl-2 interviene nel funzionamento dell'asse di segnalazione degli androgeni in cellule tumorali della prostata. In cellule tumorali androgeno-responsive, gli androgeni abbattano l'espressione dei membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2, come Bax. Un aumento dell'espressione di Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>, in tumori androgeno-indipendenti, è direttamente legata alla



capacità delle cellule di cancro alla prostata di sopravvivere in un ambiente privo di ormoni [338]. Nel loro insieme, questi eventi tendono a sottolineare l'importanza funzionale e il valore predittivo della sovra-espressione di Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> come potenziali regolatori di recidive in tumori androgeno-indipendente della prostata, dopo una prolungata terapia di ablazione degli androgeni [337].

La famiglia delle IAP inibisce l'attivazione delle caspasi-3, -7 e -9 con conseguente diminuzione dell'apoptosi [339]. L'espressione elevata di alcune IAP all'inizio del processo di tumorigenesi è stata dimostrata sia in modelli animali che in pazienti (sottoposti a prostatectomia radicale) con PCa. L'inibizione di XIAP induce apoptosi e migliora la sensibilità alla chemioterapia nelle linee di cellule di PCa androgeno-indipendenti. Un altro piccolo studio clinico condotto su 23 pazienti ha rivelato che l'espressione sia di IAP1 che IAP2, è drammaticamente sovra-regolata nei soggetti trattati con terapia neoadiuvante di ablazione degli androgeni; ciò implica un potenziale ruolo delle IAPs per lo sviluppo di una resistenza all'apoptosi in PCa androgeno indipendente [340].

Il principale inibitore endogeno del pathway dei recettori morte è **FLIP (proteine inibitori di FLICE)**. Questa proteina è costituita da due DEDs e un dominio C-terminale strutturalmente somigliante a quello delle caspasi-8.

FLIP mostra una affinità superiore per il complesso DISC dal quale scavalca la caspasi-8 impedendone così l'attivazione. In condizioni di normalità, in caso di perdita di contatto tra cellula ed ECM, il recettore Fas ed i suoi ligandi sono sovra-regolati mentre l'espressione di FLIP appare abbattuta. Questo innesca l'attivazione della caspasi-8 con una modalità FADD-dipendente, che porta all'apoptosi. Nelle cellule maligne, nonostante la perdita di contatto con l'ECM, il sistema diventa disfunzionale, le cellule non riescono ad attivare la morte apoptotica mediata dalla caspasi-8, nonostante l'aumentata espressione del recettore Fas e dei ligandi Fas, conferendo in ultima analisi resistenza all'anoikis [341].

Il meccanismo molecolare alla base di questo effetto può essere parzialmente spiegato dal fallimento, da parte delle cellule tumorali, di regolare l'abbattimento di FLIP dopo il distacco dall'ECM. Ciò fornisce la possibilità di nuovi approcci terapeutici per la cura del PCa; usando piccole molecole di sintesi inibitrici di FLIP in cellule sensibili agli stimoli apoptotici, si potrebbe invertire la resistenza all'anoikis nelle cellule maligne senza indurre l'apoptosi in cellule aderenti.

### **Nuovi target per la chemioprevenzione del PCa.**

**121** *Segnalazione Wnt.* La segnalazione Wnt gioca un ruolo importante nei processi di sviluppo embrionale delle cellule. L'attivazione aberrante della via di segnalazione canonica Wnt/ $\beta$ -catenina, che promuove l'accumulo di  $\beta$ -catenina nel nucleo con conseguente attivazione trascrizionale di specifici geni bersaglio e lo sviluppo del cancro [342], è una delle anomalie più frequenti riscontrate nei tumori umani, tra cui il PCa [343].

Wnt-3a stimola selettivamente la proliferazione di cellule CWR22Rv1 e LNCaP AR-positive. Si è inoltre constatato che la  $\beta$ -catenina non solo migliora la funzione degli AR, ma trasloca selettivamente nel nucleo delle cellule di PCa, indicando che la segnalazione Wnt è necessaria per la progressione della malattia [344]. Inoltre, la perdita o riduzione di E-caderina e l'espressione anormale di ligandi Wnt, recettori, inibitori, e altri co-regolatori, potrebbero contribuire all'attivazione della via di segnalazione Wnt in PCa. Quindi, l'inibizione di un'aberrante attività del percorso Wnt nelle cellule di PCa potrebbe fornire l'occasione per la prevenzione e/o il trattamento della malattia (figura 4.5).

**122** *Segnalazione Hh.* Hedgehog (Hh) è un'altra importante via di segnalazione implicata nella proliferazione ed il differenziamento cellulare nonché nel guidare la polarità dei tessuti. I ligandi hh, Sonic Hh e Indian Hh, stimolano i **fattori di trascrizione del Glioblastoma (GLI)** che costituiscono gli effettori finali di questo pathway di segnalazione. L'attivazione aberrante di questo percorso a seguito di mutazioni somatiche sono collegate ad un'ampia varietà di tumori umani compresi carcinomi basocellulari, medulloblastoma, leucemie, carcinoma gastrointestinale, ai polmoni, ovaie, seno e prostata [345].

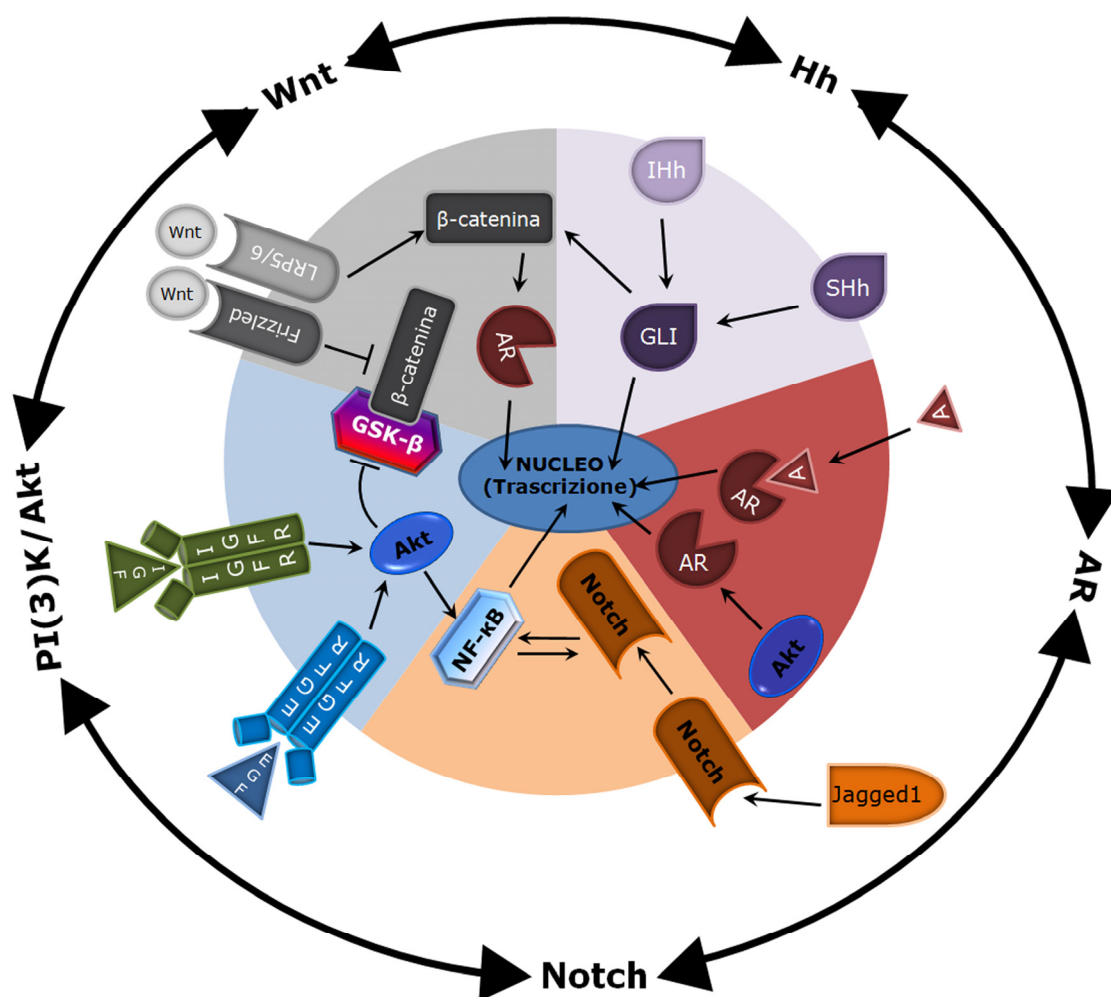
Inoltre, poiché Hh svolge un ruolo centrale nel controllo della proliferazione e la differenziazione sia di cellule staminali embrionali che adulte, l'attivazione aberrante della segnalazione Hedgehog potrebbe portare allo sviluppo del cancro e la generazione delle cellule staminali tumorali [346].

È noto che l'espressione epiteliale di ligandi Hh, durante lo sviluppo della prostata, esercita un'attività di segnalazione autocrina e paracrina che regolano la crescita e la differenziazione. Gli studi hanno rivelato il ruolo critico del segnale Hedgehog nel PCa dimostrando come la comunicazione autocrina da parte delle cellule tumorali è richiesta per la proliferazione, la vitalità e il comportamento invasivo del PCa [347]. Pertanto, lo sviluppo di inibitori di molecole Hh, risulterà essere un promettente passo per la prevenzione e/o il trattamento di PCa (figura 4.5).

**123** *Segnalazione Notch.* Hh, Wnt, i percorsi innescati dal **Fattore di Crescita Trasformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ )** e la segnalazione di Notch sono tutti coinvolti nello sviluppo embrionale, l'omeostasi dei tessuti adulti e la tumorigenesi. La segnalazione Notch, in particolare, svolge un ruolo critico nella regolazione e il mantenimento delle cellule staminali; la mancata regolazione dell'attività dei recettori Notch ed i loro ligandi, contribuisce allo sviluppo e alla progressione di un certo numero di tumori quali carcinoma al polmone, tumori renali e pancreatici, linfomi a grandi cellule e linfomi Hodgkin [348]. Al contrario, risultati controversi sono stati riportati sul ruolo di Notch nel PCa. Pare che l'espressione di ligandi di Notch sia bassa o non rilevabile nelle cellule di PCa e che l'iper-espressione di una forma costitutivamente attiva di Notch-1, inibisca la proliferazione delle cellule cancerose, suggerendo come Notch funga da soppressore del tumore.

Tuttavia, è stato appurato come l'espressione di Jagged-1, un ligando del percorso Notch, sia associata a metastasi e recidive in PCa [349] e, che la sotto-regolazione di Jagged-1, inibisce la crescita, la migrazione e il potenziale invasivo delle cellule tumorali, inducendo apoptosi attraverso l'inattivazione delle vie di segnalazione Akt, mTOR, NF- $\kappa$ B, MMP-9 e uPA [350].

Pertanto, lo sviluppo di inibitori di Notch, potrebbe essere un obiettivo importante per la prevenzione e/o il trattamento del PCa, sebbene siano necessarie più approfondite indagini molecolari e la focalizzazione del contesto cellulare in cui si opera, per determinare dosi e tempistica (figura 4.5).



**Figura 4.5. Principali vie di segnalazione cellulare alterate durante lo sviluppo e la progressione del PCa.** Le disfunzioni nelle vie di segnalazione di AR, Akt, NF- $\kappa$ B, Wnt, Hedgehog e Notch comportano una incontrollata trascrizione e proliferazione delle cellule epiteliali prostatiche, con sviluppo del PCa. L'interconnessione tra i percorsi di AR, Akt, NF- $\kappa$ B, Wnt e Hedgehog svolge dunque un ruolo critico nello sviluppo del PCa.

**RIASSUNTO.****124**

*Il cancro della prostata (PCa) rimane una delle principali cause di morte negli uomini, nonostante un'aumentata capacità di diagnosi precoce. Il cancro alla prostata che diviene ormone-indipendente a seguito di terapie di ablazione ormonale, risulta difficile da trattare in modo efficace in quanto metastatizza e quasi il 100% dei pazienti soccombe entro 18 mesi. Durante questo periodo, la chemioterapia viene somministrata principalmente come metodo palliativo dei sintomi associati alla malattia.*

*Gli sviluppi delle strategie alternative alle chemio- e radioterapia standard potrebbero avere un valore inestimabile per aumentare la sopravvivenza nei pazienti con PCa metastatico. La ricerca si sta ora indirizzando verso una genotipizzazione del tumore, con lo sviluppo di strumenti diagnostici che possono essere utilizzati per determinare le mutazioni specifiche, che sono presenti nel tumore per ogni singolo paziente, in modo da sviluppare strategie di cura migliore. Sono stati identificati nel PCa alterazioni nella segnalazione dei percorsi PI(3)K/PTEN/Akt/mTOR e Raf/MEK/ERK e nella progressione del ciclo cellulare, in seguito a mutazioni e delezioni in geni bersaglio, i più importanti dei quali appaiono essere p53, PTEN, Rb e AR.*

*PTEN, il regolatore negativo della segnalazione via PI(3)K, risulta deleto in una grande percentuale dei carcinomi prostatici. Di conseguenza, molti pazienti con PCa mostrano una segnalazione aberrante del percorso Akt che causa una maggiore resistenza ai trattamenti con doxorubicina e paclitaxel, due farmaci comunemente usati per trattare il PCa. Inoltre il percorso PI(3)K/Akt è conosciuto per il suo ruolo nella sopravvivenza delle cellule per cui, cellule con intensa attività di Akt, potrebbero non essere influenzate dal trattamento con i farmaci chemioterapici.*

*Dopo la perdita o mutazione di PTEN, Akt diventa costitutivamente attiva, causando la fosforilazione e l'inattivazione di Raf-1 a livello del residuo di serina 259 [351] con la conseguente alterazione dei segnali normalmente trasdotti dalla via Raf/MEK/ERK. Di conseguenza, la cellula cancerosa perde la capacità di differenziarsi, mentre l'accresciuta attività di Akt e conferisce un vantaggio di sopravvivenza. Insieme, questi eventi possono portare alla realizzazione di un microambiente tumorale idoneo in cui le singole cellule cancerose non solo sono resistenti ai composti chemioterapici, ma non riescono a differenziarsi in modo efficiente. Mentre i singoli farmaci chemioterapici hanno avuto scarso successo finora, il futuro per un trattamento efficace del PCa potrebbe comportare combinazioni di farmaci che agiscono contemporaneamente su più vie di segnalazione (Akt, MAPK, p53), dopo una genotipizzazione mirata,*

## Apoptosi, anoikis e microambiente tumorale.

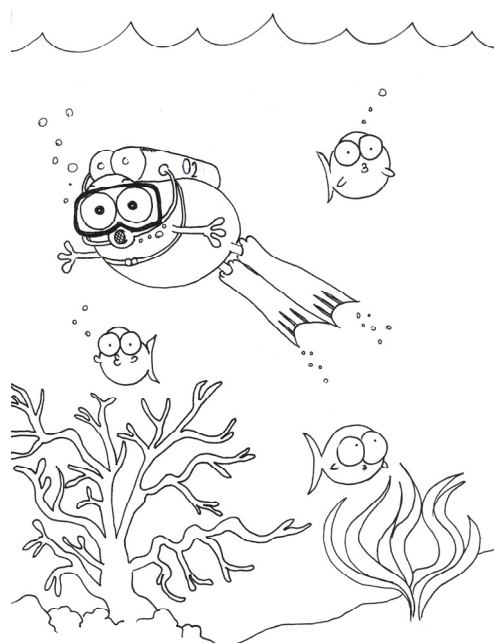
**125** La tumorigenesi è un processo a più fasi che coinvolge molteplici alterazioni genetiche le quali indirizzano le cellule normali verso un fenotipo altamente, rendendole capaci di migrare attraverso l'ECM per arrivare al torrente circolatorio e raggiungere le sedi dove creare lesioni metastatiche[352].

L'ECM è una rete dinamica e complessa, costituita da collagene, laminina, fibronectina, proteoglicani e contenente anche fattori di crescita solubili. L'ECM fornisce informazioni riguardanti la vitalità delle cellule all'interno di un tessuto e può anche regolare la proliferazione, la migrazione, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare. Nello specifico, le cellule endoteliali ed epiteliali dipendono dall'ECM per la loro sopravvivenza e proliferazione. La rottura dei contatti cellula-matrice può innescare il processo di anoikis sia *in vitro* che *in vivo* [353]. Durante la progressione del tumore alla prostata, due importanti cambiamenti influenzano le dinamiche della plasticità dei tessuti:

1. la **Transizione Epitelio-Mesenchimale (EMT)**
2. la **formazione di uno stroma reattivo** che riflette l'intensa riorganizzazione strutturale dell'ECM entro i confini spaziali del citoscheletro nelle cellule tumorali.



**Distacco della cellula dall'ECM e morte per Anoikis**



**Distacco della cellula dall'ECM e adattamento**

**Transizione epitelio/mesenchimale: gli attori principali.**

**126** L'EMT è un processo fondamentale che si verifica sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Tali transizioni, necessarie per il corretto sviluppo embrionale, possono anche offrire un luogo di crescita

adatto per i tumori di origine epiteliale, in grado di divenire altamente invasivi e rapidamente metastatizzanti, a seguito di un meccanismo simile ad un risveglio/riattivazione del programma embrionale di EMT [354].

Sia per l'EMT embrionale che tumorigenica, le cellule migranti esplorano l'ambiente che le circonda, modificano il loro rapporto con l'ECM e possono eludere l'apoptosi. Anche se non c'è evidenza istologica di intermedi cellulari durante la transizione da fenotipo epiteliale a mesenchimale, l'attivazione di geni mesenchimali in cellule epiteliali è fondamentale per il successo dell'EMT [355]. Recentemente, molecole come Snail, Twist, Par6 e NF- $\kappa$ B, sono state implicate per coordinare il TGF- $\beta$  nella partecipazione al processo di EMT.

**127** *Snail*. Snail appartiene alla famiglia dei fattori trascrizionali “*Zinc-finger*”, essenziali nello sviluppo embrionale in particolare durante l'EMT del mesoderma. Snail si lega al promotore dell'E-caderina e reprime la sua trascrizione durante l'EMT, evento fondamentale verso lo sviluppo e la progressione maligna nel cancro alla prostata [356]. Snail attiva anche la trascrizione di geni che sono associati alla differenziazione mesenchimale, come **vimentina e fibronectina** e, durante l'EMT, blocca la progressione del ciclo cellulare. Inoltre conferisce resistenza all'apoptosi, attivando la cascata di segnalazione di IP(3)P/Akt e inibendo l'attivazione della caspasi-3 attraverso il **Fattore di Necrosi Tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )** [357]. Un'elevata espressione dell'mRNA di Snail è tipica di un'ampia varietà di tumori accompagnata solo da un modesto aumento del livello proteico. Questo perché Snail è fosforilata dalla chinasi GSK-3 $\beta$  e, questa fosforilazione, è responsabile della regolazione della velocità di degradazione attraverso il proteasoma [358].

Durante l'EMT, l'attività di GSK-3 $\beta$  viene inibita per consentire a Snail di svolgere le sue funzioni. Infatti, attraverso la segnalazione del **Fattore di Crescita degli Epatociti (HGF)**, di EGF ed IGF, si favorisce la fosforilazione di GSK-3 $\beta$ , in modo da permettere la traslocazione nucleare di Snail e attivare la sua funzione di repressore/attivatore trascrizionale [359].

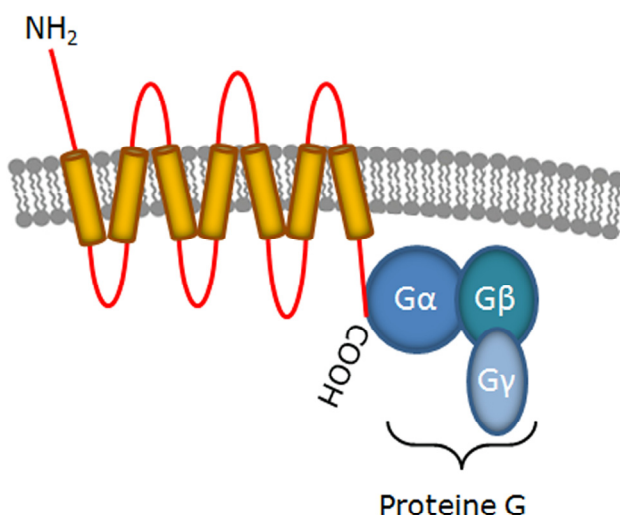
Snail è in grado di regolare strettamente l'anoikis nel microambiente tumorale aumentando sia il distacco delle cellule tumorali dal sito primario che la loro adesione al sito secondario, attraverso proteine della membrana basale come le **Laminine (LN)**  $\alpha$ 3,  $\beta$ 3 e  $\gamma$ 2 (detta anche laminina 5/LN-5) ed i recettori per LN-5, tra i quali le integrine  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 6 o  $\beta$ 4 [360].

**128** *Twist*. Si tratta di un fattore trascrizionale elica-loop-elica inizialmente descritto in *D. melanogaster* (dove è coinvolto nella morfogenesi degli arti) e successivamente ritrovato nell'EMT durante lo sviluppo embrionale dei mammiferi. Twist funge da fattore anti-apoptotico, ma possiede anche un ruolo come regolatore dell'EMT, inducendo l'espressione di marcatori mesenchimali quali fibronectina e N-caderina [361].

**129** *NF-κB*. L'attivazione della segnalazione di NF-κB, un importante regolatore delle difese immunitarie ed infiammatorie, è fortemente associata alla tumorigenesi, conferendo alle cellule tumorali una resistenza all'apoptosi. Infatti, NF-κB è costitutivamente attivata in tumori umani del seno, della prostata, al colon-retto e nei tumori ovarici ed è in grado di mantenere queste cellule in uno stato mesenchimale [362], passaggio cruciale per l'acquisizione delle caratteristiche migratorie e invasive da parte della cellula tumorale.

NF-κB è anche indirettamente legato alla metastatizzazione attraverso la sua capacità di regolare l'espressione MMP, dell'interleuchina-8, di VEGF e del **Recettore per le Chemochine C-X-C (CXCR4)** [363] (figura 4.6). Abbastanza significativo è, per NF-κB, il ruolo di regolatore dell'anoikis all'interno del microambiente tumorale, dove sopprime l'apoptosi, attraverso l'attivazione della segnalazione PI(3)P/Akt [364]. In sintesi, durante il processo di EMT, le cellule epiteliali acquisiscono caratteristiche

mesenchimali e si attivano vie di sopravvivenza, come la segnalazione PI(3)P/Akt, per assicurare la migrazione delle cellule tumorali mesenchimali nello stroma.



**Figura 4.6. I recettori per le chemochine.** I recettori per le chemochine fanno parte della famiglia dei **Recettori Accoppiati a Proteine G (GPCR)**. Strutturalmente si compongono di una regione extracellulare che lega la chemochina, da sette α-eliche transmembrana e sono associati

ad una proteina G sul versante citoplasmatico. Il legame della chemochina attiva il recettore ma al contempo ne diminuisce l'espressione sulla superficie cellulare. I recettori per le chemochine CXC rappresentano una sottofamiglia di recettori per chemochine, in quanto si legano e rispondono solo alle citochine della famiglia delle chemochine CXC. Ci sono attualmente sette recettori per le chemochine CXC nei mammiferi, chiamate CXCR1-7 [370].

#### Lo stroma reattivo.

**130** La proliferazione delle cellule tumorali e l'invasione attraverso la membrana basale nel compartimento stromale provoca una risposta che genera un nuovo microambiente, differente da quello nativo, perché mostra un rimodellamento dell'ECM, elevata attività delle proteasi, un aumento della biodisponibilità dei fattori di crescita, angiogenesi e afflusso di cellule del processo infiammatorio [365]. Il termine "stroma reattivo" è usato per descrivere questo sistema di supporto che fornisce un ambiente altamente consono per l'invadimento delle cellule tumorali [366].

La caratteristica principale di uno stroma reattivo è la presenza di miofibroblasti. Intermedio tra un fibroblasto e una cellula muscolare liscia, un miofibroblasto è contraddistinto da un profilo unico di espressione di proteine del citoscheletro, nonché specifiche caratteristiche ultrastrutturali. Una correlazione diretta tra miofibroblasti e carcinoma invasivo è stata segnalata in diversi tumori maligni umani, compresi quelli al seno, polmone, stomaco, colon e prostata. I miofibroblasti sono direttamente coinvolti nel rimodellamento dell'ECM, in quanto secernono molecole chiave come fibronectine embrionali, collagene di tipo I e III, glicoproteine (tenascina e trombospondina-1) e proteoglicani [367]. Durante la tumorigenesi del carcinoma prostatico, l'evoluzione verso uno stato altamente maligno è intimamente legata alla componente miofibroblastoide della ghiandola [368].

Come nel rimodellamento dell'ECM, l'intervento delle proteasi è altresì cruciale la formazione dello stroma reattivo. Un aumento di espressione di Serina Proteasi ed MMPs nei tessuti tumorali si correla positivamente con una maggiore aggressività ed è il riflesso di uno squilibrio di funzione tra le MMP e gli **Inibitori Tissutali delle MMP (TIMP)**. Nei tumori della prostata, di basso grado Gleason, l'espressione di TIMP è superiore a quella di MMP, mentre in tumori ad alto grado Gleason si osserva la correlazione inversa [369].

### Significato dell'anoikis nelle metastasi tumorali.

**131** Molteplici fattori, con frequente sovrapposizione di funzioni, sono stati segnalati per determinare, nelle cellule tumorali, la soppressione dell'anoikis e la stimolazione della sopravvivenza. La resistenza all'anoikis, non solo conferisce alla cellula la possibilità di sopravvivere senza aggancio all'ECM, ma può anche proteggere con successo la sua migrazione e l'invasione in sedi lontane dal sito primario del tumore. Così, nuovi bersagli terapeutici potrebbero essere molecole che, non solo partecipano allo sviluppo di resistenza all'anoikis, ma siano anche implicate nell'inibizione della migrazione, invasività e successiva proliferazione delle cellule tumorali della prostata in siti distanti da quello dello sviluppo del tumore primario (figura 4.7).

**132** *Galectine*. Le galectine appartengono ad una famiglia altamente conservata di lectine animali con membri presenti dai nematodi ai mammiferi. Forti evidenze suggeriscono che, una sovrapproduzione di galectine in cellule epiteliali maligne così come in cellule stromali associate al tumore, siano strettamente correlate all'acquisizione di un fenotipo metastatico. L'efficacia delle galectine sulla trasformazione maligna, risiede probabilmente in un rapido cambiamento della loro localizzazione sub-cellulare (traslocazione citosolica) [371].

La Gal-3 citoplasmatica è una molecole anti-apoptotica, al contrario della presenza nucleare di Gal-3, la quale esibisce proprietà pro-apoptotiche. L'esatto meccanismo attraverso il quale Gal-3 regola la proliferazione



cellulare non è ben definito ma sembra che tale molecola sia in grado di intervenire nella progressione del ciclo cellulare mediante il blocco delle cicline A ed E e la stimolazione di p27 e p21 (inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti), con conseguente arresto del ciclo cellulare. Oltre alla soppressione dell'anoikis e l'arresto del ciclo cellulare, Gal-3 possiede, *in vitro*, attività angiogenica che potrebbe indurre la migrazione delle cellule endoteliali [372].

Le galectine possono quindi intervenire, non solo durante le prime fasi di malignità delle cellule tumorali, agendo sulla progressione del ciclo, ma anche nella malattia avanzata, promuovendo l'angiogenesi (figura 4.7).

**133** *TrkB*. La funzione di TrkB, una Tirosina chinasi neurotrofica, è stata ampiamente descritta nel sistema nervoso. L'attivazione dei recettori Trk da parte dei loro ligandi, le **neurotrofine (NT)**, quali il **Fattore di Crescita Nervosa (NFG)** e le **neurotrofine NT-3 e NT-4/NT-5**, garantisce l'attivazione di meccanismi di sopravvivenza in cellule tumorali, ma non nelle cellule normali [373]. Il percorso TrkB non attiva bersagli noti a valle di Akt, suggerendo come molecole alternative a valle di Akt possono svolgere tale funzione [374].

**134** *Caveolina-1*. La caveolina (CAV-1) è normalmente implicata in una varietà di processi cellulari che vanno dalla trasduzione del segnale fino a all'omeostasi del colesterolo e il trasporto di lipidi [375].

Mutazioni nel gene *Cav-1* sono state ritrovate nel carcinoma al seno e nei carcinomi a cellule squamose; la posizione genomica di *Cav-1* (sul cromosoma 7q31.1, una probabile regione soppressore di tumori), sostiene fortemente l'idea che *Cav-1* sia un gene oncosoppressore, svelando anche un suo valore potenziale come marker di progressione tumorale. Infatti, l'espressione di questa proteina di membrana, è legata al grado e lo stadio di sviluppo del tumore, identificando così CAV-1 come un promettente predittore di prognosi della malattia [376].

CAV-1 può funzionare come promotore della tumorigenesi in carcinomi prostatici, della vescica e dell'esofago. Risulta sovra-espressa nei tumori primari, portando ad un aumento della proliferazione cellulare, mentre la migrazione delle cellule tumorali, così come la loro sopravvivenza, richiede una riduzione dell'espressione di *Cav-1* [377].

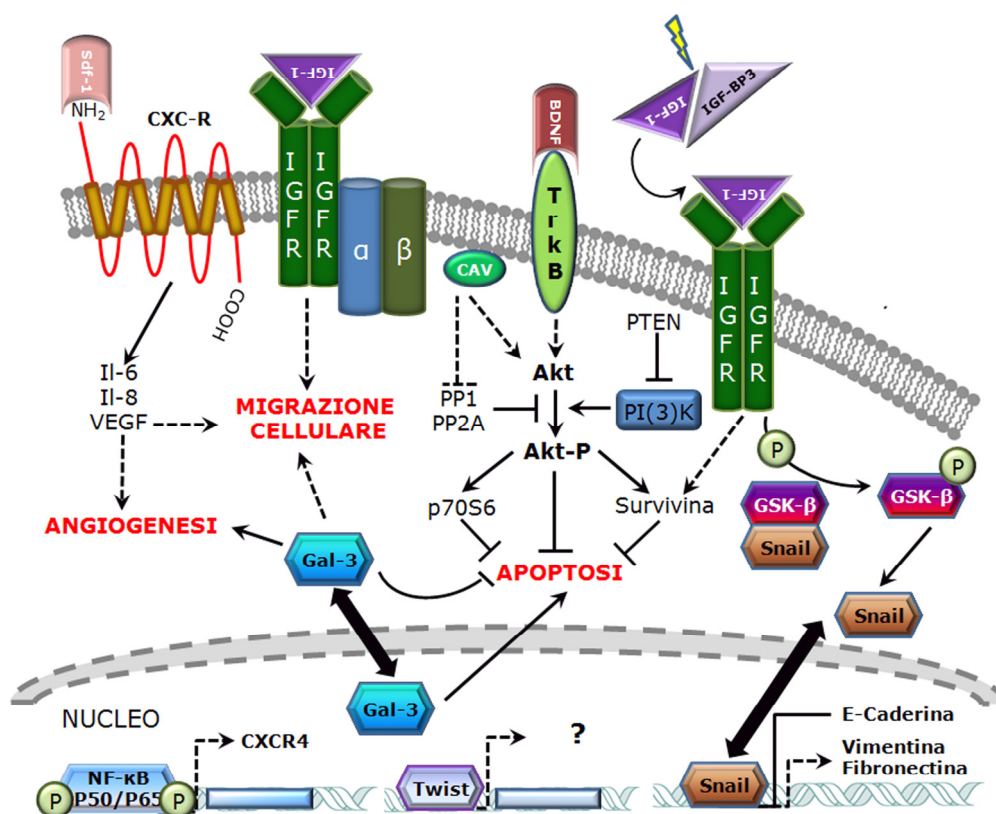
L'aspetto più interessante della segnalazione mediata dalla caveolina è il rapporto tra la caveolina stessa ed IGF-1. La caveolina è un noto mediatore dell'insulina e della via di segnalazione di IGF-1 che ha dimostrato di aumentare la sopravvivenza delle cellule in mancanza di adesione alla matrice, sovra-regolando l'espressione e la segnalazione mediata da IGF-IR (recettore di mitogeni anti-apoptotici) (figura 4.7).

#### **Il Fattore di crescita-1 insulino-simile e la sua connessione con le integrine.**

**135** Ci sono prove convincenti a supporto del fatto che la segnalazione operata da IGF apporta un contributo critico allo sviluppo e alla

progressione del cancro, indipendentemente dalla caveolina. L'effetto oncogeno di IGF risiede principalmente nella sua funzione di potente inibitore dell'apoptosi indotta da TGF- $\beta$  attraverso l'attivazione di Akt. IGF-1 è normalmente secreto dalle stroma della ghiandola prostatica e la sua biodisponibilità è per lo più regolata dai sei membri di proteine leganti l'IGF. L'aumento di segnalazione di IGF-1 promuove la crescita e la sopravvivenza delle cellule attraverso l'attivazione del percorso di sopravvivenza mediato da Akt.

Un prezioso contributo all'attività di IGF-1 proviene dall'incrocio tra la sua via di segnalazione e quella modulata dalle integrine indicando come, in cellule tumorali, IGF-R interagisca direttamente con le integrine per modulare la localizzazione dei contatti focali nelle cellule e la risposta a stimoli ambientali [378]. Una stretta associazione di IGF-R con le integrine  $\alpha\beta_{1A}$  porta ad una diminuzione della proliferazione delle cellule tumorali ed un aumento di adesione. Al contrario, l'interazione tra IGF-R con l'integrina  $\alpha\beta_{1C}$  provoca un effetto opposto, aumentando la proliferazione delle cellule tumorali e una diminuzione della loro adesione (figura 4.7).



**Figura 4.7. Resistenza all'anoikis di metastasi di cellule tumorali prostatiche.** Due importanti processi cellulari coordinano questa correlazione: l'EMT e la formazione di uno stroma reattivo. La Caveolina-1, la Galectina-3, e TrkB emergono come i sensori molecolari critici per la resistenza all'apoptosi, l'angiogenesi e la migrazione delle cellule tumorali. In questo schema, tali molecole sono individuate nel contesto del loro contributo alla connessione cellulare che guida l'EMT e la formazione di uno stroma reattivo (*modificato da Rennebeck G et al., 2005*).

**Riassunto.**

**136** *Le normali cellule epiteliali ed endoteliali possono morire per apoptosi a seguito della perdita di ancoraggio alla matrice extracellulare (ECM), attraverso il fenomeno di anoikis. Anche se le cellule normali utilizzano l'anoikis per prevenire la proliferazione cellulare in luoghi inappropriati, le cellule tumorali possono sviluppare mezzi per eludere questo processo, acquisire le capacità di staccarsi dall'ECM e migrare così verso siti bersaglio che forniranno un nuovo microambiente favorevole alla loro crescita aberrante. Due importanti processi cellulari coordinano questo evento: l'EMT e la formazione di uno stroma reattivo. Caveolina-1, Galectina-3, e TrkB emergono come collaboratori critici per la resistenza all'apoptosi e la promozione dell'angiogenesi e della migrazione di cellule tumorali. La metastasi, ossia la disseminazione di cellule tumorali da un organo primario ad un sito secondario nel corpo, rimane uno degli eventi più pericolosi per la sopravvivenza, responsabile del 90% di morte per cancro negli esseri umani [379]. Alcuni degli eventi coinvolti nella progressione delle cellule tumorali verso l'acquisizione della capacità di metastatizzare, sono mediati dalle integrine che, al momento di ricontattare i componenti dell'ECM, si riorganizzano per formare i complessi di adesione. Anche se non esiste una risposta chiara, quello che è diventato sempre più evidente è come le molecole che inducono anoikis nei tumori di cellule epiteliali e endoteliali possono rappresentare sia nuovi ed efficaci bersagli terapeutici, così come marker di progressione del cancro e previsione di resistenza alla chemioterapia. Infatti così come la comprensione dei meccanismi apoptotici, anche la comprensione dell'anoikis, che svolge un ruolo importante nella angiogenesi e nella formazioni di metastasi è di immenso valore terapeutico.*

**Anoikis in PCa: guadagno della libertà e incontro con la morte.**

**137** Durante l'anoikis, sono attivati sia il percorso dei recettori di morte apoptotici che la via mitocondriale. Il distacco delle cellule innesca contemporaneamente l'abbattimento di Bcl-X<sub>L</sub>, un componente antiapoptotico del pathway mitocondriale [380] e la sovra-regolazione del ligando di Fas (FasL), un attivatore della via morte recettoriale dopo pochi minuti dal distacco [381]. Tuttavia, una sottopopolazione di cellule tumorali diventa resistente al distacco, indotta da stimoli pro-apoptotici e, dopo essersi inserita nella circolazione sanguigna sistemica raggiunge, con successo, siti distanti da quello del tumore primario. Il contributo degli effettori di segnalazione allo sviluppo di anoikis ed alla resistenza in cellule

epiteliali di PCa, con la conseguente diffusione metastatica, non è stato ancora chiarito.

### Approfondimenti molecolari della segnalazione indotta da anoikis in PCa.

**138** *La funzione dei recettori morte nell'anoikis.* Il pathway del recettore morte è il principale percorso di morte cellulare in risposta all'anoikis in cellule maligne e non maligne. Nelle cellule normali, in caso di perdita di contatto con l'ECM, il recettore Fas ed i suoi ligandi sono sovra-espressi, al contrario di quanto accade per gli inibitori FLIP. Questi cambiamenti nella segnalazione a valle, innescano l'attivazione della caspasi-8 in un modo dipendente da FADD, che conduce a morte apoptotica [382]. Nelle cellule maligne, anche a seguito della perdita di contatto con l'ECM, il sistema diventa disfunzionale. Ne sono un esempio i carcinomi, dove le cellule non riescono ad attivare né la via dei recettori di morte, né la caspasi-8 (nonostante l'aumentata espressione del recettore FAS ed i suoi ligandi) acquisendo, in ultima analisi, resistenza all'anoikis.

Il meccanismo molecolare di questo evento può essere parzialmente spiegato dal fallimento, da parte delle cellule tumorali, di abbattere l'espressione di FLIP dopo il distacco [341]. Ciò fornisce la prima base verso la formulazione di un nuovo approccio terapeutico contro FLIP nelle cellule resistenti all'anoikis, nell'ambito del trattamento del cancro metastatico alla prostata. Questo percorso sembra essere promettente: usando piccole molecole antagoniste, l'inibizione chimica di FLIP sensibilizza le cellule agli stimoli apoptotici, invertendo la resistenza all'anoikis nelle cellule maligne (senza indurre apoptosi in cellule aderenti) [383] (figura 4.8, 1).

**TABELLA 4.3. Principali Integrine rilevabili nei vertebrati.**

NOME	DISTRIBUZIONE	LEGAMI
$\alpha_1\beta_1$	Ubiquitaria	Collagene, laminine
$\alpha_2\beta_1$	Ubiquitaria	Collagene, laminine
$\alpha_4\beta_1$	Cellule ematopoietiche	Fibronectina, VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$	Fibroblasti	Fibronectina
$\alpha_L\beta_2$	Linfociti T	ICAM-1, ICAM-2
$\alpha_M\beta_2$	Monociti	Proteine del siero, ICAM-1
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Trombociti	Proteine del siero, fibronectina
$\alpha_6\beta_4$	Cellule epiteliali	Laminina

**139** *Le integrine e le molecole ad esse connesse.* L'aggancio delle cellule epiteliali e delle cellule endoteliali all'ECM è un processo obbligato per la regolazione della proliferazione, sopravvivenza e migrazione cellulare e il contributo funzionale dato dalle integrine è essenziale in questi processi [366]. Le integrine sono proteine transmembrana, funzionalmente coinvolte nella progressione del cancro a malattia metastatica [384] (tabella 4.3).

Le integrine contribuiscono alla trasduzione del segnale dall'ambiente extracellulare a quello intracellulare mediante l'attivazione di una rete di molecole di segnalazione (FAK, PI(3)P ed ERK-1 e -2) che disciplinano proliferazione, migrazione e apoptosi nelle cellule tumorali ed endoteliali.

La perdita delle interazioni tra cellule epiteliali ed ECM a seguito di integrine mancanti o difettose, causa la mancata fosforilazione di effettori a valle, come FAK, PI(3)K, ERK1 e MAP chinasi, noti per mediare la sensibilità della cellula all'anoikis. Tra la famiglia di integrine, soprattutto le integrine  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_6$ , sono risultate essere sovra-espresse durante la progressione del cancro alla prostata [385].

**140** *La famiglia di chinasi SRC.* La Famiglia di Chinasi SRC (SFK), è la più grande famiglia di proteine tirosina chinasi non recettoriali, costituita da nove membri: **Blk, FGR, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Yes, e Yrk.**

I membri SFK sono responsabili della trasduzione del segnale mediato attraverso i Recettori EGF, le integrine, i **Recettori Accoppiati a Proteine leganti Guanosina difosfato (GPCR)** e i **Recettori delle Citochine (CXCR)**. All'interno della famiglia SFK, Src svolge un ruolo significativo durante la progressione del cancro [386].

Nel complesso di adesione focale, l'attivazione di Src è mediata principalmente attraverso l'integrina  $\beta_1$  ed una mancata regolazione è stata collegata ad una resistenza all'anoikis in varie tipologie di tumore, tra cui l'osteosarcoma, il tumore del pancreas e il carcinoma della prostata [387, 388]. Src è altamente espressa nel carcinoma della prostata, dimostrando di essere funzionalmente connessa alla capacità di formazione delle metastasi da parte dei tumori della prostata androgeno-dipendenti, mentre la sovra-regolazione di FGR (un membro SFK) è frequente nei carcinomi prostatici androgeno-indipendenti e resistenti alla castrazione. Inoltre, dal momento che Src interviene pure nel rinnovamento osseo, regolando entrambe le attività osteoclastica e osteoblastica, essa svolge un ruolo essenziale durante la formazione di metastasi ossee. Infatti, l'inibizione di Src ritarda la comparsa di metastasi indotte da carcinoma alla prostata attraverso segnali vincolanti mediati da IGF e IGF-1 [389]. La molteplicità dei ruoli mostrati da Src durante la progressione del cancro alla prostata, giustifica approcci terapeutici mirati alla realizzazione di uno specifico inibitore di Src per il trattamento del tumore avanzato (figura 4.8, 2).

**141** *La Chinasi Collegata alle Integrine. La Chinasi Collegata alle Integrine (ILK)* è una serina/treonina chinasi che interagisce con il dominio citoplasmatico delle integrine  $\beta 1$  e  $\beta 3$  ed è funzionalmente collegata alle vie di segnalazione Wnt [390] (figura 4.8, 2).

ILK regola diversi processi cellulari mediati da integrine, tra i quali l'adesione cellulare, l'ancoraggio della fibronectina all'ECM e la crescita delle cellule dipendente dall'ECM. Al momento dell'adesione cellulare, ILK è transitoriamente attivata e fosforila direttamente Akt, a livello della Ser473, e la GSK-3 $\beta$  [373]. Al contrario, inibendo ILK, nelle cellule tumorali si inibisce la fosforilazione di Akt e la sopravvivenza cellulare. Recenti evidenze indicano che ILK-1 media la resistenza all'anoikis inibendo l'apoptosi mediata dalle caspasi-3 e -8, anche senza l'attivazione di segnali provenienti dalle integrine ma, eventualmente, tramite il reclutamento di Akt a livello dei lipid-rafts di membrana [391, 392].

Nel cancro della prostata, l'espressione di ILK aumenta in modo significativo con la progressione del tumore ed è legata ad un maggior indice di proliferazione durante l'avanzamento della malattia. Pertanto, l'incremento di espressione di ILK è inversamente correlata alla sopravvivenza del paziente [393].

#### **La transizione epitelio-mesenchimale e la formazione di uno stroma reattivo nel PCa.**

**142** Il risultato funzionale dell'EMT nella la progressione del cancro alla prostata resistente alla castrazione è complesso, data l'incertezza che circonda il contributo degli androgeni al progresso della malattia metastatica. L'impatto della soppressione degli androgeni sulla diffusione metastatica delle cellule tumorali della prostata è ancora oggetto di dibattito. Si potrebbe ipotizzare che un basso livello di AR possa promuovere l'EMT, in ultima analisi, favorendo la diffusione metastatica delle cellule tumorali epiteliali della prostata. Dal momento che la deprivazione androgenica a lungo termine può abbattere l'espressione degli AR, questa soglia minima di recettori faciliterebbe l'EMT androgeno-indotta, promuovendo la malattia metastatica [394].

L'uso di antagonisti degli AR annullano le modifiche dell'EMT innescate dagli androgeni nelle cellule tumorali della prostata, sostenendo in tal modo la capacità elevata degli AR di evitare la riduzione dell'espressione di E-caderina e N-caderina [395]. Dati clinici dimostrano che la deprivazione androgenica intermittente va a beneficio dei pazienti in terapia per PCa a seguito di un rallentamento della progressione tumorale [396]. Non si può ignorare, nel contesto dell'EMT a livello delle cellule epiteliali della prostata, anche altre molecole come:

- **TGF- $\beta$ .** Considerando la regolazione autocrina dell'espressione di questa citochina multifunzionale, così come la sfortunata alleanza tra la segnalazione di TGF- $\beta$  e la progressione del tumore prostatico, la sfida è quella di identificare percorsi che non interferiscano con gli effetti positivi del TGF- $\beta$  come soppressore del tumore (attraverso l'apoptosi)

fino al momento della trasformazione maligna. Giunti a questo punto occorrerebbe inibire l'attività TGF- $\beta$ , non più sotto controllo, per evitare che la molecola agisca come promotore di metastasi nel cancro avanzato della prostata [397].

- **Twist.** La funzione di Twist è notevolmente up-regolata nei carcinomi alla prostata, dove la sua induzione è legata a prognosi infausta, alto grado Gleason e diminuita espressione di E-caderina [398]. Una sotto-regolazione o la totale perdita di funzione di Twist in linee di cellule di cancro alla prostata androgeno-indipendente, porta ad un decremento della migrazione e diminuite capacità di invasione.

Twist può regolare il meccanismo di morte apoptotica, modulando il rapporto Bcl-2/Bax, che fornisce una base molecolare per la capacità di tale proteina di conferire resistenza al taxolo e vincristine in tumori rino-faringei, alla vescica, alle ovaie e della prostata. La perdita di espressione di Twist rende le cellule tumorali più sensibili all'induzione di anoikis e all'apoptosi promossa da TNF- $\alpha$  [399].

- **NF- $\kappa$ B** è costitutivamente attivata in tumori della prostata ed è in grado di mantenere le cellule in uno stato mesenchimale.

Importante, nell'ambito della progressione tumorale del PCa, è anche la formazione di uno "stroma reattivo" ossia, un ambiente modificato fondamentale per soddisfare le esigenze delle cellule tumorali metastatiche.

#### Le proteine BH3-only nella progressione metastatica del PCa.

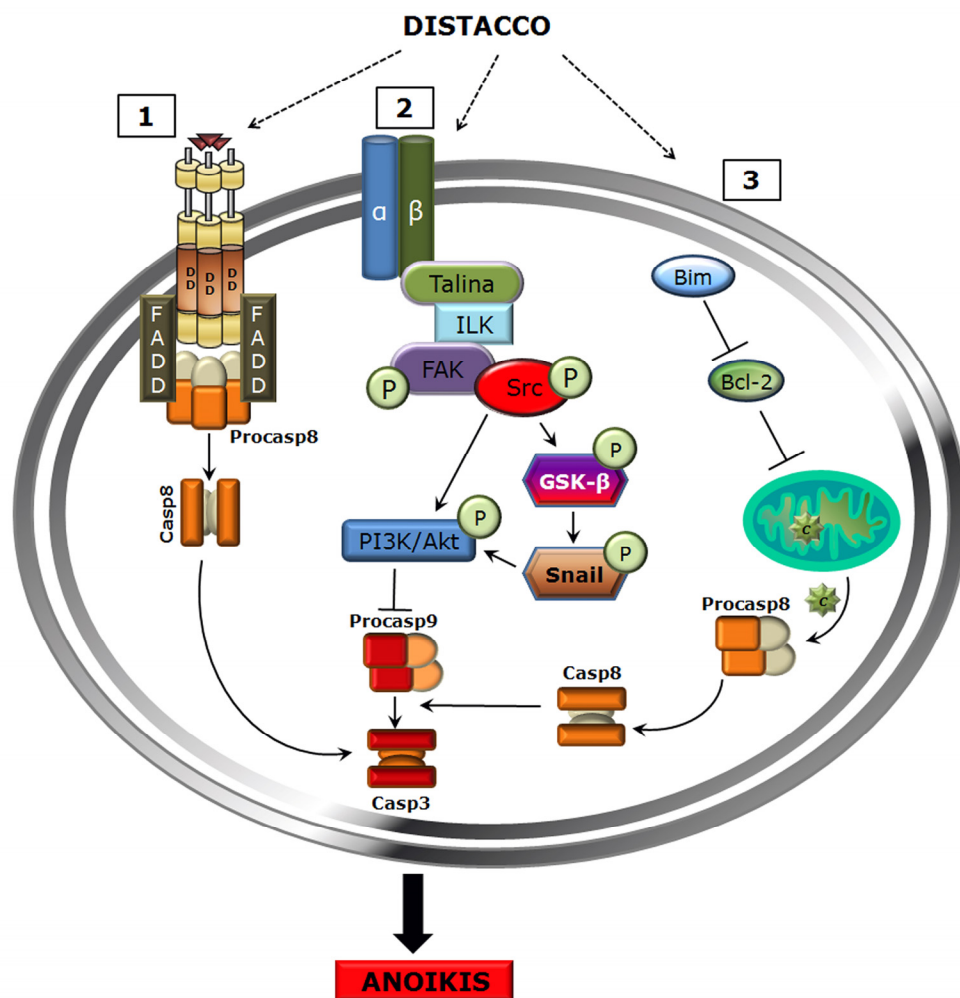
**143** In tumori della prostata scarsamente differenziati, Bcl-2 e altri membri anti-apoptotici della sua famiglia, sono significativamente sovra-regolati. La sovra-espressione di Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> è stata correlata ad una resistenza sia alla chemioterapia che radioterapia [336].

La famiglia Bcl-2 svolge un ruolo critico nel funzionamento dell'asse di segnalazione androgenica in cellule di cancro alla prostata:

1. nel caso di cellule tumorali androgeno-responsive, gli androgeni abbattano l'espressione dei membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2, come Bax [400];
2. al contrario, un aumento dell'espressione di Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> in tumori prostatici androgeno-indipendenti è direttamente legata alla capacità delle cellule di cancro alla prostata, di sopravvivere in un ambiente privo di androgeni [401]. Questo sottolinea il significato funzionale ed il valore predittivo della sovra-espressione di Bcl-2/ Bcl-X<sub>L</sub>, come potenziali regolatori chiave di recidiva nei tumori della prostata androgeno-indipendenti, dopo una prolungata terapia di ablazione androgenica [336].

Le proteine BH3-only tra cui Bid, Bad, Bim, Bmf e noxa sono essenziali durante il processo apoptotico mediato dal mitocondrio. Bim è la più potente proteina pro-apoptotica che agisce nella via intrinseca, innescata dall'assenza della segnalazione dei fattori di crescita o dall'esposizione a fattori pro-apoptotici [402]. Quando le cellule epiteliali si staccano dall'ECM, Bim trasloca ai mitocondri, dove l'interazione con Bcl-X<sub>L</sub> blocca

ulteriormente la sua funzione di fattore pro-sopravvivenza, promuovendo l'attivazione di Bax [403] (figura 4.8, 3). Al contrario, l'aggancio all'ECM mediato dalle integrine, promuove l'innescò di ERK e la fosforilazione di Bim (regolata dal percorso IP(3)R/Akt), che ne impedisce la degradazione da parte del proteasoma e ne garantisce l'accumulo intracellulare [387, 388].



**Figura 4.8 Induzione del programma di Anoikis in PCa.** Al momento del distacco delle cellule tumorali dal sito primario, il percorso che induce anoikis può essere attivato attraverso tre differenti modalità principali:

- (1) **Morte mediata da recettore.** L'attivazione del recettore Fas/FADD promuove la scissione della caspasi-8 e, successivamente, l'attivazione a valle della caspasi-3 per indurre l'apoptosi.
- (2) **Percorso di sopravvivenza delle cellule coinvolgente l'interazione ECM-integrina.** L'interazione delle cellule epiteliali con l'ECM attraverso le integrine consente l'attivazione, dipendente da Talina1, del percorso FAK/Src e di ILK-1. L'attivazione di ILK-1 permette la fosforilazione di GSK3 $\beta$  e il reclutamento di Snail. Questa cascata di segnali attiva il percorso di sopravvivenza PI(3)K/Akt. La perdita di tali segnali di sopravvivenza a seguito del distacco, migliora la sensibilità della cellula tumorale agli stimoli apoptotici.
- (3) **Morte mediata dall'attivazione della via mitocondriale.** Il distacco delle cellule induce una sovra-regolazione di proteine pro-apoptotiche, come Bim, e l'abbattimento di espressione di proteine regolatorie anti-apoptotiche, quali Bcl-



2; questo consente il rilascio del citocromo-c dai mitocondri e, successivamente, l'attivazione delle caspasi-9 e -3 con induzione di apoptosi.

### Nuovi target per la Terapia del carcinoma prostatico.

**144** Gli stretti legami funzionali tra la progressione del cancro alla prostata e la resistenza ad apoptosi e anoikis, fornisce un numero sempre crescente di conoscenze molecolari nello sviluppo e nella formulazione clinica di nuovi approcci terapeutici mirati. Tra questi, il ripristino dell'apoptosi rappresenta una fondamentale strategia di difesa contro la chemioresistenza delle cellule tumorali [404].

**145** *Galectine*. Le funzioni opposte di Gal-3 sono state documentate in cellule tumorali della prostata: Gal-3 citoplasmatica induce la migrazione delle cellule e la crescita ancoraggio-indipendente, mentre Gal-3 nucleare esercita l'effetto opposto, bloccando la migrazione cellulare [405]. La diversa localizzazione cellulare di Gal-3 si realizza in risposta a stimoli apoptotici, mentre la traslocazione dalla membrana peri-nucleare ai mitocondri, dipende dalla sinexina (annessina VII), una proteina legante fosfolipidi e Ca<sup>2+</sup>.

**146** *Caveolina-1*. Evidenze biochimiche, nell'ambito di metastasi di tumore alla prostata, indicano la capacità di CAV-1 di sopprimere l'anoikis attivando Akt e bloccando anche i due inibitori di Akt, PP1 e PP2A [406].

Nel cancro della prostata, l'induzione di *Cav-1* è stata correlata ad una sopravvivenza delle cellule, indipendenza dagli androgeni ed un maggiore potenziale metastatico. L'espressione di CAV-1 in linee cellulari di tumore prostatico comporta un rafforzamento dell'apoptosi indotta da deprivazione androgenica. Modelli murini di adenocarcinoma transgenico prostatico confermano che, in contrasto con i tumori mammari, *Cav-1* è un gene promotore dei tumori la cui eredita di funzione innesca il percorso di apoptosi delle cellule epiteliali prostatiche tramite la sovra-regolazione dei geni pro-apoptotici *PTEN* e *Par4* [407].

**147** *TrkB*. TrkB è un recettore tirosin-chinasi neurotrofico identificato come un potente e specifico soppressore di anoikis associata all'attivazione delle caspasi. TrkB conferisce resistenza all'anoikis tramite l'attivazione del percorso PI(3)K e induce la formazione di grandi aggregati cellulari che, *in vitro*, sono in grado di sopravvivere e proliferare inducendo un rapido attecchimento e crescita delle metastasi, una volta infiltrati nei vasi linfatici e sanguigni per raggiungere sedi di colonizzazione lontane dal sito primario.

Nel carcinoma della prostata, TrkB è spesso sovra-espresso, e vi è una stretta correlazione tra l'aumento della malignità ed una prognosi infausta; la sovra-espressione di TrkB è stata osservata in 22 su 32 casi di tumori primari e 6 su 10 metastasi ossee [408].

**148** *IGF-1.* Le IGF correlano direttamente con lo sviluppo del cancro alla prostata e, in topi transgenici, la sovra-espressione forzata di IGF-1 promuove la progressione del PCa [409]. Inoltre, l'IGF-R media la resistenza alla terapia anti-androgenica, incrementando l'espressione di survivina. La survivina appartiene alla famiglia di proteine inibitrici dell'apoptosi e, come tale, non sorprende la sua associazione con la progressione del tumore e la resistenza ai farmaci [410].

Un'elevata espressione di IGF-1 ed IGF-1R nell'osso è fondamentale, anche per favorire i depositi ossei metastatici di cellule di carcinoma prostatico [411]. A differenza di altri tumori che metastatizzano alle ossa (come ad esempio il tumore della mammella e quello al polmone), il cancro alla prostata causa più lesioni osteoblastiche (espressione del tentativo, da parte del tessuto osseo, di riparazione del danno causato da un tumore) che osteolitiche (espressione di predominanza del tumore).

### Riassunto.

**149** *L'anoikis è un termine greco che significa "perdita della casa" ed indica un fenomeno unico che riflette la morte apoptotica delle cellule a seguito di insufficienti interazioni cellula-matrice. Questa modalità unica di morte cellulare è stata successivamente riconosciuta come un evento importante nell'angiogenesi e nella metastatizzazione tumorale. Dopo il distacco, le cellule epiteliali ed endoteliali muoiono, normalmente per apoptosi; l'anoikis può sopprimere l'espansione delle cellule oncogeneticamente trasformate. Tuttavia, l'acquisizione di resistenza a questo processo, facilita alle cellule tumorali la loro capacità di migrare verso siti secondari e creare lesioni metastatiche. Durante la progressione metastatica, le cellule sono metabolicamente quiescenti, per via della mancanza di adesione all'ECM, e dunque particolarmente suscettibili. Durante il processo di anoikis, sia percorsi di morte attraverso i recettori che la via mitocondriale sono attivati. Per quanto riguarda il PCa, il distacco delle cellule innesca contemporaneamente una sotto-regolazione di Bcl-X<sub>L</sub> e dei componenti anti-apoptotici del pathway mitocondriale [380] ed una sovra-regolazione del ligando di Fas (FasL), un attivatore della via di morte recettoriale, entro pochi minuti dal distacco [381]. Tuttavia, una sottopopolazione di cellule tumorali diventano resistenti al distacco indotto da stimoli pro-apoptotici e, dopo aver raggiunto il sistema circolatorio con successo, migrano verso siti bersaglio secondari.*

*La resistenza a morire attraverso l'anoikis fornisce una base molecolare per il targeting terapeutico, in particolare dei carcinomi come quello prostatico. L'identificazione di eventi critici di segnalazione nell'ambito dell'anoikis, permetterà l'ottimizzazione terapeutica per impedire la metastatizzazione di cellule tumorali prostatiche. Strategie potenziali di combinazione di più bersagli tumorali nell'ambito della neovascolarizzazione e la fase critica di passaggio a cellule metastatiche rappresentano dunque una forte promessa terapeutica nell'ambito della cura del cancro della prostata.*

## Autofagia e tumorigenesi.

**150** Le metastasi sono la prima causa di mortalità in pazienti affetti da cancro. Il processo prevede più fasi distinte, tra cui:

- 1) **formazione ed invasione** delle cellule tumorali nel sito primario del tumore;
- 2) **distacco e intravasazione** nella circolazione vascolare o linfatica delle cellule tumorali e loro **sopravvivenza** durante il viaggio;
- 3) l'**extravasazione** di singole cellule tumorali nel sito organo bersaglio;
- 4) **espansione e colonizzazione** delle cellule tumorali presso il sito secondario [412].

Le cellule tumorali vanno incontro a diversi tipi di stress durante ogni passaggio della progressione metastatica attivando meccanismi adattativi che consentono loro di sopravvivere. Uno di questi è l'autofagia.

### L'autofagia nella soppressione del tumore.

**151** Il contributo dell'autofagia nel cancro è estremamente complesso. Ci sono prove che supportano sia la promozione del tumore che funzioni soppressive da parte del meccanismo autofagico. Questo apparente paradosso può essere conciliato con il fatto che il ruolo dell'autofagia durante la progressione del cancro è specifico per il tipo di tumore, lo stadio ed il contesto. Mentre evidenze genetiche suggeriscono una funzione soppressiva durante la fase iniziale del tumore, ci sono prove convincenti che l'autofagia venga utilizzata come strategia di sopravvivenza dai tumori per far fronte a sollecitazioni diverse del microambiente incontrato dalle cellule metastatiche durante la progressione tumorale. Per questo, i livelli di attività dell'autofagia, così come l'espressione di molecole autofagiche, vengono utilizzati come marcatori prognostici per predire l'esito del tumore [413-415].

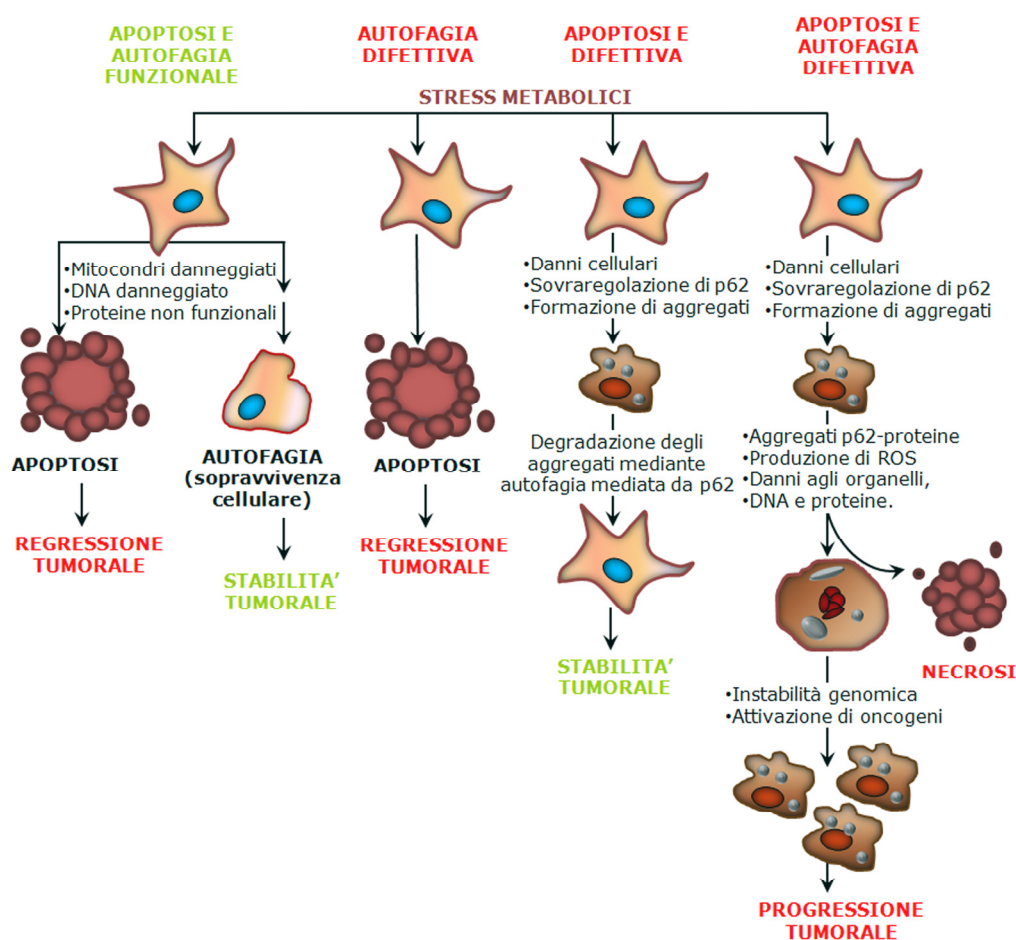
Dal momento che le funzioni principali dell'autofagia sono il riciclo di nutrienti essenziali e fornire energia per la sopravvivenza durante stress e carenza di elementi nutritivi, sembra inizialmente contro intuitivo che l'autofagia possa agire come un potenziale meccanismo di soppressione del tumore (figura 4.9). Il ruolo dell'autofagia come soppressore del tumore è stato affrontato attraverso studi genetici sulla *Beclina-1* l'ortologo, nei mammiferi, di *ATG6* in lievito. La *Beclina-1* è stata mappata in un locus di suscettibilità tumorale che è monoallelicamente deleta in una elevata percentuale di tumori quali quelli al seno, alle ovaie e alla prostata. Inoltre, oncogeni come Akt, Ras e ERK, possono inibire l'autofagia soprattutto attivando la via di segnalazione di mTOR. D'altra parte, sussistono prove evidenti di come soppressori tumorali quali p53 [416], PTEN [417] e ARF[418], attivino i percorsi autofagici.

### Funzioni di promozione del tumore da parte del macchinario autofagico.

**152** Sebbene si ritiene promuova lo sviluppo del tumore, un livello basale o minimo di autofagia sembra essere necessario per la

sopravvivenza delle cellule tumorali. L'autofagia fornisce alle cellule tumorali alcuni vantaggi selettivi per far fronte allo stress, sia nel microambiente tumorale primario, così come durante la diffusione e la metastatizzazione. Tre sono gli scenari nei quali l'autofagia media la sopravvivenza cellulare favorendo la progressione tumorale:

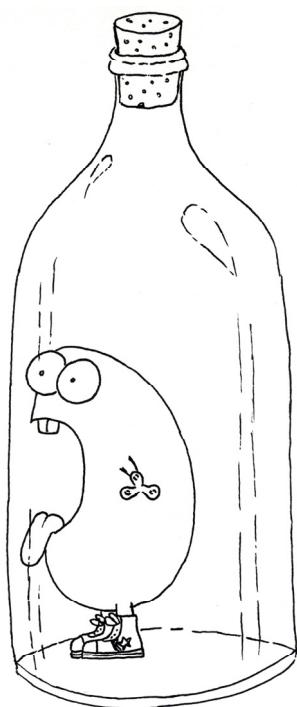
1. ipossia;
2. necrosi, infiammazione e distacco dall'ECM,
3. dormienza.



**Figura 4.9 (vedi pagina a lato). Ruolo dell'apoptosi e dell'autofagia nella risposta agli stress metabolici nella tumorigenesi.** È noto il ruolo dell'autofagia nel proteggere le cellule normali dallo stress genotossico, mantenendo l'integrità del genoma. Questa specifica funzione è stata anche caratterizzata nel contesto di stress metabolici tipici dei tumori dovuti a carenza di glucosio e ipossia, accoppiati ad una maggiore domanda di energia per cellule in rapida proliferazione. L'apoptosi funge da prima linea difensiva per rimuovere le cellule danneggiate. Tuttavia, quando l'apoptosi è ridotta o inattivata, evento comune durante la tumorigenesi, le cellule si affidano in modo significativo all'autofagia per il ripristino di una omeostasi normale. Paradossalmente, difetti nel macchinario autofagico, associati alla perdita monoallelica di Beclina-1, sono concomitanti ad un incremento della tumorigenesi; in cellule con una via autofagica poco funzionante gli stress metabolici inducono maggiori rotture nel doppio filamento di DNA ed amplificazione genica, così come

l'accumulo di mitocondri danneggiati e chaperones dell'ER, rispetto alle loro controparti naturali. Inoltre, p62, una proteina coinvolta in eventi di trasduzione del segnale e poliubiquitinazione di proteine *unfolded* (degradate poi attraverso la via autofagica), funge da collegamento critico tra autofagia difettosa e tumorigenesi [419]. L'accumulo anormale di mitocondri danneggiati e proteine malripiegate, nelle cellule difettose per l'autofagia, porta ad una produzione elevata di ROS che causano danni al DNA, così come l'accumulo di p62. L'aumento del livello di p62, a seguito di stress metabolico comporta la generazione di ROS, creando così un ciclo di feedback positivo. Dagli esperimenti condotti su cellule caratterizzate da varie anomalie genetiche, tali risultati concordano con l'ipotesi che le funzioni autofagiche difettose siano una modificazione secondaria, piuttosto che il meccanismo principale di danno genomico durante la progressione tumorale.

Un altro meccanismo autofagico di soppressione della tumorigenesi è l'inibizione della morte necrotica di cellule resistenti all'apoptosi, in condizioni di stress metabolico. Anche se l'assenza di una autofagia ed apoptosi funzionale dovrebbe incidere negativamente sulla cancerogenesi, è stato dimostrato come la morte delle cellule per necrosi provoca infiltrazione dei macrofagi e la produzione di citochine pro-infiammatorie (con conseguente ipossia e stress metabolico); dunque, l'infiammazione cronica associata a grave ipossia e stress metabolico che si sviluppa nel sito del tumore primario, favorirebbe una pro-immunità tumorale selezionando e facilitando la replicazione di cellule resistenti [420]. Così, limitandosi alla necrosi delle cellule tumorali, l'autofagia funge invece da meccanismo di soppressione tumorale, impedendo l'infiltrazione leucocitaria nella sede del tumore primario (*modificata da Shenkgan J et al., 2007*).



**153**

**Ipossia.** L'ipossia tumorale, derivante da una inadeguata vascolarizzazione del tumore, è associata ad un fenotipo maligno, alla predisposizione per le metastasi ed una prognosi infausta. Lo stress ipossico seleziona cellule resistenti all'apoptosi, così come rappresenta un grave ostacolo alla chemioterapia e alla radioterapia. Degenhardt e collaboratori, prima di altri, hanno dimostrato come l'autofagia sia indotta specificatamente nel sito primario dei tumori, dove promuove la sua sopravvivenza [420]. Ulteriori studi hanno svelato le connessioni molecolari tra ipossia e l'induzione di autofagia. **Il Fattore 1 $\alpha$  Ipossia-inducibile (HIF-1 $\alpha$ )**, un fattore di trascrizione chiave che codifica per una pletora di geni responsabili di angiogenesi, invasione e metastasi [421], è un regolatore positivo di autofagia. **La Proteina che Interagisce con Bcl-2/adenovirus E1B (BNIP3)**, una BH3-only, è un obiettivo a valle di HIF-1 $\alpha$  in grado di indurre mitofagia e, di conseguenza,

controllare la produzione di ROS in risposta all'ipossia. Inoltre tale molecola interrompe, nelle cellule ipossiche, l'interazione tra la Beclina-1 e Bcl-2, consentendo in tal modo alla Beclina-1 di innescare l'autofagia. L'induzione di BNIP3 da parte del macchinario pro-apoptotico, è una risposta adattativa di sopravvivenza durante l'ipossia prolungata [422]. Poiché l'ipossia cronica porta a gravi perturbazioni metaboliche nei tessuti tumorali, si può

postulare che, riciclando componenti cellulari di base, l'autofagia aiuti le cellule a far fronte all'aumentata domanda metabolica.

**154** *Necrosi, infiammazione e distacco dalla ECM.* L'autofagia può inibire indirettamente l'infiammazione, necessaria per le fasi iniziali della metastatizzazione, nella sede principale del tumore. Attraverso la promozione della sopravvivenza durante ipossia e lo stress metabolico (causa di necrosi e infiltrazione di cellule T, NK e macrofagi), l'autofagia attenua i fenomeni infiammatori, precludendo così l'infiltrazione di macrofagi nella sede del tumore primario [420].

L'autofagia può direttamente mediare la risposta infiammatoria associata al tumore, regolando il rilascio della **Proteina Box 1 del Gruppo ad Alta Mobilità (HMGB1)**, la quale attiva le cellule dendritiche attraverso il legame al **Toll-Like Receptor 4 (TLR4)** sulla loro superficie. Questo induce una potente risposta antitumorale in grado di eliminare le cellule cancerose e prevenire le metastasi [423].

La modulazione dell'immunità antitumorale delle metastasi, è anche associata con l'apoptosi indotta dai ligandi dei recettori di morte. Il Ligando TRAIL appare avere un ruolo critico nella regolazione della soppressione di metastasi tramite l'intervento di cellule T e NK. Mutazioni nel recettore di TRAIL, rendono le cellule cancerose refrattarie all'apoptosi indotta da TRAIL, con un conseguente incremento di metastasi. Siccome l'autofagia è aumentata in cellule con una resistenza verso TRAIL, essa svolge un ruolo citoprotettivo [424].

Per riuscire a formare metastasi, le cellule cancerose debbono acquisire l'abilità di sopravvivere in assenza di contatti con l'ECM mentre attraversano il torrente circolatorio, viaggiando in un microambiente estraneo e a distanza dalla sede secondaria. In cellule normali, la mancanza di adesione promuove la morte per anoikis. Così, le cellule tumorali, per sopravvivere e formare metastasi, hanno evoluto diversi meccanismi di resistenza. In generale, l'attivazione aberrante dei percorsi stimolati dai fattori di crescita è un meccanismo comune, utilizzato dalle cellule tumorali, per eludere l'anoikis.

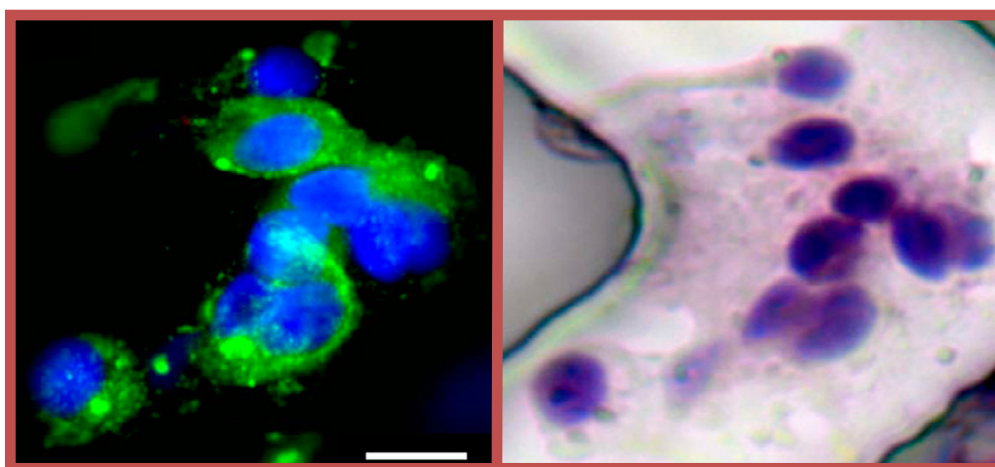
L'autofagia è un altro meccanismo che protegge le cellule (soprattutto epiteliali) dall'anoikis indotta da distacco dall'ECM. Il distacco che si verifica in seguito al blocco della funzione dei recettori per l'integrina, è stato osservato la prima volta *in vitro* nello spazio luminale di acini di epitelio ghiandolari mammari in colture tridimensionali [425]. L'autofagia, che svolge un ruolo nel mediare la resistenza all'anoikis, può essere particolarmente importante durante le fasi successive di evoluzione del cancro in cui, alle cellule tumorali, è richiesto un adattamento per sopravvivere sino al raggiungimento dell'organo bersaglio.

Normalmente, le integrine collaborano per amplificare i segnali trasmessi dai recettori dei fattori di crescita, coordinando insieme il corretto assorbimento dei nutrienti e il loro metabolismo. Similmente al ruolo svolto durante la deprivazione di nutrienti, l'autofagia, in cellule non più adese

all'ECM, può compensare la perdita dei segnali di crescita estrinseci promuovendo il recupero e l'utilizzo intrinseco di nutrienti (grazie alla demolizione di organelli e proteine) mantenendo, di conseguenza, un buon livello di metabolismo energetico [426]. Nel contesto di una rapida crescita tumorale con elevate richieste biosintetiche, l'autofagia può così promuovere l'idoneità alla sopravvivenza delle cellule prive di contatto con l'ECM. In alternativa, dato che l'autofagia è inizialmente sovra-regolata in regioni sotto stress dei tumori primari, un sostenuto auto-cannibalismo può consentire alle cellule di acquisire un fenotipo pro-mestatico captando, dopo il distacco dall'ECM, appropriati segnali di migrazione e protezione dall'anoikis.

I processi di crescita ancoraggio-indipendente appaiono utili indicatori di prognosi in clinica. Ad esempio, il comportamento di tumori metastatici al seno si correla bene con quello di linee cellulari di tumore mammario, che mostrano un fenotipo di crescita indipendente dall'ancoraggio. Se l'auto-cannibalismo agisce nella promozione della resistenza all'anoikis, altresì correla con prognosi infausta, indicando una propensione alla progressione metastatica della malattia [427].

**155** *Autofagia e dormienza.* Un evento nello sviluppo di un tumore in cui l'autofagia può svolgere un ruolo importante è rappresentato dalla dormienza delle cellule tumorali. La dormienza descrive la notevole capacità di **Cellule Tumorali Disseminate (DTC)** di sopravvivere, da anni a decenni, in siti distanti da quello del tumore primario, senza dar luogo a metastasi. La popolazione di cellule dormienti può costituire solo una piccola frazione di cellule che diffondono dal tumore primario. Queste cellule, dotate della capacità di formare metastasi, sono refrattarie ai comuni trattamenti chemioterapici che bersagliano le cellule proliferanti del tumore primario. Dal momento che la malattia latente può esistere come una sola o un piccolo numero di cellule, i meccanismi che inducono e mantengono la dormienza cellulare sono difficili da studiare sperimentalmente (figura 4.10).



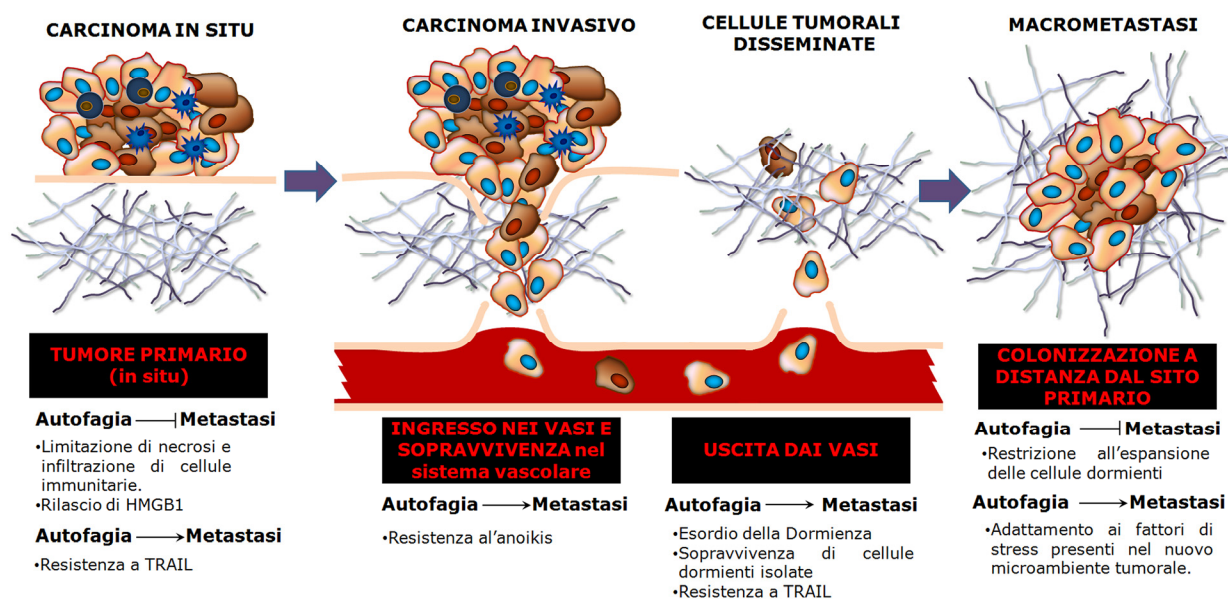
**Figura 4.10 Isolamento di cluster di cellule tumorali circolanti (CTC) dal sangue di un paziente con carcinoma metastatico ai polmoni con tecnica HB-Chip.** L'HB-chip è costituito da un vetrino incollato ad un supporto di polidimetilsilossano (PDMS) nel quale sono stati ricavati 8 microcanali con schema a spina di pesce le cui pareti interne, rese chimicamente attive, sono rivestite di anticorpi specifici. Il flusso uniforme di sangue attraverso il dispositivo permette alle eventuali cellule tumorali circolanti di essere catturate sulle pareti dei canalicoli se espongono sulla superficie determinati antigeni. Il "panel" di anticorpi che può esser fatto aderire al HB-Chip differisce da tumore a tumore ma uno dei più comuni è il sistema Ep-CAM, che comprende anticorpi diretti contro le principali molecole di adesione delle cellule epiteliali. In figura sono riportati cluster di CTC isolate da sangue di un paziente con carcinoma al polmone, rilevate mediante colorazione immunofluorescente con DAPI (nucleo, blu) e citocheratina 7/8 (Verde). L'esame del sangue con HB-Chip è così sensibile che può individuare una singola cellula tumorale nascosta tra miliardi di cellule sane. La caratterizzazione molecolare delle CTC può fornire importanti informazioni sulla natura molecolare e biologica di queste cellule, come ad esempio lo stato dei recettori ormonali ed epidermici e di altri membri della famiglia dei recettori del fattore di crescita. Queste indicazioni sono importanti per l'identificazione dei bersagli terapeutici, di eventuali meccanismi di resistenza nelle CTC e per il monitoraggio, in tempo reale, delle terapie sistemiche mirate.

In particolare, l'incapacità delle DTC a formare una forte e stabile connessione con l'ECM in un microambiente nuovo è un possibile meccanismo proposto per indurre dormienza tumorale [428]. In modelli murini di tumore, la disattivazione della funzione delle integrine  $\beta_1$ , è stata identificata come un attivatore della dormienza cellulare [429]. L'inibizione dell'attività dell'integrine  $\beta_1$ , impedisce la proliferazione delle cellule tumorali, ma non la vitalità, portando all'attivazione di uno stato di dormienza. La dormienza è anche mediata a valle delle integrine  $\beta_1$  attraverso la diminuzione della segnalazione di FAK e MAPK e l'attivazione di p38 MAPK ed eIF2 $\alpha$  [430]. Anche se non è chiaro come questi meccanismi regolino la dormienza negli esseri umani, è stato proposto che essa sia indotta in cellule tumorali disseminate esposte a microambienti sfavorevoli che non facilitano la corretta interazione ECM-integrine. In particolare, la soppressione della via di segnalazione dell'integrina  $\beta_1$ , un induttore noto di autofagia, promuove la dormienza nel modello MMTV-PyMT di cancro al seno [431]. Così è possibile che, siccome le DTC non contattano efficacemente un'ECM estranea, una compromessa segnalazione mediata dalle integrine possa stimolare il processo autofagico, che diviene vitale per il mantenimento di uno stato inattivo o per promuovere la sopravvivenza delle cellule tumorali dormienti.

Inoltre, le cellule dormienti, debbono anche resistere a stimoli apoptotici estrinseci. Nelle metastasi ossee di carcinoma mammario, dove le DTC rimangono dormienti nel midollo osseo per lunghi periodi di tempo, TRAIL è abbondantemente espresso nel microambiente midollare e può uccidere le DTC. Meccanismi come l'autofagia, che coinvolgono una soppressione delle funzioni di TRAIL mediata da Src, promuovono la sopravvivenza di queste cellule nel midollo osseo [432].



La dormienza delle cellule tumorali riflette probabilmente un adattamento evolutivo, con l'esistenza di un meccanismo conservato, attraverso il quale l'autofagia promuove la sopravvivenza durante gli stati di quiescenza. In effetti, eventi che portano ad un arresto del ciclo cellulare nella fase G0 possono indurre sia dormienza che autofagia. Un ruolo pro-sopravvivenza dell'autofagia durante la quiescenza indotta da p27<sup>Kip1</sup>, è stata dimostrata in linee di cellule di cancro al seno che, solitamente, esibiscono un comportamento inattivo *in vivo* a seguito di sovra-espressione di p27<sup>Kip1</sup> [433, 434]. Tuttavia, l'esatto ruolo biologico dell'autofagia nella dormienza rimane in gran parte sconosciuto.



**Figura 4.11. Ruoli potenziali dell'autofagia durante la metastatizzazione.** La progressione metastatica comporta una serie di passaggi (box neri) durante i quali l'autofagia può promuovere o inibire la crescita tumorale primaria.

- **Tumore primario.** L'autofagia può inibire la progressione tumorale limitando la necrosi e la conseguente infiltrazione di cellule infiammatorie o promuovendo direttamente la produzione di fattori immunomodulanti anti-metastatici, come HMGB1. In alternativa, può promuovere le metastasi consentendo alle cellule tumorali di resistere all'apoptosi indotta da TRAIL.
- **Intravasazione e sopravvivenza nella circolazione sistemica.** Come le cellule tumorali diffondono attraverso l'ECM ed entrano nella sistema circolatorio, l'autofagia può proteggere le cellule dall'anoikis e, quindi, assolvere ad una funzione pro-metastatica.
- **Uscita dai vasi sanguigni e disseminazione.** Le cellule tumorali, spesso, entrano in un periodo di dormienza, o quiescenza, per far fronte all'esposizione ad un microambiente nuovo ed ostile, presente nei siti distanti da quelli del tumore primario. L'autofagia può favorire la sopravvivenza delle cellule tumorali quiescenti durante la dormienza.
- **Colonizzazione in tessuti distanti.** L'autofagia può limitare lo sviluppo delle DTC in grandi macrometastasi, mantenendo la dormienza per lunghi periodi di tempo o, in alternativa, promuovere la formazione di macrometastasi consentendo alle cellule tumorali di superare gli stimoli stressori in un microambiente estraneo (*modificata da Kenfic CM et al., 2010*).

Se l'autofagia è necessaria per la soppressione della crescita di cellule tumorali, si può ipotizzare che essa limiti lo sviluppo di cellule dormienti a livello delle macrometastasi. Un legame diretto tra dormienza ed autofagia delle cellule tumorali è stato recentemente scoperto in cellule di carcinoma ovarico. Il gene soppressore dei tumori ARHI, induce l'autofagia e promuove la sopravvivenza *in vitro* di cellule dormienti nel contesto di un microambiente tumorale [435]. Anche se l'esistenza della dormienza è limitata a modelli *in vitro*, la manipolazione farmacologica o genetica dei processi autofagici potrebbe definire il ruolo svolto dall'autofagia durante questo fenomeno *in vivo* (figura 4.11).

Due argomenti affascinanti per la ricerca futura comprendono dunque la verifica di come avviene la regolazione dell'autofagia nei modelli esistenti di dormienza e se l'interruzione genetica degli ATGs limita la dormienza cellulare o avvia la morte di cellule tumorali dormienti.

#### Riassunto.

**156**

*Al fine di formare metastasi, le cellule tumorali devono adattarsi a microambienti fonte di stress, come la diffusione nella circolazione sistemica e la colonizzazione di organi distanti. L'autofagia, un processo strettamente regolamentato, si mostra sovra-regolato durante lo stress cellulare ed in grado di sopprimere sia la formazione primaria del tumore che la sua capacità di produrre metastasi. L'autofagia può inibire le metastasi attraverso la promozione di risposte infiammatorie o limitando l'espansione delle cellule tumorali nelle macrometastasi, congelandole in periodo di dormienza.*

*Al contrario, l'autofagia può anche promuovere la tumori genesi attraverso il rafforzamento delle cellule tumorali in risposta a stress ambientali o l'insorgere di anoikis durante la progressione metastatica.*

*La capacità dell'autofagia di inibire necrosi e infiammazione può limitare l'invasione e la diffusione delle cellule tumorali da un sito primario bloccando così il processo di metastastizzazione al primo stadio.*

*D'altra parte, l'autofagia può promuovere le metastasi nelle fasi successive attraverso la tutela delle cellule tumorali mentre queste viaggiano attraverso il sistema vascolare. Così, l'autofagia si adatta ad entrambi i ruoli pro-metastatici e anti-metastatici a seconda delle richieste contestuali.*

## La segnalazione tra ECM e macchinario autofagico.

**157**

Esistono diverse vie di segnalazione intracellulari che possono collegare le modificazioni di attività dell'integrina con l'induzione dell'autofagia in risposta a vari tipi di stress. Nonostante la sovrapposizione

di queste vie e la necessità, a volte, della combinazione di più percorsi per l'attivazione dell'autofagia a seguito di distacco, possiamo distinguere:

1. **via sensibile ai nutrienti e ai fattori di crescita;**
2. **via sensibile al metabolismo energetico;**
3. **risposte integrate ad altri tipi di stress.**

**158** *Via sensibile ai nutrienti e ai fattori di crescita.* Il corretto funzionamento dei recettori dei fattori di crescita sulla superficie cellulare richiede una perfetta adesione alla matrice mediata dalle integrine [436]. L'abbattimento dell'espressione dei recettori dei fattori di crescita o sensori di nutrienti sulla superficie della cellula, porta all'inibizione della crescita e all'attivazione, in particolare nei mammiferi, del percorso mTOR, che è l'archetipo inibitore di autofagia (vedi Box 4.3). Poiché una carenza di nutrienti o di fattori di crescita induce autofagia, la perdita di attivazione dell'integrina può spiegare un aumento di autofagia durante il distacco dall'ECM. Tuttavia, l'aumentata espressione di EGFR in cellule epiteliali in procinto di staccarsi dall'ECM, capace di ripristinare l'attivazione di importanti segnali a valle, non è in grado di inibire il processo autofagico indotto da distacco [437].

Effettivamente l'attività di mTOR può essere controllata direttamente in risposta all'adesione tra cellule e matrice attraverso la **Chinasi di Adesione Focale (FAK)**. FAK, una componente fondamentale dei complessi di adesione, può fosforilare i **Complessi di Sclerosi Tuberosa (TSC1/2)** dei regolatori posti a monte di mTOR, per sopprimere la loro attività e mantenere quella di mTOR. L'inibizione dell'attività di FAK attraverso l'espressione di una chinasi mutante, comporta l'inibizione del percorso di mTOR e il possibile sviluppo di autofagia [438] (figura 4.11).

**159** *Percorsi sensibili al metabolismo energetico.* Durante i periodi di stress bioenergetici, l'autofagia fornisce nutrienti alla cellula mediante prodotti di degradazione rilasciati dal lisosoma. Presumibilmente, questi componenti, possono essere riciclati e utilizzati per sintetizzare nuove proteine e per fornire gli input a rigenerare i cicli energetici produttori ATP (Box 4.3). Infatti, in risposta a fattori di stress diversi, l'inibizione dell'autofagia riduce i livelli di ATP intracellulare [439]. La diminuzione di ATP può essere controllata in parte dalle AMPK, che si attivano a seguito di un aumento del rapporto AMP/ATP, attraverso l'innescamento della chinasi a monte LKB1.

AMPK fosforila e attiva i TSC1/2 con conseguente inibizione a valle di mTOR. L'inibizione di mTOR non solo limita i segnali che favoriscono la crescita, ma induce anche autofagia che, a sua volta,

**Box 4.3.** L'autofagia è rapidamente indotta in una varietà di cellule epiteliali coltivate in assenza di siero. Inoltre, l'incubazione di cellule adese con anticorpi che bloccano le funzioni dell'integrina  $\beta_1$ , è sufficiente per indurre l'autofagia, mentre l'aggiunta esogena, a cellule in sospensione, di una membrana basale ricca in laminina, inibisce l'autofagia delle cellule. Questo dimostra come l'autofagia indotta dal distacco sia il risultato della perdita di funzione da parte dell'integrina.

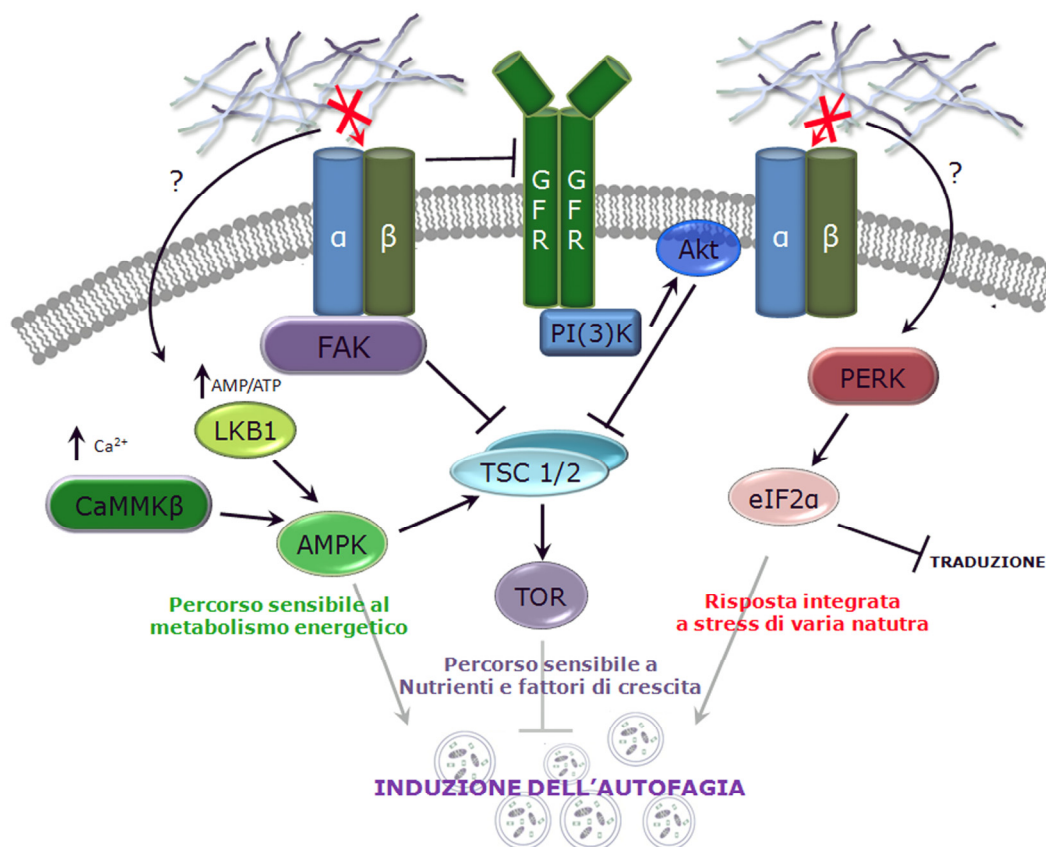
fornisce ATP attraverso il riciclo dei prodotti di degradazione [440]. Recentemente è stato dimostrato come AMPK attiva l'autofagia, in risposta sia all'attività di LKB1 che sulla base di cambiamenti nella concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare che portano all'attivazione della **Chinasi- $\beta$  della Chinasi  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina-dipendente (CaMKK $\beta$ )** [432].

Sebbene nessun dato dimostri che la perdita di funzione delle integrine porti ad una riduzione dei livelli di ATP, AMPK è fortemente attivato durante il distacco dall'ECM. Se l'attivazione avviene attraverso un percorso classico sensibile ai livelli di ATP e mediato da LKB1, o tramite attivazione di CaMKK $\beta$ , rimane poco chiaro.

AMPK rimane attiva nelle cellule distaccate sovra-esprimenti EGFR o Bcl-2, suggerendo come questa via di stress sia indotta durante il distacco dall'ECM, a prescindere dalla capacità della cellula di sostenere la segnalazione del fattore di crescita o prevenire l'apoptosi [437] (figura 4.12).

**160**

**Risposta integrata a stress di varia natura.** La fosforilazione del fattore di trascrizione eIF2 $\alpha$  sulla serina 51 è un punto cruciale dell'UPR, un programma attuato dall'ER come risposta allo stress, e conservato dai lieviti ai mammiferi. Questa fosforilazione è un meccanismo centrale nella soppressione della traduzione proteica [433]. Di conseguenza, il distacco dall'ECM attiva programmi che sopprimono la traduzione delle proteine e, per i quali, eIF2 $\alpha$  fosforilato gioca un ruolo cruciale [434, 435, 440].



**Figura 4.12. Vie di segnalazione intracellulare che collegano l'ECM all'autofagia.** La perdita di funzionamento delle integrine sulla superficie cellulare può indurre l'autofagia attraverso tre vie potenziali di segnalazione: il percorso sensibile ai fattori di crescita (blu/violetto), il percorso sensibile al metabolismo energetico (verde) o il **sistema Integrato di Risposta agli Stress (ISR, rosso)**. Una perdita di adesione mediata dalle integrine, risulta in un abbattimento dell'espressione dei recettori del fattore di crescita e/o la ridotta attivazione di segnali a valle. Normalmente, tali segnali, attivano mTOR, un soppressore noto di autofagia. Inoltre, l'interruzione del contatto cellula-matrice può innescare sia percorsi sensibili al metabolismo energetico che l'ISR, attraverso meccanismi attualmente sconosciuti. Questo porta all'attivazione di AMPK e eIF2 $\alpha$ , entrambi noti per stimolare l'autofagia in altri contesti (*modificato da Lock R et al., 2008*).

Cellule di epitelio mammario cresciute in sospensione o trattate con anticorpi per il blocco dell'integrina  $\beta 1$  mostrano un aumento della fosforilazione di eIF2 $\alpha$ , che dipende dalla chinasi dell'ER PERK, posta a monte di eIF2 $\alpha$  [441]. Sebbene PERK sia classicamente attivata a seguito di stress dell'ER, allo scopo di innescare la repressione della traduzione proteica e l'apoptosi, durante il distacco dall'ECM, l'attivazione di PERK non è una risposta secondaria allo stress del reticolo così come la trascrizione indotta da stress del reticolo di molti classici geni, non appare sovra-regolata [441]. In particolare, lo stress del reticolo procurato da agenti chimici o l'utilizzo di proteine tossiche contenenti ripetizioni di poliglutammine, provoca la formazione di autofagosomi dipendenti sia dall'attivazione di PERK che dalla fosforilazione di eIF2 $\alpha$  [442] (figura 4.12).

### Autofagia, tumorigenesi e terapie del PCa.

**161** *Tirosin chinasi Src.* Le Tirosin-chinasi giocano un ruolo importante nella progressione tumorale e di chemioresistenza tanto che gli inibitori delle tirosin-chinasi sono farmaci in prima linea nella terapia antitumorale mirata. Per quanto riguarda il PCa, le tirosin-chinasi risultano implicate nello sviluppo del tumore resistente alla castrazione, l'aspetto più preoccupante nella tumorigenesi delle cellule prostatiche, attualmente non contrastato da alcun trattamento efficace. Tra le circa 30 tirosin-chinasi espresse da una tipica cellula di PCa, quasi un terzo risultano implicate nella carcinogenesi. È interessante notare come molte di esse utilizzino, come percorsi di segnalazione, un gruppo di tre tirosin-chinasi non recettoriali, **Src/ETK/FAK**, note come **complesso Src**, il quale si dimostra efficace nell'attivazione aberrante del recettore degli androgeni (AR) mediata da fattori di crescita (EGF), citochine (IL-6), chemochine (IL-8) e neurochine (peptide che rilascia gastrina, o Bombesina). Questi fattori sono indotti e rilasciati dalle cellule di PCa per le cellule stromali, a seguito della deprivazione di androgeni. Il complesso Src mostra infatti la capacità di fosforilare gli AR, promuovendo la loro traslocazione nucleare e la stabilizzazione della molecola in uno stato conformazionale privo di ligando (e dunque inattiva). Gli inibitori delle complesso Src si dimostrano efficaci

nell'indurre l'arresto della crescita androgeno-indipendente e la progressione metastatica di cellule tumorali prostatiche sia *in vitro* che in un modello pre-clinico di xenotrapianto in topo, ma senza indurre un significativo livello di apoptosi. Questo riflette l'inefficacia generale degli inibitori delle tirosin-chinasi come monoterapia farmacologica adottabile nella progettazione di studi clinici. Diviene anche chiaro come la causa alla base della resistenza all'apoptosi sia l'autofagia, promossa sia dagli inibitori delle tirosin-chinasi che a seguito della deprivazione di androgeni. Infatti, un blocco autofagico sensibilizza le cellule tumorali della prostata nei confronti dell'attività degli inibitori del complesso Src. Quindi, una terapia combinata con inibitori delle tirosin-chinasi Src e modulatori di autofagia meriterebbe ulteriori sviluppi potendo rappresentare un potenziale trattamento per il cancro della prostata recidivante [443].

**162**

**GRP78/BiP ed AR.** La segnalazione pro-sopravvivenza mediata dagli AR è dunque un fattore chiave per la tumorigenesi delle cellule di prostata (figura 4.5). I tumori della prostata sono caratterizzati da microambienti poveri di nutrienti, ipossici e acidificati ed, un meccanismo attraverso il quale gli AR possono contribuire alla sopravvivenza, è quello di promuovere l'adattamento allo stress cellulare anche attraverso l'inibizione dell'autofagia indotta da deprivazione di siero. Questa capacità mediata dagli AR è dovuta ad una sovra-regolazione della proteina GRP78/BiP e si verifica indipendentemente dal percorso di risposta allo stress dell'ER. L'attivazione degli AR a seguito di deprivazione di nutrienti non influenza l'inibizione di mTOR, illustrando un ruolo adattativo degli AR che non risiede nella loro capacità di rilevare lo stato nutrizionale in cui versa la cellula bensì nel promuovere stabilità e funzioni dell'ER. Tale vantaggio adattativo è però temporaneo in quanto, a seguito di deprivazione cronica di nutrienti, gli AR ritardano, ma non sopprimono l'insorgenza di autofagia e la morte cellulare [444].

Altri esempi possono essere fatti nell'ambito della tumorigenesi del PCa, molti dei quali coinvolgono l'utilizzo di nutraceutici per indurre morte cellulare attraverso l'attivazione dei percorsi già analizzati in precedenza. I casi di autofagia non sono predominanti, ma nemmeno assenti. Ne è un esempio l'utilizzo di geraniolo, un monoterpene aciclico alimentare che favorisce la cooperazione tra macchinario autofagico e apoptotico per indurre morte in linee di cellule metastatiche di prostata, le PC-3 [445].

La progressione del cancro alla prostata a malattia metastatica avanzata è associata all'alterazione dei meccanismi di segnalazione regolati da fattori di crescita, a loro volta intimamente associati all'EMT ed al fenomeno di anoikis. La caratterizzazione della rete di segnalazione dell'anoikis, azionata in risposta all'apoptosi estrinseca, ha consentito l'elaborazione di strategie terapeutiche mirate a contrastare questa tipologia unica di morte cellulare durante lo sviluppo del cancro e la progressione verso le metastasi. L'attuale interesse clinico è rivolto all'efficacia dei short hairpin RNA

(shRNA) utilizzati come regolatori di anoikis per ostacolare la malattia metastatica prostatica. Il successo di questo approccio dipende sia dalla scelta delle adeguate proteine bersaglio che dalla capacità di indirizzare i shRNA con successo e selettivamente, nelle cellule tumorali [341, 397].

L'azione apoptotica svolta dai nuovi composti basati su Chinazolina (un classico farmaco già utilizzato per la cura sintomatica di ipertrofia prostatica) che sensibilizzano le cellule tumorali prostatiche all'anoikis, potrebbe rappresentare una grande promessa terapeutica per il trattamento di metastasi allo stadio iniziale. In effetti, l'individuazione di specifici bersagli lungo il percorso di segnalazione che porta all'anoikis, dovrebbero essere implementate ad altri bersagli, attivi nelle vie di segnalazione innescate durante la transizione epitelio-mesenchimale. La definizione di uno o più marker predittivi in tal senso, prima della comparsa delle metastasi, permetterà la valutazione del livello di resistenza all'anoikis e la selezione di tutti quei pazienti con carcinoma prostatico che potranno trarre beneficio da una terapia mirata a ripristinare la morte per anoikis [320, 336]. In modo analogo, si è tentato lo sfruttamento terapeutico dell'ERS per il trattamento del cancro della prostata avanzato. In tal senso, la **Ca<sup>2+</sup> ATPasi Sarcoplasmatica e del Reticolo Endoplasmatico (SERCA)** rappresenta l'obiettivo terapeutico primario. Tale pompa protonica è presente in tutti i tipi di cellule e serve a trasferire il Ca<sup>2+</sup> dal citosol al lume sarcoplasmatico e del Reticolo. La Tapsigargina, un noto induttore di ERS ed un efficace agente che innesca apoptosi, inibisce l'attività della pompa SERCA, con conseguente impoverimento di Ca<sup>2+</sup> nel lume dell'ER. Per controllare la specificità di azione e prevenire citotossicità nei pazienti è stato messo a punto un derivato della tapsigargina inattivo sino a quando non viene scisso dal PSA in modo, che, teoricamente, questo pro-farmaco risulti idrolizzato in un agente biodisponibile attivo solo nel microambiente tumorale prostatico. Anche in questo però, terapie mirate ad inceppare i meccanismi di ERS/UPR per la cura del PCa acquisiranno un elevato terapeutico solo quando, come per l'anoikis, saranno state caratterizzate a pieno le vie biochimiche ed i geni attivati in un determinato contesto di stress [402].

#### Riassunto.

**163**

*L'adesione, mediata dalle integrine, delle cellule epiteliali all'ECM è fondamentale per una sopravvivenza e crescita corretta. Sebbene il distacco dall'ECM conduca alla morte per anoikis, esso può anche portare ad un'autofagia strettamente regolamentata, in grado di promuovere la sopravvivenza delle cellule epiteliali allo stress dovuto al distacco, a condizione di recuperare un contatto con l'ECM in modo tempestivo. I segnali intracellulari che connettono le integrine al processo autofagico sono poco chiari, ma la sensibilità a nutrienti, fattori di crescita e lo stato energetico cellulare, così come risposte integrate a vari tipi di stress, rappresentano i candidati più interessanti.*

*Inoltre, l'autofagia può rappresentare un meccanismo adottato dalle cellule tumorali per sopravvivere all'anoikis, agevolando processi quali dormienza, diffusione e metastasi. Nell'ambito del PCa, l'autofagia può essere attivata o inibita dall'innescò di differenti percorsi molecolari, rappresentando sia una potenziale arma per contrastare la malattia recidivante che un meccanismo di adattamento più o meno temporaneo, in grado di consentire la sopravvivenza della cellula tumorale.*

## Polifenoli del tè verde per la chemioprevenzione del cancro alla prostata.

**164** Numerosi e potenziali meccanismi sono stati proposti per spiegare gli effetti di chemioprevenzione mostrati dai componenti del tè in base a studi condotti su linee cellulari tumorali e modelli animali. Molti di questi studi si sono focalizzati sull'EGCG che ha dimostrato di inibire la crescita e indurre arresto del ciclo cellulare e morte in diverse linee cellulari tumorali. Nonostante più studi clinici siano già stati conclusi, l'importanza relativa di questi meccanismi *in vivo* resta da stabilire.

### Studi in colture cellulari.

**Modulazione della segnalazione associata all'arresto del ciclo cellulare, apoptosi e metastasi.**

**165** *EGCG induce apoptosi e arresto del ciclo cellulare.* La catechina EGCG è la molecola più abbondante e più studiata con una significativa attività inibitoria sulla crescita di cellule tumorali della prostata ed una IC<sub>50</sub> calcolata variabile da 40 µM a 300 µM. Questa inibizione dipende dalla durata dell'esposizione (da 24 fino a 72 ore), così come la linea cellulare utilizzata. Gli studi condotti con polifenoli del tè verde in linee di cellule umane di cancro alla prostata androgeno-sensibili (cellule 22Rv1 e LNCaP) e androgeno-refrattarie (DU145 e cellule PC3), che rappresentano le varie fasi di progressione della malattia, mostrano una generale inibizione della crescita cellulare [446]. Ancora più importante, quando una linea di cellule primarie, come cellule epiteliali normali, vengono trattate con EGCG, si osserva assenza di tossicità alle dosi usate per gli studi di inibizione su linee cellulari tumorali [447].

Il proto-oncogene K-ras è frequentemente mutato nel codone 61 del cancro alla prostata latente [448] permettendogli di tramutarsi nell'oncogene Ras. Tè verde, estratti del tè verde ed EGCG purificato, hanno dimostrato di diminuire l'espressione di k-ras nelle cellule LNCaP [449].

Mentre le cellule tumorali della prostata androgeno-sensibili subiscono una rapida morte per apoptosi a seguito dell'ablazione di androgeni, le cellule



tumorali androgeno-insensibili mantengono intatto il macchinario molecolare di morte. L'EGCG esercita effetti anti-proliferativi sia su cellule LNCaP androgeno-sensibili che in cellule DU145 androgeno-refrattarie agendo:

- sull'arresto del ciclo cellulare nella fase G0/G1 in modo dose-dipendente;
- aumentando i livelli di p53 nelle cellule LNCaP, ma non in DU145 (mutate in p53);
- inducendo l'inibitore della ciclina chinasi p21<sup>WAF1</sup> in entrambe i tipi di cellule LNCaP e DU145 [450].

L'EGCG può innescare l'apoptosi anche attraverso la modulazione delle CDK e degli inibitori delle **Ciclin-Chinasi Ciclina dipendenti (CKI)**. Il trattamento con EGCG ha rivelato:

- una significativa regolazione, dose e tempo dipendente, della espressione delle proteine p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, p16<sup>INK4a</sup> e p18<sup>INK4c</sup>;
- abbattimento dell'espressione proteica della ciclina D1, ciclina E, cdk2, cdk4 e cdk6 ma non della ciclina D2;
- aumento del legame della ciclina D1 verso p21<sup>WAF1</sup> e p27<sup>KIP1</sup>;
- diminuzione del legame della ciclina E verso cdk2 [451].

I mitocondri sono i regolatori centrali della via intrinseca dell'apoptosi, caratterizzata dal rilascio di pro-caspasi, citocromo-*c*, Apaf-1, di endonucleasi G e di IAP. In linee tumorali prostatiche LNCaP e DU145 l'EGCG promuove l'apoptosi, come evidenziato dalla frammentazione del DNA, rispettivamente alla dose di 87  $\mu\text{M}$  e 80 175  $\mu\text{M}$ .

Utilizzando sia le cellule LNCaP che DU145, una relazione lineare tra dose di EGCG e apoptosi è stata osservata mediante microscopia confocale e citometria a flusso, trovando, rispettivamente, una percentuale di apoptosi del 9-53% e del 14-58%. Una scissione catalitica dose-dipendente delle procaspasi-3, -8, -9 può essere osservata a 40 e 80  $\mu\text{M}$  dopo 24 ore [452].

Inoltre l'induzione di apoptosi, da parte dell'EGCG, nelle cellule LNCaP, può essere il risultato di:

- una stabilizzazione di p53 attraverso la fosforilazione di residui di serina critica mediata dalla p14<sup>ARF</sup>,
- la regolazione negativa dell'attività di NF- $\kappa\text{B}$ , che modifica il rapporto Bax/Bcl-2 innescando l'apoptosi [453].

L'ablazione, dipendente dal trattamento con polifenoli del tè verde in cellule tumorali della prostata, di p21 o Bax può abrogare l'apoptosi indotta p53. Nel loro insieme questi risultati suggeriscono che, indipendentemente dalla sensibilità agli androgeni e dall'attività di p53, i componenti polifenolici del tè verde diminuiscono *in vitro* la progressione del PCa.

**166**

***EGCG agisce come un agente sensibilizzante nelle cellule LNCaP resistenti all'apoptosi.*** Il ligando TRAIL/Apo2L, correlato al **Fattore di Necrosi Tumorale (TNF)**, è uno dei componenti della via apoptotica estrinseca, spesso attivata nelle cellule LNCaP androgeno-sensibili [454]. Recentemente, un effetto sinergico di EGCG (alla dose di 20  $\mu\text{M}$ ), quando usato in combinazione con TRAIL (100 ng/ml), ha evidenziato tre eventi:

- sovra-regolazione di Poli (ADP-ribosio) Polimerasi (PARP),
- clivaggio di proteine pro- ed anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2,
- modulazione dell'attività di TRAIL R1, dei domini di morte associati a Fas e delle proteine inibitrici FLICE,

con conseguente diminuzione dell'invasività e delle capacità migratorie delle cellule LNCaP [455]. Un'ulteriore valutazione dell'effetto combinato di EGCG e TRAIL, rivela una diminuita capacità invasiva e migratoria, resa possibile attraverso l'inibizione dell'attività di: VEGF, uPA, angiopoietina 1 e 2, MMP-2, -3, -9 e la sovra-regolazione di TIMP-1.

**167** *EGCG e i percorsi p38/JNK/ERK e PI(3)K/Akt.* Le MAPKs sono serina-treonina chinasi che, in diverse linee di cellule cancerose, appaiono coinvolte nella regolazione della proliferazione e della morte cellulare. Sono noti sei distinti gruppi di MAPKs che includono: ERK1 e ERK2, JNKs, l'isoforma p38 MAPK, ERK5, ERK3/4 e ERK7/8.

PI(3)K/AKT svolge un ruolo importante in una varietà di vie di segnalazione che possono regolare la crescita, la sopravvivenza e la motilità delle cellule e i polifenoli del tè verde sembra riducano l'espressione di PI(3)K e Akt in cellule LNCaP e DU145 [456].

### EGCG e la modulazione di altri segnali cellulari.

**168** *Effetti pro- e anti-ossidanti ed il metabolismo degli acidi grassi.*

Come accade nelle cellule DU145, il trattamento con i polifenoli del tè verde o EGCG puro, può provocare un aumento della formazione di specie reattive dell'ossigeno e la depolarizzazione mitocondriale. Inoltre, l'esposizione ad EGCG di linee di cellule refrattarie agli androgeni DU145 e PC-3 ha dimostrato di inibire *in vitro*, in modo specifico, l'attività del proteasoma con conseguente accumulo di due dei suoi substrati naturali, p27/Kip1 e I $\kappa$ B- $\alpha$  (un inibitore del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B) cui farebbe seguito un arresto della crescita nella fase G1 del ciclo cellulare [457].

I polifenoli del tè verde sembrano mimare gli inibitori chimici della **Sintasi di Acidi Grassi (FAS)** durante l'inibizione della crescita e l'induzione di apoptosi in diverse linee cellulari tumorali *in vitro* e in xenotrapianti tumorali *in vivo*. L'EGCG inibisce ad alti livelli l'attività di FAS nelle cellule LNCaP in un modo dipendente dalla dose e questo si accompagna ad una concomitante diminuzione della sintesi endogena dei lipidi, in modo più efficiente rispetto all'attività degli inibitori sintetici noti di FAS [458].

**169** *EGCG e suoi bersagli molecolari delle vie infiammatorie (NF- $\kappa$ B e COX-2).* EGCG diminuisce *in vitro* l'attività di legame al DNA di NF- $\kappa$ B riducendo così l'espressione della subunità p65 di NF- $\kappa$ B nelle cellule LNCaP.

Invece, la cicloossigenasi-2 (COX-2), l'isoforma inducibile degli enzimi che convertono l'acido arachidonico a prostaglandine pro-infiammatorie, risulta

essere sovra-regolato nei PIN, ma non nel cancro alla prostata conclamato, nonostante favorisca la progressione del cancro [459].

L'EGCG è in grado di inibire la COX-2 senza influenzare l'espressione della COX-1 sia a livello di mRNA che di proteine, in cellule LNCaP androgeno-sensibili così come nelle PC-3 androgeno-refrattarie, questo avviene sia in modelli *in vitro* che *in vivo* [460]. Un effetto sinergico è stato osservato sull'inibizione della crescita delle cellule tumorali (sia *in vitro* che *in vivo*), quando viene utilizzata una combinazione tra EGCG ed inibitori della COX-2 [461].

**170** *EGCG, il recettore degli androgeni e il PSA.* Il recettore degli androgeni AR, è un recettore nucleare che viene attivato dal legame di ormoni (come testosterone e 5 $\alpha$ -diidrottestosterone). Si trova nel citoplasma dove è complessato a proteine heat-shock per renderlo inattivo fino a quando un ligando, come il 5 $\alpha$ -diidrottestosterone scalza l'inibitore e prende il suo posto. Il recettore degli androgeni può così traslocare nel nucleo, dove dimerizza e agisce come un fattore di trascrizione per una moltitudine di geni diversi, tra i quali quello che codifica il PSA.

Sia l'EGCG che miscele di catechine del tè verde riducono la trascrizione genica e l'espressione proteica di AR nella linea di cellule LNCaP androgeno-dipendenti alle concentrazioni di 10-20  $\mu$ M. A supporto di queste osservazioni è stata somministrata una soluzione, in acqua potabile, di polifenoli del tè verde (allo 0,1%) a topi nudi atimici impiantati con cellule CWR22Rv1 che ha determinato non solo una riduzione del volume del tumore ma anche dei livelli sierici di PSA, rispetto i controlli non supplementati [462].

Un'attenta interpretazione degli effetti dei polifenoli del tè, ha permesso di identificare molteplici azioni all'interno di differenti regioni anatomiche della prostata. L'EGCG allo 0,6% disciolto in acqua potabile e sostituito all'acqua per 12 settimane è stato in grado, in topi TRAMP, di ridurre l'espressione delle proteine AR nella zona ventrale della prostata (VP) del 41% e di ben il 121% nella regione dorso laterale (DLP) rispetto ai controlli [463].

Un altro obiettivo importante rispetto alla tumorigenesi delle cellule prostatiche è l'attività della 5 $\alpha$ -reduttasi, responsabile per la conversione del testosterone in diidrottestosterone (DHT). Esistono due isoenzimi della 5 $\alpha$ -reduttasi (di tipo 1 e di tipo 2), codificati da geni distinti e con distinte proprietà biochimiche e farmacologiche, dei quali, soprattutto quello di tipo 2, si esprime ad alti livelli nel tessuto della prostata rispetto ad altri sedi, dove prevale il tipo 1 [464]. Sia il testosterone che il DHT sono ligandi per il recettore degli androgeni, tuttavia, DHT ha un'affinità 4-5 volte superiore rispetto al testosterone. Studi condotti sull'attività strutturale di catechine del tè verde hanno suggerito come il gruppo gallil- o galloil- possa interagire con un sito specifico della 5 $\alpha$ -reduttasi [465, 466] competendo per il legame dei ligandi classici e giustificando la riduzione di attività dell'isoenzima di tipo 1. In alcuni studi condotti *in vivo* con i costituenti del tè verde si è

dimostrata una significativa riduzione delle dimensioni del tumore e la completa regressione sia per cellule LNCaP-104R (con repressione dell'attività androgenica), sia in PC-3 androgeno-refrattarie, dopo xenotrapianto in topi nudi atimici.

**171** *EGCG e gli enzimi di disintossicazione.* Gli xenobiotici, che includono farmaci, veleni e sostanze cancerogene, vengono eliminati principalmente attraverso percorsi metabolici che comprendono una fase I di biotrasformazione ed una fase II di coniugazione. La famiglia del citocromo P450 mono-ossigenasi (comprendente CYP1, CYP2, e CYP3) è responsabile della fase I del metabolismo favorendo l'ossidazione, l'idrossilazione, la riduzione e l'idrolisi degli xenobiotici.

Le reazioni della fase II coniugano i metaboliti degli xenobiotici a gruppi idrofilici, attraverso l'attività della UDP-glucuronosiltransferasi (UGT), della Glutazione S-transferasi (GST), della sulfotransferasi e N-acetiltransferasi (NAT) per aumentare la loro solubilità in acqua, diminuire la solubilità lipidica e favorire l'eliminazione urinaria. La Glutazione S-transferasi si divide in

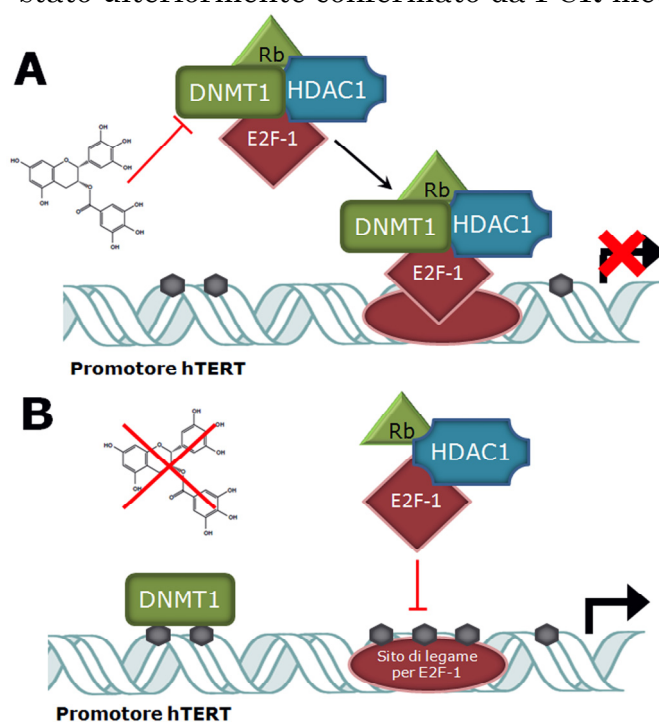
tre distinte classi,  $\alpha$ ,  $\mu$  e  $\pi$  espresse in tessuti epatici ed extra-epatici. GST- $\pi$  è l'isoenzima più abbondante, localizzato soprattutto nei linfociti del sangue e a livello del colon-retto e della prostata.

La catechine potrebbero operare un effetto aggiuntivo sull'inibizione dell'attività di GST- $\pi$ , poiché il silenziamento di GST- $\pi$  si verifica già nella gran parte delle neoplasie prostatiche intraepiteliali di alto grado (HG-PIN) e nel PCa a causa di una metilazione aberrante della regione promotore del gene [467].



**172** *EGCG e la demetilazione del DNA.* Recentemente si è focalizzata l'attenzione su un interessante meccanismo, attraverso il quale i polifenoli del tè verde possono contribuire alla chemioprevenzione del cancro alla prostata: si tratta dell'attivazione di geni silenziati epigeneticamente che si verifica durante la trasformazione dell'epitelio prostatico normale ad uno stadio neoplastico e la successiva progressione verso il tumore maligno. Questo effetto è attribuibile all'inibizione della DNMT1, il principale enzima coinvolto nella ipermetilazione delle isole CpG presenti nella regione del promotore all'interno degli esoni di diversi geni [468]; questa inibizione risulta fortemente migliorata dalla presenza di ioni  $Mg^{2+}$ . Studi di modellazione computazionale, indicano che il gruppo gallato dell'EGCG è coinvolto nella diretta interazione ad alta affinità, e di tipo inibitorio, con il sito catalitico della DNMT1 umana, con gli ioni  $Mg^{2+}$  che stabilizzando il legame [469].

Per capire se l'inibizione di DNMT1 si traducesse in una demetilazione effettiva del promotore di geni specifici nel carcinoma della prostata umana, utilizzando cellule LNCaP androgeno-responsive, sono stati sviluppati array di 82 sequenze di promotori di diversi geni che rappresentano una varietà di differenti funzioni biologiche. Il DNA isolato da cellule LNCaP esibisce una estesa ipermetilazione dei promotori in 14 geni e precisamente *CASP8*, *CD14*, *IL-4*, *IRF-7*, *Maspina*, *MYC L2*, *Nestina*, *NME2*, *PDGF-B*, *RPA2*, *Survivina*, *Tastina*, *TFF1* e *VHL*. Il trattamento delle cellule LNCaP con i polifenoli del tè verde alla concentrazione di 10 µg/ml per 14 giorni inverte, in un modo tempo-dipendente e in maniera significativa, lo stato ipermetilato del DNA nel promotore dei suddetti geni. L'aumento di promotori demetilati in cellule LNCaP dopo il trattamento con polifenoli è stato ulteriormente confermato da PCR metil-specifica (MS).



**Figura 4.13 Meccanismo proposto per il controllo delle alterazioni epigenetiche indotte da EGCG in cellule tumorali.**

In condizioni di crescita tumorale, la capacità di metilazione di DNMT1 non è inibita e questo consente la metilazione del promotore di hTERT (gene codificante per una subunità proteica catalitica, essenziale per il corretto funzionamento della telomerasi, espressa in circa il 90% di tutti i tumori), bloccando il legame del complesso repressore Rb/E2F-1/DNMT1/HDAC1. Tutto questo risulta in un promotore ipermetilato e acetilato con trascrizione attiva del gene. Il

trattamento con EGCG inibisce la capacità metilante di DNMT1 che porta all'ipometilazione del promotore hTERT, compresa la regione di legame a E2F-1. Questo consente il legame del complesso repressore Rb/E2F-1/HDAC1 con conseguente ipoacetilazione e trascrizione ridotta (*modificato da Berletch JB et al., 2008*).

I promotori dei geni identificati sono stati demetilati con 5-aza-2'-deossicitidina, un inibitore specifico della DNA metiltransferasi e le cellule LNCaP trattate con dosi fisiologiche non tossiche (1-10 µg/ml) di polifenoli del tè verde per 1, 3, 7 e 14 giorni. Questo ha comportato l'inibizione dell'espressione di DNMT1 sia a livello di mRNA che di proteine, risultato che correla ad una effettiva diminuzione di promotori genici ipermetilati [470]. I polifenoli del tè verde mostrano dunque la capacità di ridurre l'ipermetilazione dei promotori di geni suscettibili, inibendo l'espressione

DNMT1 e sostenendo la loro potenziale utilità nella prevenzione del cancro alla prostata.

### EGCG e Studi condotti su modelli animali.

**173** Riguardo gli effetti benefici dei polifenoli del tè verde nel carcinoma della prostata, studi condotti su ratti maschi Sprague Dawley, hanno dimostrato che i costituenti EGCG ed ECG dei polifenoli del tè verde, ma non EC ed EGC, sono potenti inibitori di tipo 1 della 5 $\alpha$ -reduttasi, con conseguente inibizione dello sviluppo della prostata, indicando che i polifenoli del tè verde sono in grado di modificare l'attività degli androgeni a livello prostatico (Box 4.4).

In topi SCID, inoculati intraprostaticamente con cellule LNCaP androgeno-responsive, la somministrazione di polifenoli del tè ha

comportato una significativa riduzione delle dimensioni del tumore [471].

È stato dimostrato come anche l'**Ornitina DeCarbossilasi (ODC)**, un enzima coinvolto nella biosintesi delle poliammine, è sovra-espresso in adenocarcinoma prostatico umano e nel liquido prostatico [472]. L'induzione di ODC, mediata da testosterone, appare inibita in ratti Cpb:WU e topi C57BL/6 [473]. Un altro studio ha dimostrato che cellule PC-3 impiantate in topi nudi atimici alimentati con dieta regolare integrata con lo 0,5% di una miscela di nutrienti contenete lisina, prolina, arginina, acido ascorbico e estratto di tè verde, inibisce la crescita tumorale. Studi istologici dei tumori hanno rivelato l'inibizione della secrezione della MMP-9 ed VEGF [474].

In generale, il trattamento con tutti i componenti estratti dalle foglie del tè portano ad una significativa inibizione nella crescita dei tumori della prostata impiantati in modelli animali, con riduzione dei livelli sierici di PSA e induzione del programma apoptotico accompagnato da un aumentata attività di Bax e una diminuzione dei livelli di proteine Bcl-2 e VEGF. Nel 1995, Greenberg e colleghi hanno creato un modello trasgenico murino di adenocarcinoma prostatico, i **topi TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate)** (Box 4.5) che si fonda su una riorganizzazione genomica per indirizzare l'espressione genica eterologa specifica nell'epitelio della prostata. In uno dei primi studi condotti su topi TRAMP nel 2001, Gupta e collaboratori riferirono come la somministrazione orale di polifenoli del tè verde da sola fosse sufficiente a inibire la carcinogenesi della prostata [475]. Topi TRAMP da 8 a 32 settimane di età ricevevano, come unica bevanda, lo 0,1% di infusione di una frazione polifenolica isolata dal tè verde, corrispondente al bere, per un individuo umano adulto, 6 tazze di tè verde al

**Box 4.4.** L'azione degli androgeni a livello prostatico dipende dalla conversione del testosterone, ad opera dell'enzima 5 $\alpha$ -reduttasi, in 5 $\alpha$ -diidrotestosterone (5 $\alpha$ -DHT). La 5 $\alpha$ -DHT si lega ai recettori degli androgeni per esercitare la sua azione cellulare. L'inibizione della 5 $\alpha$ -DHT limita i livelli di enzima disponibili per la prostata e necessari per la sua crescita e sviluppo, senza tuttavia influenzare i livelli di testosterone circolante, che possono poi essere utilizzati per le funzioni del testicolo dipendenti da testosterone, quali il comportamento sessuale e la crescita muscolare.

giorno. In due esperimenti separati, l'incidenza cumulativa di tumori palpabili in topi non trattati a 32 settimane è stata del 100% (20 su 20) con lo sviluppo di metastasi linfonodali (95%) e ai polmoni (65%), fegato (40%) e ossa (25%).

La somministrazione orale di polifenoli del tè verde provocava invece un notevole ritardo nell'incidenza e nello sviluppo della massa tumorale con:

- diminuzione del peso della prostata (64%) e dell'apparato genitourinario (72%);
- inibizione, nel siero, di IGF-1;
- il recupero di attività della IGF-BP3;
- la riduzione dei livelli di espressione dell'Antigene di Proliferazione Nucleare (PCNA) nelle cellule della prostata;

il tutto rispetto a topi di controllo.

Un'altra osservazione sorprendente di questo studio è stata come l'assunzione dei polifenoli portava ad un'inibizione quasi completa delle metastasi a distanza e l'induzione, nel sito del tumore primario, di apoptosi con diffusione ridotta delle cellule tumorali.

Studi sul meccanismo di azione dei polifenoli del tè verde nel modello TRAMP hanno mostrato una significativa inibizione nella trascrizione di geni coinvolti nell'angiogenesi e nelle metastasi, vale a dire VEGF e MMP-2 e MMP-9, chiarendo ulteriormente il ruolo polivalente dei polifenoli verso bersagli multipli [476].

Molteplici percorsi di segnalazione sono modulati dai polifenoli del tè verde nei topi TRAMP. È noto come livelli elevati di IGF-1 con concomitante abbassamento di IGF-BP3 siano associati ad aumentato rischio di progressione del cancro alla prostata. In effetti, l'aumento dei livelli di IGF-1, IP(3)K, Akt fosforilato (sulla treonina 308) ed ERK1-2, accompagnati ad un concomitante calo di IGFBP-3 nella zona dorso-laterale della prostata dei topi TRAMP, è stato osservato durante la progressione del cancro alla

**Box 4.5. I topi TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate)**

sono il modello transgenico murino di adenocarcinoma prostatico. In questo sistema, l'espressione degli antigeni T/t di SV40 (un virus oncogenico) si trova sotto il controllo del promotore della probasina di ratto e la sua attività è dipendente dal livello di androgeni circolanti. Gli antigeni virali causano l'abrogazione della funzione di p53 e pRb e l'inibizione dell'attività di PP2A (Proteina Fosfatasi 2A), causando la perdita di controllo del ciclo cellulare e, quindi, della proliferazione. Nei topi TRAMP lo sviluppo del cancro alla prostata è correlato all'età e mima l'intero spettro di progressione del carcinoma prostatico umano, dalla neoplasia intraepiteliale prostatica (PIN) alla malattia androgeno-indipendente.

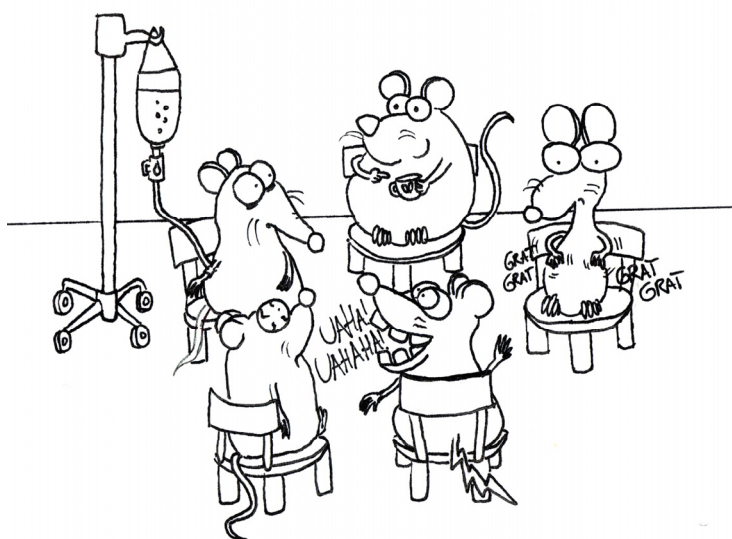
I topi trasgenici maschi sviluppano, a partire dalla 12<sup>a</sup> settimana e nel 100% dei casi, microscopiche lesioni tumorali (evidenti solo all'esame istologico) che evolvono nel carcinoma invasivo, prima ben differenziato e poi indifferenziato (con formazione di tumori palpabili) fino alle metastasi che si evidenziano nella maggior parte degli animali a partire dalla 24<sup>a</sup> settimana di vita [479, 480].



prostata [477]. La somministrazione orale di polifenoli del tè verde promuove una modulazione di IGF/IGFBP-3 associata con l'inibizione:

- dell'espressione di PI(3)K,
- di forme fosforilate di Akt (sulla treonina 308) e ERK1-2,
- di VEGF, urochinasi, attivatore del plasminogeno e delle MMP-2 e -9.

Caporali e collaboratori, riferiscono come, mentre il 100% dei topi TRAMP sviluppa cancro alla prostata, solo nel 20% di quelli alimentati con una soluzione acquosa di EGCG allo 0,3% compare la neoplasia [447]. Questo è stato attribuito all'accumulo di clusterina (CLU), una proteina ampiamente distribuita nei tessuti animali e coinvolta in molti processi diversi, tra cui apoptosi e trasformazione neoplastica. L'espressione di CLU è drammaticamente abbattuta con l'insorgenza e la progressione del cancro alla prostata e, nei topi TRAMP, trattati con EGCG in cui la progressione del tumore veniva inibita, si notava un progressivo accumulo nella ghiandola prostatica dell'mRNA e della proteina CLU. EGCG è inoltre in grado di abbattere, in questi topi, i livelli di mRNA dell'istone H3 e sovra-regolare il Gene-1 per l'Arresto Specifico della Crescita (GAS1). Valutando l'istopatologia di sezione di tessuto prostatico, marcatori dello stress ossidativo nel sangue e progressione dell'iperplasia è stato messo in evidenza come, l'efficacia dell' EGCG nel ridurre l'espansione e circoscrivere l'iperplasia, sia maggiormente elevata nel lobo ventrale [478].



Nel modello di topo TRAMP è stato osservato che la somministrazione di una miscela arricchita al 95% di **Estratto in polifenoli del Tè Verde (GTE)** comporti una riduzione dell'espressione di NF- $\kappa$ B e di proteine ad esso correlate (I $\kappa$ K $\alpha$ , I $\kappa$ K $\beta$ , RANK, NIK), rispetto ai topi di controllo [481]. Questi risultati sono significativi, poiché la sovra-espressione di NF- $\kappa$ B regola una varietà

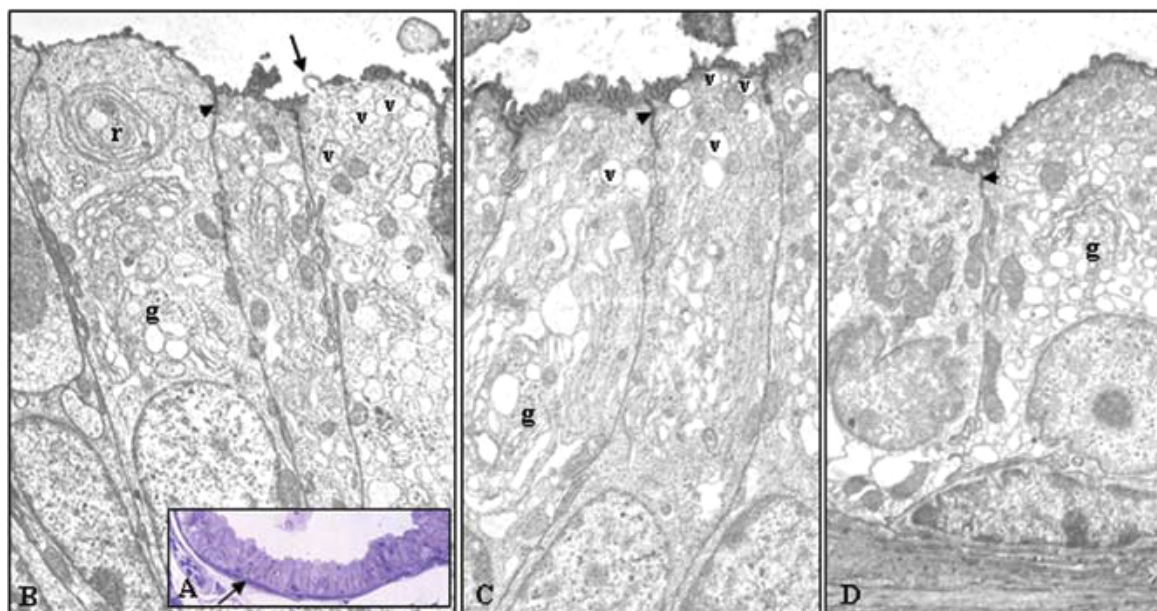
di proteine bersaglio tra le quali la COX-2. Proprio COX-2 risulta sovra-espresso nel PCa, forse come evento secondario alla sovra-espressione di NF- $\kappa$ B; in linee cellulari LNCaP e PC-3 trattate con EGCG (da 10 a 100  $\mu$ M) è stata dimostrata l'inibizione di COX-2 stimolata da mitogeni [482]. Studi *in vivo* nel modello TRAMP confermano che i polifenoli del tè verde riducono l'espressione di COX-2 (24%) così come dei NOS (77%) probabilmente attraverso la regolazione dei fattori di trascrizione come NF- $\kappa$ B. La quasi totalità degli studi condotti su linee cellulari di PCa con EGCG non mostra la comparsa di eventi di morte differenti da quelli apoptotici o apoptosi-



simile. In modelli animali invece, uno studio condotto dal nostro gruppo evidenzia come, la somministrazione cronica di GTE in topi TRAMP risulti nel collasso dell'ER e dell'apparato del Golgi in cellule epiteliali della prostata. 42 topi TRAMP sono stati divisi in quattro gruppi sperimentali: i gruppi II e IV, ricevevano GTE in acqua di rubinetto (0,3 g/100 ml di soluzione) a partire dall'8<sup>a</sup> settimana di età e fino al momento del sacrificio.

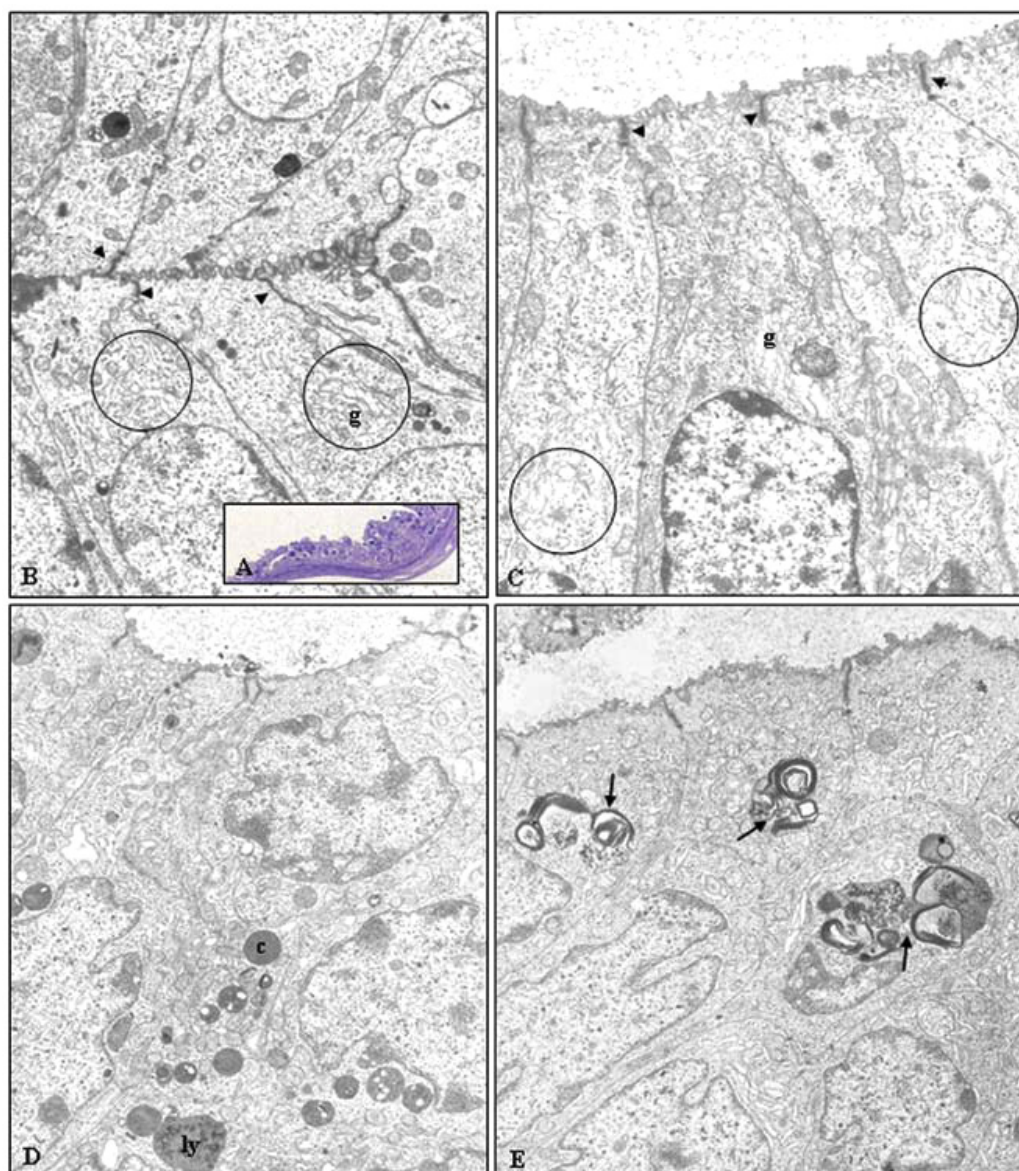
**Box 4.6.** Le linee cellulari TRAMP-C2 sono state ottenute da un tumore primario della prostata di un topo TRAMP di 32 settimane. Né le cellule in coltura, né i tumori derivanti dalle cellule in vivo, esprimono l'antigene T del virus SV40. Questa linea cellulare rappresenta una delle varie fasi di trasformazione tumorale prostatica verso la progressione a malattia androgeno-indipendente e si propone come buon modello di studio.

Ai Gruppi I e IIIa partire dalla settesima età dei precedenti, è stata somministrata acqua come unica bevanda. Gli animali sono stati sacrificati dopo 4 settimane (gruppi I e II) o 40 settimane di trattamento (gruppi II e IV). Il GTE è stato utilizzato anche per il trattamento di cellule TRAMP-C2 (Box 4.6) (20 µg/ml per 7 giorni) allo scopo di verificare il profilo di espressione di CLU, una proteina coinvolta nella tumorigenesi prostatica, ampiamente modificata attraverso l'ER e l'apparato del Golgi prima di essere secreta. *In vivo*, abbiamo evidenziato come, la somministrazione cronica di GTE in topi TRAMP, risulti in un collasso dell'ER e dell'apparato del Golgi nelle cellule epiteliali della prostata (figura 4.13 e 4.14).



**Figura 4.13. Topi TRAMP alimentati con acqua per 12 settimane.** L'epitelio cubico dorso-laterale dei lobi prostatici (A, colorazione con blu di toluidina, ingrandimento 60X), presenta piccoli pieghe corrispondenti alle lesioni PIN. Numerosi granuli secretori elettrondensi e un ben sviluppato apparato del Golgi, composto da gruppi curvilinei di cisterne (g), vengono rilevati nel citoplasma delle cellule da analisi al Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM) (B, C e D ingrandimento 5670X, 6750X e 4670X, rispettivamente). Molti piccoli granuli

secretori dal contenuto elettron-denso (v) appaiono uniformemente distribuiti all'interno del citoplasma e alcuni aderiscono e si fondono alla membrana plasmatica luminale (B, freccia). La maggior parte dell'ER (r) è allargata e, di tanto in tanto, mostra una disposizione concentrica. Analisi istologiche e ultrastrutturali indicano che tali cellule sono caratterizzate da una marcata attività secretoria. *Vacuoli e granuli secretori (v); vacuoli esocitotici (→); giunzioni gap (▶).*



**Figura 4.14. Topi TRAMP di 48 settimane di età trattati con GTE** (pagina seguente). La maggior parte delle cellule acinose secretorie sono caratterizzate da un epitelio cubico compresso che, di tanto in tanto, forma pieghe e sporge (A, colorazione con blu di toluidina, ingrandimento 220X). A livello ultrastrutturale il citoplasma, caratterizzato da una matrice di struttura a densità media, presenta sia l'ER che l'apparato del Golgi fortemente ridotti in volume. Soprattutto nella zona

sopranucleare, l'ER è costituito da scarsi tubuli appiattiti, fiancheggiati dai ribosomi. L'apparato del Golgi (g, cerchi) consiste in cluster di piccole cisterne e in poche vescicole secretorie (B e C, 11250X, 9000X rispettivamente). È interessante notare la presenza di molti lisosomi (Ly), fagolisosomi, fagosomi (D) e grandi masse costituite da materiale eterogeneo elettrondenso (E, frecce). La membrana plasmatica dell'epitelio secretorio mostra anche cospicue interdigitazioni laterali con le cellule adiacenti. Desmosomi e complessi giunzionali specializzati sono presenti nel citoplasma apicale (D ed E, 4560X). *Desmosomi, giunzioni strette e gap* (►).

Coerentemente, *in vitro*, in cellule TRAMP-C2, la forma matura di CLU e la sua modificazione nell'isoforma sCLU è fortemente ridotta dal trattamento con GTE. Tenendo conto della dipendenza, per la biogenesi di sCLU, dell'integrità dell'ER e dell'apparato del Golgi e del potenziale ruolo anti-apoptotico svolto dalla proteina in quella forma, abbiamo ipotizzato la possibilità che il trattamento con GTE contrasti la progressione del PCa interferendo con la biogenesi di sCLU, attraverso una disorganizzazione degli organelli cellulari [483].

### EGCG e Studi clinici condotti su esseri umani.

**174** *Studio n°1:* Uno studio clinico di fase II multi-istituzionale aperto e a singolo braccio, ha valutato l'effetto della polvere di tè verde in 42 pazienti con carcinoma prostatico ormone-refrattario valutato dopo biopsia [484]. La polvere, costituita da foglie di tè macinate e mescolate con zucchero, acido citrico e aromatizzanti è stata somministrata, nella quantità di 1 grammo in acqua calda o fredda, sei volte al giorno. Tra i 42 pazienti eleggibili uno solo ha avuto una diminuzione del 50% del PSA, sebbene questo effetto non sia stato sostenuto oltre i 2 mesi. Ciò suggerisce in generale un tasso di risposta del 2%, inferiore a quanto ci si aspettava che accadesse per un singolo caso. Inoltre, lo studio riportava poca o nessuna attività terapeutica. I risultati apparivano tuttavia inficiati da più variabili quali:

- contesto della popolazione oggetto di studio (PCa avanzato, già reduce da più terapie precedenti),
- progettazione dello studio (studio aperto, non progettato per rilevare piccoli effetti),
- la formulazione utilizzata (un prodotto unico, con nessuna informazione sulla concentrazione di polifenoli del tè verde).

**175** *Studio n°2:* Un secondo studio clinico aperto a singolo braccio ha valutato l'effetto di un estratto standardizzato di tè verde in 19 pazienti a cui era stato diagnosticato cancro alla prostata ormone-refrattario [485]. La mediana dell'età dei pazienti in questo studio era di 76 anni con una mediana del PSA pari a 161 ng/ml. Ai pazienti sono state somministrate capsule di estratto di tè verde (Sabina Corp, Piscataway, NJ) alla dose di 250 mg due volte al giorno. Ogni capsula conteneva il 75% polifenoli, di cui oltre il 30% era EGCG mentre il contenuto in caffeina inferiore al 2%.

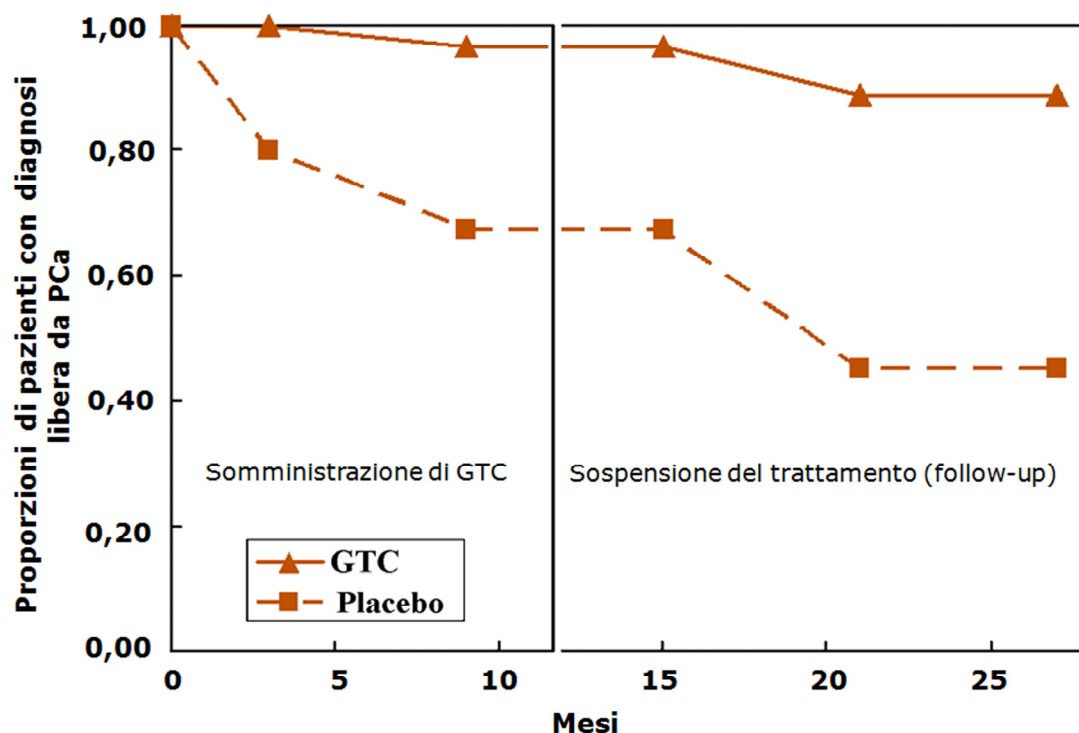
Quindici pazienti sono riusciti a completare il minimo previsto di terapia (di due mesi), nove pazienti avevano sviluppato una malattia progressiva entro 2 mesi dall'inizio della terapia e sei pazienti hanno sviluppato una malattia progressiva dopo ulteriori 1 o 4 mesi di terapia. Uno dei problemi legati alla progettazione di questo studio è stato il basso dosaggio di GTE. La dose di 500 mg/die (circa 150 mg di EGCG) era significativamente inferiore a quella utilizzata negli studi di farmacocinetica con il Polyphenon-E® (400-1200 mg di EGCG sul totale) che rappresenta una discrepanza, nel dosaggio variabile, da 2,6-8 volte in meno di EGCG quotidiano. Ci sono stati alcuni possibili indizi di attività biologica in 6 dei 19 pazienti per un breve periodo, con stabilizzazione dei loro PSA, indipendentemente dal dosaggio più basso di EGCG. Anche questo studio ha esaminato pazienti con malattia avanzata, sottoposti a trattamenti preventivi e impiegato una formulazione non facilmente replicabile. Tuttavia, è stato possibile ricavare alcune preziose informazioni sul tè verde e il suo uso in stadi tardivi del carcinoma prostatico, suggerendo come i pazienti con refrattarietà ormonale del PCa non rappresentino una popolazione ideale per gli studi clinici.

**176**

*Studio n°3.* Nel 2006 uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo su 60 pazienti è stato effettuato per valutare la sicurezza e l'efficacia di una miscela estratta dalle foglie di tè nella chemioprevenzione del PCa in volontari con HG-PIN [486]. I pazienti sono stati randomizzati in due bracci, uno dei quali riceveva il placebo e l'altro 600 mg al giorno di catechine (cioè tre capsule da 200 mg) con ogni capsula contenente EGC (5,5%), EC (12,2%), EGCG (51,9%), ECG (6,1%) e caffeina (<1%). I soggetti erano pazienti con recente diagnosi di HG-PIN che, sulla base di studi storici, hanno una probabilità del 30% di sviluppare PCa ad un anno dalla diagnosi. Come atteso 9 su 30 pazienti (cioè il 30%) trattati con placebo ha sviluppato PCa dopo un anno, mentre solo 1 paziente (3%) trattato con le catechine ha sviluppato PCa. Il PSA totale non era notevolmente differente tra i due bracci, tuttavia, i pazienti trattati con le capsule di catechine mostravano valori inferiori, rispetto ai pazienti trattati con placebo, suggerendo che il PSA non possa essere un marcatore biologico ideale per l'attività chemiopreventiva del tè verde.

La differenza più significativa tra questo studio e le sperimentazioni cliniche precedenti è stata che i pazienti arruolati avevano una lesione precancerosa rispetto al carcinoma della prostata metastatico.

Due anni di follow-up sono stati portati a termine in un sottogruppo di partecipanti scoprendo come l'effetto chemiopreventivo delle catechine ancora durava [487]. Questo è stato il primo studio che ha mostrato come i polifenoli del tè verde siano agenti di chemioprevenzione del cancro alla prostata sicuri ed efficaci per il trattamento di lesioni pre-maligne, prima della loro acquisizione di un fenotipo metastatico (figura 4.15).



**Figura 4.15** L'analisi di Kaplan-Meier mostra l'incidenza relativa di sviluppo di PCa sia durante la somministrazione di Catechine estratte dal Tè Verde (GTC) nell'arco di 12 mesi a pazienti con HI-PIN, nonché 2 anni più tardi, dopo la sospensione della somministrazione (studio di follow-up).

**177** *Studio n°4.* Uno studio clinico di fase II, aperto, a singolo braccio composto da due distinti fasi per valutare gli effetti di una miscela standardizzata di polifenoli del tè verde durante l'intervallo tra la biopsia della prostata e la prostatectomia radicale, è stato recentemente completato [488]. L'integrazione a breve termine è stata eseguita con Polyphenon E® (800 mg di (-)-epigallocatechina-3-gallato (EGCG) per dose) e quantità inferiori di (-)-epicatechina, (-)-epigallocatechina ed (-)-epicatechina-3-gallato (per un totale di 1,3 g di polifenoli del tè), fino al momento della prostatectomia radicale (cioè con una mediana del periodo di somministrazione pari a 34,5 giorni). Diversi biomarcatori sono stati valutati durante la sperimentazione clinica come HGF, VEGF, PSA, IGF-1, IGF-BP3 e il rapporto IGF-1/IGF-BP3. Una diminuzione significativa è stata osservata nei livelli di siero di HGF, VEGF, PSA, IGF-I e IGF-BP3 (tutti con  $p < 0,03$  misurata attraverso il test di Wilcoxon). Anche il rapporto IGF-I/IGF-BP3 cambiava in modo significativo. Inoltre, nonostante le alte dosi di EGCG utilizzate, potenzialmente tossiche, nessun alterato effetto della funzionalità epatica è stato riscontrato (albumina, bilirubina, bilirubina coniugata, alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi, fosfatasi

alcalina,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasi, amilasi e lipasi rientravano nella norma).

Occorre sottolineare come l'effetto del Polyphenon E<sup>®</sup> sui livelli sierici di PSA sia stato modesto, tuttavia, questo dato deve essere interpretato con cautela. Infatti, una varietà di parametri fisiologici estranei alla progressione del cancro possono alterare i livelli sierici di PSA. Inoltre, il PSA, può non riflettere in modo accurato i mutamenti nel numero di cellule cancerose o riguardo le dimensioni del tumore. Questi dati sostengono comunque un ruolo potenziale per miscele standardizzate di polifenoli del tè verde nell'inibizione della segnalazione cellulare che contribuisce alla progressione del PCa e, dunque, ad un potente effetto chemio preventivo.

### Riassunto.

**178** *Nel corso degli ultimi 15 anni un aumento del numero di studi epidemiologici, pre-clinici e clinici è stato effettuato per valutare il ruolo del tè verde nella prevenzione e/o il trattamento del cancro alla prostata. L'EGCG, il costituente principale del tè verde, svolge un ruolo importante nelle cellule in coltura e modelli animali, regolando i percorsi pro-infiammatori, le vie di segnalazione mediate da MAPK e i fattori di crescita, come pure gli effetti degli androgeni. Nei modelli animali, che includono modelli tumorali di xenotrapianto così come animali transgenici, i polifenoli del tè verde possono ridurre il potenziale oncogenico di cellule tumorali prostatiche. Le prime indagini cliniche su soggetti umani hanno dimostrato come l'utilizzo di miscele standardizzate di polifenoli del tè verde siano sicure e tollerabili. Un incoraggiante studio prospettico, in doppio cieco, controllato con placebo nell'arco di 12 mesi, utilizzando una miscela di polifenoli del tè somministrata in forma di capsule a soggetti maschili con HG-PIN, ha permesso di osservare una riduzione del 90% nello sviluppo di PCa. I risultati di questa sperimentazione hanno dato inizio ad uno studio clinico negli Stati Uniti, con circa 300 pazienti affetti da HG-PIN, che ha avuto inizio nel 2007 e valuterà il ruolo della somministrazione di 200 mg di EGCG due volte al giorno (cioè 400 mg/die di EGCG sottoforma di Polyphenon E<sup>®</sup>) per un periodo di un anno con un endpoint primario identificato come la progressione della HG-PIN in PCa. Gli studi clinici condotti con miscele standardizzate di tè verde sono in massima parte concentrati sui soggetti umani con lesioni precancerose (cioè HG-PIN) o con PCa in fase avanzata refrattario agli androgeni: ciò rende significativo il divario nelle conoscenze disponibili riguardo i pazienti con PCa in situ. Nonostante ciò, i paziente con HG-PIN rappresentano una popolazione ideale dato che sono sottoposti a vigile attesa senza interventi farmaceutici, valutando il PSA come biomarcatore di routine.*

*Inoltre, quello che è diventato evidente nel corso del tempo, è la necessità di utilizzare miscele standardizzate di polifenoli del tè verde, al contrario di semplici infusi per i quali non vi è alcuna garanzia circa la composizione. È imperativo che ogni studio futuro volto a valutare l'effetto di qualunque*

*composto di origine vegetale dovrà utilizzare una miscela ben caratterizzata prima che gli studi vengano eseguiti.*

*In conclusione, le prove raccolte in questi decenni suggeriscono come i polifenoli del tè verde possono rappresentare un promettente agente per la chemioprevenzione del PCa in pazienti a rischio di sviluppo del PCa o con PCa ai primi stadi in fase di attuazione, sebbene, in quest'ultimo caso, siano utili ulteriori e più approfondite indagini.*

#### **BIBLIOGRAFIA dei paragrafi da 111 a 178**

- 278) Moore K, Dalley A.: **Clinically Oriented Anatomy**. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. 1999
- 279) Bonkoff H, Remberger K.: **Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem model cell**. *Prostate*. 1996 28(2): 98-106
- 280) Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, Yang A, Montironi R, McKeon F, Loda M.: **p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development**. *Am J Pathol*. 2000 Dec;157(6):1769-75.
- 281) Lalani EN, Stubbs A, Stamp GW.: **Prostate cancer; the interface between pathology and basic scientific research**. *Semin Cancer Biol*. 1997 Feb;8(1):53-9. Review.
- 282) Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA.: **Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development**. *Acta Anat (Basel)*. 1996;155(1):63-72. Review
- 283) Chung LW, Davies R.: **Prostate epithelial differentiation is dictated by its surrounding stroma**. *Mol Biol Rep*. 1996;23(1):13-9.
- 284) McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA.: **Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread**. *Am J Surg Pathol*. 1988 Dec;12(12):897-906.
- 285) Silverberg E.: **Statistical and Epidemiological data on urological cancer**. *Cancer*. 1987 60(3): 692-717
- 286) Carter HB, Pearson JD.: **Prostate-specific antigen velocity and repeated measures of prostate-specific antigen**. *Urol Clin North Am*. 1997 May;24(2):333-8.
- 287) Gleason DF.: **Classification of prostatic carcinomas**. *Cancer Chemother Rep*. 1966 Mar;50(3):125-8.
- 288) MacLennan GT, Eisenberg R, Fleshman RL, Taylor JM, Fu P, Resnick MI, Gupta S.: **The influence of chronic inflammation in prostatic carcinogenesis: a 5-year followup study**. *J Urol*. 2006 Sep;176(3):1012-6.
- 289) Gleason DF.: **Histologic grading of prostate cancer: a perspective**. *Hum Pathol*. 1992 Mar;23(3):273-9. Review.
- 290) Houston B, Chisholm GD, Habib FK.: **Evidence that human prostatic 5 alpha-reductase is located exclusively in the nucleus**. *FEBS Lett*. 1985 Jun 17;185(2):231-5.
- 291) Coffey DS, Isaacs JT.: **Prostate tumor biology and cell kinetics-theory**. *Urology*. 1981 Mar;17(Suppl 3):40-53.
- 292) Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN.: **A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region**. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):274-7.
- 293) Martelli AM, Tazzari PL, Evangelisti C, Chiarini F, Blalock WL, Billi AM, Manzoli L, McCubrey JA, Cocco L. **Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous**

- leukemia therapy: from bench to bedside.** *Curr Med Chem.* 2007;14(19):2009-23. Review.
- 294) Du K, Montminy M.: **CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB.** *J Biol Chem.* 1998;273:32377-9.
- 295) Brennan P, Babbage JW, Burgering BM, Groner B, Reif K, Cantrell DA.: **Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F.** *Immunity.* 1997;7:679-89.
- 296) McClellan KA, Slack RS.: **Specific in vivo roles for E2Fs in differentiation and development.** *Cell Cycle.* 2007;6:2917-27.
- 297) Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC.: **Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.** *Science.* 1998;282:1318-21.
- 298) del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G.: **Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt.** *Science.* 1997;278:687-9.
- 299) Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA.: **Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.** *Nature.* 1995;378:785-9.
- 300) Pesche S, Latil A, Muzeau F, Cussenot O, Fournier G, Longy M, Eng C, Lidereau R.: **PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers.** *Oncogene.* 1998;16:2879-83.
- 301) Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, Bedolla RG, Troyer DA, Kreisberg S, Ghosh PM.: **Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer.** *Cancer Res.* 2004;64:5232-6.
- 302) Borriello A, Cucciolla V, Oliva A, Zappia V, Della Ragione F.: **p27<sup>Kip1</sup> metabolism: a fascinating labyrinth.** *Cell Cycle.* 2007;6:1053-61.
- 303) Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ.: **Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1.** *Curr Biol.* 2000;10:1201-4.
- 304) Gingras AC, Raught B, Sonenberg N.: **mTOR signaling to translation.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004;279:169-97.
- 305) Galmozzi E, Casalini P, Iorio MV, Casati B, Olgiati C, Menard S.: **HER2 signaling enhances 5'UTR-mediated translation of c-Myc mRNA.** *J Cell Physiol.* 2004;200:82-8.
- 306) Klein EA, Yang C, Kazanietz MG, Assoian RK.: **NF-κB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac.** *Cell Cycle.* 2007;11:15-21.
- 307) Chung J, Bachelder RE, Lipscomb EA, Shaw LM, Mercurio AM.: **Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells.** *J Cell Biol.* 2002;158:165-74.
- 308) Dunsmuir WD, Gillett CE, Meyer LC, Young MP, Corbishley C, Eeles RA, Kirby RS.: **Molecular markers for predicting prostate cancer stage and survival.** *BJU Int.* 2000;86:869-78.
- 309) Pimienta G, Pascual J.: **Canonical and alternative MAPK signaling.** *Cell Cycle.* 2007;6:2628-32.
- 310) Peehl DM.: **Oncogenes in prostate cancer.** *An update. Cancer.* 1993;71:1159-64.
- 311) Buday L, Downward J.: **Epidermal growth factor regulates p21<sup>ras</sup> through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor.** *Cell.* 1993;73:611-20.
- 312) Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A.: **Complexes of Ras. GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase.** *Science.* 1993;260:1658-61.
- 313) O'Neill E, Kolch W.: **Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway.** *Br J Cancer.* 2004;90:283-8.
- 314) Zheng CF, Guan KL.: **Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues.** *Embo J.* 1994;13:1123-31.
- 315) Morrison DK.: **KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway?** *J Cell Sci.* 2001;114:1609-12.
- 316) Fu Z, Kitagawa Y, Shen R, Shah R, Mehra R, Rhodes D, Keller PJ, Mizokami A, Dunn R, Chinnaiyan AM, Yao Z, Keller ET.: **Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer.** *Prostate.* 2006;66:248-56



- 317) Shapiro PS, Whalen AM, Tolwinski NS, Wilsbacher J, Froelich-Ammon SJ, Garcia M, Osheroff N, Ahn NG.: **Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase IIalpha through a mechanism independent of phosphorylation.** *Mol Cell Biol.* 1999;19:3551-60.
- 318) Xiao D, Singh SV.: **Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in p53-deficient PC-3 human prostate cancer cell line is mediated by extracellular signal-regulated kinases.** *Cancer Res.* 2002;62:3615-9.
- 319) Paweletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Petricoin IE, Liotta LA.: **Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front.** *Oncogene.* 2001;20:1981-9.
- 320) Lee JT, Lehmann BD, Terrian DM, Chappell WH, Stivala F, Libra M, Martelli AM, Steelman LS, McCubrey JA: **Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways.** *Cell Cycle.* 2008 Jun 15;7(12):1745-62.
- 321) Phillips SM, Barton CM, Lee SJ, Morton DG, Wallace DM, Lemoine NR, Neoptolemos JP.: **Loss of the retinoblastoma susceptibility gene (RB1) is a frequent and early event in prostatic tumorigenesis.** *Br J Cancer.* 1994;70:1252-7.
- 322) Konishi N, Nakamura M, Kishi M, Nishimine M, Ishida E, Shimada K.: **Heterogeneous methylation and deletion patterns of the INK4a/ARF locus within prostate carcinomas.** *Am J Pathol.* 2002;160:1207-14.
- 323) Badal V, Menendez S, Coomber D, Lane DP.: **Regulation of the p14ARF promoter by DNA methylation.** *Cell Cycle.* 2008;7:112-9.
- 324) McKeon F, Melino G.: **Fog of war: the emerging p53 family.** *Cell Cycle.* 2007;6:229-3
- 325) Mazumder S, Plesca D, Almasan A.: **A Jekyll and hyde role of cyclin E in the genotoxic stress response: switching from cell cycle control to apoptosis regulation.** *Cell Cycle.* 2007;6:1437-42.
- 326) Loffler H, Bochtler T, Fritz B, Tews B, Ho AD, Lukas J, Bartek J, Kramer A.: **DNA damage-induced accumulation of centrosomal Chk1 contributes to its checkpoint function.** *Cell Cycle.* 2007;6:2541-8.
- 327) Gilkes DM, Chen J.: **Distinct roles of MDMX in the regulation of p53 response to ribosomal stress.** *Cell Cycle.* 2007;6:151-5.
- 328) Gu J, Kawai H, Nie L, Kitao H, Wiederschain D, Jochemsen AG, Parant J, Lozano G, Yuan ZM.: **Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53.** *J Biol Chem.* 2002;277:19251-4.
- 329) Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT.: **A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53.** *Genes Dev.* 1999;13:152-7.
- 330) Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, Masuyama Y, Gotoh Y.: **Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53.** *J Biol Chem.* 2002;277:21843-50.
- 331) Cao C, Subhawong T, Albert JM, Subhawong TK, Shinohara ET, Albert JM, Ling G, Cao C, Gi YJ, Lu B.: **Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells.** *Cancer Res.* 2006;66:10040-7.
- 332) Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM.: **DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis.** *Cell.* 2006;126:121-34.
- 333) Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T.: **Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo.** *Nature.* 2007;445:661-5.
- 334) Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP.: **Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis.** *Nature.* 2005;436:725-30.
- 335) Hill R, Song Y, Cardiff RD, Van Dyke T.: **Heterogeneous tumor evolution initiated by loss of pRb function in a preclinical prostate cancer model.** *Cancer Res.* 2005;65:10243-54.
- 336) McCarty MF.: **Targeting multiple signaling pathways as a strategy for managing prostate cancer: multifocal signal modulation therapy.** *Integr Cancer Ther.* 2004 Dec;3(4):349-80.

- 337) Kajiwarra T, Takeuchi T, Ueki T, Moriyama N, Ueki K, Kakizoe T, Kawabe K.: **Effect of Bcl-2 overexpression in human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*.** *Int J Urol.* 1999 Oct;6(10):520-5.
- 338) Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Huang X, Turner B, Bubendorf L, Kallioniemi OP, Shabaik A, Vitiello A, Peehl D, Gao GJ, Reed JC.: **Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer.** *Clin Cancer Res.* 2003 Oct 15;9(13):4914-25
- 339) McEleny KR, Watson RW, Fitzpatrick JM.: **Defining a role for the inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer.** *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2001;4(1):28-32.
- 340) Amantana A, London CA, Iversen PL, Devi GR.: **X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells.** *Mol Cancer Ther.* 2004 Jun;3(6):699-707.
- 341) Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD.: **Anoikis resistance and tumor metastasis.** *Cancer Lett.* 2008 Dec 18;272(2):177-85.
- 342) Behrens J.: **Control of beta-catenin signaling in tumor development.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;910:21-33.
- 343) Verras M, Sun Z.: **Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer.** *Cancer Letters* 2006;237:22-32.
- 344) Chesire DR, Ewing CM, Gage WR, Isaacs WB.: ***In vitro* evidence for complex modes of nuclear betacatenin signaling during prostate growth and tumorigenesis.** *Oncogene* 2002;21:2679-2694.
- 345) Yang L, Xie G, Fan Q, Xie J.: **Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications.** *Oncogene* 2010;29:469-481.
- 346) Medina V, Calvo MB, Díaz-Prado S, Espada J.: **Hedgehog signalling as a target in cancer stem cells.** *Clinical & Translational Oncology* 2009;11:199-207.
- 347) Antón Aparicio LM, Garcia CR, Cassinello EJ, Valladares AM, Reboredo LM, Diaz PS, Aparicio GG.: **Prostate cancer and Hedgehog signalling pathway.** *Clinical & Translational Oncology* 2007;9:420-
- 348) Zardawi SJ, O'Toole SA, Sutherland RL, Musgrove EA.: **Dysregulation of Hedgehog, Wnt and Notch signalling pathways in breast cancer.** *Histology and Histopathology* 2009;24:385-398.
- 349) Santagata S, Demichelis F, Riva A, Varambally S, Hofer MD, Kutok JL, Kim R, Tang J, Montie JE, Chinnaiyan AM, et al.: **JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence.** *Cancer Research* 2004;64:6854-6857.
- 350) Wang Z, Li Y, Banerjee S, Kong D, Ahmad A, Nogueira V, Hay N, Sarkar FH.: **Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF-kappaB signaling pathways.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2010;109:726-736.
- 351) Lee JT Jr, Steelman LS, McCubrey JA.: **Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells.** *Cancer Res.* 2004 Nov 15;64(22):8397-404.
- 352) Hanahan D, Weinberg RA.: **The hallmarks of cancer.** *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- 353) Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A.: **Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells.** *Cancer Res.* 1999 Aug 15;59(16):4148-54.
- 354) Thiery JP.: **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nat Rev Cancer.* 2002 Jun;2(6):442-54. Review.
- 355) Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D.: **Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?.** *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):5991-5; discussion 5995.
- 356) Cavallaro U, Christofori G.: **Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough.** *Biochim Biophys Acta.* 2001 Nov 30;1552(1):39-45. Review.
- 357) Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA.: **Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death.** *Genes Dev.* 2004 May 15;18(10):1131-43.

- 358) Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC.: **Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition.** *Nat Cell Biol.* 2004 Oct;6(10):931-40
- 359) Schlessinger K, Hall A.: **GSK-3beta sets Snail's pace.** *Nat Cell Biol.* 2004 Oct;6(10):913-5.
- 360) Haraguchi M, Okubo T, Miyashita Y, Miyamoto Y, Hayashi M, Crotti TN, McHugh KP, Ozawa M.: **Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins.** *J Biol Chem.* 2008 Aug 29;283(35):23514-23.
- 361) Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA.: **Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.** *Cell.* 2004 Jun 25;117(7):927-39.
- 362) Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T.: **NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression.** *J Clin Invest.* 2004 Aug;114(4):569-81.
- 363) Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE, Nakshatri H.: **NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4.** *J Biol Chem.* 2003 Jun 13;278(24):21631-
- 364) Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS Jr.: **Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38.** *J Biol Chem.* 2001 Jun 1;276(22):18934-40.
- 365) Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhau HE.: **Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment.** *J Urol.* 2005 Jan;173(1):10-20. Review.
- 366) Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR.: **Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model.** *Cancer Res.* 2002 Jun 1;62(11):3298-307.
- 367) Albrecht M, Renneberg H, Wennemuth G, Möscher O, Janssen M, Aumüller G, Konrad L.: **Fibronectin in human prostatic cells in vivo and in vitro: expression, distribution, and pathological significance.** *Histochem Cell Biol.* 1999 Jul;112(1):51-61.
- 368) Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR.: **Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling.** *Clin Cancer Res.* 2002 Sep;8(9):2912-23.
- 369) Jung K, Lein M, Ulbrich N, Rudolph B, Henke W, Schnorr D, Loening SA.: **Quantification of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in prostatic tissue: analytical aspects.** *Prostate.* 1998 Feb 1;34(2):130-6.
- 370) De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, Zhang HH, Fales H, Tosato G.: **Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity.** *Blood* 103 (7): 2452-9 (2004)
- 371) Oka N, Takenaka Y, Raz A.: **Galectins and urological cancer.** *J Cell Biochem.* 2004 Jan 1;91(1):118-24. Review.
- 372) Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR.: **Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation.** *J Biol Chem.* 2002 May 3;277(18):15819-27
- 373) Weeraratna AT, Arnold JT, George DJ, DeMarzo A, Isaacs JT.: **Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer.** *Prostate.* 2000 Oct 1;45(2):140-8.
- 374) Aoyama M, Asai K, Shishikura T, Kawamoto T, Miyachi T, Yokoi T, Togari H, Wada Y, Kato T, Nakagawara A.: **Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants.** *Cancer Lett.* 2001 Mar 10;164(1):51-60.
- 375) Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP.: **Role of caveolae and caveolins in health and disease.** *Physiol Rev.* 2004 Oct;84(4):1341-79. Review

- 376) Razani B, Lisanti MP.: **Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease.** *J Clin Invest.* 2001 Dec;108(11):1553-61. Review
- 377) Fong A, Garcia E, Gwynn L, Lisanti MP, Fazzari MJ, Li M.: **Expression of caveolin-1 and caveolin-2 in urothelial carcinoma of the urinary bladder correlates with tumor grade and squamous differentiation.** *Am J Clin Pathol.* 2003 Jul;120(1):93-100.
- 378) Goel HL, Breen M, Zhang J, Das I, Aznavoorian-Cheshire S, Greenberg NM, Elgavish A, Languino LR.:  **$\beta$ 1A integrin expression is required for type 1 insulin-like growth factor receptor mitogenic and transforming activities and localization to focal contacts.** *Cancer Res.* 2005 Aug 1;65(15):6692-700.
- 379) Yilmaz M, Christofori G.: **EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion.** *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jun;28(1-2):15-33.
- 380) Rosen K, Rak J, Leung T, Dean NM, Kerbel RS, Filmus J.: **Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells.** *J. Cell Biol* 2000;149:447-456.
- 381) Loza-Coll MA, Perera S, Shi W, Filmus J.: **A transient increase in the activity of Src-family kinases induced by cell detachment delays anoikis of intestinal epithelial cells.** *Oncogene* 2005;24:1727-1737.
- 382) Aoudjit F, Vuori K.: **Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for cflip and implications for anoikis.** *J. Cell Biol* 2001;152:633-643.
- 383) Mawji IA, Simpson CD, Gronda M, Williams MA, Hurren R, Henderson CJ, Datti A, Wrana JL, Schimmer AD.: **A chemical screen identifies anisomycin as an anoikis sensitizer that functions by decreasing FLIP protein synthesis.** *Cancer Res* 2007;67:8307-8315.
- 384) Goel HL, Languino LR.: **Integrin signaling in cancer.** *Cancer Treat. Res* 2004;119:15-31.
- 385) Goel HL, Li J, Kogan S, Languino LR.: **Integrins in prostate cancer progression.** *Endocr. Relat. Cancer* 2008;15:657-664.
- 386) Fizazi K.: **The role of Src in prostate cancer.** *Ann. Oncol* 2007;18:1765-1773
- 387) Giannoni E, Buricchi F, Grimaldi G, Parri M, Cialdai F, Taddei ML, Raugeri G, Ramponi G, Chiarugi P.: **Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival.** *Cell Death Differ* 2008;15:867-878
- 388) Giannoni E, Fiaschi T, Ramponi G, Chiarugi P.: **Redox regulation of anoikis resistance of metastatic prostate cancer cells: key role for Src and EGFR-mediated pro-survival signals.** *Oncogene* 2009;28:2074-2086
- 389) Edwards J, Krishna NS, Witton CJ, Bartlett JM.: **Gene amplifications associated with the development of hormone-resistant prostate cancer.** *Clin. Cancer Res* 2003;9:5271-5281
- 390) Wu C, Dedhar S.: **Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes.** *J. Cell. Biol* 2001;155:505-510.
- 391) Cieslik K, Zembowicz A, Wu JL, Tang KK.: **Transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by lysophosphatidylcholine.** *J. Biol. Chem* 1998;273:14885-14890
- 392) Fukuda T, Chen K, Shi X, Wu C.: **PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival.** *J. Biol. Chem* 2003;278:51324-51333.
- 393) Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S.: **Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK.** *Nat. Rev. Cancer* 2005;5:51-63
- 394) Graff JR, Deddens JA, Konicek BW, Colligan BM, Hurst BM, Carter HW, Carter JH.: **Integrin-linked kinase expression increases with prostate tumor grade.** *Clin. Cancer Res* 2001;7:1987-1991.
- 395) Zhu M, Kyprianou N.: **Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of Prostate Cancer Cells.** *The FASEB J.* 2009
- 396) Boccon-Gibod L, Hammerer P, Madersbacher S, Mottet N, Prayer-Galetti T, Tunn U.: **The role of intermittent androgen deprivation in prostate cancer.** *BJU Int* 2007;100:738-743

- 397) Rennebeck G, Martelli M, Kyprianou N.: **Anoikis and survival connections in the tumor microenvironment: is there a role in prostate cancer metastasis?** *Cancer Res* 2005;5:11230–11235.
- 398) Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TC, Zhou C, Zhang X, Chua CW, Chan KW, Chan FL, Glackin C, Wong YC, Wang X.: **Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target.** *Cancer Res.* 2005 Jun 15;65(12):5153-62.
- 399) Šošić D, Richardson JA, Yu K, Ornitz DM, Olson EN.: **Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity.** *Cell.* 2003 Jan 24;112(2):169-80.
- 400) Coffey RN, Watson RW, O'Neill AJ, Mc Eleny K, Fitzpatrick JM.: **Androgen-mediated resistance to apoptosis.** *Prostate* 2002;53:300–309
- 401) Kajiwara T, Takeuchi T, Ueki T, Moriyama N, Ueki K, Kakizoe T, Kawabe K.: **Effect of Bcl-2 overexpression in human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*.** *Int. J. Urol* 1999;6:520–525.
- 402) Wang X, Yin L, Rao P, Stein R, Harsch KM, Lee Z, Heston WD.: **Targeted treatment of prostate cancer.** *J. Cell. Biochem* 2007;102:571–579.
- 403) Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS.: **Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis.** *Nat. Cell Biol* 2003;5:733–740.
- 404) Sun SY, Hail N Jr, Lotan R.: **Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention.** *J Natl Cancer Inst.* 2004 May 5;96(9):662-72.
- 405) Califice S, Castronovo V, Bracke M, van den Brûle F.: **Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3.** *Oncogene.* 2004 Sep 30;23(45):7527-36.
- 406) Li L, Ren CH, Tahir SA, Ren C, Thompson TC.: **Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A.** *Mol Cell Biol.* 2003 Dec;23(24):9389-404.
- 407) Williams TM, Hassan GS, Li J, Cohen AW, Medina F, Frank PG, Pestell RG, Di Vizio D, Loda M, Lisanti MP.: **Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice.** *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):25134-45
- 408) Dionne CA, Camoratto AM, Jani JP, Emerson E, Neff N, Vaught JL, Murakata C, Djakiew D, Lamb J, Bova S, George D, Isaacs JT.: **Cell cycle-independent death of prostate adenocarcinoma is induced by the trk tyrosine kinase inhibitor CEP-751 (KT6587).** *Clin. Cancer Res* 1998;4:1887–1898.
- 409) DiGiovanni J, Kiguchi K, Frijhoff A, Wilker E, Bol DK, Beltrán L, Moats S, Ramirez A, Jorcano J, Conti C.: **Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3455-60.
- 410) Altieri DC.: **Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer.** *Oncogene.* 2003 Nov 24;22(53):8581-9. Review.
- 411) Yoneda T, Hiraga T.: **Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Mar 18;328(3):679-87. Review.
- 412) Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: **Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** *Nat Rev Cancer* 2002, 2:563-572.1).
- 413) Ding ZB, Shi YH, Zhou J, Qiu SJ, Xu Y, Dai Z, Shi GM, Wang XY, Ke AW, Wu B, Fan J.: **Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res.* 2008;68:9167–9175.
- 414) Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, Kinoshita T, Ueno T, Esumi H, Ochiai A.: **Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome.** *Cancer Sci.* 2008;99:1813–1819.
- 415) Pirtoli L, Cevenini G, Tini P, Vannini M, Oliveri G, Marsili S, Mourmouras V, Rubino G, Miracco C.: **The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas.** *Autophagy.* 2009;5:930–936.
- 416) Budanov AV, Karin M.: **p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling.** *Cell.* 2008;134:451–460
- 417) Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, Ogier-Denis E.: **The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the**

- phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem.* 2001;276:35243–35246.**
- 418) Pimkina J, Humbey O, Zilfou JT, Jarnik M, Murphy ME.: **ARF induces autophagy by virtue of interaction with Bcl-xl.** *J Biol Chem.* 2009;284:2803–2810.
- 419) Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, Lopez-Otin C.: **Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3.** *J Biol Chem* (2007) 282:18573–18583.
- 420) Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E.: **Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis.** *Cancer Cell.* 2006;10:51–64.
- 421) Bertout JA, Patel SA, Simon MC.: **The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer.** *Nat Rev Cancer.*2008;8:967–975.
- 422) Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM.: **Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains.** *Mol Cell Biol.* 2009;29:2570–2581.
- 423) Thorburn J, Horita H, Redzic J, Hansen K, Frankel AE, Thorburn A: **Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die.** *Cell Death Differ* 2008, 16:175-183.
- 424) Herrero-Martín G, Høyer-Hansen M, García-García C, Fumarola C, Farkas T, López-Rivas A, Jäättelä M.: **TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells.** *EMBO J.* 2009 Mar 18;28(6):677-85.
- 425) Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J: **Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival.** *Mol Biol Cell* 2008, 19:797-806.
- 426) Lock R, Debnath J.: **Extracellular matrix regulation of autophagy.** *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Oct;20(5):583-8.
- 427) Mori S, Chang JT, Andrechek ER, Matsumura N, Baba T, Yao G, Kim JW, Gatza M, Murphy S, Nevins JR.: **Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential.** *Oncogene.* 2009 Aug 6;28(31):2796-805
- 428) Aguirre-Ghiso JA.: **Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy.** *Nat Rev Cancer.* 2007 Nov;7(11):834-46. Review.
- 429) White DE, Kurpios NA, Zuo D, Hassell JA, Blaess S, Mueller U, Muller WJ: **Targeted disruption of [beta]1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction.** *Cancer Cell* 2004, 6:159-170.
- 430) Bambang IF, Lu D, Li H, Chiu LL, Lau QC, Koay E, Zhang D.: **Cytokeratin 19 regulates endoplasmic reticulum stress and inhibits ERp29 expression via p38 MAPK/XBP-1 signaling in breast cancer cells.** *Exp Cell Res.* 2009 Jul 1;315(11):1964-74.
- 431) Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J: **Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival.** *Mol Biol Cell* 2008, 19:797-806.
- 432) Zhang XHF, Wang Q, Gerald W, Hudis CA, Norton L, Smid M, Foekens JA, Massague J: **Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals.** *Cancer Cell* 2009, 16:67-78.
- 433) Liang J, Shao SH, Xu Z-X, Hennessy B, Ding Z, LarreaM, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL.: **The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis.** *Nat Cell Biol* 2007, 9:218-224.
- 434) Barkan D, Kleinman H, Simmons JL, Asmussen H, Kamaraju AK, Hoenorhoff MJ, Liu Z-y, Costes SV, Cho EH, Lockett S et al.: **Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton.** *Cancer Res* 2008, 68:6241-6250.
- 435) Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB.: **The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells.** *J Clin Invest* 2008, 118:3917-3929.
- 436) Miranti CK, Brugge JS.: **Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction.** *Nat Cell Biol.* 2002;4:E83–E90

- 437) Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J: **Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival.** *Mol Biol Cell.* 2008;19:797–806.
- 438) Gan B, Yoo Y, Guan JL.: **Association of focal adhesion kinase with tuberous sclerosis complex 2 in the regulation of s6 kinase activation and cell growth.** *J Biol Chem.* 2006;281:37321–37329.
- 439) Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B : **Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development.** *Cell.* 2007;128:931–946.
- 440) Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG.: **AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.** *Cell Metab.* 2005;1:15–25.
- 441) Sequeira SJ, Ranganathan AC, Adam AP, Iglesias BV, Farias EF, Aguirre-Ghiso JA: **Inhibition of proliferation by PERK regulates mammary acinar morphogenesis and tumor formation.** *PLoS ONE.* 2007;2:e615.
- 442) Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H.: **Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice.** *Nature.* 2006;441:885–889
- 443) Hsing-Jien Kung.: **Targeting Tyrosine Kinases and Autophagy in Prostate Cancer** *Horm Cancer.* 2011 February; 2(1): 38–46.
- 444) Bennett HL, Fleming JT, O'Prey J, Ryan KM, Leung HY.: **Androgens modulate autophagy and cell death via regulation of the endoplasmic reticulum chaperone glucose-regulated protein 78/BiP in prostate cancer cells.** *Cell Death Dis.* 2010 Sep 9;1:e72.
- 445) Kim SH, Park EJ, Lee CR, Chun JN, Cho NH, Kim IG, Lee S, Kim TW, Park HH, So I, Jeon JH.: **Geraniol induces cooperative interaction of apoptosis and autophagy to elicit cell death in PC-3 prostate cancer cells.** *Int J Oncol.* 2011 Dec 23. doi: 10.3892/ijo.2011.1318.
- 446) Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, Mukhtar H.: **Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3- gallate.** *J Biol Chem* 2006;281:33761–33772.
- 447) Caporali A, Davalli P, Astancolle S, D'Arca D, Brausi M, Bettuzzi S, Corti A.: **The chemopreventive action of catechins in the TRAMP mouse model of prostate carcinogenesis is accompanied by clusterin over-expression.** *Carcinogenesis* 2004;25:2217–2224
- 448) Anwar K, Nakakuki K, Shiraishi T, Naiki H, Yatani R, Inuzuka M.: **Presence of ras oncogene mutations and human papillomavirus DNA in human prostate carcinomas.** *Cancer Res* 1992;52:5991–5996.
- 449) Lyn-Cook BD, Rogers T, Yan Y, Blann EB, Kadlubar FF, Hammons GJ.: **Chemopreventive effects of tea extracts and various components on human pancreatic and prostate tumor cells *in vitro*.** *Nutr Cancer* 1999;35:80–86.
- 450) Gupta S, Ahmad N, Nieminen AL, Mukhtar H.: **Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;164:82– 90.
- 451) Gupta S, Hussain T, Mukhtar H.: **Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells.** *Arch Biochem Biophys* 2003;410:177–185
- 452) Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H.: **Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells.** *Oncogene* 2003;22:4851–4859.
- 453) Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H.: **Essential role of caspases in epigallocatechin-3- gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis.** *Oncogene* 2004;23:2507–2522.
- 454) Mitterberger M, Neuwirt H, Cavarretta IT, Hobisch A, Culig Z.: **Increased resistance to trail-induced apoptosis in prostate cancer cells selected in the presence of bicalutamide.** *Prostate* 2007;67:1194– 1201.
- 455) Siddiqui IA, Malik A, Adhami VM, Asim M, Hafeez BB, Sarfaraz S, Mukhtar H.: **Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to**

- TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis.** *Oncogene* 2008; 27:2055–2063
- 456) Siddiqui IA, Adhami VM, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H.: **Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/ protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells.** *J Cell Biochem* 2004;91:232–242.
- 457) Nam S, Smith DM, Dou QP.: **Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity *in vitro* and *in vivo*.** *J Biol Chem* 2001;276:13322–13330
- 458) Brusselmans K, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV.: **Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells.** *Int J Cancer* 2003;106:856–862.
- 459) Fujita H, Koshida K, Keller ET, Takahashi Y, Yoshimoto T, Namiki M, Mizokami A.: **Cyclooxygenase-2 promotes prostate cancer progression.** *Prostate* 2002;53:232–240
- 460) Harper CE, Patel BB, Wang J, Eltoum IA, Lamartiniere CA.: **Epigallocatechin-3-Gallate suppresses early stage, but not late stage prostate cancer in TRAMP mice: Mechanisms of action.** *Prostate* 2007;67:1576–1589.
- 461) Adhami VM, Malik A, Zaman N, Sarfaraz S, Siddiqui IA, Syed DN, Afaq F, Pasha FS, Saleem M, Mukhtar H.: **Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both *in vitro* and *in vivo*.** *Clin Cancer Res.* 2007 Mar 1;13(5):1611-9.
- 462) Siddiqui IA, Zaman N, Aziz MH, Reagan-Shaw SR, Sarfaraz S, Adhami VM, Ahmad N, Raisuddin S, Mukhtar H.: **Inhibition of CWR22Rnu1 tumor growth and PSA secretion in athymic nude mice by green and black teas.** *Carcinogenesis* 2006;27:833–839
- 463) Mukhtar H.: **Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both *in vitro* and *in vivo*.** *Clin Cancer Res* 2007;13:1611–1619
- 464) Harper CE, Patel BB, Wang J, Eltoum IA, Lamartiniere CA.: **Epigallocatechin-3-Gallate suppresses early stage, but not late stage prostate cancer in TRAMP mice: mechanisms of action.** *Prostate* 2007;67:1576–1589.
- 465) Andersson S, Russell DW.: **Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3640–3644.
- 466) Hiiipakka RA, Zhang HZ, Dai W, Dai Q, Liao S.: **Structure-activity relationships for inhibition of human 5alpha-reductases by polyphenols.** *Biochem Pharmacol* 2002;63:1165–1176
- 467) Meiers I, Shanks JH, Bostwick DG.: **Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer.** *Pathology* 2007;39:299–304.
- 468) Fang M, Chen D, Yang CS.: **Dietary polyphenols may affect DNA methylation.** *J Nutr* 2007;137:223S–228S.
- 469) Lee WJ, Shim JY, Zhu BT.: **Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids.** *Mol Pharmacol* 2005;68:1018–10130
- 470) Pandey M, Gupta S.: **Green tea polyphenols inhibit promoter hypermethylation through downregulation of DNMT expression in prostate cancer LNCaP cells.** Late Breaking Abstract- LB212. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2007;98:53.
- 471) Zhou JR, Yu L, Zhong Y, Blackburn GL.: **Soy phytochemicals and tea bioactive components synergistically inhibit androgen-sensitive human prostate tumors in mice.** *J Nutr* 2003;133:516– 521
- 472) Mohan RR, Challa A, Gupta S, Bostwick DG, Ahmad N, Agarwal R, Marengo SR, Amini SB, Paras F, MacLennan GT, Resnick MI, Mukhtar H.: **Overexpression of ornithine decarboxylase in prostate cancer and prostatic fluid in humans.** *Clin Cancer Res* 1999;5:143–147.
- 473) Gupta S, Ahmad N, Mohan RR, Husain MM, Mukhtar H.: **Prostate cancer chemoprevention by green tea: *in vitro* and *in vivo* inhibition of testosterone-mediated induction of ornithine decarboxylase.** *Cancer Res* 1999;59:2115–2120.
- 474) Roomi MW, Ivanov V, Kalinovskiy T, Niedzwiecki A, Rath M.: ***In vivo* anti-tumor effect of ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on human**



- prostate cancer PC-3 xenografts in nude mice: evaluation of tumor growth and immunohistochemistry.** *In vivo* 2005;19:179-183.
- 475) Gupta S, Hastak K, Ahmad N, Lewin JS, Mukhtar H.: **Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10350- 10355.
- 476) Saleem M, Adhami VM, Siddiqui IA, Mukhtar H.: **Tea beverage in chemoprevention of Prostate Cancer: a mini-review.** *Nutr Cancer* 2003;47:13-23.
- 477) Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H.: **Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of Prostate Cancer.** *Cancer Res* 2004;64:8715-8722.
- 478) Scaltriti M, Belloni L, Caporali A, Davalli P, Remondini D, Rizzi F, Astancolle S, Corti A, Bettuzzi S.: **Molecular classification of green tea catechin-sensitive and green tea catechin-resistant prostate cancer in the TRAMP mice model by quantitative real-time PCR gene profiling.** *Carcinogenesis.* 2006 May;27(5):1047-53.
- 479) Kaplan-Lefko PJ, Chen TM, Ittmann MM, Barrios RJ, Ayala GE, Huss WJ, Maddison LA, Foster BA, Greenberg NM.: **Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model.** *Prostate.* 2003 May 15;55(3):219-37
- 480) Gingrich JR, Barrios RJ, Foster BA, Greenberg NM.: **Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model.** *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 1999 Mar;2(2):70-75.
- 481) Siddiqui IA, Shukla Y, Adhami VM, Sarfaraz S, Asim M, Hafeez BB, Mukhtar H.: **Suppression of NFkappaB and its regulated gene products by oral administration of green tea polyphenols in an autochthonous mouse prostate cancer model.** *Pharm Res* 2008 ;25:2135-2142.
- 482) Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H.: **Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells.** *Int J Cancer* 2005;113:660-669. [
- 483) Davalli P, Rizzi F, Caldara GF, Davoli S, Corti A, Silva A, Astancolle S, Vitale M, Bettuzzi S, Arcari M, Azzali G.: **Chronic administration of green tea extract to TRAMP mice induces the collapse of Golgi apparatus in prostate secretory cells and results in alterations of protein post-translational processing.** *Int J Oncol.* 2011 Dec;39(6):1521-7.
- 484) Jatoi A, Ellison N, Burch PA, Sloan JA, Dakhil SR, Novotny P, Tan W, Fitch TR, Rowland KM, Young CY, Flynn PJ.: **A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma.** *Cancer* 2003;97:1442-1446.
- 485) Choan E, Segal R, Jonker D, Malone S, Reaume N, Eapen L, Gallant V.: **A prospective clinical trial of green tea for hormone refractory prostate cancer: an evaluation of the complementary/alternative therapy approach.** *Urol Oncol* 2005;23:108-113.
- 486) Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, Castagnetti G, Peracchia G, Corti A.: **Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study.** *Cancer Res* 2006;66:1234-1240.
- 487) Brausi M, Rizzi F, Bettuzzi S.: **Chemoprevention of human prostate cancer by green tea catechins: two years later. A follow-up update.** *Eur Urol* 2008;54:472-473.
- 488) McLarty J, Bigelow RL, Smith M, Elmajian D, Ankem M, Cardelli JA.: **Tea Polyphenols Decrease Serum Levels of Prostate-Specific Antigen, Hepatocyte Growth Factor, and Vascular Endothelial Growth Factor in Prostate Cancer Patients and Inhibit Production of Hepatocyte Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor In vitro.** *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 2009



# II

## **PARTE SECONDA**

---

5.Scopo della tesi

6.Materiali e Metodi

7.Risultati

8.Discussione e Conclusioni



# 5

## SCOPO DELLA TESI.

**178** Come ampiamente discusso nella parte introduttiva le catechine estratte dal tè verde manifestano *in vitro*, praticamente in tutte le linee cellulari nelle quali sono state testate, un marcato effetto di inibizione della crescita che è da attribuirsi tanto ad un blocco della proliferazione (attuato attraverso una alterazione dell'espressione delle proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare), quanto ad un aumento della morte cellulare. Questi fenomeni, evidenziati anche in linee cellulari prostatiche, sono dose e tempo dipendenti, e la sensibilità al trattamento varia a seconda del tipo di linea cellulare impiegata. Noi ed altri autori abbiamo verificato in precedenza che l'EGCG è efficace nell'indurre arresto della proliferazione e morte cellulare tanto in cellule epiteliali prostatiche immortalizzate non tumorigeniche, (PNT1a), quanto in cellule androgeno indipendenti, tumorigeniche, metastatiche (PC-3), mentre non ci sono evidenze di alcuna alterazione della proliferazione in cellule prostatiche normali in coltura primaria.

Questo lavoro di tesi è stato progettato al fine di:

- a) investigare *in vitro* la citostaticità e la citossicità di una miscela standardizzata e altamente purificata di catechine estratte dalle foglie della pianta del tè (*C. sinesis*) su linee cellulari immortalizzate di epitelio prostatico (PNT1a) e linee tumorali (PC-3) di PCa;
- b) Chiarire quali specifici percorsi di segnalazione biomolecolare vengano attivati dalle catechine per indurre la morte nelle cellule PNT1a e PC-3.



# 6

## MATERIALI e METODI.

### Caratteristiche delle linee cellulari impiegate e loro mantenimento.

**179** Tutti gli esperimenti sono stati condotti su linee cellulari PNT1a e PC-3. Le cellule DU145 e HeLa sono state utilizzate come controllo positivo negli esperimenti di western blot, per verificare la modificazione del livello di espressione di marker di autofagia, stress del reticolo endoplasmatico, caspasi e proteine pro-apoptotiche.

Le caratteristiche delle linee cellulari impiegate sono riportate nelle tabelle che seguono.

#### **LINEA CELLULARE:**

#### **PC-3**

PROPRIETA' DI CRESCITA	Cellule aderenti.
PROVENIENZA	Linea cellulare derivata da metastasi ossee di adenocarcinoma prostatico di IV grado isolate da maschio adulto caucasico di 62 anni [489]
CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E CELLULARI	Si tratta di cellule dalla morfologia fibroblastoide caratterizzate da un fenotipo androgeno-indipendente con una debole attività della fosfatasi acida e della testosterone-5- $\alpha$ -reduttasi. Possiedono una proteina p53 inattiva.
MANTENIMENTO	Acquisite dall'American Tissue Culture Collection (ATCC) sono state coltivate in mezzo Ham's F12 completo a 37°C in atmosfera umidificata satura di aria al 5% di CO <sub>2</sub> e staccate dal supporto di crescita mediante Tripsina/EDTA 0.2 g/mL.

**LINEA CELLULARE: PNT1a**

PROPRIETA' DI CRESCITA	Cellule aderenti.
PROVENIENZA	La cultura primaria è stata ottenuta dalla prostata di un maschio caucasico di 35 anni post-mortem.
CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E CELLULARI	Queste cellule, dalla morfologia epiteliale, sono state immortalizzate mediante trasfezione con un plasmide contenente il genoma di SV40 con una origine di replicazione difettiva ed esprimono l'antigene della proteina Grande T [490]. Mostrano il fenotipo di cellule prostatiche luminali differenziate con espressione delle citocheratina 8 e 18 (marcatori di cellule epiteliali ghiandolari luminali) e della vimentina. Le PNT1a non sono tumorigeniche in topi nudi.
PROPAGAZIONE	Acquistate dall'American Tissue Culture Collection (ATCC) sono state coltivate in mezzo RPMI completo a 37°C in atmosfera umidificata satura di aria al 5% di CO <sub>2</sub> e staccate dal supporto di crescita mediante Tripsina/EDTA 0.2 g/mL.

**LINEA CELLULARE: DU145**

PROPRIETA' DI CRESCITA	Cellule aderenti.
PROVENIENZA	Linea cellulare derivata da metastasi cerebrali di adenocarcinoma prostatico di maschio adulto caucasico di 69 anni.
CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E CELLULARI	Analisi ultrastrutturali sia della linea cellulare che del tumore originale rivelano microvilli, tonofilamenti, desmosomi, mitocondri e apparato del Golgi ben sviluppato e lisosomi eterogenei. Si tratta di cellule androgeno-indipendenti, solo debolmente positive alla fosfatasi acida, che formano colonie isolate in soft-agar. Le cellule non esprimono l'antigene prostatico specifico.
PROPAGAZIONE	Acquistate dall'American Tissue Culture Collection (ATCC) sono state coltivate in mezzo MEM completo a 37°C in atmosfera umidificata satura d'aria al 5% di CO <sub>2</sub> e staccate dal supporto di crescita mediante Tripsina/EDTA 0.2 g/mL.



<b>NOME:</b>	<b>HeLa</b>
PROPRIETA' DI CRESCITA	Cellule aderenti
ORGANISMO SORGENTE	Linea cellulare tumorale altamente stabilizzata, isolata da cellule epiteliali di cancro della cervice uterina di una donna caucasica di anni 31
CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E CELLULARI	Prima linea cellulare ad essere prodotta, le HeLa sono molto più resistenti delle altre cellule tumorali e sono in grado di sopravvivere per un periodo relativamente lungo anche in assenza di terreno di coltura. Le HeLa possono dividersi molte più volte rispetto alle altre cellule e ciò dipende da una mutazione della telomerasi, che previene l'accorciamento del telomero durante la replicazione. Sono caratterizzate dalla produzione di cheratina e lisofosfatidilcolina (Liso-PC) L'espressione dell'mRNA di p53 è bassa mentre la proteina non è presente a livelli apprezzabili. Sono stati riportati livelli basali di pRB.
PROPAGAZIONE	Sono state coltivate in mezzo MEM a 37°C in atmosfera umidificata satura d'aria al 5% di CO <sub>2</sub> e staccate dal supporto di crescita mediante Tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich) 0.2 g/mL

#### **Composizione dei mezzi di coltura:**

**PNT1a completo:** FBS 10% (v/v) (LONZA), Glutamina 1% (v/v) (GIBCO), Penicillina-Streptomicina 1% (SIGMA-ALDRICH), RPMI 1640 82% (v/v) (EUROCLONE)

**PC-3 completo:** FBS 10% (v/v) (LONZA), Glutamina 1% (v/v) (GIBCO), Penicillina-Streptomicina 1% (SIGMA-ALDRICH), Ham-F12 82% (v/v) (EUROCLONE)

**DU145 completo:** FBS 10% (v/v) (LONZA), Glutamina 1% (v/v) (GIBCO), Penicillina-Streptomicina 1% (SIGMA-ALDRICH), DMEM 82% (v/v) (EUROCLONE)

**HeLa completo:** FBS 10% (v/v) (LONZA), Glutamina 1% (v/v) (GIBCO), Medium F12-k 82% (v/v) (EUROCLONE)


#### **Soluzione utilizzate:**

**Phosphate-buffered Saline (PBS):** NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM.

**Tripsina/EDTA 1X:** Tripsina/EDTA 10X (v/v) (SIGMA-ALDRICH), PBS 1X (v/v).

**Polyphenon-E®: descrizione ed esperimenti.**

**180** Il Polyphenon E è una miscela purificata e altamente standardizzata di catechine estratte dalle foglie del tè (*C. sinensis*). La composizione esatta è riportata in tabella.

<b>Tabella 1. Composizione del Polyphenon-E®</b>		
	<b>Componenti</b>	<b>% approssimativa nella miscela</b>
	(-)-Epigallocatechina-3-gallato (EGCG)	70%
	(-)-Epicatechina (EC)	9%
	(-)-Epicatechina-3-gallato (ECG)	6%
	(-)-Epigallocatechina (EGC)	4%
	(-)-Gallocatechin-3-gallato (GCG)	4%
	Teaflavine. Tearubigine, etc...	<7%
	Caffeina	<1%

Per tutti gli esperimenti è stata preparata una soluzione stock sciogliendo 5 mg di polvere per ogni mL di acqua deionizzata (w/v) e sterilizzata per filtrazione. Nelle pagine successive di questa tesi verrà utilizzata la dicitura abbreviata Poly-E per indicare il prodotto.

**181** *Curva dose-risposta e IC<sub>50</sub> del Poly-E.* La concentrazione di Poly-E, in grado di inibire l'attività della succinato deidrogenasi cellulare del 50% (o IC<sub>50</sub>), è stata valutata utilizzando il reattivo WST-1, contenente un sale di tetrazolio ((4-[3-(4-iodofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonato), Roche, Lewes, UK) in accordo con il protocollo allegato al prodotto. Brevemente, le cellule PNT1a e PC-3 sono state seminate in triplicato in una piastra di coltura da 96 pozzetti (96 wells) alla densità di 0,8 x 10<sup>4</sup> e 1.0 x 10<sup>4</sup> cellule per pozzetto, rispettivamente, 24 ore prima del trattamento con dosi crescenti di Poly-E per costruire la curva dose-risposta. La soluzione stock di Poly-E è stata miscelata con mezzo di crescita fresco fino a raggiungere le concentrazioni finali desiderate di 0-5-10-15-20-25-30-35-40-45-50-60 µg/mL per le cellule PNT1a e 0-20-40-60-80-120-140-180-200-220 µg/mL per le cellule PC-3.

Le cellule sono state incubate per 24 ore con i mezzi di crescita supplementati, sostituendo tutto, allo scadere del tempo, con nuovo mezzo di crescita con WST-1 al 10% (v/v). L'attività della succinato deidrogenasi è stata stimata sulla base della capacità delle cellule di metabolizzare il sale di tetrazolio (WST-1) a formazano, un composto colorato che assorbe luce a 480 nm, procedendo alla misurazione della densità ottica (O.D.) attraverso uno spettrofotometro SUNRISE (Tecan).

I valori così ottenuti correlano in modo diretto al numero di cellule metabolicamente attive. I dati sono stati espressi come [media  $\pm$  deviazione standard (S.D.)] di tre repliche sperimentali e comparati con i valori determinati per cellule non trattate.

### 182 *Saggi sperimentali con PolyE.*

Sulla base della densità cellulare utilizzata per l'identificazione della IC<sub>50</sub> del Poly-E è stata elaborata una formula matematica in grado di adattare il numero di cellule ed il volume di mezzo di coltura sulla base dell'area di crescita, per garantire una ripetibilità degli esperimenti (vedi a lato). Tenendo conto di questa formula sono state calcolate sia la densità di semina che il volume del mezzo di crescita per i diversi supporti di coltura utilizzati.

$$N = S \text{ (in cm}^2\text{)} \times C \text{ (in cm}^2\text{)} \times K$$

Dove:

*N* = numero di cellule da seminare per raggiungere una confluenza del 70-75%.

*S* = superficie di crescita (in cm<sup>2</sup>)

*C* = numero di cellule/cm<sup>2</sup> (25.000 cell/cm<sup>2</sup> per le PNT1a e 31.250 cell/cm<sup>2</sup> per le PC-3)

*K* = 0,75, costante che tiene conto della percentuale di cellule che non aderiscono alla superficie di crescita o che vanno incontro a replicazione.

In modo analogo:

$$V = S \text{ (in cm}^2\text{)} \times K$$

Dove:

*V* = volume di mezzo di crescita (in  $\mu$ L)

*S* = superficie di semina (in cm<sup>2</sup>)

*K* = 312,5 costante che tiene conto della superficie di crescita e il volume inizialmente utilizzati per la curva dose risposta.

Tipo di piastra	Superficie	N° di cellule PNT1a	N° di cellule PC-3	Volume di mezzo
96 well	0,32 cm <sup>2</sup>	0,8 x 10 <sup>6</sup>	0,01 x 10 <sup>6</sup>	0,1 mL
Capsule 35 mm	8 cm <sup>2</sup>	0,15 x 10 <sup>6</sup>	0,187 x 10 <sup>6</sup>	3 ml
6 well	9,5 cm <sup>2</sup>	0,17 x 10 <sup>6</sup>	0,23 x 10 <sup>6</sup>	3 mL
4 well	20 cm <sup>2</sup>	0,3 x 10 <sup>6</sup>	0,4 x 10 <sup>6</sup>	4 ml
T25 Flask	25 cm <sup>2</sup>	0,46 x 10 <sup>6</sup>	0,6 x 10 <sup>6</sup>	7,8 mL
T75 Flask	75 cm <sup>2</sup>	1,4 x 10 <sup>6</sup>	1,7 x 10 <sup>6</sup>	20 mL

### Analisi del ciclo cellulare (FACS monodimensionale).

183 L'effetto del Poly-E sul ciclo cellulare è stato determinato mediante citofluorimetria di flusso dopo fissazione e colorazione delle cellule con ioduro di propidio (PI). In breve, cellule PNT1a e PC-3 sono state seminate in triplo in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> (T75, Corning) e lasciate in coltura per 24 ore.

Allo scadere delle 24 ore il mezzo di crescita è stato sostituito con mezzo fresco addizionato con la concentrazione di Poly-E corrispondente all'IC<sub>50</sub> (35  $\mu$ g/mL per cellule PNT1a, 145  $\mu$ g/mL per cellule PC-3) e per un tempo di 12, 24 e 48 ore. Come controllo positivo sono state utilizzate le stesse linee

cellulari trattate per 24 ore con Etoposide 200  $\mu\text{M}$  (inibitore dell'enzima topoisomerasi 2, noto induttore di apoptosi).

Allo scadere dei tempi sperimentali sia le cellule in sospensione che aderenti sono state raccolte, lavate due volte con PBS freddo e centrifugate a 1.000 rpm per 5 minuti. Il pellet cellulare è stato fissato in PBS-BSA 2% permeabilizzando le membrane con etanolo freddo al 70% per poi mantenere i campioni  $-20^{\circ}\text{C}$  O/N. Questi processi non conservano i frammenti di DNA a basso peso molecolare presenti nel citoplasma i quali vengono persi durante i lavaggi. Il risultato è che le cellule morte avranno un contenuto totale di DNA inferiore a quello delle cellule normali. La frazione di cellule a contenuto di DNA ridotto verrà individuata da un picco di marcatura inferiore rispetto a quello delle popolazioni in G0/G1 e definito come picco sub-G0 o picco ipodiploide.

Per la colorazione del DNA il pellet è stato risospeso nel tampone di colorazione ed incubato per 30 min a temperatura al buio. La sospensione è stata analizzata considerando, in base allo stato del DNA, la distribuzione delle cellule durante le diverse fasi del ciclo cellulare tramite analisi citofluorimetrica, utilizzando un FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). I dati sono stati esaminati con il programma Quest CELL computer (Becton Dickinson).

#### Soluzioni utilizzate:

**Etoposide:** 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in DMSO

**Phosphate-buffered Saline (PBS):** NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM.

**PBS-BSA 2%:** PBS 1% (v/v), BSA 2% (w/v)

**Etanolo 70%:** Etanolo puro 70%, H<sub>2</sub>O deionizzata.

**Soluzione di Propidio Ioduro:** PBS, Ribonucleasi-A 0,1% (v/v a partire da uno stock di 20 mg/mL), Propidio ioduro 0,05% (v/v) a partire da uno stock di 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$

#### DNA laddering.

**184** Le cellule PNT1a e PC-3 sono state seminate in fiasche da 75  $\text{cm}^2$  e trattate con dosi di Poly-E in modo tempo e dose dipendente ossia:

- Cellule PNT1a e PC-3 per 12, 24 e 48 ore con una dose di Poly-E corrispondente alla  $\text{IC}_{50}$ ;
- Cellule PNT1a e PC-3 per 24 ore con tre differenti dosi di Poly-E (17-35-80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 70-145-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , rispettivamente).

Allo scadere dei tempi sperimentali si è proceduto all'estrazione del DNA genomico utilizzando il "QIAamp DNA mini Kit" (Qiagen), seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Brevemente, alle cellule raccolte, pellettate e risospese in 200  $\mu\text{L}$  di PBS, sono stati aggiunti 20  $\mu\text{L}$  di QIAGEN Proteinasi K e 200  $\mu\text{L}$  del buffer di lisi procedendo all'incubazione a  $56^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti. Dopo l'aggiunta di 200  $\mu\text{L}$  di etanolo 100%, la soluzione è stata trasferita in colonnina "QIAamp Mini spin column" e si è centrifugato 1 minuto a 6.000 g per eliminare il filtrato.

Dopo alcuni lavaggi della colonnina con i buffer AW1 e AW2, contenenti etanolo 100%, si è proceduto effettuando l'eluizione con 30  $\mu$ L di buffer AE. L'intero volume eluito per ogni condizione sperimentale è stato addizionato a DNA loading Buffer 1X (Blue/Orange 6X, Promega) e caricato su gel d'agarosio 1.5% in presenza di 10  $\mu$ L del marcatore 1Kb DNA ladder (Promega). Alla fine della corsa elettroforetica il DNA è stato visualizzato utilizzando un trans-illuminatore UV (UV Transilluminater 2000, Biorad). Le dimensioni dei frammenti di DNA sono state valutate confrontandole con quelle del marcatore di peso molecolare 1kb.

#### Soluzioni utilizzate:

**Gel per elettroforesi:** TAE 1X (v/v), Agarosio 1% (w/v), Etidio Bromuro 0,05% (v/v).

**Buffer di caricamento:** Blue/Orange 6X loading dye, Promega.

**Marker:** 1Kb ladder, Promega.

**Etanolo 70%:** Etanolo puro 70% (v/v), H<sub>2</sub>O DEPC 0,1% (v/v).

**H<sub>2</sub>O DEPC:** DEPC 0,1% (v/v) in H<sub>2</sub>O

#### Vitalità delle linee cellulari dopo il trattamento.

**185** L'utilizzo di colorazione con Trypan Blue e ha permesso di valutare lo stato vitale delle cellule a seguito di trattamento con Poly-E, mentre la colorazione con arancio di acridina (AO) ha fornito una prima indicazione su eventuali disfunzionalità degli organelli interni.

**186** *Test di esclusione del colorante Trypan Blue.* La vitalità delle cellule è stata valutata mediante il test di esclusione del colorante Trypan Blue. Le cellule PNT1a e PC-3 sono state seminate in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> e sottoposte al trattamento con mezzo supplementato con Poly-E per i tempi e le concentrazioni richieste. Al termine, il mezzo è stato rimosso e le cellule recuperate con tripsina, neutralizzando l'attività dell'enzima con un adeguata quantità di mezzo di crescita fresco. Il tutto è stato centrifugato a 2.000 rpm per 5 min ed il pellet cellulare è stato quindi risospeso in una soluzione di medium e Trypan Blue allo 0.04% (v/v) per un tempo di 3 min. Si è quindi proceduto al conteggio con camera bürker. A fresco, le cellule vitali appaiono chiare al microscopio, per via della loro capacità di escludere il Trypan Blue dal citosol, al contrario delle cellule morenti che, avendo perso l'integrità della membrana plasmatica non sono in grado di impedire l'ingresso del colorante e si mostrano colorate di blu. La vitalità è stata determinata come percentuale di cellule vitali (non colorate) sul totale delle cellule (non colorate più le colorate) scegliendo tre campi in diagonale della camera bürker contenenti non meno di 50 cellule, per tre prove indipendenti allestite per ogni condizione sperimentale. I dati sono stati espressi come

[valore medio  $\pm$  S.D.] calcolando la significatività statistica con il Test-*t* di Student's, con il valore di *p* indicato nella legenda delle figure.

#### Soluzioni utilizzate:

**Trypan Blu:** Trypan Blue 0.4% in PBS 1X.

**Phosphate-buffered Saline (PBS):** NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM.

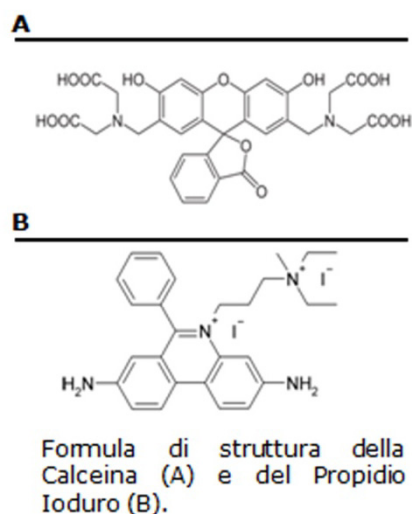
#### 187 *Analisi morfologica attraverso microscopia ottica e laser-confocale.*

Sui controlli non trattati di cellule PNT1a e PC-3 e le cellule sottoposte ai trattamenti con Poly-E è stata eseguita l'analisi morfologica, attraverso l'acquisizione di immagini in contrasto di fase, per valutare la morfologia generale del corpo cellulare.

Per un più accurato studio, teso ad evidenziare modificazioni e frammentazioni nucleari, le cellule sono state colorate con Calceina, Ioduro di Propidio (PI) e Draq 5 (colorazioni vitali). Quindi si è fatto uso di un microscopio confocale laser dotato di dispositivo per l'acquisizione diretta delle immagini attraverso una fotocamera digitale a colori integrata.

Cellule PNT1a e PC-3 sono state seminate su vetrini porta-oggetto (24 x 50 mm, precedentemente sgrassati con etanolo puro e sterilizzati) posti all'interno di una piastra quadripartita (4 well dish Nunclon Delta, Nunc) e trattate per 12, 24 e 48 ore con Poly-E alle rispettive dosi di IC<sub>50</sub>. Al termine dei tempi sperimentali i vetrini sono stati recuperati e montati in una camera di flusso [491] che permette il controllo del microambiente e consente anche sostituzioni di mezzo di crescita senza modifiche del piano di scansione preselezionato durante il periodo di osservazione. Le cellule sono state caricate con una soluzione di mezzo di crescita condizionato (Poly-E alle rispettive IC<sub>50</sub>) con l'aggiunta di Calceina 2  $\mu$ M e PI 2  $\mu$ g/mL il tutto 15 min prima dell'acquisizione delle immagini e, per cellule PC-3, anche di Draq 5 1  $\mu$ M, dopo l'acquisizione dei precedenti set di immagini, essendo il colorante molto tossico.

Questo test di vitalità cellulare si basa sulla determinazione simultanea di cellule vive e morte, facendo uso di due sonde, Calceina e PI, che misurano parametri riconosciuti di vitalità cellulare, rispettivamente: l'attività della esterasi intracellulare e l'integrità della membrana plasmatica. Le cellule vive si distinguono per la presenza ubiquitaria dell'attività dell'esterasi intracellulare, determinata dalla conversione enzimatica della Calceina, virtualmente non fluorescente, a Calceina intensamente fluorescente. Il colorante polianionico calceina permea dunque, con facilità, all'interno di



cellule vive, producendo un'intensa ed uniforme fluorescenza verde (eccitazione ~495 nm; emissione ~515 nm).

Il PI entra solo nelle cellule con membrane compromesse e subisce un incremento della sua fluorescenza di circa 40 volte a seguito del legame con gli acidi nucleici, producendo così una fluorescenza di colore rosso in cellule morte (eccitazione ~495 nm; emissione ~635 nm). L'ingresso del PI è ostacolato da una membrana plasmatica intatta, tipica delle cellule vive.

I livelli di fluorescenza di fondo sono intrinsecamente bassi, essendo le molecole praticamente non fluorescenti prima di interagire con le cellule.

Il Draq 5 è una molecola fluorescente permeabile e altamente interattiva con il DNA, con una emissione che si estende nella regione infrarossa dello spettro. Si tratta di una buona scelta per la colorazione nucleare di cellule vive in quanto non richiede una sorgente UV laser per l'eccitazione ed è spettralmente sovrapponibile con altri fluorocromi. È un composto sintetico puro, stabile a temperatura ambiente e in condizioni di luce ed è solubile in acqua a pH biologicamente compatibili. Risulta tossico per sistemi cellulari già compromessi. Proprio per tale motivo, nel nostro caso, la sua aggiunta è stata eseguita solo al termine dell'analisi morfologica, allo scopo di valutare le caratteristiche morfologiche del nucleo nelle cellule PC-3.

#### **Soluzioni utilizzate:**

**Ioduro di Propidio:** Ioduro di Propidio 2 µg/mL (10 µl di PI 1 mg/mL in 5 ml di mezzo di crescita condizionato (con Poly-E).

**Calceina:** 2 µM finale in mezzo di crescita condizionato (con Poly-E)

**Draq 5:** :1 µM finale in mezzo di crescita condizionato (con Poly-E)

**188**

**Colorazione con Arancio di Acridina.** L'autofagia è stata valutata mediante colorazione con Arancio di Acridina (AO). Si tratta di un colorante cationico fluorescente selettivo per acidi nucleici. È permeabile alla membrana e interagisce con il DNA ed RNA per intercalazione o attrazioni elettrostatiche, rispettivamente. Può anche entrare in compartimenti acidi come i lisosomi (e dunque anche autofagolisosomi). Colora citoplasma e nucleo rispettivamente di verde e rosso, mentre gli scompartimenti acidi di un arancio-rosso brillante: l'intensità della fluorescenza arancione è proporzionale al grado di acidità e/o al volume del vano cellulare. Le cellule PNT1a e PC-3 sono state seminate in capsule Petri da 35mm e sottoposte a trattamento con Poly-E, come già descritto. Come controllo positivo sono state usate le medesime linee cellulari fatte crescere però in mezzo EBSS. Allo scadere dei tempi sperimentali, le colture di cellule sono state incubate in mezzo di crescita fresco addizionato a 2 µg/mL di AO per 15 minuti in incubatore termostato. Allo scadere del tempo, l'AO è stato rimosso e le cellule lavate per tre volte con PBS, ricoprendole infine con 0.5-1 mL di

mezzo di crescita fresco o EBSS per l'osservazione al microscopio a fluorescenza. Il processo autofagico è stato quantificato sulla base delle media matematica del numero di cellule che mostravano, al loro interno, granuli colorati di rosso-arancio in tre diversi campi per ogni condizione sperimentale. I dati raccolti sono stati espressi come [media  $\pm$  deviazione standard (S.D.)] di tre diversi campi per ognuna di tre repliche sperimentali, comparando i risultati con i valori determinati per i controlli positivi (le stesse cellule in EBSS).

#### Soluzioni utilizzate:

**Arancio di Acridina:** Arancio di acridina 6 mM (w/v), mezzo di crescita fresco.

**EBSS:** CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 1,36 mM (w/v), KCl 5,6 mM (w/v), MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0,8 mM (w/v), NaCl 11,6 mM (w/v), NaHCO<sub>3</sub> 2,62 mM (w/v), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 1,1 mM (w/v), D-Glucosio 5,5 mM (w/v), Rosso Fenolo 0,01 % (w/v);

**Phosphate-buffered Saline (PBS):** NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM.

#### Profilo proteomico e distribuzione di marker molecolari delle linee cellulari sottoposte a trattamento.

**189**

Per chiarire in maniera definitiva la tipologia di morte, le variazioni nel profilo di espressione proteico di marker di autofagia, caspasi e proteine pro-apoptotiche indotte dalla somministrazione di Poly-E nelle linee cellulari PC-3 e PNT1a, sono state valutate attraverso analisi Western Blot (WB) ed analisi immunocitochimica (ICC). A queste tecniche si è aggiunta l'analisi dell'attività di molecole pro-apoptotiche e del livello di trascrizione di geni target mediante qRT-PCR.

I controlli positivi utilizzati sono stati i seguenti:

1. **come controllo positivo di apoptosi:** cellule DU145, seminate in fiasche da 25 o 75 cm<sup>2</sup> (0.6 x 10<sup>6</sup> o 1.7 x 10<sup>6</sup> cellule rispettivamente) e trattate con Etoposide 200 e 400  $\mu$ M;
2. **come controllo positivo di autofagia:** cellule PNT1a e PC-3 seminate in fiasche da 25 o 75 cm<sup>2</sup> e trattate con:
  - **EBSS**, mezzo di coltura privo di siero normalmente utilizzato per indurre la crescita di linee cellulari in condizioni di carenza di fattori nutritivi, stimolando l'innesco del macchinario autofagico;
3. **come controllo positivo di stress del reticolo endoplasmatico:**
  - cellule HeLa, trattate con **A0** ossia Complesso Cu(II) di [(4-amino-1,4-diodro-3-(2-piridil)-5-tiossi-1,2,4-triazolo)] sintetizzato come descritto preventivamente [492] dotato anch'esso di forte attività citotossica, alla concentrazione di 450  $\mu$ M. La propagazione, il mantenimento e il recupero delle proteine è stato eseguito dal Dott. Saverio Tardito.
  - Cellule PC-3 e PNT1a trattate con **Brefeldina-A** sostanza antibiotica isolata da *P. brefeldianum*, dotata di potente attività citotossica,



mediata dall'inibizione del trasporto di proteine tra reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi.

**190** *Estrazione e dosaggio delle proteine.* Le cellule PC3 e PNT1a, trattate con la dose di Poly-E corrispondente alla IC<sub>50</sub> ed i relativi controlli, sono state raccolte, lavate con PBS freddo e lisate in RIPA buffer. I lisati cellulari sono stati mantenuti in agitatore orbitante a 4°C per un'ora e centrifugati a 12.000 g per 20 minuti a 4°C al fine di recuperarne il surnatante. La concentrazione proteica è stata determinata con il lettore di assorbanza per micro piastre "Sunrise" (TECAN) mediante reattivo tipo Lowri, DC Protein assay kit (Bio-Rad), utilizzando soluzioni di albumina sierica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) a concentrazione nota (0-0.125-0.250-0.500-0.750-1.00-1.25-1.50-1.75-2 µg/µL) come standard per la costruzione della curva di taratura.

#### Soluzioni utilizzate:

**Brefeldina-A** (1 mg/mL in Etanolo puro); 15 e 30 g/mL in mezzo di crescita fresco.

**A0:** 450 µM in mezzo di crescita fresco.

**RIPA buffer:** Tris-HCl 50 mM pH 8, Triton X-100 1% (v/v), NaCl 150 mM, inibitori di proteasi (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) 1 mL ogni 100 mL di tampone, inibitori di fosfatasi (Phosphatase Inhibitor Cocktail) sempre 1 mL ogni 100 mL di tampone

**Phosphate Buffered Saline (PBS):** NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM.

**191** *SDS-PAGE e Western Blot.* Per ogni condizione sperimentale, 50 µg di proteine sono state addizionate ad SB (Sample-loading Buffer 5X), incubati a 100°C per 10 minuti e caricati, in presenza di 10 µl del marcatore di peso molecolare "SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard" (Invitrogen), su gel di poliacrilammide al 12% in condizioni riducenti. La corsa elettroforetica è stata effettuata in SDS-running buffer 1X a voltaggio costante pari a 80 V.

Nel caso di "non denaturing SDS-PAGE", le proteine sono state addizionate a SB 5X privo di qualsiasi agente denaturante e caricate su gel di poliacrilammide al 12% preparato in condizioni non riducenti. Anche la corsa elettroforetica è stata effettuata in SDS-running buffer 1X senza SDS a voltaggio costante pari a 80 V.

Il gel ottenuto, e la membrana in PVDF (Immobilon P, Millipore), preventivamente attivata da lavaggi in metanolo e acqua, sono stati equilibrati in blotting buffer per 15 minuti a temperatura ambiente. Le proteine sono state trasferite sulla membrana mediante elettroblotting a 200 mA in blotting buffer 1X, a 4°C O.N. L'efficienza di trasferimento è stata controllata ogni volta mediante colorazione della membrana con reattivo Red Ponceau S (Sigma-Aldrich) per il tempo necessario alla completa visibilità delle bande, bloccando la colorazione con TCA 0.3%. Dopo decolorazione con TBS 1X, i siti di legame aspecifici delle proteine sono stati

bloccati incubando le membrane a temperatura ambiente per 4 ore in blocking solution 1% o nonfat-dried milk 5%. Per la rilevazione della banda immunoreattiva, le membrane sono state ibridate con gli anticorpi specifici riportati nel pannello a fine paragrafo e con l'anticorpo monoclonale anti- $\beta$ -actina umana (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:2000 in blocking solution 1% a temperatura ambiente per un'ora. Sono stati poi effettuati 2 lavaggi da 10 minuti con TTBS 1X ed altri 2 con blocking solution 0.5% (diluita in TBS 1X). La membrana è stata ibridata con un anticorpo secondario adeguato (anti-mouse o anti-rabbit) coniugato alla perossidasi di rafano (Sigma-Aldrich) per un'ora a temperatura ambiente. Dopo quattro lavaggi da 15 minuti con TTBS 1X, le membrane sono state trattate con il substrato chemiluminescente, BM chemiluminescence Blotting Substrate (Roche Diagnostics Corporation) ed esposte alle lastre fotografiche "Hyperfilm ECL" (Amersham) per rilevare eventuali bande immunoreattive.

#### Composizione di un gel di poliacrilammide al 12%:

Running gel		Stacking gel	
H <sub>2</sub> O	4 mL	H <sub>2</sub> O	1,4 mL
Tris HCl 1.5 M pH 8.8 <sup>a</sup>	2,5 mL	Tris HCl 1M pH 6.8 <sup>b</sup>	0,380 mL
Mix Acrilammide 30%	3,3 mL	Mix Acrilammide 30%	0,250 mL
APS 10%	0,1 mL	APS 10%	0,030 mL
TEMED	0,004 mL	TEMED	0,003 mL

#### Soluzioni utilizzate:

**Sample-loading Buffer (SB) 5X<sup>d</sup>:** Glicerolo 25% (w/v); SDS 2% (w/v); Tris HCl pH 6.8 60 mM; DTT 14.4 mM; blu di bromofenolo 0.1% (w/v).

**4X Separating Gel<sup>a</sup>:** 2M Tris-HCl pH 8.8 1.5M, SDS 0,4%, H<sub>2</sub>O.

**4X Separating Gel<sup>b</sup>:** 1M Tris-HCl pH 6.8 0.5M, SDS 0,4%, H<sub>2</sub>O.

**SDS Running buffer 10X<sup>c</sup>:** Tris-HCl 250 mM pH 8.3; Glicina 1,92 M; SDS 1% (w/v)

**Blotting Buffer 1X:** Tris-HCl 48 mM; glicina 39 mM; metanolo 10% (w/v).

**Red Ponceau 1X:** Red ponceau in polvere 0,1% (w/v); acido acetico 5% (v/v) in H<sub>2</sub>O .

**TCA (Acido Tricloro Acetico) 20X:** 100 g di TCA; 227 mL di acqua.

**TBS 10X (Tris Buffered Saline):** Tris-HCl pH 7.5 50 mM; NaCl 150 mM.

**Blocking Solution 10X:** TBS 1X (v/v), Tween 2% (v/v); NaOH 1N, 1% (v/v); blocking reagent 10% (v/v) (Roche).

- *Primary Antibody Dilution Buffer 1X: Blocking Solution 1X (v/v), TBS 1X (v/v).*

- *Secondary Antibody Dilution Buffer 0.5X: Primary Antibody Dilution Buffer 1X (v/v), TBS 1X (v/v).*

**Blocking Buffer 5X:** TBS 1X (v/v), Tween 20 0,1% (v/v), nonfat dry milk (SIGMA-ALDRICH) 5% (w/v).

- Primary Antibody Dilution Buffer 5X: TBS 1X (v/v), Tween 20 0,1% (v/v), BSA 5% (w/v).

- Secondary Antibody Dilution Buffer 1X: Primary Antibody Dilution Buffer 1X (v/v), TBS 1X (v/v), Tween 20 0,1% (v/v).

**TTBS 1X:** Tween 0,1% (w/v) in TBS 1X.

*a, b, c, d: nel caso di SDS-PAGE in condizioni non denaturanti in tutte le soluzioni indicate è stato eliminato il SDS, modificando il volume di soluto per arrivare alla voluta concentrazione.*

<b>Proteina</b>	<b>Abs I</b>	<b>Abs II</b>
<b>AIF</b> <b>Caspasi-9, caspasi-9 clivata, Caspasi-8, caspasi-8 clivata, caspasi-7, caspasi-7 clivata Caspasi-3, caspasi-3 clivata.</b>	AIF antibody #4642 Cell Signaling 1:1000 in TTBS-BSA 5%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in TTBS-BSA 1%
	Apoptosis Antibody Sampler Kit (Cell Signaling). 1:1000 in TTBS-BSA 1%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in TTBS-BSA 1%
<b>Pan-Citocheratine</b>	Anti-Cytocheratyn Pan antibody, C2931 SIGMA 1:1000 in TTBS -BSA 5%	Anti-mouse IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in blocking solution 0.5%
<b>Bad, p-Bad, Bax, Bik, Bim, Bid, BAK, Puma</b>	Pro-Apoptosis Bcl-2 Family Antibody Sampler Kit (Cell Signaling) 1:1000 TTBS-BSA 5%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in TTBS-BSA 1%
<b>Beclina-1</b>	Beclin-1 antibody #3738 Cell Signaling 1:1000 in TTBS-BSA 5%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in TTBS-BSA 1%
<b>E-Caderina</b>	Anti E-Cadherin antibody 610181 BD 1:1000 in TTBS-BSA 5%	Anti-mouse IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in TTBS-BSA 1%
<b>Caspasi-8</b>	Caspase-8 antibody #9746 Cell Signaling 1:1000 in TTBS-BSA 5%	Anti-mouse IgG peroxidase conjugate A 5906 (SIGMA) 1:5000 in TTBS-BSA 1%
<b>Ciclina D<sub>1</sub></b>	Anti-Cyclin D1, C5588 SIGMA 1:1000 in TTBS -BSA 5%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in blocking solution 0.5%
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	EIF2S1 (p-S51) antibody (ab32157) Abcam 1:500 in TTBS-BSA 5%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in TTBS-BSA 1%
<b>Fibronectina</b>	Anti Fibronectin antibody 610077 BD 1:1000 in TTBS-BSA 5%	Anti-mouse IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in TTBS-BSA 1%
<b>GADD 153/CHOP</b>	GADD153 (R-20), sc-793, Santa Cruz Biotechnology 1:50 in TTBS-BSA 5%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in TTBS-BSA 1%
<b>GADD 34</b>	GADD 34 (D-8), sc-46661, Santa Cruz Biotechnology 1:50 in TTBS-BSA 5%	Anti-mouse IgG peroxidase conjugate A 5906 (SIGMA) 1:5000 in TTBS -BSA 1%
<b>GRP78/BiP</b>	Anti-GRP78/BiP G8919 (SIGMA) 1:500 in blocking solution 1%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in blocking solution 0.5%
<b>LC3B</b>	LC3B (D11) XP #3868 Cell Signaling 1:1000 in TTBS-BSA 5%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in TTBS-BSA 1%
<b>PARP-1</b>	PARP1 (F-2) sc-8007 Santa Cruz Biotechnology 1:500 in blocking solution 1%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in blocking solution 0.5%
<b>PCNA</b>	PCNA (F-2) sc-25280 Santa Cruz Biotechnology 1:500 in blocking solution 1%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in blocking solution 0.5%
<b>p21<sup>WAF/Cip1</sup></b>	Anti- p21 <sup>WAF/Cip1</sup> clone CP74 (SIGMA) 1:500 in blocking solution 1%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in blocking solution 0.5%

Proteina	Abs I	Abs II
<b>p-p38<math>\alpha</math></b>	p-p38 (D-8) sc-7973 Santa Cruz Biotechnology 1:2000 in TTBS-BSA 5%	Anti-mouse IgG peroxidase conjugate A 5906 (SIGMA) 1:5000 in TTBS -BSA 1%
<b>p38<math>\alpha</math></b>	p38 $\alpha$ (C-20) sc-535 Santa Cruz Biotechnology 1:2000 in TTBS-BSA 5%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in blocking solution 0.5%
<b>Vimentina</b>	Vimentin (H-84) sc-5565 Santa Cruz Biotechnology 1:2000 in TTBS-BSA 5%	Anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A 0545 (SIGMA) 1:5000 in blocking solution 0.5%
<b>Ubiquitina</b>	Ub (FL-760) sc-9133 Santa Cruz Biotechnology 1:2000 in TTBS-BSA 5%	Anti-mouse IgG peroxidase conjugate A 5906 (SIGMA) 1:5000 in TTBS -BSA 1%

**192** *Valutazione dell'apoptosi mediante saggio colorimetrico.* L'innesco del programma di morte apoptotica in colture cellulari è stato saggiato anche attraverso la determinazione dell'attività delle caspasi-3. Quest'ultima è stata messa in evidenza attraverso analisi spettrofotometrica del cromoforo *p*NA (*p*-nitroanilide) rilasciato in soluzione dopo specifico clivaggio del substrato DEVD-*p*NA (Asp-Glu-Val-Glu-*p*-Nitroanilide) da parte delle caspasi-3. È stato fatto uso del kit CPP32/Caspase-3 Colorimetric Protease Assay (MBL, International Corporation, Watertown, MA, USA) seguendo le istruzioni riportate nel protocollo allegato al kit. Tutte le cellule, sia adese al substrato di crescita che non adese a seguito di distacco, trattate con Poly-E o Etoposide (i controlli positivi), sono state raccolte in buffer di lisi e riposte in ghiaccio per 10 min, per poi recuperare il sovrantante (dopo 2 min. di centrifugazione a 12.000g a 4°C). L'equivalente di 100  $\mu$ g di proteina del surnatante (corrispondente alla frazione citosolica) è stato addizionato a 50  $\mu$ l di buffer di reazione contenente 200  $\mu$ M (concentrazione finale) del substrato fluorogenico DEVD-*p*NA ed incubato a 37°C per 2 ore. L'attività della caspasi-3 nella soluzione surnatante è stata poi misurata a 400-450 nm attraverso l'utilizzo di un microplate reader (Sunrise, TECAN).

Sul valore medio  $\pm$  S.D. ottenuti per tre differenti repliche è stata eseguita l'analisi statistica (Test-t di Student's) per la valutazione di differenze significative.

#### Soluzioni utilizzate:

**Buffer di lisi:** Tris/HCl 10 mM, pH 7.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5; NaCl 130 mM; Triton X-100 1%

**Buffer di reazione:** NaCl 1,4 M; KCl 27 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5; DTT 10mM.

### Estrazione dell'RNA.

**193** Dopo semina in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> ed il rispettivo trattamento con la IC<sub>50</sub> di Poly-E, l'RNA delle cellule PNT1a e PC-3 è stato estratto con il reattivo TRIZOL (Invitrogen), utilizzando il metodo guanidinio tiocianato-fenolo-cloroformio, e precipitato con isopropanolo. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo 70% (v/v) in acqua DEPC (dietilpirocarbonato, agente alchilante altamente reattivo in grado di inibire l'attività catalitica delle RNasi) e risospeso in una soluzione di RNasina in H<sub>2</sub>O-DEPC contenente 0.2 U/μL dell'inibitore di RNasi (Promega). La concentrazione dell'RNA ottenuto è stata quantificata per via spettrofotometrica in un biofotometro (BioPhotometer, Eppendorf) e ne è stata verificata l'integrità mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%.

**194** *Retrotrascrizione.* Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato il kit ImProm II Reverse Transcription System (Promega) secondo le indicazioni fornite dal produttore.

Per ogni campione, ad 1 μg di RNA sono stati aggiunti 1 μL di Primers oligo dT (0,5 μg/μL) e, dopo un annealing di 5 minuti a 25°C, i diversi campioni sono stati incubati a 42°C per 60 minuti con 4 μL di buffer di reazione (Improm-II Reaction Buffer), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTPs 0,5 mM e 1 μL di enzima (Improm-II reverse Transcriptase), per consentire l'estensione del primo filamento. La trascrittasi inversa è stata quindi inattivata al calore (70°C per 15 minuti).

**195** *RT-qPCR.* Il cDNA ottenuto per retrotrascrizione dell'mRNA è stato amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi nel corso di una Real-Time PCR, una PCR cinetica utilizzata per amplificare e quantificare simultaneamente il DNA di ogni campione. Dopo ogni ciclo di amplificazione, esso viene quantificato grazie alla presenza, nella miscela di reazione, di una molecola fluorescente che si intercala al DNA a doppio filamento; in questo caso è stato utilizzato il Sybr-Green. Dal momento che il template è il cDNA ottenuto per retrotrascrizione dell'mRNA, un elevato numero di copie e un aumento rapido della fluorescenza indicano una trascrizione attiva del gene da cui è stato trascritto un determinato mRNA.

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione dell'RNA estratto dalle linee cellulari PNT1a e PC-3 trattate con Poly-E è stato amplificato in Real Time PCR con le coppie di primers riportate nella Tabella 6.

La reazione di PCR è stata allestita in un volume finale di 25 μl per pozzetto in piastre da 96 pozzetti di plastica bianca originali MJ, dotate di cap a profilo piatto, originali MJ. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato nella stessa piastra. Nello specifico il volume totale è stato così suddiviso:

- 12,5 μl di 2X SYBR Premix Ex Taq (Takara BIO Inc, Japan) composta da:
  - *HotStart Taq DNA polimerasi*
  - *QuantiTect SYBR Green PCR Buffer*

- *Miscela di dNTP*
- *SYBR Green I*
- *MgCl<sub>2</sub>, 5 mM*

0,5 µL primer fw (soluzione

- contenente 12,5 pmoli/µL)
- 0,5 µL primer rv (soluzione contenente 12,5 pmoli/µL)
- 9,5 µL H<sub>2</sub>O (RNase, DNase free)
- 2 µL di cDNA

In ogni piastra sono stati allestiti i BIANCHI di tutti i geni testati al fine di evidenziare presenza di eventuale cross-contaminazione dei primers o presenza di dimeri di primers. Le mix dei bianchi contenevano tutte le componenti eccettuato i cDNA i quali venivano sostituiti con un uguale volume di acqua. Tutte le operazioni di preparazione delle mix e allestimento della piastra sono state svolte sotto cappa a flusso laminare.

L'amplificazione del cDNA è stata eseguita con il termociclatore Chromo4 (MJ Research, Whatman, MA, USA), impiegando le specifiche condizioni di temperatura per l'appaiamento dei primers. Le temperature e le successioni di cicli utilizzate per le diverse coppie di primers sono riportate nella Figura e nella Tabella 6.1. La specificità degli ampliconi ottenuta è stata testata sia mediante verifica delle curve di melting che mediante corsa su gel di agarosio.

**TABELLA 6. Coppie di Primers utilizzate nella qRT-PCR.**

	Primers	Sequenza	T <sub>m</sub>
<b>CHOP</b>	CHOP-fw	5' CTT CTC TGG CTT GGC TGA CT 3'	58°C
	CHOP-rv	5' TCC CTT GGT CTT CCT CCT CT 3'	
<b>GRP78/BiP</b>	GRP78/BiP-fw	5' GCC GTC CTA TGT CGC CTT C 3'	58°C
	GRP78/BiP-rv	5' TTT GTT TGC CCA CCT CCA AT 3'	
<b>GADD34</b>	GADD34-fw	5' GCC CAG AAA CCC CTA CTC AT 3'	58°C
	GADD34-rv	5' ACA GCC AGG AAA TGG ACA GT 3'	
<b>XBP1</b>	XBP1s-fw	5' CCT TGT AGT TGA GAA CCA GG 3'	58°C
	XBP1s-rv	5' GGA AGG GCA TTT GAA GAA CA3'	
<b>XBP1s</b>	XBP1s-fw	5' GCT GAG TCC GGC AGG TGC 3'	58°C
	XBP1s-rv	5' GGA AGG GCA TTT GAA GAA CA 3'	
<b>GAPDH</b>	GAPDH-fw	5' AAC CTG CCA AAT ATG ATG AC 3'	58°C
	GAPDH-rv	5' TTG AAG TCA GAG GAG ACC AC 3'	

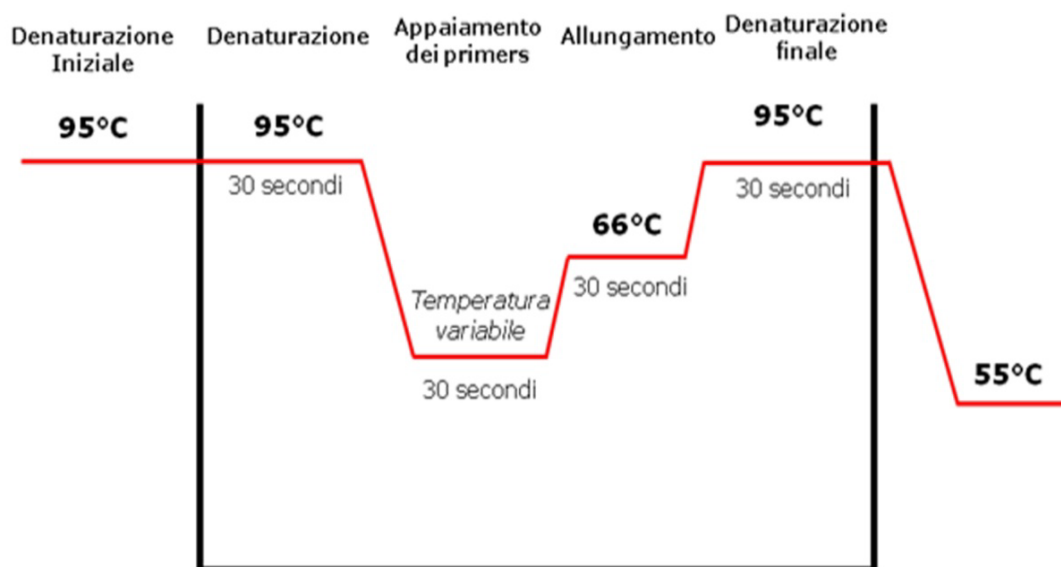


TABELLA 6.1

Temperatura	Descrizione del ciclo	Durata	Ripetizioni
95°C	Denaturazione iniziale	30 secondi	1 ciclo
95°C	Denaturazione	30 secondi	} 40 cicli
58°C	Appaiamento dei primers	30 secondi	
72°C	Allungamento	30 secondi	
<i>Lettura della fluorescenza (<b>Melting Curve</b>): innalzamento scalare della temperatura (fino a 90°C) con acquisizione della fluorescenza ogni 0,5°C per valutare la presenza di dimeri aspecifici.</i>			
95°C	Denaturazione finale	30 secondi	1 ciclo
55°C	Estensione finale		1 ciclo

### Analisi statistica.

**196** I dati di qRT-PCR sono stati normalizzati attraverso il metodo detto “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ”, dove per Ct s’intende il ciclo soglia, ovvero il ciclo in corrispondenza del quale si osserva il primo incremento rilevabile di fluorescenza, tenendo conto del background di fondo. Al termine della qRT-PCR viene opportunamente sistemata la CT line. Per ciascun campione è

stata poi normalizzata la misura del ciclo soglia (Ct) relativa al gene d'interesse utilizzando la formula  $\Delta Ct = Ct(\text{gene target}) - Ct(\text{gene housekeeping} = \text{GAPDH})$ . È stato poi calcolato il  $\Delta\Delta Ct$  come differenza fra il  $\Delta Ct$  del campione trattato e il  $\Delta Ct$  del controllo ( $\Delta\Delta Ct$  per il gene d'interesse =  $\Delta Ct$  (campione trattato) -  $\Delta Ct$  (controllo)).

La significatività statistica della variazione dei livelli di espressione dei geni di interesse, misurata nei campioni trattati rispetto ai controlli, è stata valutata sul  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  del [valore medio  $\pm$  S.D.] ottenuti in tre differenti esperimenti analizzati con il Test-*t* di Student's per evidenziare le differenze significative.

### Immunocitochimica.

**197** Le cellule PNT1a e PC-3 sono state seminate su vetrini portaoggetti (18 x 18 mm, precedentemente sgrassati con etanolo puro e sterilizzati) posti all'interno di capsule Petri da 35mm e trattati con le rispettive dosi di IC<sub>50</sub> del Poly-E. Come controlli positivi, dopo 24 ore di crescita, il mezzo di crescita è stato sostituito con mezzo fresco addizionato a Brefeldina A (15  $\mu\text{g/mL}$  per le cellule PNT1a e 30  $\mu\text{g/mL}$  per le cellule PC-3, per 24 ore) o con mezzo EBSS per 24 ore.

Allo scadere del trattamento il mezzo di crescita condizionato è stato rimosso ed i monostrati cellulari, dopo un lavaggio con Dulbecco's Phosphate-buffered Saline with calcium and magnesium (D-PBS), sono stati fissati con PFA 4% e permeabilizzati immergendo i vetrini coprioggetto in metanolo per 3 minuti a  $-20^\circ\text{C}$ . Dopo aver lasciato asciugare i vetrini all'aria, è stato effettuato un lavaggio di 10 minuti con D-PBS.

I siti immunoreattivi aspecifici sono stati bloccati incubando i vetrini 20 minuti a temperatura ambiente con horse serum blocking solution in camera umida. Al termine del blocco sono stati effettuati due lavaggi da 10 minuti con D-PBS addizionato di BSA 0.3% (w/v).

Per l'ibridazione sono stati utilizzati alcuni degli anticorpi primari descritti per l'analisi western blot, diluendoli 1:50 in D-PBS addizionato di BSA 3% (w/v), ed incubando i vetrini 1 ora a temperatura ambiente in camera umida. Dopo due lavaggi con D-PBS+BSA 0.3%, si è proceduto ibridando 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario fluorescente anti-mouse "Alexa Fluor™ 488" (Invitrogen) diluito 1:50 in D-PBS+BSA 3%. Tutti i passaggi seguenti sono stati effettuati mantenendo i vetrini al buio. Dopo due lavaggi con D-PBS+BSA 0.3% e uno con D-PBS, i nuclei sono stati colorati per 5 minuti a temperatura ambiente con DAPI 5% (4',6-diamidino-2-fenilindolo, Sigma-Aldrich) diluito 1:5000 in D-PBS, in camera umida.

I vetrini coprioggetto sono stati quindi lavati con D-PBS e montati con Mowiol (Sigma-Aldrich) su un vetrino portaoggetti da microscopia. I campioni così preparati sono stati visualizzati mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiovert 200 e le relative immagini digitali acquisite con videocamera a colori direttamente collegata al microscopio (AxioCam HRc, Zeiss).



**Soluzioni utilizzate:**

**Dulbecco's Phosphate-buffered Saline with calcium and magnesium (D-PBS):**  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,9 mM;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5 mM; KCl 2.7 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM; NaCl 137 mM ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM;

**Horse serum blocking solution:** 15  $\mu\text{L}$  horse serum (Sigma-Aldrich) in 1,3 mL di D-PBS 1X

**DAPI:** DAPI 5% (w/v) in D-PBS 1X

**Mowiol:** glicerolo 3% (w/v); mowiol 0,13% (w/v); 6 mL acqua; 12 mL Tris-HCl 0,2M pH 8.5.

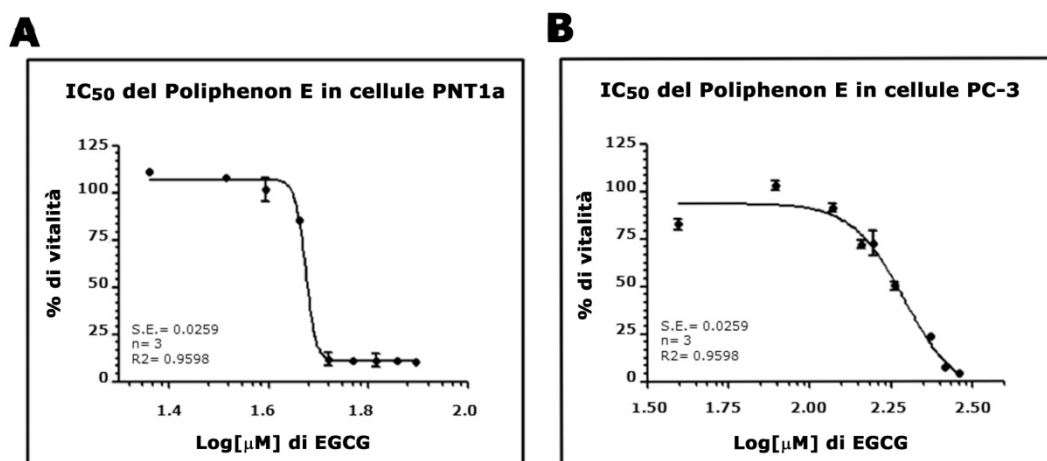


## 7

## RISULTATI

## Curva dose-risposta.

**198** Il trattamento di cellule PNT1a e PC-3 con concentrazioni crescenti di Poly-E (da 0 a 60  $\mu\text{g/mL}$  e da 0 a 220  $\mu\text{g/mL}$ , rispettivamente) somministrate nel mezzo di crescita per un tempo di 24 ore, comporta una inibizione della vitalità dose-dipendente (figura 7, pannelli A e B). Il valore di  $\text{IC}_{50}$  del Poly-E sull'attività della succinico deidrogenasi mitocondriale è pari 35  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente a 53,5  $\mu\text{M}$  di EGCG) per le cellule PNT1a e 145  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente a 221  $\mu\text{M}$  di EGCG) per le PC-3 dopo 24 ore di trattamento (vedi figura 7). Le  $\text{IC}_{50}$  così calcolate sono state impiegate nei successivi esperimenti.



**Tabella 1.** Dosi di Poliphenon-E® in grado di esercitare effetti inibitori sul metabolismo di linee cellulari umane immortalizzate di epitelio prostatico (PNT1a) e tumorali metastatiche di PCa (PC-3)

Linee cellulari	IC <sub>50</sub> * Poly E	
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{mol/L}^*$
<b>PNT1a</b>	<b>35</b>	<b>53.5</b>
<b>PC-3</b>	<b>145</b>	<b>221</b>

\*IC<sub>50</sub> concentrazione che causa il 50% di inibizione del metabolismo.  
 •Valore espresso come concentrazione di EGCG nel Polyphenon-E®.

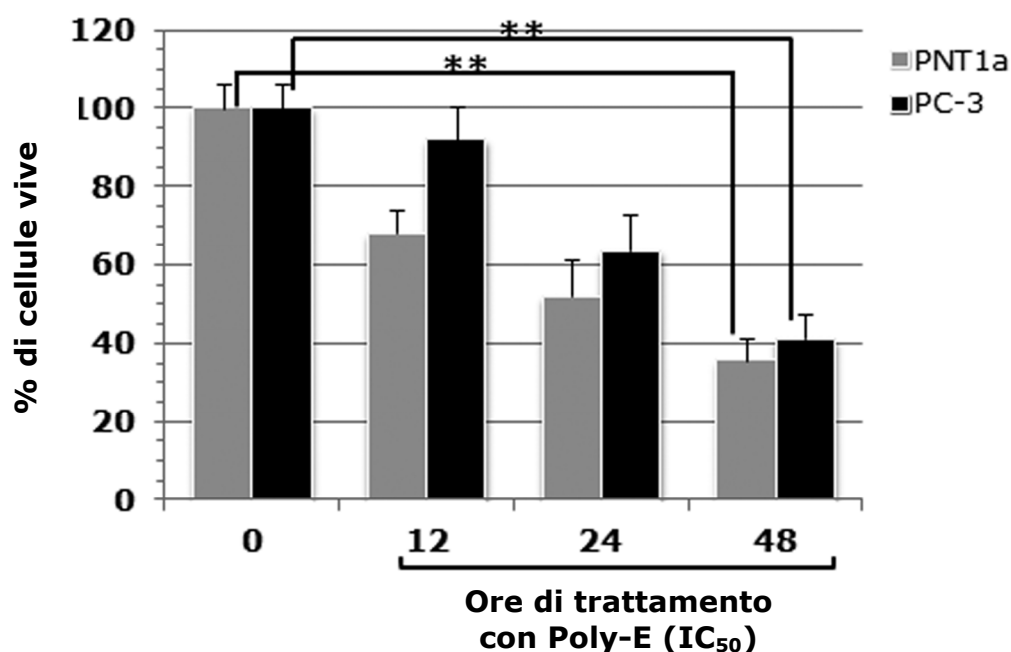
Figura 7 (didascalia nella pagina seguente).

**Figura 7. Curve dose risposta di cellule PNT1a e PC-3 trattate con Poly-E.**

Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di Poly-E e mantenute in incubatore umidificato al 5% di CO<sub>2</sub>. 24 ore dopo, l'attività metabolica cellulare è stata misurata attraverso l'uso del WST-1. L'IC<sub>50</sub> è stata calcolata utilizzando un'analisi di regressione lineare. Nella Tabella 1 sono indicati i valori di IC<sub>50</sub> di ciascuna linea cellulare espressi anche come concentrazione di EGCG.

**Conta vitale con Trypan Blue.**

**199** Le cellule PNT1a e PC-3, sono state in seguito trattate con la rispettiva dose IC<sub>50</sub> di Poly-E e, poi, contate a tempi prestabiliti dopo essere state colorate con il colorante Trypan Blue. Appare evidente come il Poly-E provoca un marcato aumento della percentuale di cellule morte. Il fenomeno è tempo-dipendente ed è significativo per entrambe le linee cellulari (vedi figura 7.1).

**Figura 7.1. Il trattamento con Poly-E risulta citotossico per cellule PNT1a e PC-3.**

Cellule PNT1a e PC-3, trattate con le rispettive dosi di Poly-E corrispondenti all'IC<sub>50</sub> per i tempi indicati, sono state raccolte dal substrato di crescita e risospese in una soluzione di Trypan Blue. L'osservazione al microscopio ottico è stata seguita dal conteggio delle cellule in una camera Bürker. Posta pari a 100 la vitalità delle cellule non trattate, i punti della curva descrivono la % di vitalità rispetto a cellule di controllo. I valori posti in grafico rappresentano la [media ± S.D.] di tre esperimenti indipendenti per ogni tempo sperimentale (\*\*= p<0.01).

### Analisi del ciclo cellulare.

**200** I risultati ottenuti mediante l'analisi del ciclo cellulare evidenziano come, nel caso delle cellule PNT1a, il trattamento con Poly-E induce un blocco significativo in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> alle 48 ore di trattamento nonché morte in maniera tempo-dipendente, con un aumento significativo del picco ipodiploide (da 1,7% a 10,6%, passando dalle 12 alle 24 ore di trattamento, figura 7.2, pannello A). In contemporanea è rilevabile un aumento complessivo dei debris cellulari (figura 7.2, pannello C ed E).

I risultati correlano con l'espressione proteica della ciclina D1 (figura 7.3, pannello A), coinvolta nel passaggio tra la fase G<sub>1</sub> ed S, la quale rimane sostanzialmente invariata rispetto al controllo e con l'aumento della p21, che regola la progressione del ciclo cellulare a livello del checkpoint tra le fasi G<sub>1</sub> ed S.

Gli effetti del Poly-E, alla corrispettiva IC<sub>50</sub>, su cellule PC-3, sono stati misurati tramite citofluorimetria a flusso agli stessi tempi sperimentali (figura 7.2, pannello B). I risultati mostrano un blocco significativo nella transizione tra G<sub>2</sub>/M alle 24 ore (dal 24% del controllo al 39%). Alle 48 ore il picco della popolazione G<sub>2</sub>/M si riduce, con un concomitante aumento della percentuale dei debris cellulari (figura 7.2, pannello D ed E), mentre rimane praticamente invariato il picco ipodiploide.

Anche in questo caso i risultati al citofluorimetro trovano corrispondenza con i profili di espressione proteica delle cicline (figura 7.3, pannello B). Il calo di espressione della ciclina D1 blocca le cellule PC-3 al check-point della fase G<sub>1</sub>/S ed anche il livello di espressione di p21 risulta diminuire.

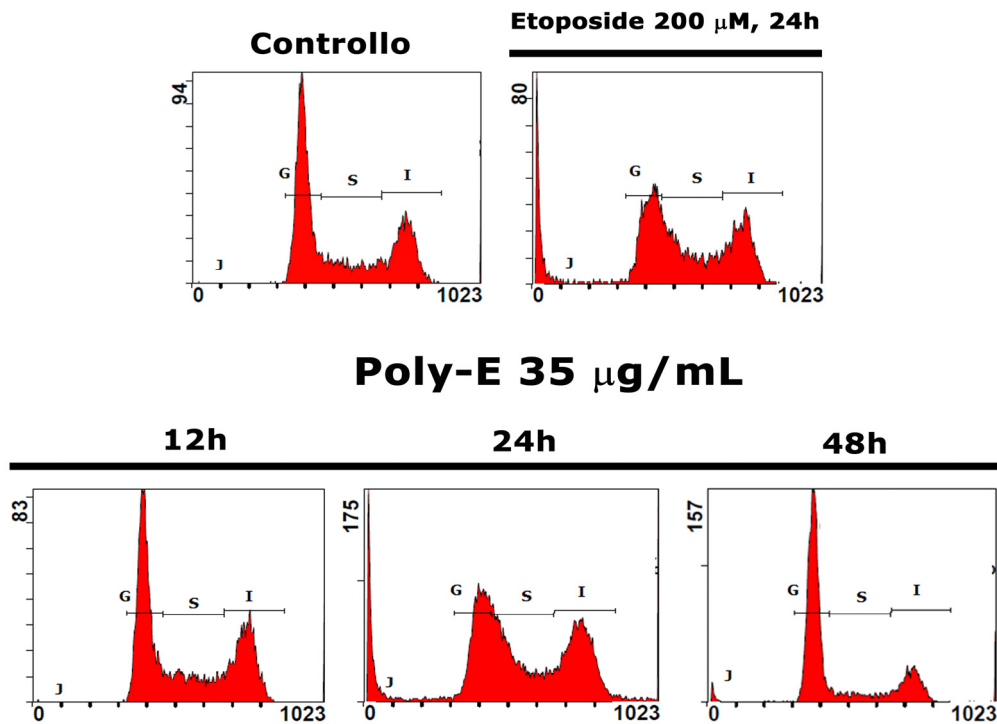
### DNA Laddering

**201** L'analisi di frammentazione del DNA indica che le cellule PNT1a trattate con dosi crescenti di Poly-E (17, 35 e 80 µg/mL) per 24 ore, oppure con la dose IC<sub>50</sub> per diversi tempi sperimentali (12, 24 e 48 ore), producono un aumento della frammentazione internucleosomiale ("smear") sia in caso del trattamento dose-dipendente che tempo-dipendente (figura 7.4, pannello A).

Nelle cellule PC-3 trattate allo stesso modo non è possibile apprezzare un significativo aumento della frammentazione del DNA rispetto ai controlli non trattati (figura 7.4, pannello B).

# PNT1a

# A



PNT1a + Poly-E 35 µg/mL	C	12h	24h	48h
G0/G1	45,80	43,50	34,90	60,50
S	21,35	24,65	25,80	21,30
G2/M	25,25	28,35	29,15	23,40
Cellule morte	2,25	1,70	10,60	3,95

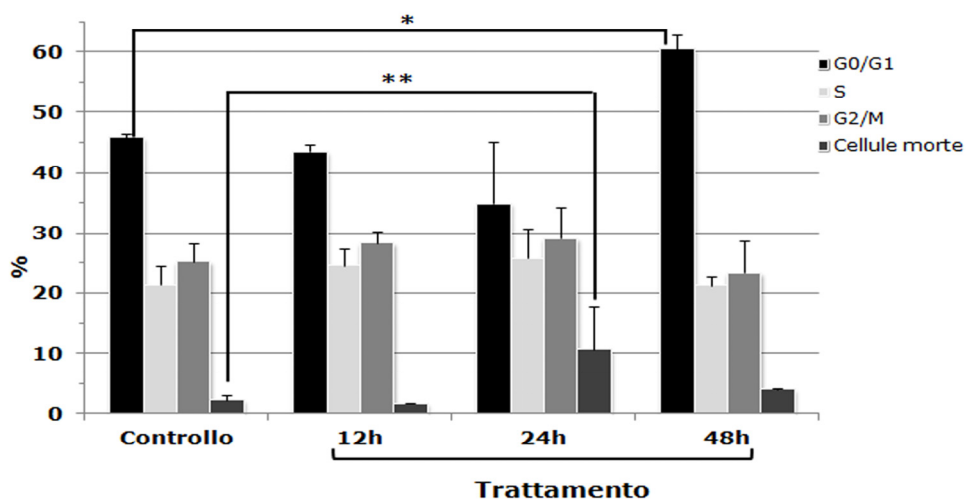
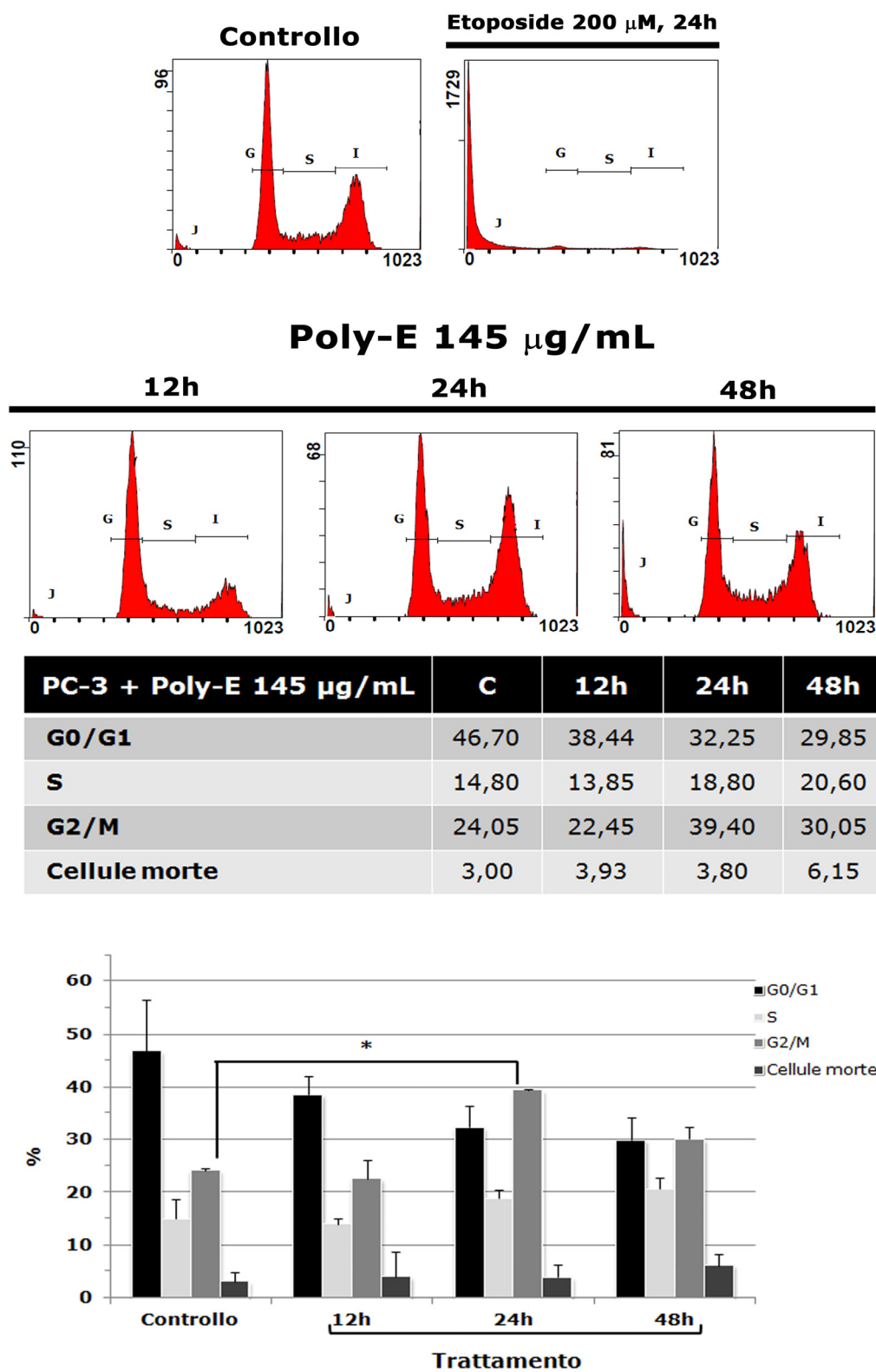


Figura 7.2, pannello A (vedi didascalia a pag. 227)

**PC-3****B**

**Figura 7.2, pannello B** (vedi discalia a pag. 227)

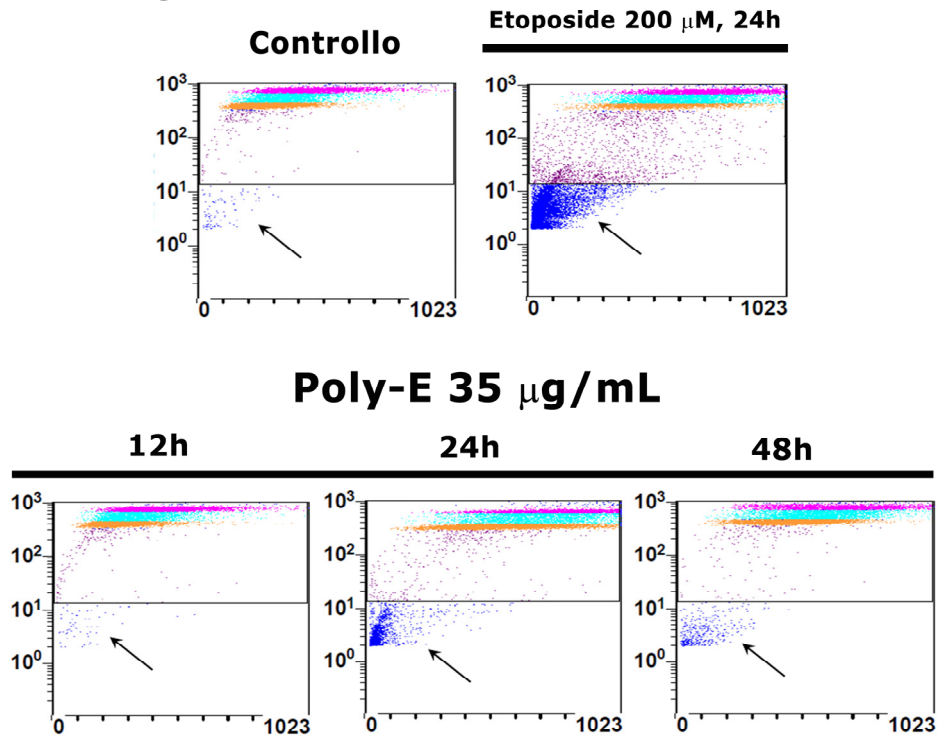
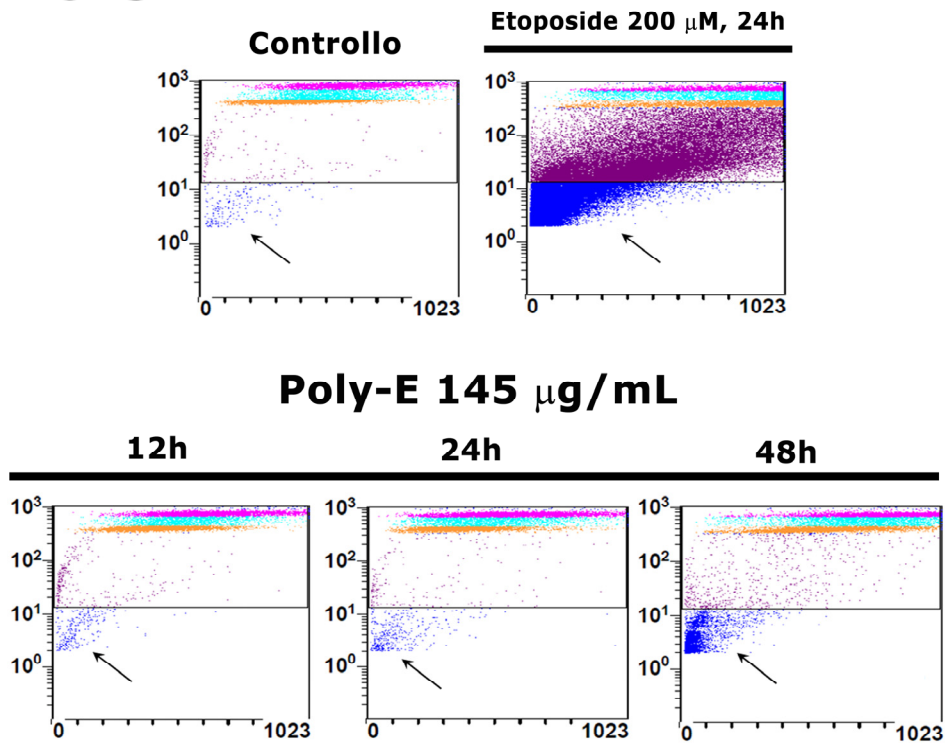
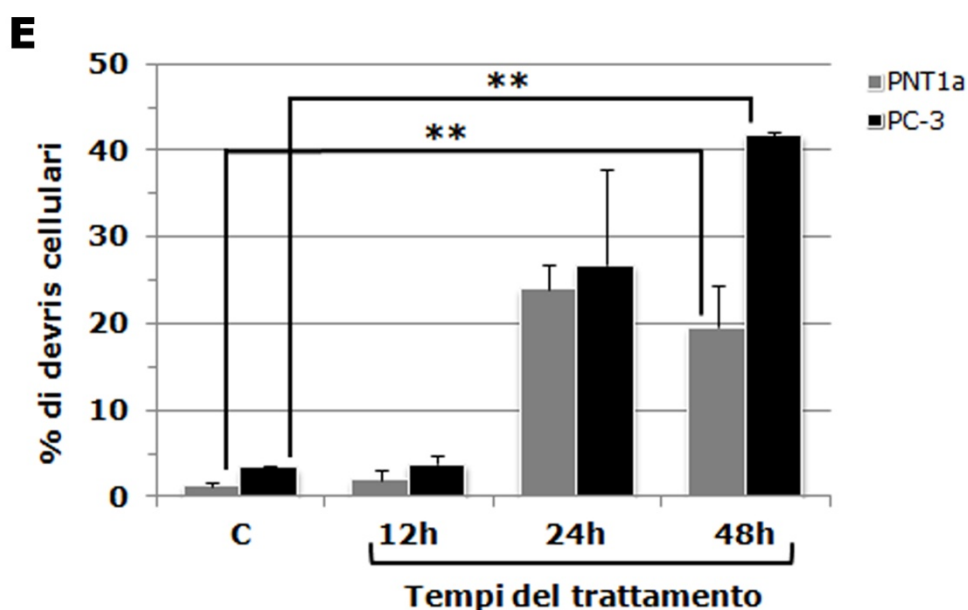
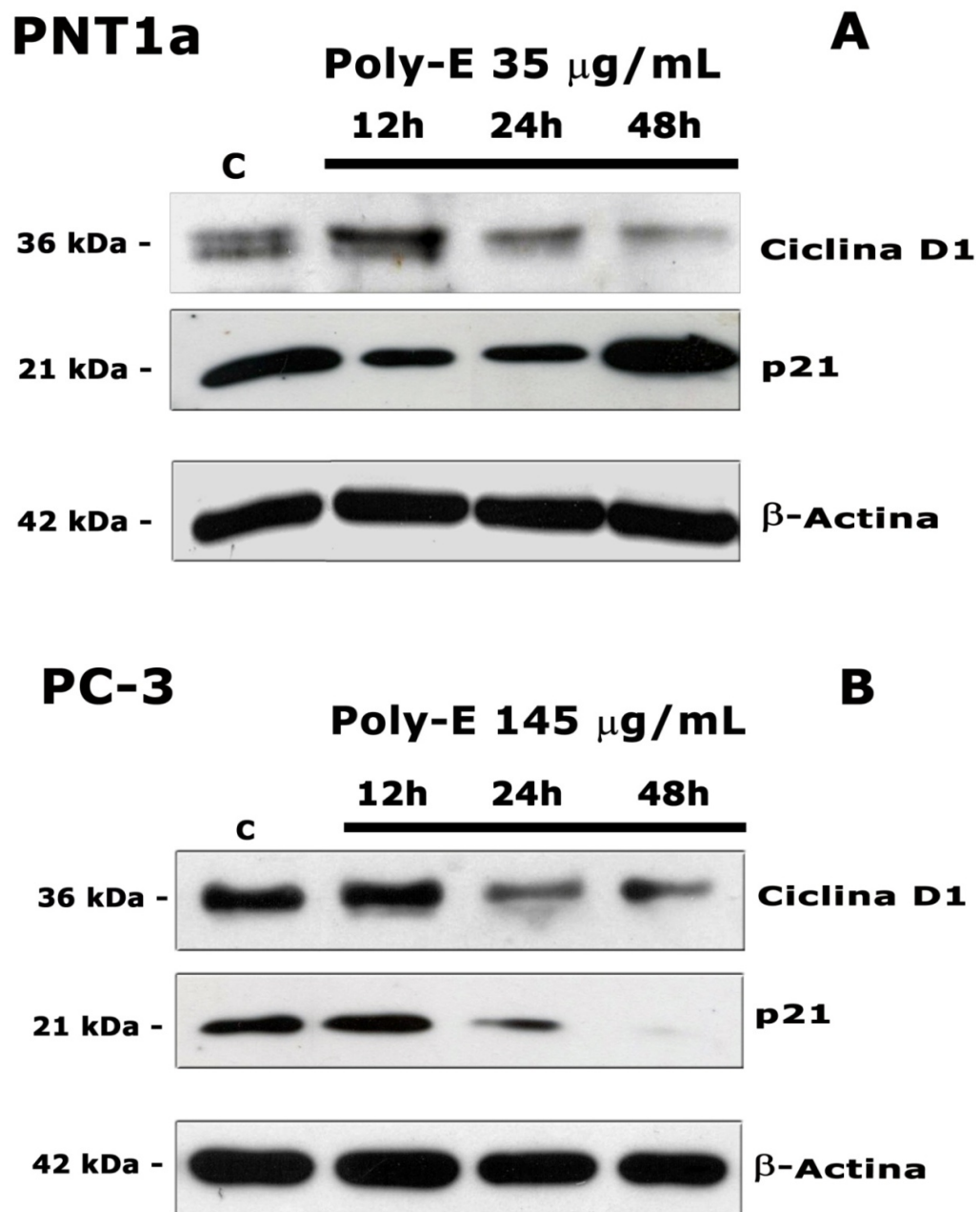
**PNT1a****C****PC-3****D**

Figura 7.2, pannello C e D (vedi didascalia a pag. 227)

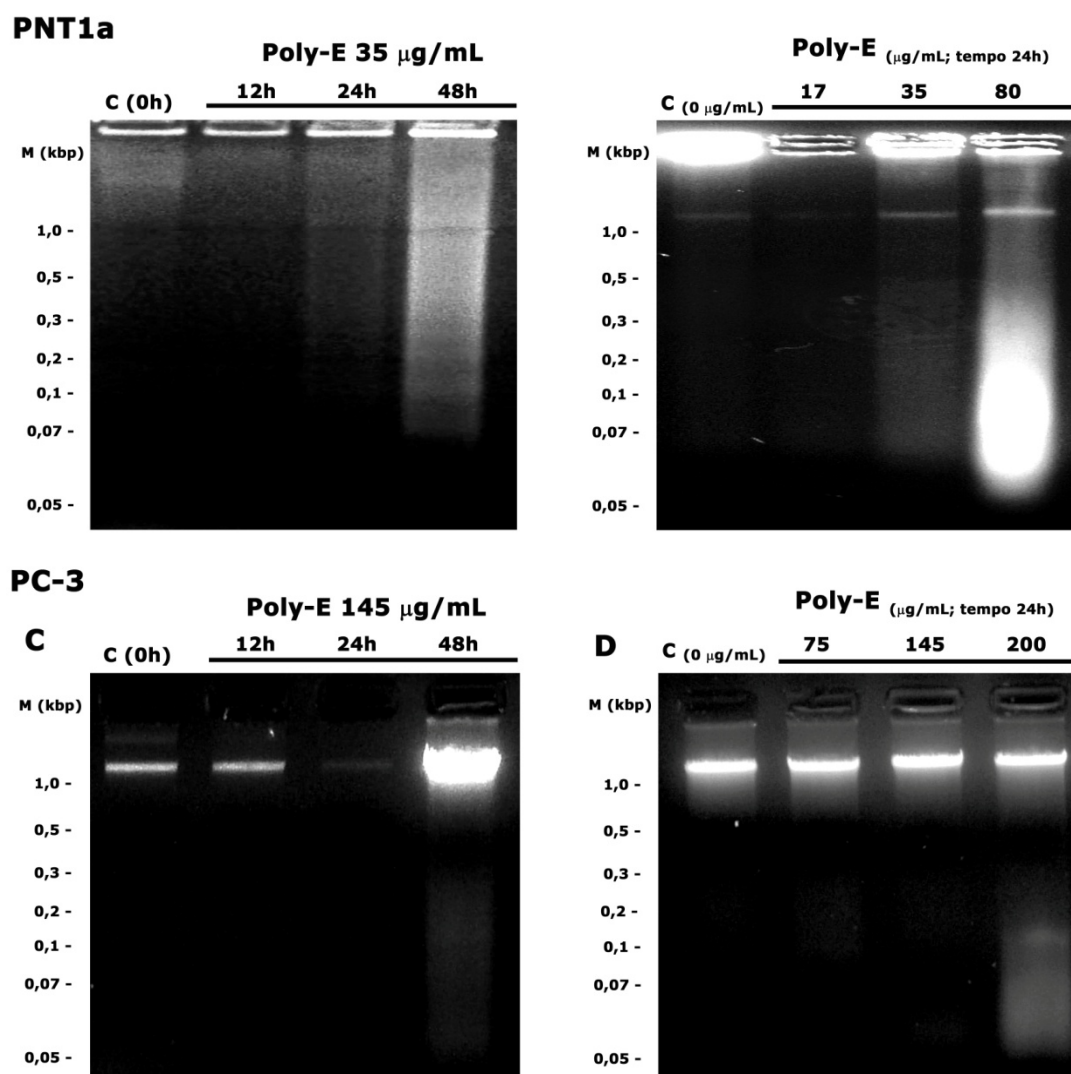




**Figura 7.2 (pannelli A, B, C, D ed E). Il Poly-E esercita un effetto citostatico bloccando le cellule PNT1a e PC-3 in diverse fasi del ciclo e causando accumulo di "debris" cellulari.** Le cellule PNT1a e PC-3 sono state trattate, rispettivamente, con la dose corrispondente all'IC<sub>50</sub> di Poly-E ai tempi indicati, lavate, raccolte ed il pellet risospeso in una soluzione di Ioduro di Propidio per l'analisi citofluorimetrica. Nei pannelli A e B sono mostrati, in alto, gli istogrammi derivanti dall'analisi del ciclo cellulare. La percentuale di eventi, distribuiti nelle fasi sub-G1, G1/G0, S ed G2/M, della popolazione cellulare in esame è stata calcolata usando il software CellFIT (Bencton Dickinson) e riportata in un grafico a barre. Le frecce nei pannelli C e D indicano la presenza di un aumento di "debris" cellulari in entrambe le popolazioni esaminate che risultano significativi come si evince dal grafico a barre nel pannello E. Come controllo positivo si sono utilizzate le stesse linee cellulari trattate con Etoposide 200  $\mu$ M ai tempi indicati. Le immagini del ciclo cellulare qui riportate sono quelle di un esperimento rappresentativo ripetuto tre volte con risultati simili. In maniera analoga, i dati utilizzati per lo sviluppo dei grafici sono rappresentativi della media di tre repliche sperimentali  $\pm$  S.D. per ogni tempo di trattamento (\* =  $p < 0.05$  \*\* =  $p < 0.01$ )



**Figura 7.3. Il trattamento con Poly-E determina un differente livello di espressione di alcune proteine chiave coinvolte nel ciclo cellulare.** Le cellule PNT1a (pannello A) e PC-3 (pannello B) sono state incubate con Poly-E alla dose e per i tempi indicati ed il lisato cellulare è stato analizzato mediante western blot con anticorpi anti-Ciclina D1 e anti-p21. Il controllo di caricamento è stato verificato con anticorpo anti- $\beta$ -actina.



**Figura 7.4. Frammentazione internucleosomiale del DNA in cellule PNT1a e PC-3 a seguito della somministrazione di Poly-E.** Le linee cellulari PNT1a (pannello A) e PC-3 (pannello B) sono state trattate alle dosi ed ai tempi indicati, il DNA isolato come descritto in "Materiali e Metodi" e sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio. Il DNA è stato poi visualizzato su un transilluminatore UV mediante colorazione con etidio bromuro. Nelle PNT1a si nota una frammentazione internucleosomiale che è dose e tempo dipendente, mentre nelle cellule PC3 compare una frammentazione parziale e solo con la dose più elevata di Poly-E.

#### Analisi morfologica al microscopio a fluorescenza.

**202** La morfologia delle linee cellulari PNT1a e PC-3 è stata osservata, mediante microscopia in contrasto di fase, dopo la somministrazione delle rispettive  $IC_{50}$  di Poly-E per 24 ore. Come mostrato in figura 7.5 entrambe le linee cellulari tendono a perdere la propria tipica morfologia, epitelioida per le PNT1a (immagine B) e fibroblastica con presenza di

pseudopodi in PC-3 (immagine D) a differenza dei rispettivi controlli (immagine A e immagine C).

Nel caso delle PNT1a le cellule appaiono globose, con un grosso nucleo e dalla membrana lievemente frastagliata. Nel tempo, si assiste alla perdita progressiva di aderenza al substrato di crescita e distacco, a seguito di un graduale arrotondamento delle cellule che divengono sferiche, con un nucleo eccentrico picnotico. Non è raro osservare corpi galleggianti riuniti in ammassi.

Diverso destino subiscono le cellule PC-3. Il trattamento porta alla formazione di cellule giganti, con perdita degli pseudopodi, sostituiti da corte estroflessioni citoplasmatiche che rendono frastagliato il margine cellulare. Alcune cellule sono polinucleate, probabile risultato di una mitosi aberrante (comunque tipica di questa linea tumorale) che non porta a segregazioni e citodieresi.

In entrambe le linee cellulari è apprezzabile la comparsa, nel citoplasma, di vacuoli tondeggianti, concentrati soprattutto nella zona peri-nucleare. Mentre nel caso di cellule PNT1a questi appaiono come un “merletto traforato” costituito da elementi di piccole dimensioni, nelle PC-3 compaiono pochi vacuoli di medie/grosse dimensioni.

#### **Colorazione con Arancio di Acridina ed Immunocitochimica.**

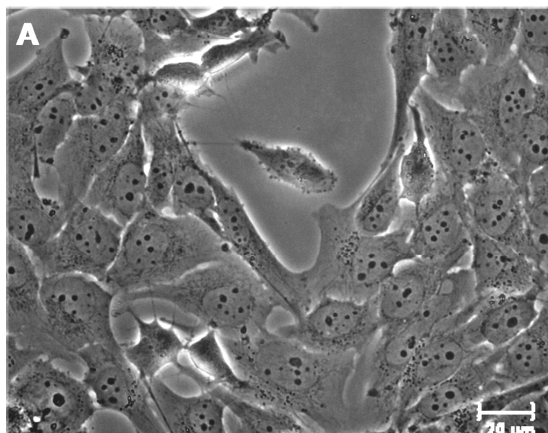
**203**

Per indagare la natura dei vacuoli citoplasmatici cellule PNT1a e PC-3 sono state colorate con una soluzione di Arancio di Acridina (AO) dopo la somministrazione delle rispettive dosi  $IC_{50}$  di Poly-E per 24 ore. I controlli positivi sono stati ottenuti sostituendo il mezzo di crescita di cellule non trattate con EBSS.

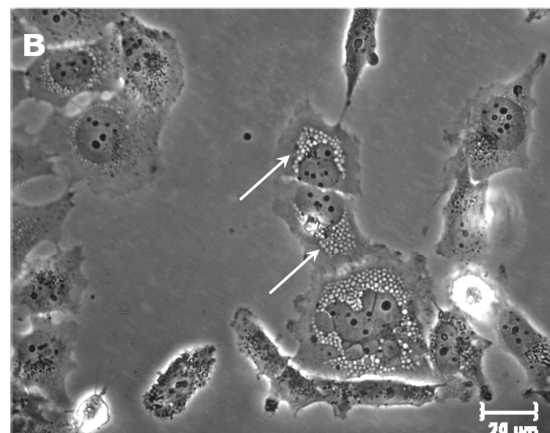
La figura 7.6 indica chiaramente, sia in cellule PNT1a (immagini A e C) che in PC-3 (immagini B e D), una formazione di vescicole autofagiche modesta che comunque non colocalizza con i vacuoli indotti dal trattamento con Poly-E e visibili nell'immagine come serie di fori neri. Questo trova conferma nel grafico in figura 7.6, dove la percentuale di cellule PNT1a e PC-3 marcate dall'AO è significativamente inferiore rispetto al controllo positivo trattato con EBSS.

## PNT1a

Controllo

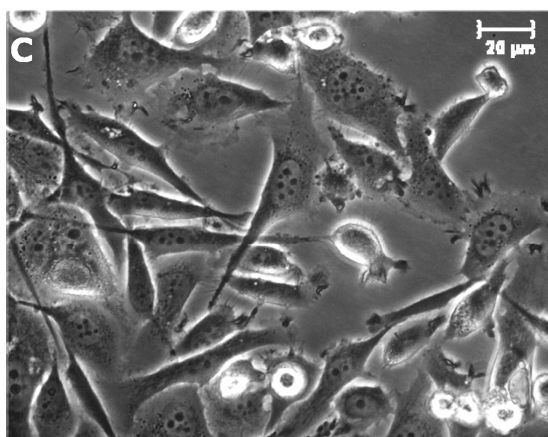


Poly-E 35 μg/mL, 24h

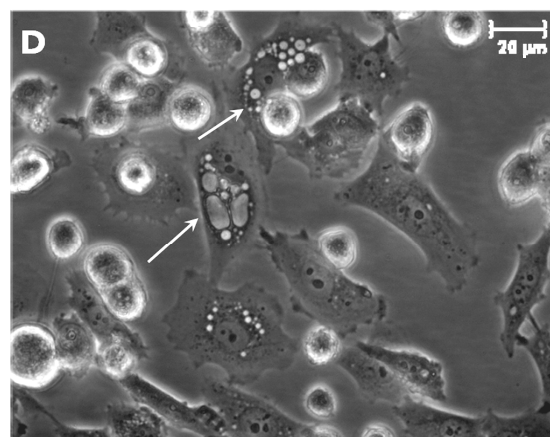


## PC-3

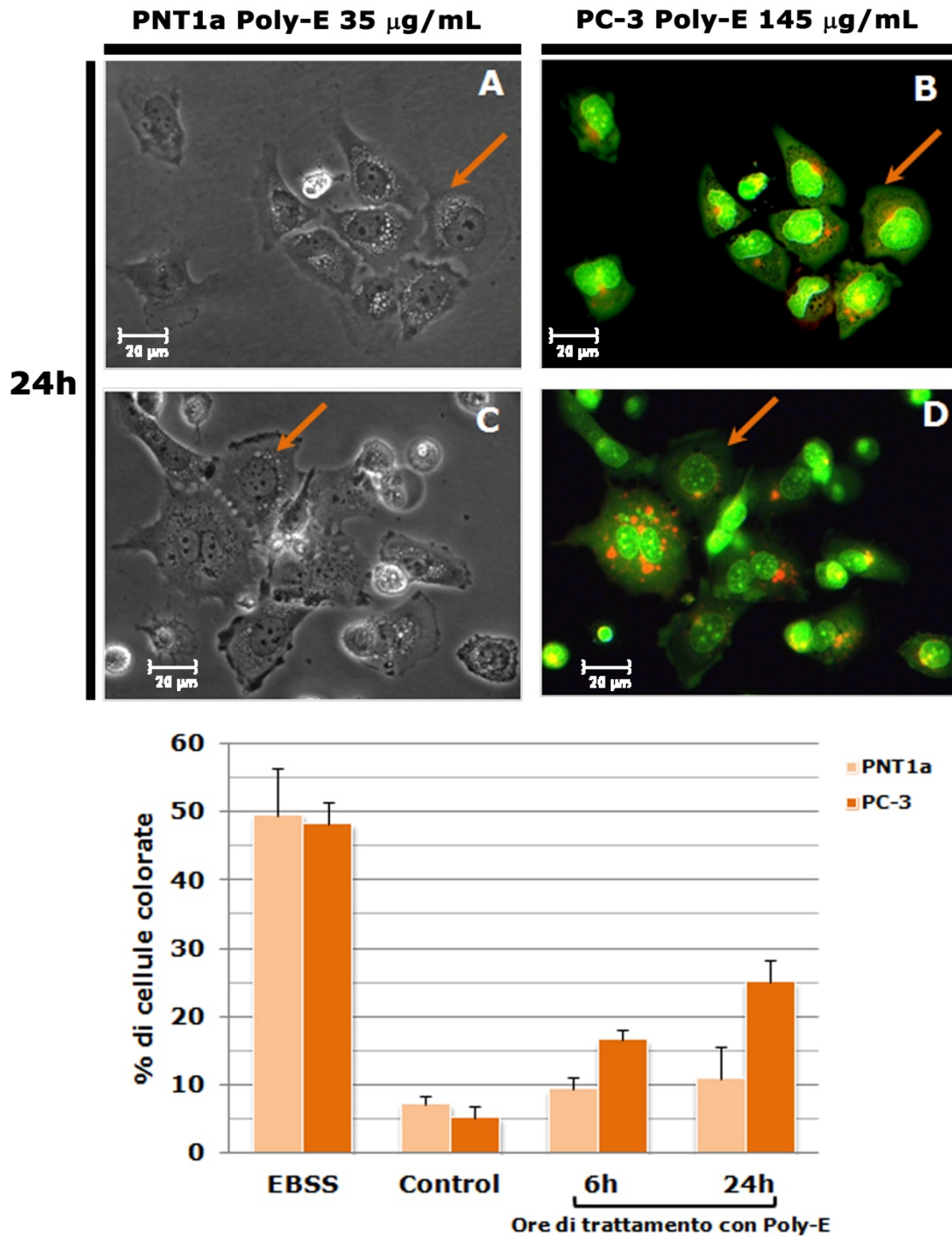
Controllo



PolyE 145 μg/mL, 24h



**Figura 7.5. Il Poly-E induce evidenti alterazioni morfologiche in PNT1a e PC-3.** Cellule PNT1a e PC-3 sono state trattate con dosi di Poly-E corrispondenti all'IC<sub>50</sub> per i tempi indicati, allo scadere dei quali le colture sono state osservate al microscopio per la valutazione morfologica. Le frecce bianche indicano i vacuoli comparsi nel citoplasma. Le immagini sono state acquisite in contrasto di fase, con un ingrandimento 20X.



**Figura 7.6. La marcatura con Arancio di Acridina (AO) non co-localizza significativamente con i vacuoli citoplasmatici in cellule PNT1a e PC-3 trattate con Poly-E.** Le cellule PNT1a (immagini A-C) e PC-3 (immagini B-D) sono state esposte a Poly-E per 24 ore (mentre i rispettivi controlli positivi sono stati mantenuti in mezzo EBSS per lo stesso tempo), colorate con una soluzione di AO disciolto nel mezzo di crescita e lavate, monitorando lo sviluppo di fluorescenza attraverso un microscopio a fluorescenza. Sulla colorazione verde di fondo si riflette la colorazione arancio brillante dei vacuoli acidi, autofagici e non. È stata

quantificata la percentuale, sul totale della popolazione cellulare, marcata con AO. I dati in tabella sono rappresentativi della [media  $\pm$  S.D.] di tre repliche sperimentali indipendenti (ingrandimento 20X).

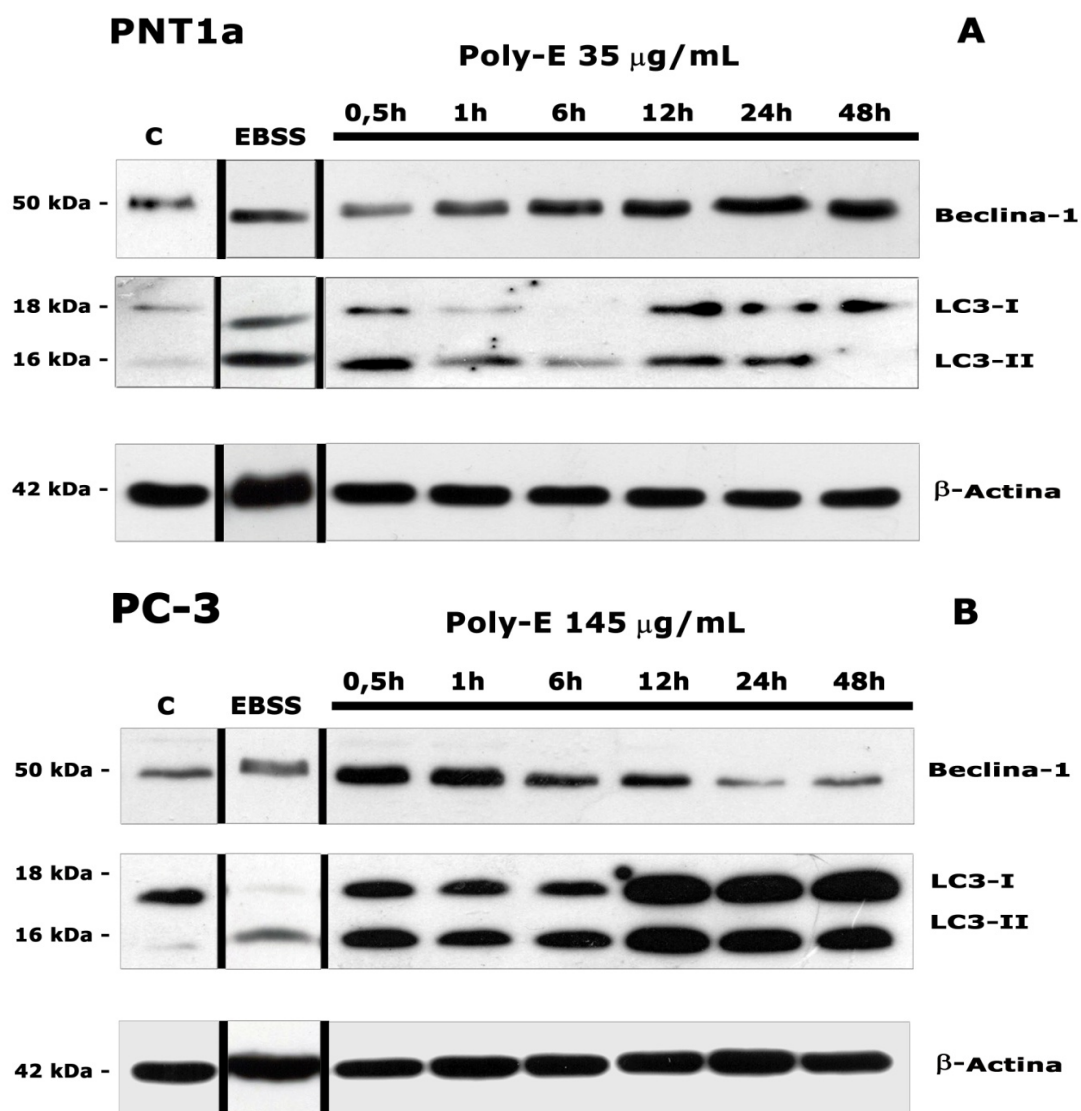
I risultati ottenuti mediante colorazione con AO sono stati convalidati dall'analisi western blot di LC3 e Beclina-1 e dalla immunocitochimica indiretta.

In cellule PNT1a (figura 7.7, pannello A) la conversione di LC3-I in LC3-II è chiara nel controllo positivo (cellule PNT1a cresciute in EBSS per 48 ore), così come l'aumento del livello proteico di Beclina-1. Nelle cellule trattate con Poly-E si rileva solo un lieve incremento di Beclina-1 associato all'aumento della interconversione di LC3-I nella forma coniugata a lipidi LC3-II in tempi precoci (tra le 0.5 e le 6 ore di trattamento) che è indice di comparsa di vescicole autofagiche; tale fenomeno si arresta dopo le 6 ore e fino alle 48 ore di trattamento.

Una conferma di questo dato si ottiene dall'esperimento di monitoraggio della proteina LC3 mediante immunofluorescenza. Nelle cellule PNT1a, il trattamento con EBSS comporta un evidente aumento della fluorescenza a una localizzazione cellulare di LC3, tipico di una cellula nella quale è attivo il processo autofagico (figura 7.8, immagine B) mentre, in cellule trattate con Poly-E, il fenomeno è marginalmente rilevabile solo alle 6 ore. Questi dati sono in accordo anche con i risultati delle western blot.

In cellule PC-3 la beclina-1 subisce un decremento di media entità anche se dobbiamo ricordare come, in molti tumori tra cui il PCa, tale proteina si presenta mono-allelicamente deleta in maniera frequente (figura 7.7, pannello B).

Per quel che riguarda la proteina LC3, ad eccezione del controllo positivo, dove è visibile una interconversione di LC3-I in LC3-II, non è rilevabile alcuna attività autofagica significativa. Si assiste infatti al concomitante aumento di entrambe le forme LC3-I e LC3-II che, di per sé, non costituisce prova di autofagia in atto. Il risultato trova conferma anche in analisi immunocitochimica dove il numero e l'intensità delle fluorescenza delle vescicole verdi non subisce una significativa variazione rispetto al controllo positivo (figura 7.9, immagini F-G).

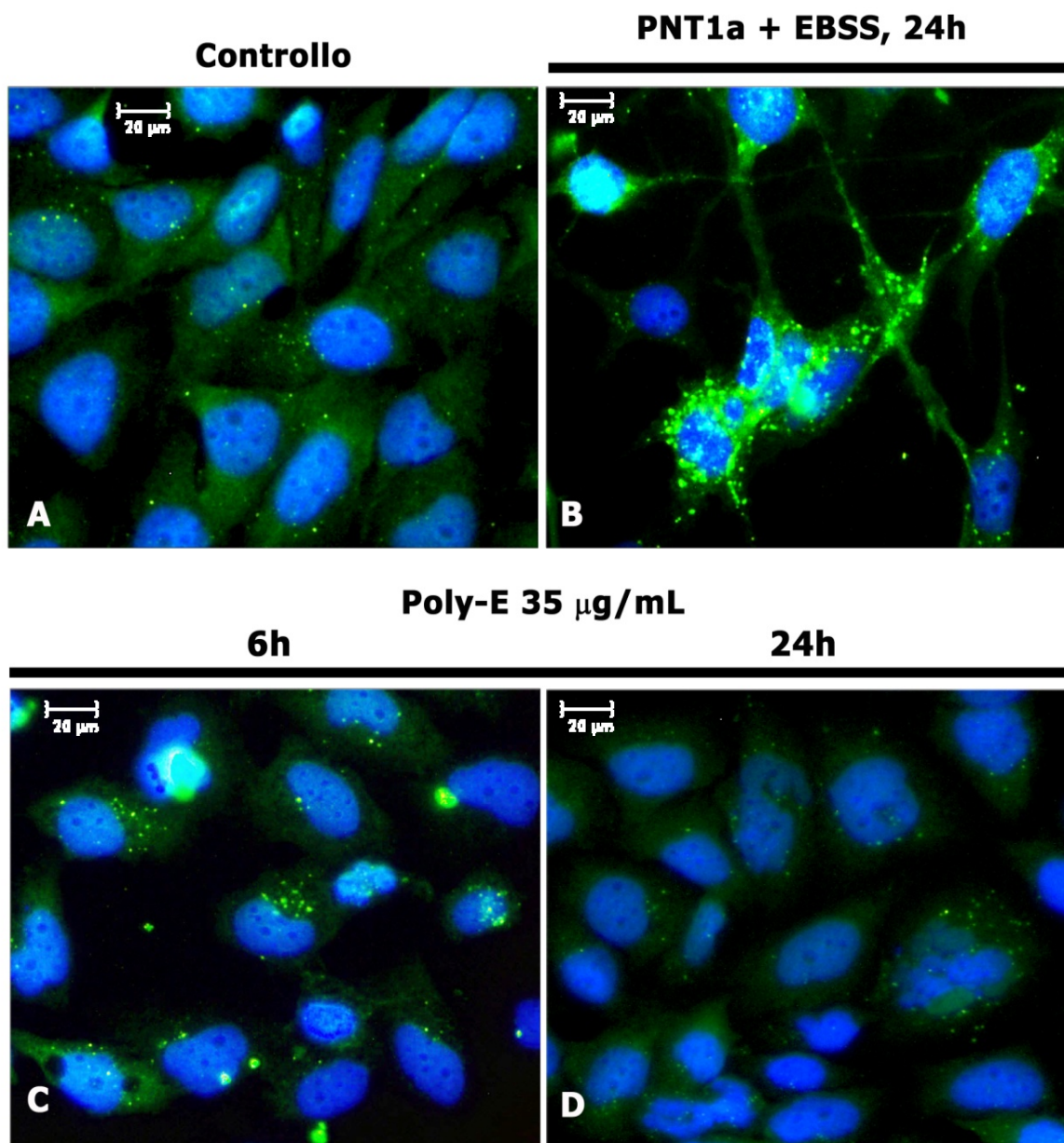


**Figura 7.7. Effetti del Poly-E sul clivaggio del marcatore di autofagia LC3.**

Le cellule PNT1a (pannello A) e PC-3 (pannello B) sono state incubate con Poly-E alla dose e per i tempi indicati in figura. Il lisato cellulare è stato analizzato mediante western blot per riscontrare la presenza di marker di autofagia classici con anticorpi anti-Beclina-1 e anti-LC3B mentre il controllo di caricamento è stato verificato con anticorpo anti- $\beta$ -actina. LC3-I è la forma non coniugata di LC3B ed LC3-II la forma coniugata ai lipidi. Al contrario delle cellule PNT1a (pannello A), nelle PC-3 il livello di Beclina-1 diminuisce progressivamente nel tempo (pannello B). Così come accade nei controlli positivi (cellule trattate con EBSS le cui proteine provengono da altre membrane e, per questo, le bande relative sono state divise dalle altre dalla presenza di margini) sia in cellule PNT1a (pannello A) che PC-3 (pannello B) il trattamento con Poly-E causa un accumulo di LC3 coniugato rispetto ai controlli non trattati, sebbene l'evento sia marginalmente significativo solo nell'ambito delle cellule PNT1a.

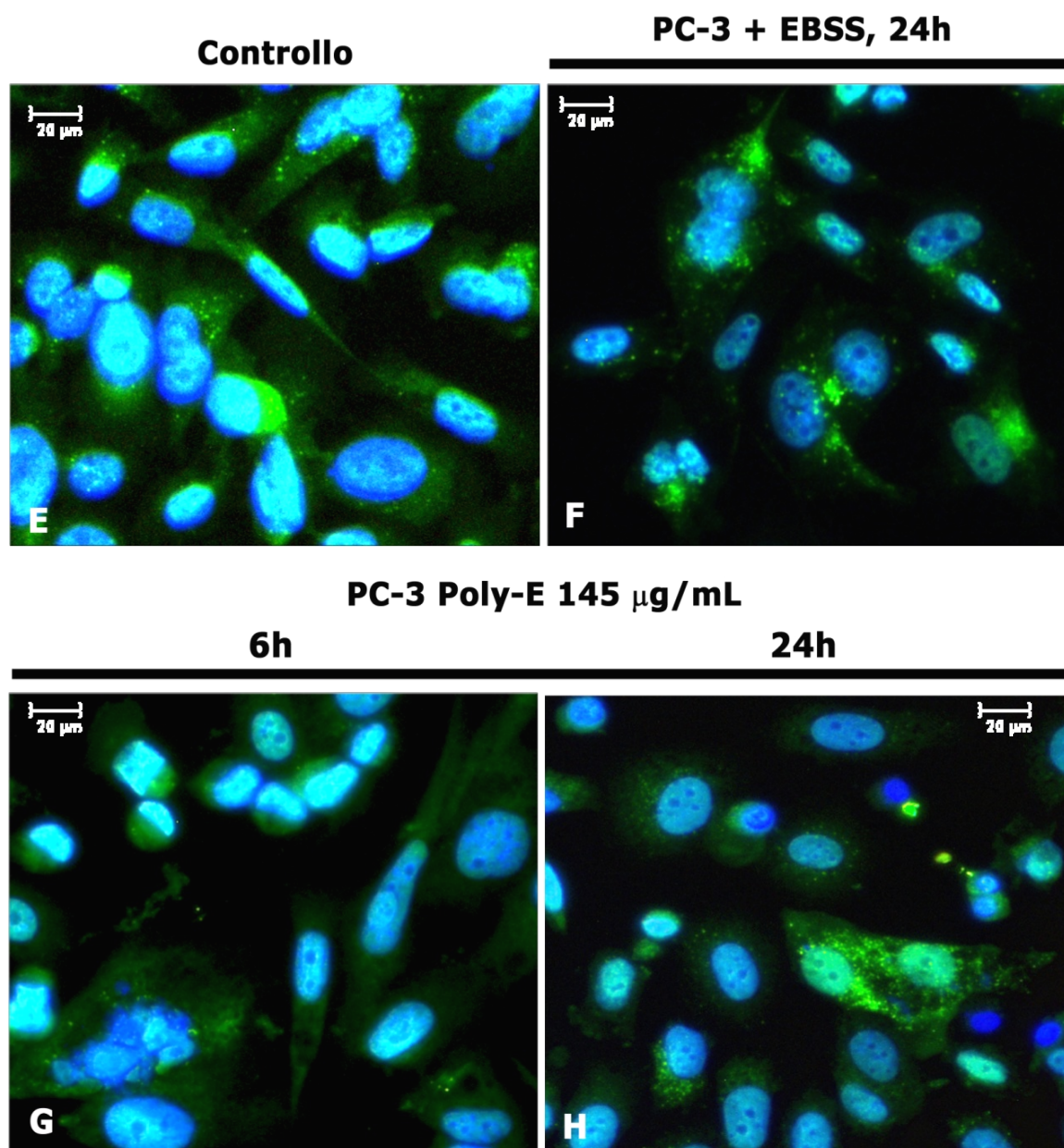


# PNT1a



**Figura 7.8. Comparsa di vacuoli autofagici in cellule PNT1a dopo la somministrazione di Poly-E.** Le cellule PNT1a sono state trattate per 6 (immagine C) e 24 ore (immagine D) con la rispettiva  $IC_{50}$  di Poly-E o sostituendo il mezzo di crescita con mezzo EBSS per 24 ore, in modo da privarle di nutrienti e indurre la formazione delle vescicole autofagiche (immagine B). Allo scadere dei tempi previsti, la coltura cellulare è stata analizzata, tramite immunocitochimica, con anticorpo anti-LC3 e contro-colorazione dei nuclei con DAPI, acquisendo le immagini tramite microscopio a fluorescenza ad un ingrandimento 20X. Nell'immagine A, compaiono le cellule di controllo non trattate.

# PC-3



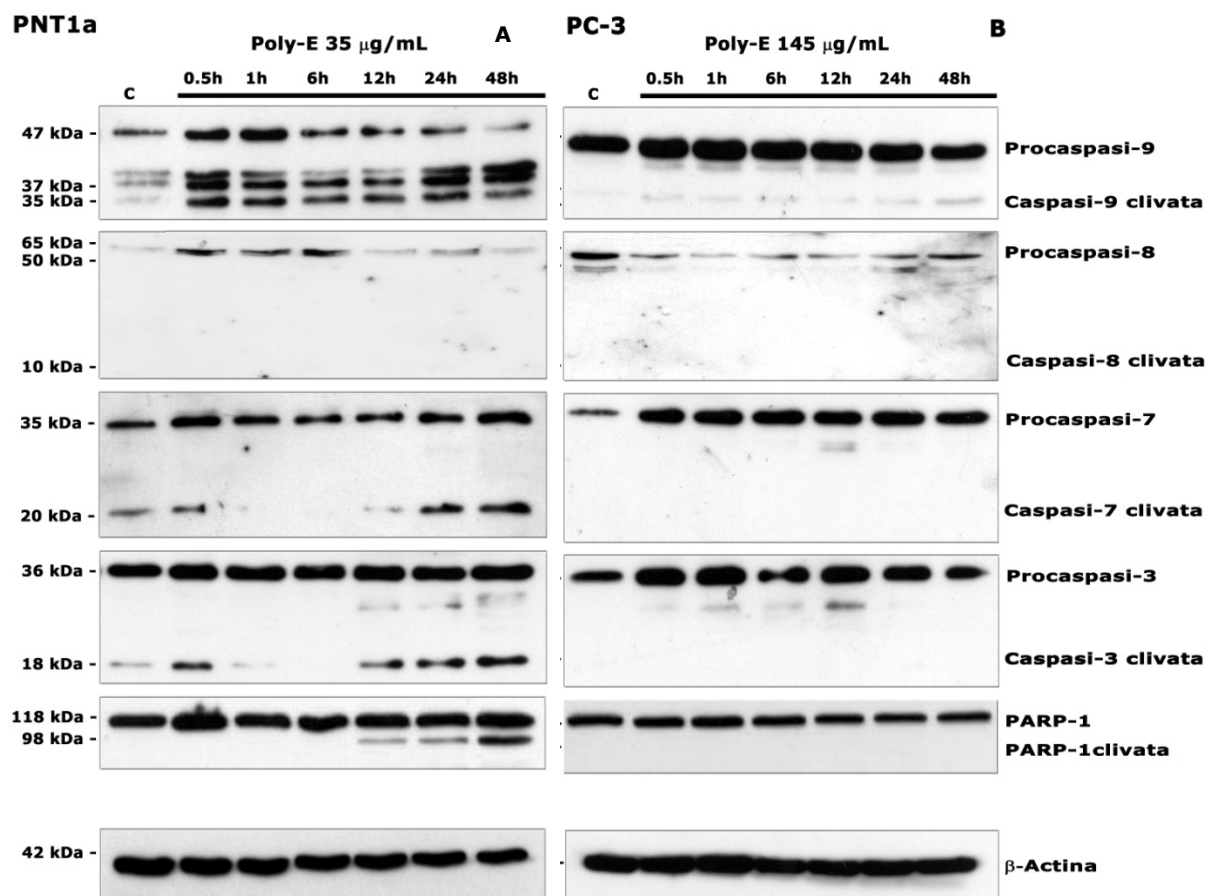
**Figura 7.9. Il Poly-E non induce la formazione di vacuoli autofagici in cellule PC-3.** Le cellule PC-3 sono state trattate per 6 (immagine G) e 24 ore (immagine H) con la rispettiva  $IC_{50}$  di Poly-E o sostituendo il mezzo di crescita con mezzo EBSS per 24 ore in modo da privarle di nutrienti e indurre la formazione delle vescicole autofagiche (immagine F). Allo scadere dei tempi previsti, la coltura cellulare è stata poi analizzata, tramite immunocitochimica, con anticorpo anti-LC3 e contro-colorazione dei nuclei con DAPI, acquisendo le immagini tramite microscopio a fluorescenza ad un ingrandimento 20X. Nell'immagine A, compaiono le cellule di controllo non trattate.

### Analisi western blot di caspasi iniziatrici ed esecutrici ed analisi morfologica con colorazioni vitali al microscopio confocale al laser.

**204** Sono stati analizzati gli effetti dell'incubazione con Poly-E alla  $IC_{50}$  per 48 ore in cellule PNT1a e PC-3, caratterizzando l'eventuale attivazione del percorso apoptotico attraverso i livelli di espressioni delle pro-caspasi-9, -8, -7 e -3 e le relative forme clivate attive, nonché della PARP-1 attraverso analisi western blots. Le cellule DU145, trattate con Etoposide 200 e 400  $\mu$ M sono state utilizzate come controllo positivo di apoptosi (figura 7.10, pannello C).

I risultati riportati in figura 7.10 mostrano come, per cellule PNT1a (pannello A), ogni step del programma di morte cellulare mediato dalla caspasi-9 sia in fase di esecuzione mentre non si verifica, in queste condizioni sperimentali, l'attivazione della caspasi-8. L'analisi western blot indica inoltre come, già a tempi precoci, il trattamento con Poly-E è sufficiente per indurre il clivaggio della caspasi-9 ma non la proteolisi della PARP-1, fenomeno che diventa evidente a partire dalle 12 ore.

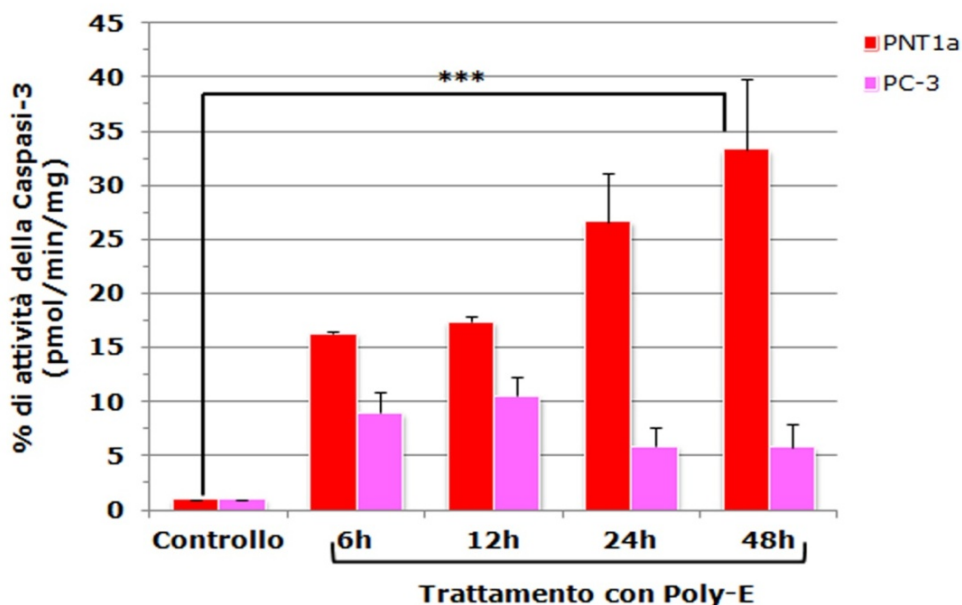
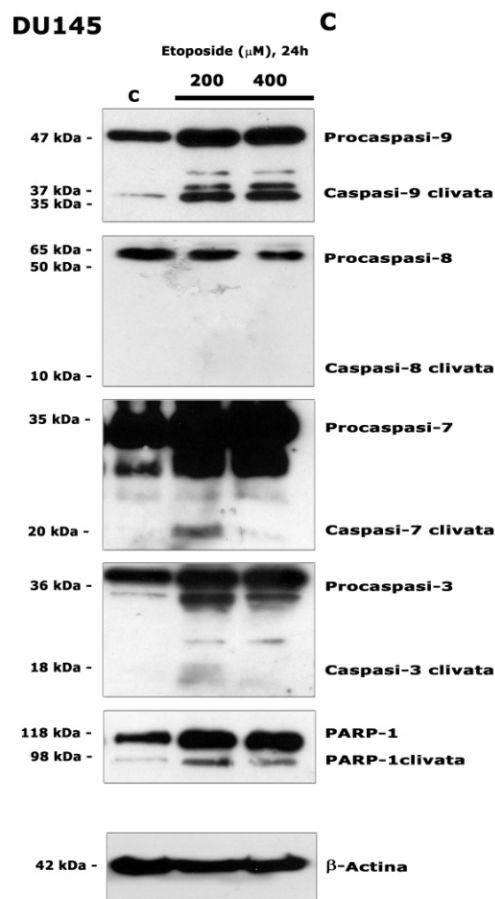
Nel caso delle cellule PC-3 si presenta un'anomala situazione in cui compare l'attivazione della caspasi-9 cui non segue la cascata di attivazione delle caspasi esecutrici (-3 e -7) e nemmeno della PARP-1 (figura 7.10, pannello B). Anche in questo caso la caspasi-8 non viene attivata.



**Figura 7.10, pannelli A e B** (vedi didascalia pagina seguente).

**Figura 7.10 (pannelli A, B e C). Il trattamento con Poly-E induce morte per apoptosi nelle cellule PNT1a.** Le cellule PNT1a (pannello A) e PC-3 (pannello B) sono state incubate con Poly-E alla dose e per i tempi indicati ed il lisato cellulare è stato analizzato mediante western blot con anticorpi diretti contro le principali caspasi iniziatrici (anti-caspasi-7, -8, 9) ed esecutrici (anti-caspasi-3). Il controllo di caricamento è stato verificato con anticorpo anti- $\beta$ -actina. Nel pannello C è riportato un controllo positivo di apoptosi, ossia cellule DU145 trattate con Etoposide (ETO).

I dati sono confermati quantitativamente dall'analisi di attività della caspasi-3 (figura 7.11) in cui si nota un aumento significativo tempo-dipendente dell'attività in cellule PNT1a mentre il livello rimane basale per le cellule PC-3.



**Figura 7.11. L'attività della caspasi-3 è significativamente aumentata in cellule PNT1a a seguito della somministrazione di Poly-E.** La percentuale di cellule positive all'attività della caspasi-3 è stata misurata con Ac-DEVD-pNa, utilizzando un test colorimetrico su estratto proteico totale. I dati in tabella sono rappresentativi della media di tre repliche sperimentali  $\pm$  S.D. per ogni tempo di trattamento (\*\*\*) =  $p < 0.001$ )

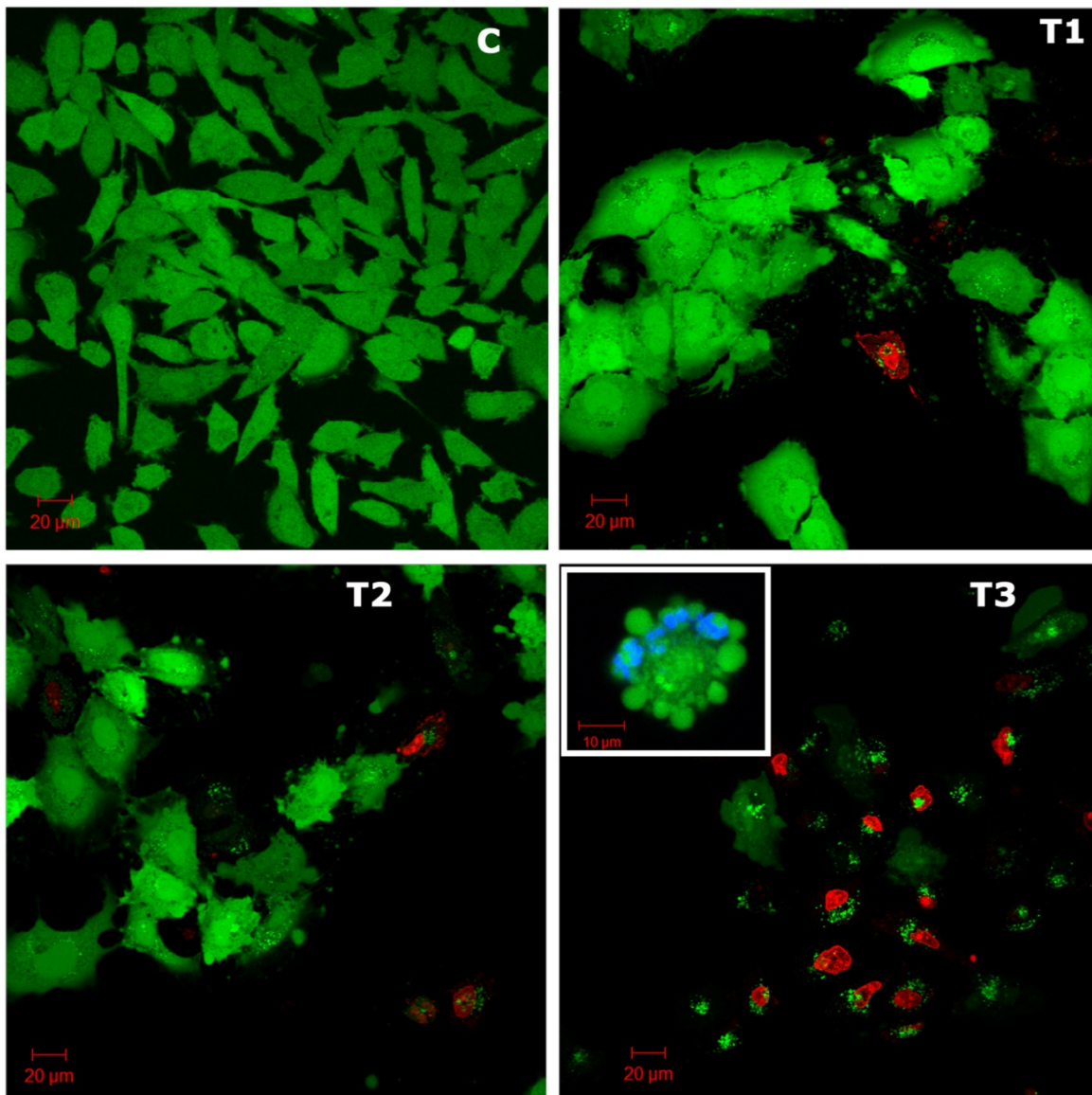
Per indagare nel dettaglio le modificazioni morfologiche a seguito dell'effetto citotossico del Poly-E, cellule PNT1a e PC-3 sono state osservate al microscopio confocale al laser dopo una colorazione vitale con Calceina e Propidio Ioduro (PI) e con Calceina, PI e Draq 5.

Il comportamento delle due linee cellulari risulta nettamente diverso. Come si può osservare in figura 7.12, le cellule PNT1a vanno incontro ad un progressivo arrotondamento con retrazione degli pseudopodi, riduzione del volume cellulare e formazione di corpi apoptotici. Dalle 12 ore in avanti e, in maniera più conclamata, dalle 24 alle 48 ore, si assiste al distacco progressivo delle cellule dalla superficie di crescita ed una intensa condensazione della cromatina cui segue, solo in tempi tardivi la frammentazione, dimostrata dalla colorazione rossa del PI ed una fluorescenza della calceina spenta e ridotta nel poco volume cellulare rimasto. La ricostruzione tridimensionale di cellule di controllo e l'immagine di cellule trattate a tempi tardivi (dato non mostrato) evidenzia chiaramente la progressiva retrazione e il distacco dalla superficie di semina, valutabile dalla maggior altezza e globosità delle cellule PNT1a come si nota anche nella sottoregione inserita nel quadro T3 della figura 7.12.

Il distacco è coerente con le variazioni di espressione di alcune molecole coinvolte nei meccanismi di adesione cellulare e nel rimodellamento del citoscheletro. Come mostrato in figura 7.14, pannello A, in cellule PNT1a l'analisi western blot rivela come il trattamento con il Poly-E diminuisce in modo tempo-dipendente i livelli di marcatori di adesione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare (quali E-caderina e cheratina-18) mentre il livello del marcatore stromale fibronectina resta sostanzialmente invariato a differenza della vimentina, caratterizzata da un lieve aumento di espressione rispetto al controllo.

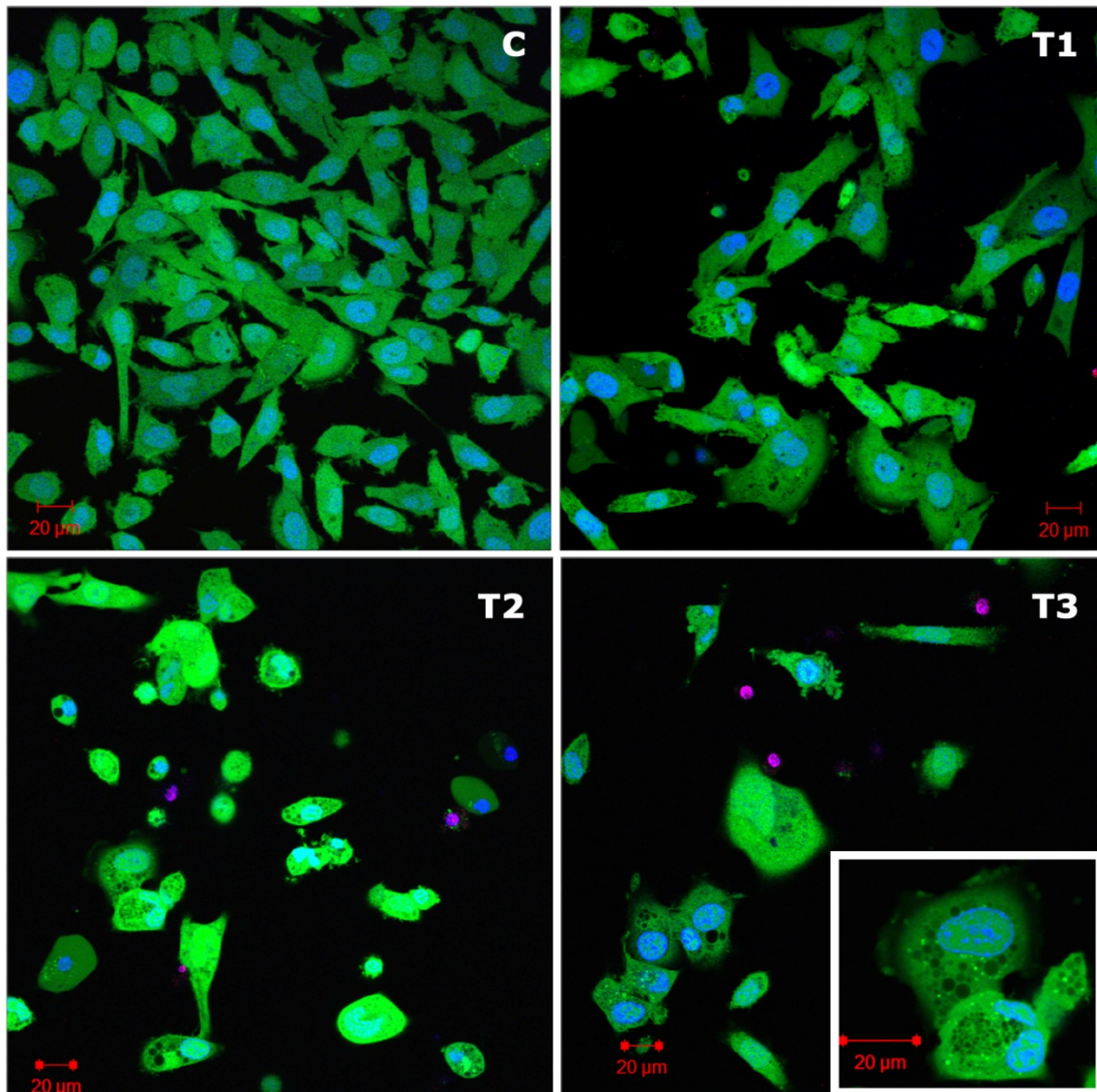
Il quadro delle cellule PC-3 appare alquanto diversificato (figura 7.13). Nonostante tra le 12 e le 24 ore siano già presenti alterazioni della morfologia cellulare, come testimoniato dalla presenza sia di cellule giganti polinucleate dalla membrana frastagliata che di cellule di più piccole dimensione, globose, e crivellate da vescicole al cui interno non si rileva calceina, la maggior parte di cellule rimane adese alla superficie di crescita anche a 48 ore (figura 7.13, immagine T3), quando il PI penetra in alcune di esse nelle quali la permeabilità di membrana risulta compromessa.

L'aggiunta del colorante Draq 5 per evidenziare lo stato del nucleo, mostra un organello non compatto, con setti di marginazione interna, che lo fanno assomigliare ad una "ruota dentata" (sottoregione inserita nel quadro T3 della figura 7.13). Anche la ricostruzione tridimensionale (dato non mostrato) mostra come le cellule trattate rimangono adese, nonostante la visibile alterazione morfologica e la marcatura sia con PI che Draq 5 del nucleo, ad evidenziare un processo di morte irreversibile.

**PNT1a****A**

**Figura 7.12. Il Poly-E induce morte cellulare apoptotica in PNT1a che culmina con il distacco delle cellule dalla superficie di crescita.** Le cellule PNT1a sono state trattate con la rispettiva  $IC_{50}$  di Poly-E per i tempi T1= 12 ore, T2= 24h e T3= 48h e, in seguito, analizzate mediante colorazione vitale, caricandole con una soluzione formata da mezzo di crescita addizionato a Calceina 2  $\mu$ M e PI 2  $\mu$ g/mL, 15 min prima dell'acquisizione delle immagini. Il Draq 5, nella concentrazione di 1  $\mu$ M, è stato aggiunto solo in ultimo, dopo l'acquisizione degli altri set di immagini.

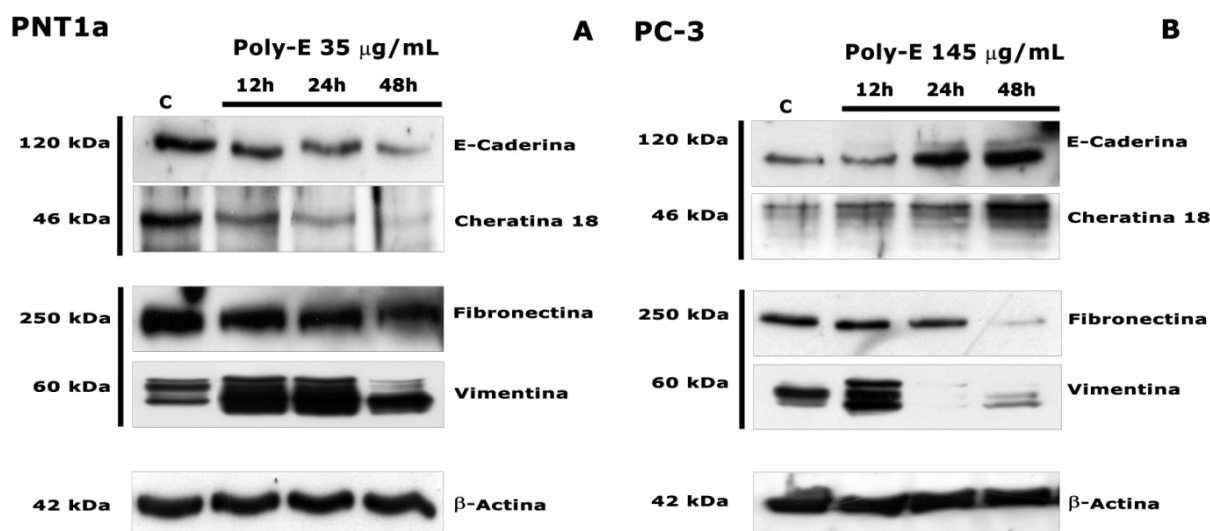
Le immagini nei pannelli mostrano delle sezioni scattate al microscopio confocale al laser. La marcatura immunofluorescente evidenzia i nuclei apoptotici in rosso e blu ed i residui cellulari in verde.

**PC-3****B**

**Figura 7.13. Il Poly-E induce una completa disorganizzazione a livello morfologico e intracitoplasmatico di cellule PC-3, che culmina con la morte delle cellule ancora adese alla superficie di crescita.** Le cellule PC-3 sono state trattate con la rispettiva  $IC_{50}$  di Poly-E per i tempi T1= 12 ore, T2= 24h e T3= 48h e, in seguito, analizzate, mediante colorazione vitale, caricandole con una soluzione formata da mezzo di crescita addizionato a Calceina 2  $\mu$ M e PI 2  $\mu$ g/mL, 15 min prima dell'acquisizione delle immagini. Il Draq 5, nella concentrazione di 1  $\mu$ M, è stato aggiunto solo in ultimo, dopo l'acquisizione degli altri set di immagini. Le immagini nei pannelli mostrano delle sezioni scattate al microscopio confocale al laser. La marcatura immunofluorescente evidenzia i nuclei apoptotici in rosso e blu ed i residui cellulari in verde.

Anche per le cellule PC-3, l'analisi western blot dei marcatori di adesione cellulare conferma il comportamento delle cellule osservato al microscopio. In particolare abbiamo trovato un aumento del livello di E-caderina e

cheratina-18, mentre l'espressione dei biomarcatori stromali (vimentina e fibronectina) si riduce a seguito del trattamento con Poly-E e sempre in modo tempo-dipendente (figura 7.14,B).



**Figura 7.14. Il trattamento di cellule PNT1a e PC-3 con Poly-E modifica l'espressione di proteine di adesione e del citoscheletro.** Le cellule PNT1a (pannello A) e PC-3 (pannello B) sono state incubate con Poly-E alla dose e per i tempi indicati. Il lisato cellulare è stato analizzato mediante western blot per verificare la presenza di marker epiteliali (anticorpi anti-E-caderina), proteine del citoscheletro (anti-citocheratina 18) e marker di adesione cellulare (anticorpi anti-fibronectina e anti-vimentina). Il controllo di caricamento è stato verificato con anticorpo anti-β-actina.

**Analisi degli mRNA retrotrascritti con qRT-PCR e livello di espressione proteomica di proteine coinvolte nello stress del reticolo endoplasmatico.**

**205** Per stabilire la tipologia di morte cui vanno incontro le cellule PC-3 è stato proposto un coinvolgimento del fenomeno noto come Stress del Reticolo Endoplasmatico (ERS) innescato dalla presenza di proteine non ripiegate correttamente (UPR, Unfolded Protein Response).

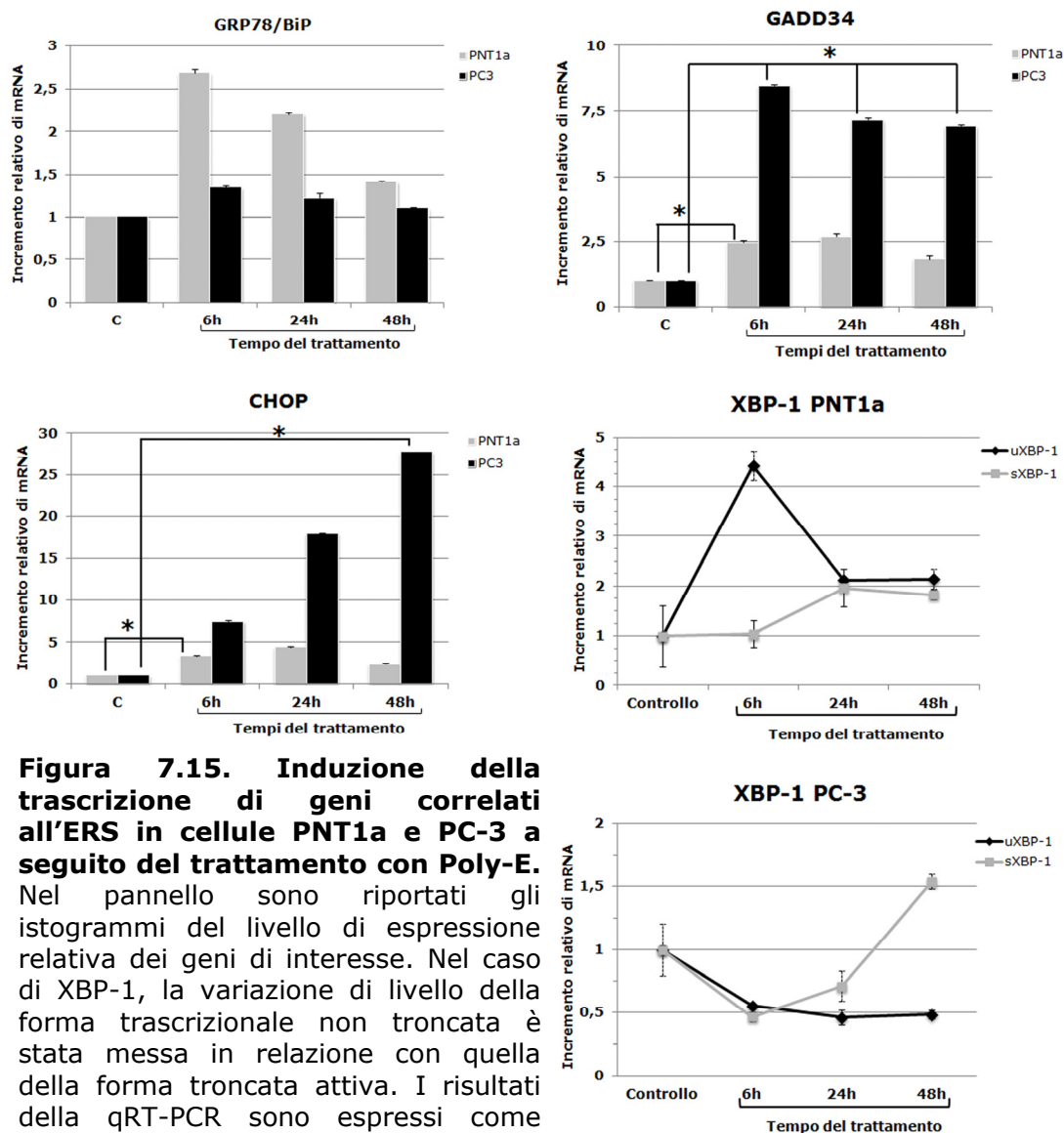
Le cellule PNT1a e PC-3 sono state trattate con le rispettive concentrazioni di Poly-E corrispondenti alla  $IC_{50}$  per la raccolta degli RNA e delle proteine totali. Abbiamo validato con qRT-PCR che il trattamento con Poly-E promuove la trascrizione di tre geni target connessi allo stress del reticolo, ossia i geni codificanti per CHOP e GADD34 (con funzione pro-morte) ma anche GRP78/BiP, con funzioni connesse alla sopravvivenza (figura 7.15).

In cellule PNT1a, l'induzione di CHOP e GADD34 non aumenta significativamente di livello rispetto al controllo, al contrario di quanto accade per GRP78/BiP il quale è significativamente sovra-regolato in tempi precoci (sino alle 6h) per decrescere progressivamente al prolungarsi dell'esposizione all'agente citotossico, pur rimanendo a livelli più elevati rispetto il controllo. In cellule PC-3, al contrario, è CHOP che incrementa progressivamente, raggiungendo il massimo livello di espressione



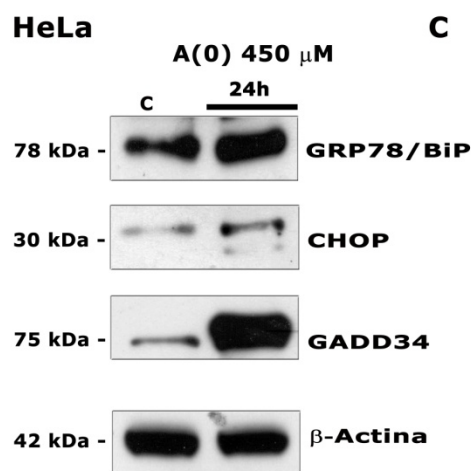
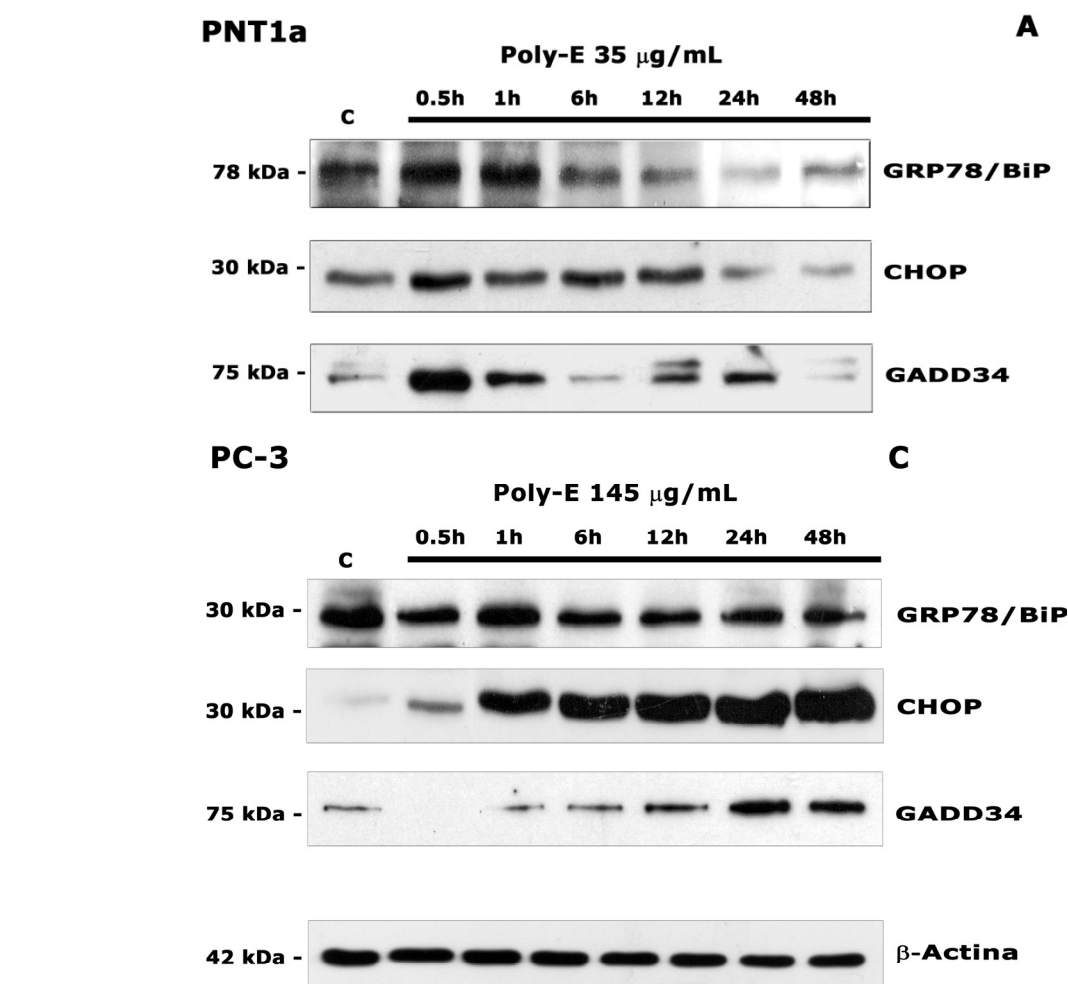
alle 48h di incubazione con Poly-E, mentre GRP78/BiP non subisce sostanziali variazioni rispetto al controllo non trattato. Anche GADD34 aumenta precocemente in maniera significativa (fino a 6 ore) per poi decrescere di poco, assestandosi nei tempi sperimentali successivi.

Un altro marker di UPR è lo splicing dell'mRNA di XBP-1 il cui prodotto viene tradotto in un fattore trascrizionale attivo. La qRT-PCR eseguita con primers in grado di amplificare selettivamente la forma clivata dell'mRNA di XBP1 mostra come il trattamento con Poly-E promuove un incremento iniziale della forma integra inattiva in cellule PNT1a mentre in cellule PC-3 si verifica un progressivo aumento della forma di splicing e, coerentemente, la riduzione della forma integra.



**Figura 7.15. Induzione della trascrizione di geni correlati all'ERS in cellule PNT1a e PC-3 a seguito del trattamento con Poly-E.** Nel pannello sono riportati gli istogrammi del livello di espressione relativa dei geni di interesse. Nel caso di XBP-1, la variazione di livello della forma trascrizionale non troncata è stata messa in relazione con quella della forma troncata attiva. I risultati della qRT-PCR sono espressi come (media  $\pm$  S.D.) di due esperimenti indipendenti. (\*=  $p < 0.05$ )

Il tutto trova conferma nei risultati di western blot delle proteine prodotte a partire dalla trascrizione di questi geni (figura 7.16) con una progressiva diminuzione dei livelli di GRP78, GADD34 e CHOP in cellule PNT1a (pannello A) ed invece una forte induzione di CHOP e GADD34 in cellule PC-3 (pannello B).

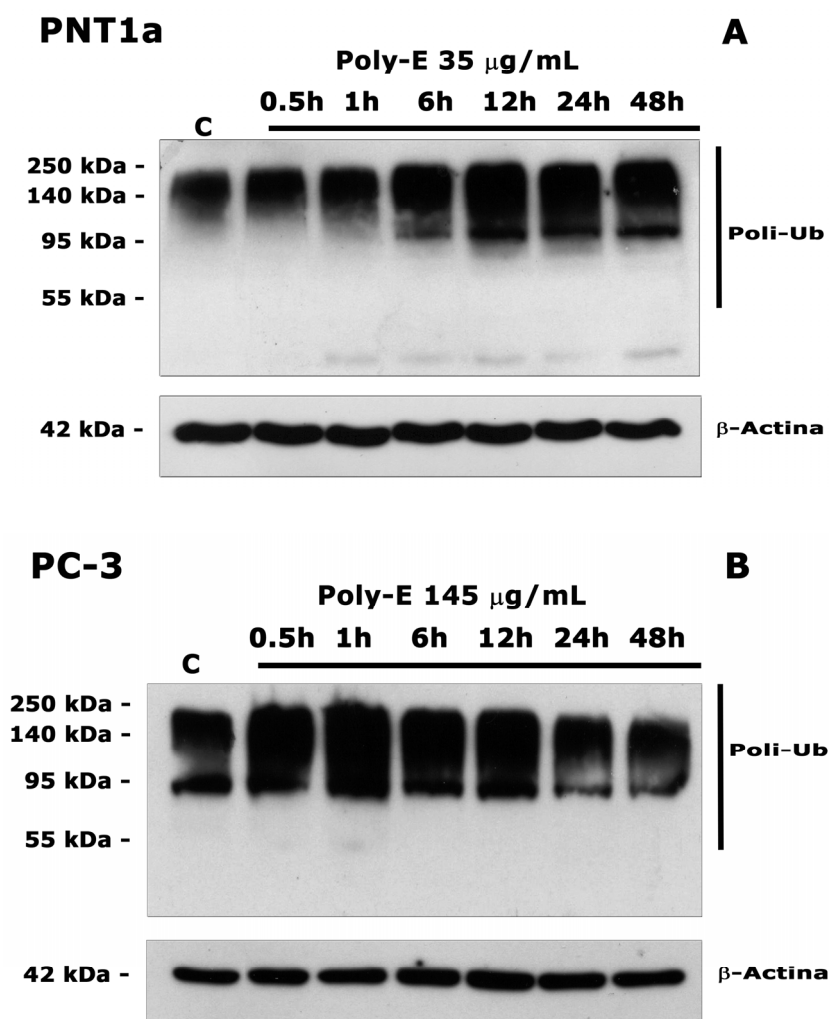


positivo (Tardito S et al, 2009).

**Figura 7.16. Il trattamento con Poly-E modifica i livelli di espressione di marker molecolari di ERS.** Le cellule PNT1a (pannello A) e PC-3 (pannello B) sono state incubate con Poly-E alla dose e per i tempi indicati. Il lisato cellulare è stato analizzato, mediante western blot, per verificare la presenza di marker di induzione dell'UPR, con anticorpi anti-GRP78/BiP, anti-CHOP ed anti-GADD34. Il controllo di caricamento è stato verificato con anticorpo anti-β-actina.

Nel pannello D sono stati caricati estratti proteici totali di cellule HeLa nelle quali è stato indotto stress del reticolo endoplasmatico mediante trattamento con un composto tiositriazolico di rame (II) (A0) ed utilizzate come controllo

Nel loro insieme, l'analisi dei trascritti e delle proteine espresse in cellule PNT1a e PC-3 trattate con Poly-E, correlano in western blot con la risposta UPR, misurabile attraverso la determinazione della quantità di proteine poli-ubiquitinate presenti nella cellula. L'aumento di tali proteine si verifica in maniera più marcata per le cellule PC-3 (figura 7.17, pannello B) dove la diminuzione del fenomeno parte dopo le 24 ore di incubazione. Per le cellule PNT1a l'evento appare più modesto fino alle 6 ore a partire dalle quali il livello di proteine poli-ubiquitinate aumenta (figura 7.17, pannello A).

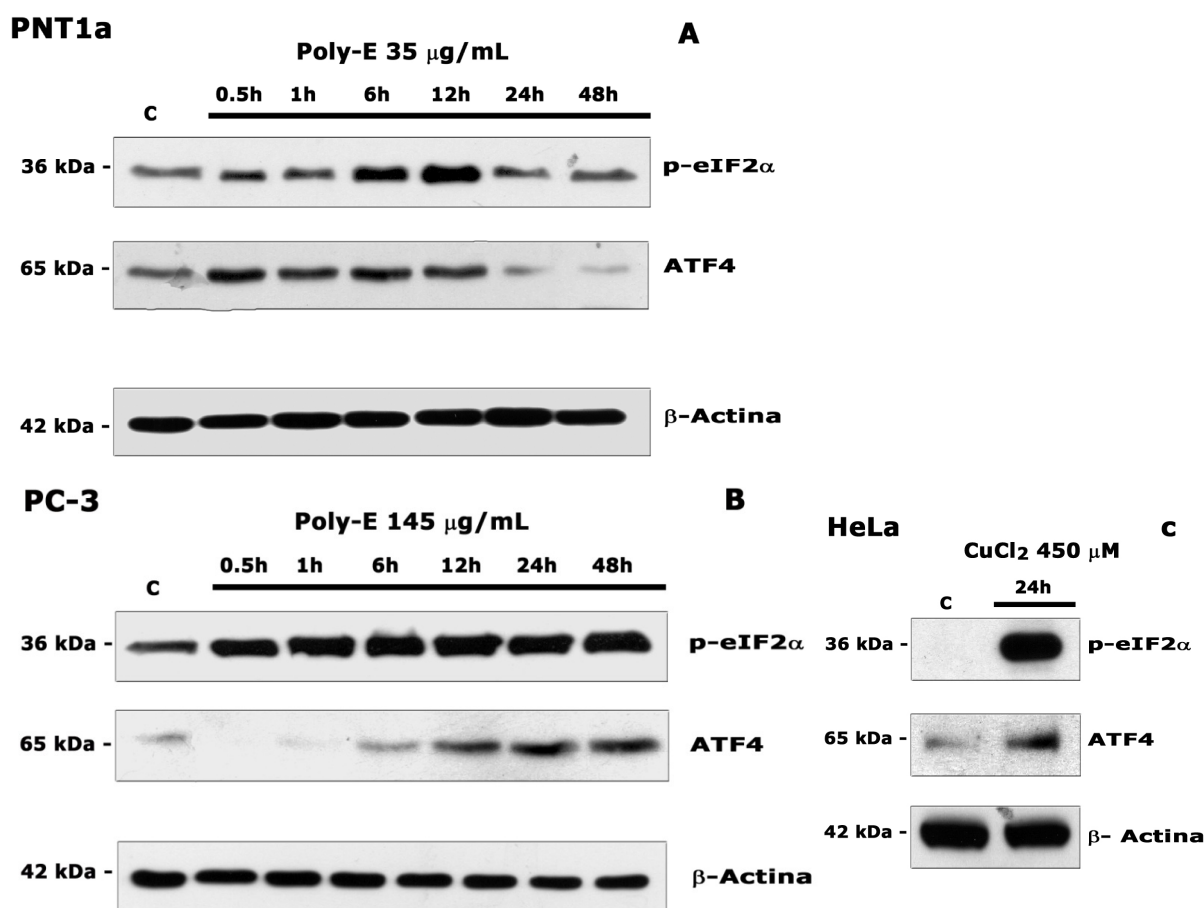


**Figura 7.17. Il trattamento con Poly-E induce un accumulo di proteine poliubiquitinate in cellule PNT1a e PC-3.** Le cellule PNT1a e PC-3 sono state incubate con il Poly-E alla dose e per i tempi indicati in figura. Il lisato cellulare è stato analizzato mediante western blot con anticorpo anti-poli-Ubiquitina mentre il controllo di caricamento è stato verificato con anticorpo anti-β-actina. Risultano evidenti gli elevati pesi molecolari delle proteine.

L'induzione di una UPR provoca l'attivazione della chinasi 3 del fattore eucariotico 2 $\alpha$  di inizio della traduzione (eIF2 $\alpha$ ). La fosforilazione di eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) causa un'attenuazione generale della traduzione proteica, agendo come meccanismo difensivo.

L'analisi western blot della forma fosforilata di eIF2 $\alpha$ , rivela, nelle cellule PNT1a, un transitorio aumento del livello di espressione di p-eIF2 $\alpha$  fra le 6 e le 12 ore che decresce successivamente tornando ai livelli del controllo non trattato (figura 7.18, pannello A).

Diverso il comportamento nelle cellule PC-3, le quali mostrano un incremento di p-eIF2 $\alpha$  già dopo 1 ora di trattamento con Poly-E (figura 7.18 pannello B) e si mantiene elevato fino alle 48 ore. Coerentemente, con l'aumento della forma fosforilata di eIF2 $\alpha$ , aumenta il livello proteico del fattore di trascrizione ATF4 nel caso delle cellule PC-3 e così per le cellule PNT1a, sebbene per queste ultime il segnale decada con lo scomparire di p-eIF2 $\alpha$  (figura 7.18, pannello A e B).



**Figura 7.18. Effetti del Poly-E sull'espressione di fattori trascrizionali associati a stress del Reticolo Endoplasmatico.** Le cellule PNT1a e PC-3 sono state incubate con il Poly-E alla dose e per i tempi indicati in figura. Il lisato cellulare è stato analizzato mediante western blot per verificare la presenza della

forma fosforilata attiva di eIF2 $\alpha$  (con anticorpo anti-p-eIF2 $\alpha$ ) e del fattore di trascrizione ATF4 (con anticorpo anti-ATF4). Il controllo di caricamento è stato verificato con anticorpo anti- $\beta$ -actina. Come controllo positivo sono stati utilizzati estratti proteici totali di cellule HeLa incubate con un composto tiositriazolico di rame (II) (A0).

#### **Analisi immunocitochimica indiretta con anticorpo anti calreticulina.**

**206** La prosecuzione degli studi sulla morfologia cellulare ha confermato, attraverso analisi immunocitochimica con anticorpo anti-calreticulina, come le vescicole intra-citoplasmatiche rilevate già nelle immagini scattate in contrasto di fase, coincidano con porzioni di reticolo endoplasmatico disorganizzato.

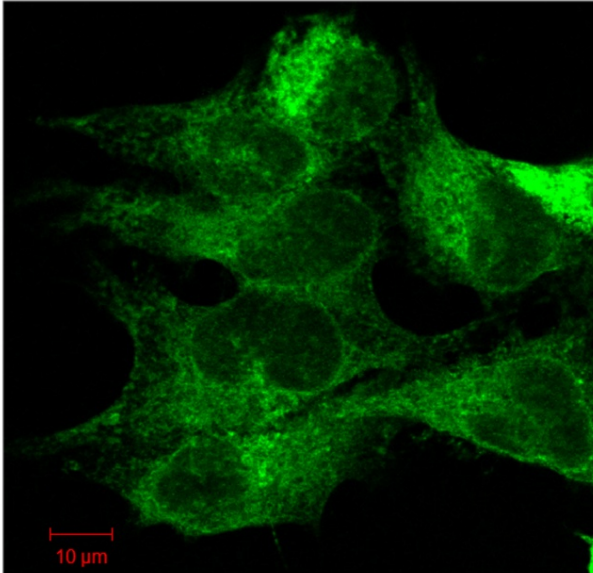
In cellule PNT1a trattate con Poly-E, le vescicole appaiono già dopo 6 ore di trattamento e raggiungono il massimo livello alle 24 ore. Esse sono paragonabili per numero e dimensioni a quelle rilevate nel controllo positivo, ossia cellule PNT1a trattate con Brefeldina-A.

In cellule PC-3 si nota, in tempi precoci (6 ore), la presenza di vescicole per forma e dimensioni simili a quelle delle cellule PNT1a le quali poi, alle 24 ore, tendono a confluire le une nelle altre per formare corpi vescicolari di diametro maggiore (come si evidenzia anche nel controllo positivo).

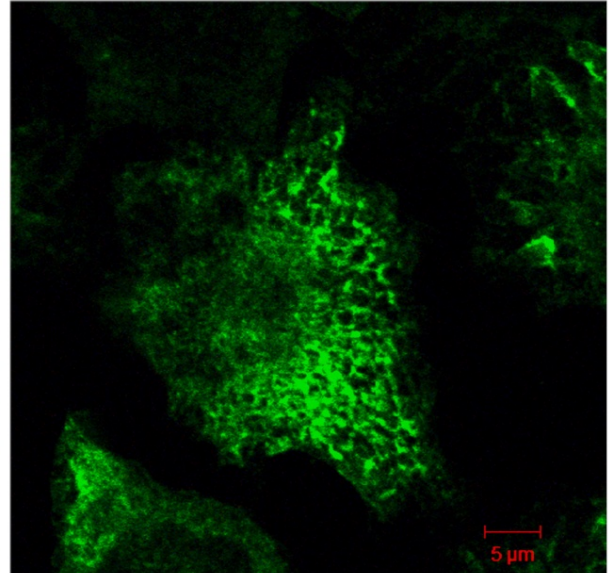
**Figura 7.19** (*vedi pagina seguente*). **Il trattamento con Poly-E induce una parziale disorganizzazione del Reticolo Endoplasmatico in cellule PNT1a.** Le cellule PNT1a sono state incubate con il Poly-E per 6-24 ore alla dose corrispondente alla IC<sub>50</sub>. Le cellule sono state analizzate mediante analisi immunocitochimica con l'anticorpo anti-Calreticulina (segnale verde). La marcatura immunofluorescente coincide in maniera esatta con il perimetro dei vacuoli visibili in contrasto di fase (non mostrato). Come controllo positivo le cellule PNT1a sono state trattate 48 ore con Brefeldina A alla dose indicata in figura.

# PNT1a

**Controllo**

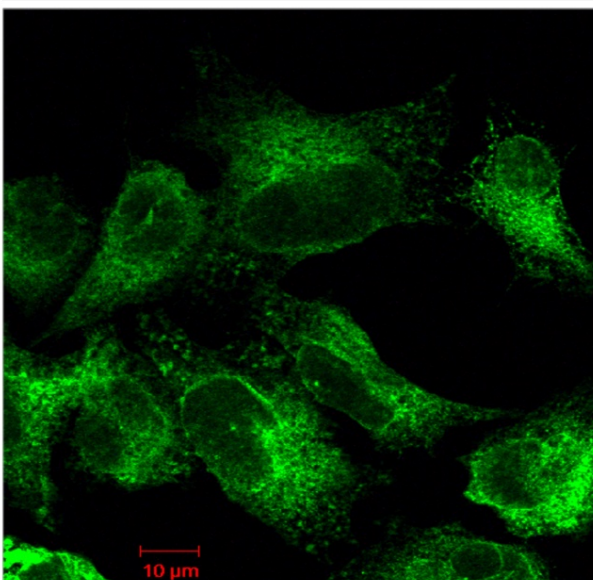


**PNT1a + Brefeldina A, 15 μg/mL**

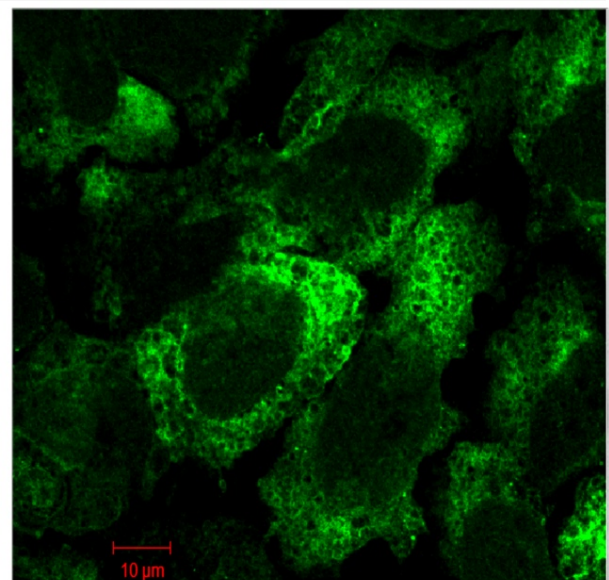


**PNT1a Poly-E 35 μg/mL**

**6h**

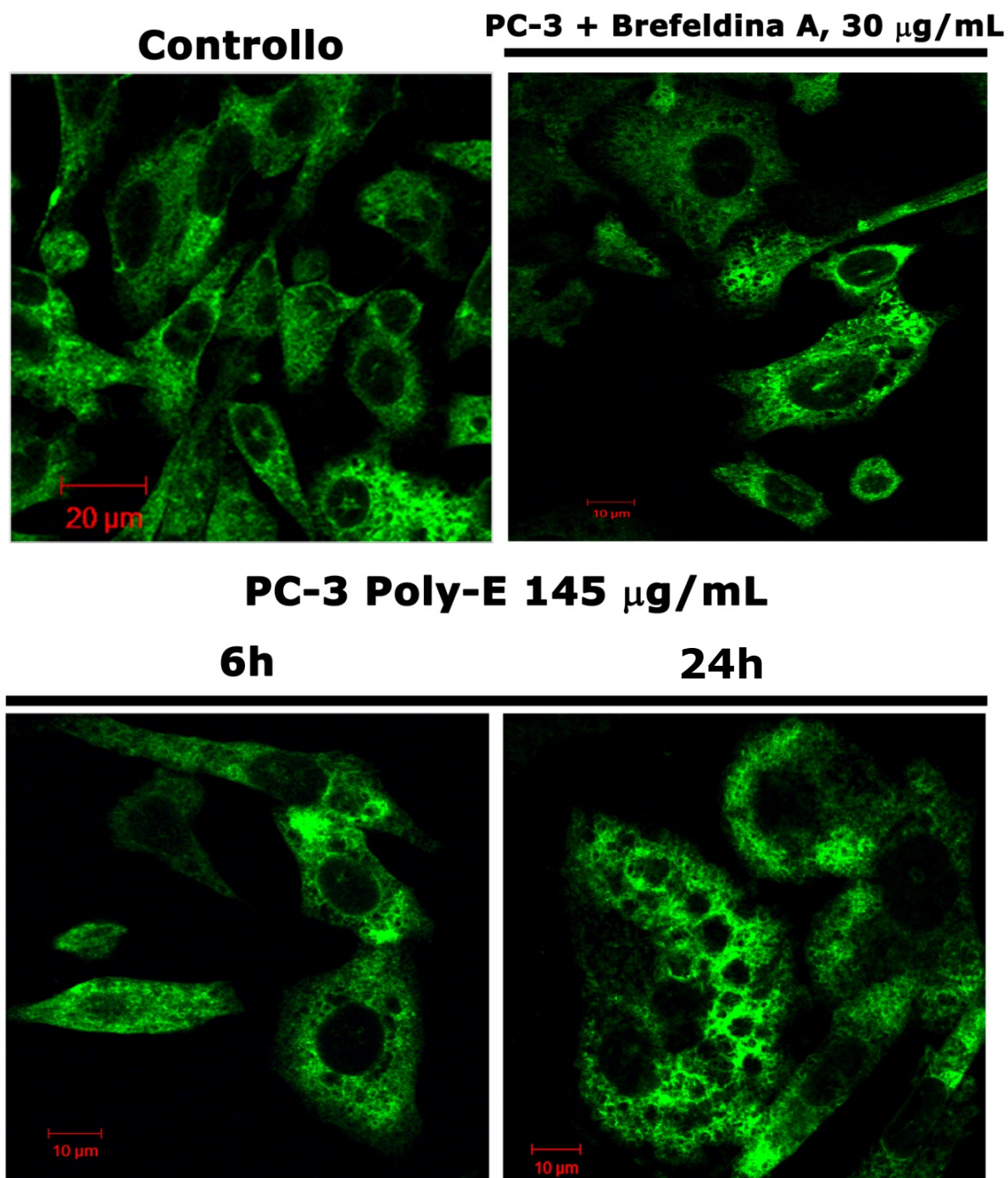


**24h**



**Figura 7.19** (vedi discalia nella pagina precedente)

## PC-3



**Figura 7.20. Il trattamento con Poly-E provoca una marcata modificazione morfologica del Reticolo Endoplasmatico in cellule PC-3.** Le cellule PC-3 sono state incubate con il Poly-E per 6-24 ore alla dose corrispondente la  $\text{IC}_{50}$ . Le cellule sono state analizzate mediante analisi immunocitochimica con l'anticorpo anti-Calreticulina (emissione nel verde). La marcatura immunofluorescente coincide in maniera esatta con il perimetro dei vacuoli visibili in contrasto di fase (dato non

mostrato). Come controllo positivo le cellule PC-3 sono state trattate 48 ore con Brefeldina A alla dose indicata in figura.

### Espressione di p38 MAPK e molecole BH3-only della famiglia Bcl-2 aventi funzioni pro-apoptiche.

**207** Per chiarire ulteriormente i meccanismi molecolari alla base dell'innesco delle due diverse tipologie di morte in cellule PNT1a e PC-3 è stato valutato il ruolo della proteina p38-MAPK (una classe di proteine sensibili a stimoli di stress, come citochine, irradiazione ultravioletta, shock termico, osmotico e ossidoriduttivo, coinvolte nella differenziazione cellulare e nell'innesco di apoptosi) e alcuni membri pro-apoptotici BH3-only della famiglia Bcl-2. Queste proteine, una volta attivate, traslocano dal citoplasma al mitocondrio dove innescano eventi di segnalazione apoptotica tra i quali il rilascio di molecole mitocondriali (come AIF), in grado di migrare nel nucleo e frammentare il DNA.

Come si nota in maniera chiara in cellule PNT1a (figura 7.21, pannello A), a fronte di una diminuzione della forma fosforilata attiva di p38 $\alpha$  (ed un aumento della molecola inattiva) le proteine PUMA, Bak, Bax subiscono un progressivo decremento del loro livello di espressione all'aumentare dei tempi di esposizione al Poly-E. La diminuzione di Bad avviene in concomitanza con l'aumento della sua forma fosforilata.

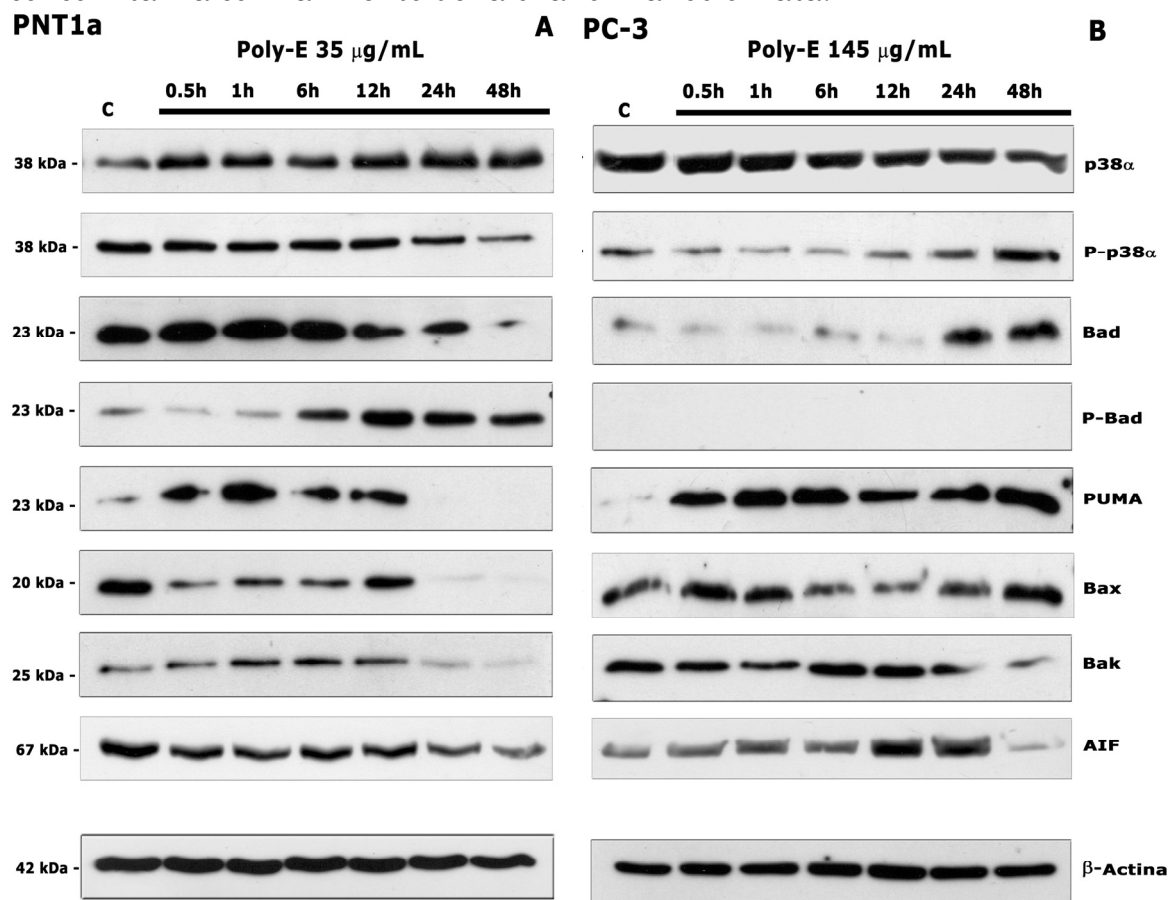
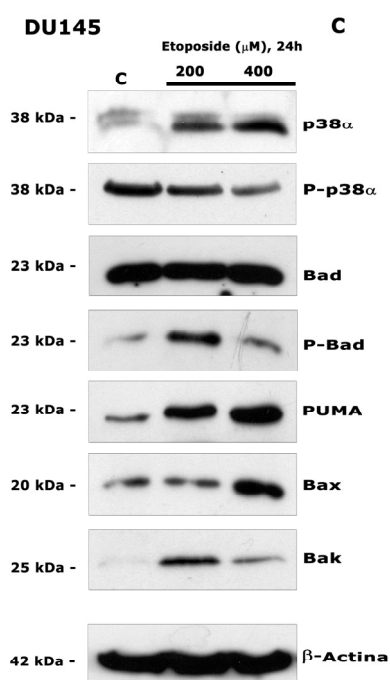


Figura 7.21, pannelli A e B (vedi discalia a pag. 251)





**Figura 7.21 (Pannelli A, B e C). Il trattamento con Poly-E altera l'espressione di proteine pro-apoptotiche della famiglia Bcl-2.** Le cellule PNT1a e PC-3 sono state incubate con il Poly-E alla dose e per i tempi indicati in figura. Il lisato cellulare è stato analizzato mediante western blot per verificare la presenza:

- di p38 MAPK attivata (attraverso anticorpo anti-p38 $\alpha$  e anti-P-p38 $\alpha$ );
- dei membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2 (con anticorpo anti-PUMA, anti-Bax, anti-Bak, anti-Bad e anti-P-Bad);
- della molecola mitocondriale AIF (con anticorpo anti-AIF).

Il controllo di caricamento è stato verificato con anticorpo anti- $\beta$ -actina mentre come controllo positivo sono stati utilizzati estratti proteici totali di cellule DU145 incubate Etoposide alle dosi ed i tempi indicati.

Per le cellule PC-3 la situazione è diversa ed opposta a quanto osservato in cellule PNT1a. (figura 7.21, pannello B). La forma fosforilata di p38 $\alpha$  aumenta progressivamente in risposta al trattamento con Poly-E, raggiungendo il massimo di espressione a 48 ore. Il trattamento con Poly-E produce un aumento dell'espressione di PUMA e Bax, rispetto alle cellule non trattate, a tutti i tempi sperimentali considerati. Non abbiamo potuto invece rilevare, sempre nelle cellule PC-3, l'espressione della forma fosforilata di Bad, mentre la forma non fosforilata aumenta rispetto ai controlli alle 24 e 48 ore. Anche il fattore AIF aumenta marcatamente dopo 12 ore di trattamento con Poly-E.

Il controllo positivo costituito da cellule DU145 trattate con dose crescenti di Etoposide (figura 7.21, pannello C) mostra l'aumento del livello di espressione delle molecole pro-apoptotiche esaminate, come atteso in caso di innesco di morte cellulare per apoptosi classica.



# 8

## DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

---

**208** L'attività di chemioprevenzione da parte dei polifenoli estratti dalle foglie della pianta del tè è stata ampiamente dimostrata in numerosi e diversi modelli animali di tumori. Studi condotti *in vitro*, hanno dimostrato che i polifenoli del tè verde, ed in particolare l'(-)-epigallocatechina-3-gallato (EGCG, la molecola più abbondante e biologicamente attiva), possono modulare diverse vie metaboliche e percorsi di trasduzione del segnale. Questi eventi molecolari sono alla base di importanti cambiamenti cellulari, quali la soppressione della proliferazione, l'inibizione della migrazione e dell'angiogenesi tumorale e l'innescio di specifiche tipologie di morte, riconducibili non solo all'apoptosi classica ma anche a forme alternative di morte, coinvolgenti lo Stress del Reticolo Endoplasmatico (ERS), autofagia e anoikis [493].

Questo lavoro di tesi è stato progettato al fine di chiarire i meccanismi biomolecolari attraverso i quali una miscela altamente standardizzata e purificata di catechine del tè verde (Polyphenon-E<sup>®</sup>, 70% di EGCG in peso secco) provoca morte in linee cellulari epiteliali prostatiche immortalizzate e tumorigeniche. Il profilo di espressione genica e le caratteristiche morfologiche delle due linee cellulari trattate supportano l'ipotesi di distinti meccanismi d'azione.

**209** *Il trattamento con Poly-E induce un blocco della proliferazione e morte cellulare in linee PNT1a e PC-3.*

Il confronto dei valori di dose letale, in grado di inibire l'attività metabolica del 50% dei due tipi cellulari, dimostra con chiarezza una maggiore sensibilità da parte delle cellule PNT1a ai polifenoli del tè verde. Inoltre, la ripidità della curva nel ristretto range di concentrazioni nel quale si ricava la dose critica di Poly-E per le cellule PNT1a, suggerisce il probabile verificarsi di un effetto "tutto o nulla", ovvero la presenza di una soglia critica di attività. Ciò non vale nel caso delle cellule PC-3, che mostrano maggior resistenza al Poly-E.

L'effetto citostatico della miscela è evidente in entrambe le linee cellulari, nonostante la presenza di una proteina p53 difettiva in PNT1a e la mancanza completa nelle cellule PC-3. L'espressione di p21, che lega e inibisce l'attività dei complessi ciclina-CDK2/4, regolando la progressione del ciclo cellulare a livello del check-point tra le fasi G1 ed S, è strettamente

controllata dall'oncosoppressore p53 ed è tramite questa interazione che p53 può portare all'arresto del ciclo cellulare in G1, in risposta a stimoli stressori di varia natura [494]. Sebbene l'assenza di una proteina p53 funzionale conferisca resistenza alla chemioterapia [495] ci sono evidenze di sensibilizzazione agli agenti chemioterapici in cellule p53-deficienti [496]. Dopo somministrazione di Poly-E le cellule PNT1a, che possiedono una p53 parzialmente funzionale, rispondono arrestandosi in fase G0/G1 attraverso la mediazione di p21, senza raggiungere la fase mitotica. Al contrario, le cellule PC-3, nelle quali la funzione di p53 è totalmente abrogata, continuano a sintetizzare DNA, arrestandosi poi in fase G2/M a seguito della già documentata inibizione dell'attività della ciclina D1 da parte delle catechine [497, 498] e, come confermato dai risultati da noi ottenuti, con conseguente mancanza di citodieresi e poliploidia. In queste cellule abbiamo verificato un progressivo incremento dei *debris* cellulari, che è compatibile con l'aumento di cellule morte.

In PNT1a, la comparsa di un picco ipodiploide tra le 24 e le 48 ore, come ottenuto dall'analisi del ciclo cellulare, suggerisce una morte per apoptosi, che trova conferma anche nel saggio di DNA laddering.

La miscela di Poly-E impiegata è dunque in grado di indurre morte in entrambe le linee di cellule, come evidenziato dai saggi di conta cellulare con Trypan Blu. Gli effetti sulla proliferazione e sulla vitalità cellulare sono sia tempo sia dose-dipendenti.

**210**






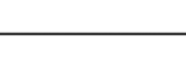
*Il trattamento con Poly-E provoca alterazioni morfologiche e degli organelli citoplasmatici con attivazione di distinti programmi di morte cellulare, caratterizzati da tempi e modalità di esecuzione diversificate per le cellule PNT1a e PC-3.*

Da un punto di vista morfologico, l'evidente vacuolizzazione intracitoplasmatica in entrambe le linee cellulari, ci ha fatto inizialmente ipotizzare ad un innesco del processo autofagico ma, nè la colorazione degli autofagolisosomi con arancio di acridina nè il livello di espressione di specifici marker proteici di autofagia, ci hanno portato a concludere che il Poly-E produca una significativa formazione di vacuoli autofagolisosomici associati a morte cellulare per autofagia.

La Beclina-1 ed LC3 rappresentano i principali marker di autofagia; la Beclina-1 ed il suo legame con la fosfoinositide 3-chinasi di classe III (PI3K), sono necessari per l'avvio della formazione dell'autofagosoma. LC3, clivata all'estremo C-terminale per la sintesi della forma LC3-I, durante l'autofagia viene convertita in LC3-II da un sistema ubiquitina-simile che permette la lipidazione della molecola e la sua associazione alla membrana delle vescicole autofagiche. La presenza di LC3 negli autofagosomi e, la conversione di LC3 nella forma LC3-II, sono utilizzati come indicatori di autofagia. Tuttavia, LC3-II stesso è degradato dal macchinario autofagico, per cui l'interpretazione dei dati di immunoblotting può risultare controversa. Nel commento dei risultati ci si è affidati alla tabella 8, redatta

sulla base delle linee guida per l'interpretazione ed il monitoraggio dell'autofagia negli eucarioti superiori [499].

Sebbene si possa trattare di un semplice accumulo di autofagosomi, riteniamo che, in cellule PNT1a, almeno in tempi precoci, si abbia la formazione di vescicole autofagiche con funzioni protettive, per contrastare l'iniziale stress innescato dalla somministrazione della miscela di catechine; i risultati ottenuti mediante immunocitochimica con anticorpi anti-LC3 e l'aumento del livello di espressione della Beclina-1 confermano questa deduzione.

<b>1) Cosa indica il risultato ottenuto?</b>	
<p>Trattate (-)    Trattate (+)</p> <p>LC3-I </p> <p>LC3-II </p>	<p>Il trattamento causa o una up-regolazione della formazione di autofagosomi o il blocco della degradazione autofagica. Il semplice aumento di LC3-II indica un accumulo di autofagosomi ma non garantisce che avvenga la degradazione autofagica.</p>
<b>2) Si può parlare di autofagia difettiva?</b>	
<p>Trattate (-)    Trattate (+)</p> <p>LC3-I </p> <p>LC3-II </p>	<p>È possibile che queste cellule mostrino un malfunzionamento del macchinario autofagico poiché LC3-II compare in ogni condizione.</p>
<b>3) Siccome LC3-II &gt; LC3-I, l'autofagia è attivata?</b>	
<p>Trattate (-)    Trattate (+)</p> <p>LC3-I </p> <p>LC3-II </p>	<p>No. LC3-II tende ad essere più sensibile in immunoblotting che LC3-I. Non è pertanto possibile predire l'attività autofagica semplicemente dall'aumento di LC3-II in W.B.</p>

**Tabella 8.** Come interpretare in immunoblotting i dati di LC3 (*modificato da Mizushima M et al., 2007*).

Il quadro delle cellule PC-3 è nettamente diverso da quanto osservato in cellule PNT1a.

In questa linea cellulare, l'aumento concomitante delle due forme LC3-I e -II può essere interpretato come un malfunzionamento del macchinario autofagico. A rafforzare tale ipotesi interviene il decremento del livello di espressione della Beclina-1, indispensabile per l'innescò dell'autofagia (nonostante alcuni studi abbiano messo in evidenza l'esistenza di meccanismi autofagici Beclina-1 indipendenti) [500].

L'analisi dell'espressione delle caspasi in cellule PNT1a evidenzia come in queste cellule, il Poly-E provochi l'attivazione del programma apoptotico attraverso la via intrinseca. La via estrinseca non è coinvolta, come dimostrato dal mancato clivaggio della caspasi-8. L'innescò dell'apoptosi è successivo all'attivazione dell'autofagia e, ragionevolmente, si verifica quando il macchinario autofagico non è più in grado di contrastare lo stress metabolico mediato dalle catechine del Poly-E. In particolare, la presenza

delle caspasi effettrici -3 e -7 e l'attivazione della PARP-1 a partire dalle 12 ore di trattamento con la dose IC<sub>50</sub> di Poly-E, indica come in tale punto avvenga lo *switch* tra autofagia ed apoptosi. Questo è in linea con i dati recenti della letteratura i quali suggeriscono che l'autofagia agisce primariamente come meccanismo citoprotettivo, promuovendo la morte delle cellule tumorali nei primi stadi di sviluppo della trasformazione cellulare, ed in seguito, a carcinogenesi avviata, le caratteristiche citoprotettive dell'autofagia sembrano essere sfruttate dalle cellule tumorali per la sopravvivenza in ambienti ostili [501, 502].

Per quanto riguarda le cellule PC-3, il trattamento con Poly-E non si accompagna ad un significativo aumento dell'espressione delle caspasi attivate. Abbiamo rilevato solo un incremento della forma clivata di caspasi-9 (una caspasi inziatrice), che però rimane un processo inefficace, non risultando nell'attivazione delle caspasi effettrici poste a valle della stessa. In queste cellule, non potendo confermare un significativo innesco del processo autofagico ma, essendo evidenti delle alterazioni a livello morfologico (quali l'intensa vacuolizzazione che si produce nei tempi successivi al trattamento), abbiamo voluto valutare se la somministrazione di Poly-E potesse in qualche modo innescare un intenso e protratto ERS in grado di attivare un percorso di morte caspasi-indipendente.

**211** *L'alterazione dell'omeostasi cellulare indotta dal Poly-E attiva percorsi di autofagia, ERS ed UPR con distinti significati per le cellule PNT1a e PC-3.*

Quando le proteine di nuova sintesi non sono accuratamente ripiegate e modificate prima di uscire dal reticolo endoplasmatico esse si accumulano nel lume del reticolo e sono causa di stress metabolico che porta all'attivazione della Risposta a Proteine *Unfolded* (UPR) per ripristinare una normale omeostasi. L'UPR si manifesta con l'aumentata espressione di determinate chaperones quali Grp78/BiP, calnexina e calreticulina, coinvolte sia nel folding delle proteine che nell'attivazione della Degradazione proteica Associata al Reticolo Endoplasmatico (ERAD), sistema che elimina le proteine mal ripiegate attraverso l'attività del proteasoma [503]. Inoltre, l'induzione di una UPR, è nota per attivare il fattore di trascrizione eIF2 $\alpha$ , la cui fosforilazione causa un'attenuazione generale della traduzione proteica, agendo come meccanismo difensivo durante l'UPR per prevenire un ulteriore sovraccarico del reticolo endoplasmatico già sofferente. Allo stesso tempo, specifici UPR mRNA, così come quello del fattore di trascrizione ATF4, sono preferenzialmente trascritti e tradotti. Attraverso l'attenuazione della sintesi proteica globale e la simultanea e selettiva traduzione di proteine appartenenti al *pathway* UPR, la fosforilazione di eIF2 $\alpha$  può giocare un ruolo pro-morte o pro-sopravvivenza a seconda del modello cellulare e delle condizioni sperimentali. Tuttavia, in caso di stress severi e prolungati, l'UPR non funziona e la cellula attiva percorsi programmati distruttivi che portano alla

morte, solitamente per apoptosi [504]. Sono noti almeno quattro percorsi coinvolti in questi eventi di morte:

1. l'attivazione trascrizionale del gene CHOP/GADD153 (collegata allo splicing dell'mRNA del fattore di trascrizione XBP-1) che abbatta l'espressione di Bcl-2 e aumenta quella ERO1 ed altre proteine coinvolte nella UPR [505],
2. l'innescamento del percorso JNK/p38 MAPK che, non solo incrementa l'attività di CHOP/GADD153, ma porta anche all'attivazione di Bak/Bax [506],
3. l'attivazione della caspasi-8 [507],
4. l'attivazione, associata ad ERS, della caspasi-12 [508].

Nei nostri modelli sperimentali la caspasi-8 non risulta attivata né in cellule PNT1a né in cellule PC-3, mentre non abbiamo condotto prove per verificare l'attivazione della caspasi-12. Abbiamo invece verificato se la citotossicità indotta dalle catechine del Poly-E in linee cellulari PNT1a e PC-3 fosse accompagnata da modificazioni nei livelli di eIF2 $\alpha$  fosforilata e ATF4, Grp78/BiP e CHOP/GADD153 e nell'attivazione di p38 MAPK.

Per le cellule PNT1a la vacuolizzazione intracitoplasmatica, come dimostrato dalle immagini in contrasto di fase, è contenuta e compatibile con l'attivazione di uno stress dell'ER transitorio e auto-limitante entro le prime 12 ore dopo il trattamento con Poly-E. In queste cellule abbiamo verificato un modesto incremento dei messaggeri di CHOP e GADD34 e nessuna variazione significativa della forma breve di splicing di XBP-1. L'aumento della forma fosforilata della proteina eIF2 $\alpha$ , nelle prime 12 ore di trattamento con Poly-E, si accompagna ad un aumento di ATF4, ed è coerente con l'incremento dei livelli di espressione, di modesta intensità, di proteine dell'ERS, quali CHOP e GADD34. In cellule PNTa aumenta significativamente l'espressione proteica di GRP78/BiP, una chaperone che assiste il corretto ripiegamento delle proteine e che, in concomitanza con l'innescamento del percorso autofagico e l'accumulo delle proteine poliubiquitinate fino alle 12 ore di trattamento, agisce da meccanismo di sopravvivenza per contrastare gli effetti citotossici dei polifenoli. Come ulteriore conferma che la formazione dei vacuoli osservati fosse associata all'ERS abbiamo eseguito una marcatura fluorescente con calreticulina una proteina che, oltre a fungere da chaperone come già accennato, si localizza sulla membrana dell'ER. Le immagini acquisite in fluorescenza hanno evidenziato la perfetta sovrapposizione fra il perimetro esterno dei vacuoli e il segnale della calreticulina, provando che i vacuoli sono porzioni di reticolo dilatato a causa dei fenomeni di UPR e ERS.

Nelle cellule PNT1a l'UPR è un fenomeno transitorio che avviene in concomitanza con il meccanismo autofagico come tentativo di ripristinare le normali condizioni fisiologiche. La cronicizzazione dello stress dovuto alla somministrazione prolungata di Poly-E sarebbe responsabile di un sovraccarico di proteine *unfolded* e, probabilmente, organelli danneggiati, nei confronti dei quali l'attività citoprotettiva dell'ERS non è più in grado di porre rimedio. Questo porterebbe all'induzione, dalle 12 ore in avanti, di un apoptosi caspasi-dipendente che, a seguito di attivazione delle caspasi

esecutrici -3 e -7, culminerebbe con il clivaggio della PARP-1 e la frammentazione internucleosomiale del DNA.

Nel caso delle cellule PC-3, come mostrano le immagini in contrasto di fase, la dilatazione e la vacuolizzazione intracitoplasmatica appare più accentuata che per le PNT1a, facendo ipotizzare un importante coinvolgimento dell'ERS. I dati più interessanti riguardano un progressivo aumento del messaggero di ATF4, in concomitanza alla crescente fosforilazione di eIF2 $\alpha$  e, soprattutto, al forte incremento, sia a livello trascrizionale che proteico, dei marcatori di stress residenti nell'ER, CHOP (la cui espressione risulta massima alle 48 ore) e GADD34. In particolare, l'incremento della forma breve di splicing dell'mRNA di XBP-1 correla con l'aumento dell'espressione di CHOP. Al contrario di quanto accade per le cellule PNT1a, la somministrazione di Poly-E non si accompagna ad una variazione dei livelli di espressione di GRP78/BiP. In queste cellule, la risposta all'ERS, produce un accumulo di proteine poliubiquitinate nei tempi successivi ai trattamenti con il Poly-E. La riduzione osservabile dopo le 24 ore è correlabile più ad una compromissione definitiva della cellula, ormai indirizzata alla morte e nella quale i processi biosintetici sono sicuramente ridotti, piuttosto che ad una attenuazione del fenomeno di UPR. Anche in questo caso, la conferma che la formazione dei vacuoli osservati fosse associata all'ERS ci è stata data dalla marcatura fluorescente con calreticulina. Nel contesto delle cellule PC-3 le porzioni di reticolo appaiono più dilatate e confluenti, nel tempo, in strutture vacuolari di ampie dimensioni.

Nelle cellule PC-3, dunque, le proteine eIF2 $\alpha$  fosforilata, GADD34 e CHOP, aumentano di espressione dopo il trattamento (coerentemente con quanto osservato per i loro mRNA) e fungono da sensori in grado di percepire lo stimolo stressorio e le variazioni delle condizioni omeostatiche generali. In situazioni di prolungata esposizione al Poly-E le suddette proteine sarebbe responsabili dell'innescare di segnali che portano la cellula verso una morte per vacuolizzazione non autofagica caspasi-indipendente.

**213** *Il coinvolgimento di p38 MAPK e dei membri BH3-only nei processi di apoptosi e di morte per vacuolizzazione non autofagica rispettivamente in cellule PNT1a e PC-3 a seguito del trattamento con Poly-E.*

p38 MAPK è un membro della famiglia di MAP chinasi attivato tramite fosforilazione in risposta a varie tipologie di stress. Mentre il percorso di ERK (MAPK attivate da segnali extracellulari) regola principalmente un programma di proliferazione e sopravvivenza e la via di JNK è in grado di promuovere sia la proliferazione che l'apoptosi [509], al contrario, la via di p38 MAPK spesso è implicata nella soppressione della tumorigenesi perché può inibire la crescita delle cellule diminuendo l'espressione della ciclina D [510] e attivando i percorsi dei geni oncosoppressori p16/Rb e p19ARF/p53 [511, 512]. Oltre ad innescare la trascrizione di geni collegati all'ERS (come CHOP), p38 MAPK è criticamente coinvolta nell'attivazione di varie



proteine BH3-only come PUMA e Bax [513, 514, 515]. Il ruolo di p38 MAPK nella soppressione della tumorigenesi non è chiaro, nonostante uno studio di Dolado e collaboratori (2007) dimostri come p38 MAPK agisca selettivamente come un sensore in risposta a specie reattive dell'ossigeno regolando negativamente la tumorigenesi.

Più studi condotti sull'utilizzo di EGCG in ambito chemiopreventivo riportano una regolazione negativa della tumorigenesi accompagnata sia dall'induzione di fosforilazione del percorso di p38 MAPK [516, 517] che tramite un blocco del ciclo cellulare promosso da un'inibizione della fosforilazione. Nell'ambito del trattamento del PCa con catechine del tè verde l'inibizione delle tumorigenesi può essere associata sia ad una defosforilazione di p38, con eventuale innesco del percorso apoptotico, sia tramite un blocco dell'attivazione del percorso di p38 MAPK. Nello specifico, in cellule DU145, il trattamento con EGCG porta ad un blocco proliferativo dovuto ad un'inibizione dell'attività delle MMP-2 e -9 attraverso l'inibizione della fosforilazione di p38 MAPK [518]. Uno studio condotto in cellule LNCaP e PC-3 ha mostrato invece come l'inibizione della fosforilazione della proteina Bcl-X<sub>L</sub>, attraverso l'inibizione dell'attività del proteasoma e della via di p38 MAPK, induce morte per apoptosi [519, 520].

Riguardo l'apoptosi, l'attivazione trascrizionale della proteina BH3-only PUMA svolge un ruolo importante nell'indurre la morte delle cellule. Tali proteine compaiono in risposta a stress cellulari, attivando direttamente Bax/Bak (gli effettori a valle) o contrapponendosi alla funzione dei membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2. Una delle quattro isoforme di p38, p38 $\alpha$ , è necessaria per l'attivazione di Bax e l'induzione di apoptosi [521]. L'inibizione di p38 $\alpha$  è sufficiente ad inibire il raggruppamento mitocondriale di Bax e l'attivazione di morte cellulare. Poiché l'attivazione di p38 $\alpha$  attraverso la sua fosforilazione comporta l'induzione di un cambiamento conformazionale di Bax e la sua traslocazione ai mitocondri [522], p38 è un importante molecola di attivazione a monte di Bax, in risposta ad una varietà di stimoli dannosi.

In cellule PNT1a, abbiamo verificato un consistente aumento dei livelli di PUMA la quale, bloccando l'attività anti-apoptotica dei membri della famiglia di Bcl-2, consente l'incremento dei livelli di espressione di Bak entro le prime 12 ore di trattamento. Nonostante in questo intervallo di tempo il livello di Bax non subisca variazioni significative rispetto al controllo, non possiamo escludere che, assieme a Bak, si riorganizzi in pori transmembrana sulle membrane mitocondriali, favorendo il rilascio del citocromo-*c* e la prosecuzione del programma di morte apoptotica nelle ore successive. Anche Bad sembra dare il suo contributo a bloccare le funzioni dei membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2 almeno fino alle 12 ore. Dopo questo tempo, invece, il livello della sua forma fosforilata inattiva prevale.

In queste cellule, il meccanismo di espressione di PUMA non appare significativamente correlata all'attivazione di p38 $\alpha$  (la cui fosforilazione non subisce grandi cambiamenti entro le prime 6 ore dopo il trattamento) ma potrebbe essere riconducibile sia ad un intervento di p53 (in questa linea

cellulare parzialmente attiva) oppure, visti i risultati ottenuti, più verosimilmente, al segnale prodotto dalle condizioni di stress dell'ER, a seguito del trattamento con Poly-E.

In cellule PC-3, al contrario, il trattamento con Poly-E incrementa il livello di fosforilazione di p38 $\alpha$  a tempi tardivi. In concomitanza aumenta l'espressione della proteina PUMA e si assiste all'aumento del livello proteico di Bad: le due proteine cooperano per bloccare l'attività dei membri anti-apoptotici della famiglia di Bcl-2. Nonostante le variazioni nel livello di espressione di Bax e Bak, comunque non significative, è presumibile che le due molecole si aggregino nei pori transmembrana a livello mitocondriale permettendo il rilascio del citocromo-*c* e, dunque, la formazione dell'apoptosoma. Questo spiegherebbe la debole attivazione della procaspasi-9 che, però, non è in grado di attivare il clivaggio di PARP-1. L'alterata permeabilità mitocondriale consente il rilascio di AIF il quale, migrando nel nucleo, diventa il responsabile della condensazione e successiva frammentazione della cromatina, confermando l'ipotesi di una morte per vacuolizzazione non autofagica caspasi-indipendente.

PUMA è il più potente induttore pro-apoptotico tra i membri della sua famiglia. Anche se originariamente identificato come gene bersaglio di p53, in risposta a determinati stimoli, quali la deprivazione di nutrienti [524] e lo stress del reticolo endoplasmatico indotto da tunicamicina [525], è noto che la sua espressione viene regolata anche in maniera p53-indipendente. L'induzione di PUMA nel modello di cellule PC-3 si verifica con una modalità indipendente da p53 (che, in questa linea cellulare è mutato ed inattivo). Dunque, la perdita di espressione di p53 non influenza le risposte al trattamento con Poly-E. Ciò suggerisce che l'attivazione di p53 potrebbe aver un ruolo ridondante nella citotossicità mediata dal Poly-E. I nostri risultati sono dunque in linea con quanto già dimostrato da Gupta e colleghi i cui esperimenti avevano evidenziato un ruolo di EGCG nel modulare negativamente la crescita di cellule di PCa (LNCaP e DU145) inducendo arresto del ciclo cellulare e apoptosi indipendentemente dalla risposta agli androgeni e lo stato di p53 [450]. L'induzione di PUMA è concomitante con l'attivazione p38 $\alpha$  per la quale potremmo dunque ipotizzare un ruolo di molecola "sensore" nei confronti di un possibile stress ossidativo indotto dal trattamento con Poly-E.

In sintesi, nel nostro studio, si sono identificati nuovi elementi nella cascata di segnali che porta alla permeabilizzazione della membrana mitocondriale in cellule trattate con catechine del tè verde, suggerendo come p38 MAPK e PUMA fungano da segnali a monte per attivare l'effettore Bax e stimolare la via mitocondriale per indurre apoptosi classica o morte caspasi-indipendente.

L'analisi morfologica al microscopio confocale a laser ha permesso di tradurre in immagini quanto accade a livello molecolare evidenziando, in particolare modo, il progressivo distacco e la morte in sospensione delle cellule PNT1a, a differenza di quanto accade per le cellule PC-3 saldamente adese al substrato di crescita anche quando irrimediabilmente

compromesse. Questo differente comportamento è stato confermato dai dati molecolari. Abbiamo infatti verificato che, mentre in cellule PNT1a il trattamento con Poly-E causa una progressiva riduzione nell'espressione di E-caderina (proteina presente a livello delle giunzioni cellula-cellula) si assiste invece ad un aumento transitorio dei livelli di vimentina (fino alle 24 ore di trattamento) compatibile con un rimodellamento del citoscheletro delle cellule che si arrotondano e progressivamente perdono contatto con la superficie di crescita.

In cellule PC-3, il marcatore epiteliale E-caderina aumenta, giustificando come, nonostante la forte compromissione dell'omeostasi cellulare, molte cellule rimangono adese al substrato di crescita dove andranno in seguito incontro ad un lento processo di morte per vacuolizzazione non autofagica caspasi-indipendente. Sempre in questo modello si assiste ad una progressiva riduzione dell'espressione di vimentina e fibronectina. Nel complesso, in cellule PC-3, è possibile speculare come, *in vitro*, l'aumento dei marcatori epiteliali e la riduzione di quelli mesenchimali suggerisca un recupero del fenotipo epiteliale, che viene perso durante la transizione epitelio-mesenchimale (EMT, processo in grado di rendere le cellule tumorali capaci di acquisire un fenotipo migratorio, dunque metastatico), subita dalle cellule nei processi di cancerogenesi.

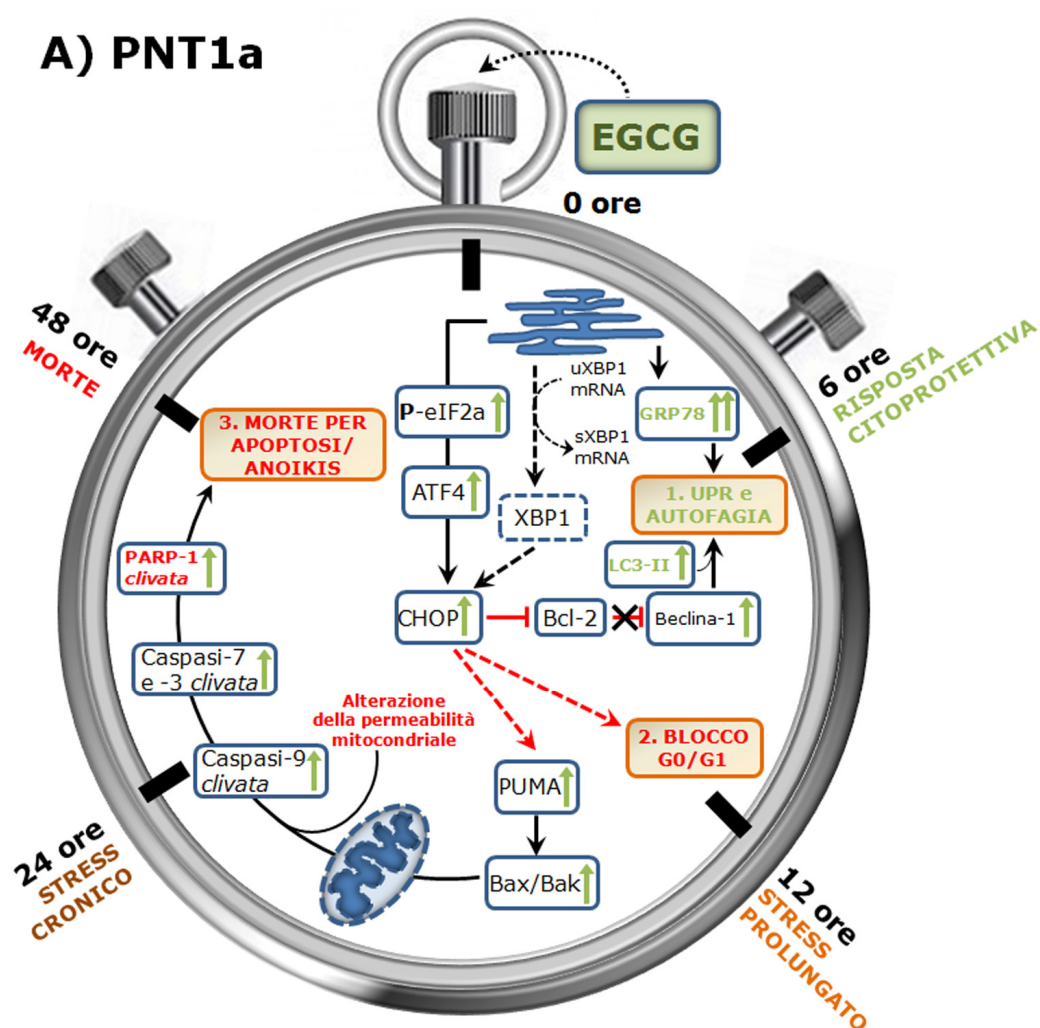
#### **214** Conclusioni.

In conclusione, i dati raccolti evidenziano che la somministrazione di Poly-E risulta citotossico per le linee cellulari PNT1a e PC-3, attivando percorsi di morte che vengono indotti con tempi e modalità diversificate. In contrasto con l'apoptosi caspasi-dipendente (innescata da un iniziale stress del reticolo endoplasmatico e del mitocondrio) che poi evolve in anoikis per le cellule PNT1a, nelle cellule PC-3 la somministrazione di Poly-E induce una massiccia vacuolizzazione e progressiva disorganizzazione del reticolo endoplasmatico fin nei tempi iniziali, con l'innescamento di uno stress del reticolo endoplasmatico che cronicizza e conduce ad un processo di morte per vacuolizzazione non autofagica, coinvolgente la via mitocondriale in tempi tardivi, con l'intervento delle proteine BH3-only della famiglia Bcl-2 e di p38 $\alpha$ .

Per le PNT1a l'autofagia è un processo marginale e transitorio, con funzioni pro-sopravvivenza, che si limita alle 6 ore dopo il trattamento con Poly-E ed è causa concomitante della transitoria attivazione di stress del reticolo endoplasmatico che lascia poi il posto, alle 12 ore, ad un processo di morte programmata attraverso l'attivazione della via intrinseca delle caspasi, nella quale sono coinvolti le proteine BH3-only della famiglia Bcl-2. L'insieme dei risultati ottenuti è stato schematizzato nella figura 8.2 A.

Nel caso delle PC-3 è possibile speculare che sussista la formazione di vescicole autofagiche, probabilmente incapaci di fondersi con i lisosomi che, non espletando la loro funzione, si accumulano nel citoplasma danneggiando la cellula. Il reticolo endoplasmatico, tentando il ripristino di una normale omeostasi, fin da subito subisce gli effetti tossici del Poly-E. Lo stress

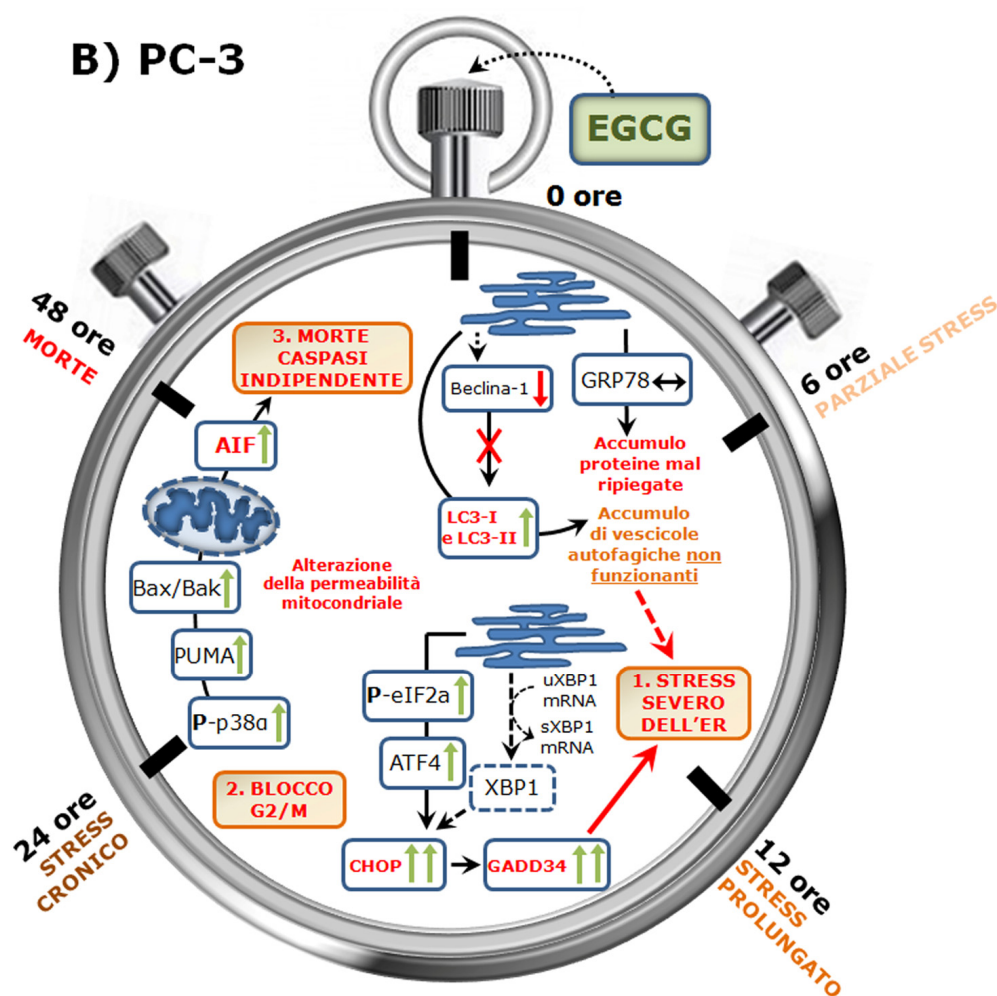
iniziale poi cronicizza e l'organello perde progressivamente la sua funzionalità, nonché la struttura morfologica. In queste cellule, a tempi tardivi, s'innescia un programma di morte per vacuolizzazione non autofagica, paroptosi-simile e caspasi-indipendente che, attraverso le proteine BH3-only della famiglia Bcl-2, culmina con la permeabilizzazione del mitocondrio ed il rilascio di AIF. L'attivazione di p38 $\alpha$  appare chiaramente correlata a questi eventi e potrebbe ricondursi a quanto già esposto in letteratura sul suo ruolo di molecola responsiva a determinati tipi di stress esogeni (si veda figura 8.2 B).



**Figura 8.2. Modello degli effetti antiproliferativi indotti da Poly-E.** In cellule prostatiche immortalizzate (PNT1a) e tumorigeniche (PC-3) il Poly-E agisce sequenzialmente inducendo:

1. un'alterazione morfologica delle reti di membrane componenti il reticolo endoplasmatico rugoso;
2. un blocco del ciclo cellulare;
3. una modificazione di permeabilità della membrana mitocondriale esterna, con morte della cellula.

Le cellule PNT1a (A) reagiscono inizialmente innescando il macchinario autofagico ed un moderato stress del reticolo endoplasmatico a scopo citoprotettivo. Dopo le 24 ore prevale l'innescio di un percorso di morte apoptotica caspasi-dipendente. Nelle cellule PC-3 (B), l'esposizione al Poly-E, determina un marcato stress del reticolo, evidenziato sia dall'attivazione di parametri molecolari che da nette alterazioni morfologiche. La cronicizzazione dello stress, oltre le 24 ore, determina l'attivazione di un percorso mitocondriale caspasi-indipendente che indirizza le cellule alla morte (*per maggiori dettagli si vedano Risultati e Conclusioni*).



**Figura 8.2.** (vedi didascalia nella pagina precedente).

Questi dati sperimentali sono in accordo con i dati clinici precedentemente ottenuti dal nostro gruppo di ricerca con una miscela di catechine di tè verde simile al Poly-E che si è rivelata efficace come cura chemiopreventiva in pazienti affetti da HG-PIN, i quali corrono un alto rischio di sviluppo del carcinoma prostatico [486]. Molto rimane da chiarire circa il ruolo di p38α nel modulare l'inibizione della tumorigenesi inducendo morte cellulare, nonché il suo possibile ruolo di sensore molecolare (la sua attivazione avviene in risposta alla produzione di ROS da parte del Poly-E in cellule PC-3? E se questo è vero per le cellule PC-3, in cellule PNT1a non tumorigeniche quale via regola p38α?). Appare inoltre opportuno esplorare

l'eventuale uso di Poly-E in tumori clinicamente conclamati. Sebbene i primi risultati di studi clinici condotti su pazienti giunti ad uno stadio terminale della malattia (tumore prostatico resistente alla castrazione) non siano stati incoraggianti [500] le ultime evidenze cliniche in pazienti sottoposti a prostatectomia radicale [500] hanno dimostrato come la somministrazione di Poly-E, durante il periodo che intercorreva tra l'ultima biopsia e l'intervento, era in grado di ridurre in maniera significativa i livelli sierici di alcuni importanti biomarcatori, quali HGF, VEGF, PSA, IGF-I, e IGFBP-3. Questo suggerisce come l'utilizzo di catechine del tè verde possa essere un promettente agente per la chemioprevenzione di pazienti a rischio di PCa o con PCa ai primi stadi.

### **Ringraziamenti.**

*Un sentito ringraziamento a coloro che hanno reso possibile la realizzazione di questo lavoro di tesi. Al Prof. Saverio Bettuzzi e la Dott.ssa Federica Rizzi, per avermi permesso di svolgere il lavoro di ricerca presso il laboratorio di Biochimica del Dipartimento di Medicina Sperimentale. Alla Prof.ssa Rita Gatti, al Dr. Jacopo Uggeri e al Dr. Saverio Tardito, per i consigli preziosi e il supporto tecnico. Un grazie a Christian Bassi, per i disegni.*

**Alessandro Silva.**

### **BIBLIOGRAFIA dei paragrafi da 179 a 214.**

489. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW.: **Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).** *Invest Urol.* 1979 Jul;17(1):16-23.
490. Valeri A, Drelon E, Paiss T, Vogel W, de Petriconi R, Hautmann R, Fournier G, Mangin P, Berthon P, Cussenot O.: **Genetic analysis of familial prostatic cancer: localization of a gene predisposing to prostatic cancer (PCa) on chromosome 1q 42.2-43].** *Prog Urol.* 1999 Sep;9(4):680-8. French.
491. Orlandini G, Ronda N, Gatti R, Gazzola GC, Borghetti A.: **Receptor-ligand internalization.** *Methods Enzymol.* 1999;307:340-50. No abstract available
492. Dallavalle F, Gaccioli F, Franchi-Gazzola R, Lanfranchi M, Marchiò L, Pellinghelli MA, Tegoni M.: **Synthesis, molecular structure, solution equilibrium, and antiproliferative activity of thioxotriazoline and thioxotriazole complexes of copper II and palladium II.** *J Inorg Biochem.* 2002 Nov 11;92(2):95-104.
493. Yang CS, Wang H.: **Mechanistic issues concerning cancer prevention by tea catechins.** *Mol Nutr Food Res.* 2011 Jun;55(6):819-31.
494. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ.: **The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.** *Cell* 1993 75 (4): 805-16.
495. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al.: **p53 status and the efficacy of cancer therapy *in vivo*.** *Science.* 1994;266:807-10
496. Hawkins D, Demers W, Galloway D.: **Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents.** *Cancer Res.* 1996;56:892-8.
497. Ho HY, Wei TT, Cheng ML, Chiu DT.: **Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate protects cells against peroxynitrite-induced cytotoxicity: modulatory effect of cellular G6PD status.** *J Agric Food Chem.* 2006 Mar 8;54(5):1638-45.
498. Lim YC, Cha YY.: **Epigallocatechin-3-gallate induces growth inhibition and apoptosis of human anaplastic thyroid carcinoma cells through suppression of**

- EGFR/ERK pathway and cyclin B1/CDK1 complex.** *J Surg Oncol.* 2011 Dec;104(7):776-80.
499. Klionsky DJ et al.: **Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes.** *Autophagy.* 2008 Feb;4(2):151-75. Review.
500. Chen YB, Hou JH, Feng XY, Chen S, Zhou ZW, Zhang XS, Cai MY.: **Decreased expression of Beclin 1 correlates with a metastatic phenotypic feature and adverse prognosis of gastric carcinomas.** *J Surg Oncol.* 2011 Nov 17
501. Yang Z, Klionsky DJ.: **Eaten alive: a history of macroautophagy.** *Nat Cell Biol.* 2010 Sep;12(9):814-22.
502. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E.: **Role of autophagy in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2007; 7:961-7
503. Oyadomari S, Yun C, Fisher EA, Kreglinger N, Kreibich G, Oyadomari M, et al.: **Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload.** *Cell* 2006;126:727-39
504. Kim I, Shu CW, Xu W, Shiau CW, Grant D, Vasile S, et al.: **Chemical biology investigation of cell death pathways activated by endoplasmic reticulum stress reveals cytoprotective modulators of ASK1.** *J Biol Chem* 2009;284:1593-603
505. Lai E, Teodoro T, Volchuk A.: **Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response.** *Physiology* 2007;22:193-201.30
506. Kim I, Shu CW, Xu W, Shiau CW, Grant D, Vasile S, et al.: **Chemical biology investigation of cell death pathways activated by endoplasmic reticulum stress reveals cytoprotective modulators of ASK1.** *J Biol Chem* 2009;284:1593-603
507. Jimbo A, Fujita E, Kouroku Y, Ohnishi J, Inohara N, Kuida K, et al.: **ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation.** *Exp Cell Res* 2003;283:156-66. 32
508. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, et al.: **Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program; an Apaf-1-independent intrinsic pathway.** *J Biol Chem* 2002;277:21836-42
509. Kennedy NJ, Davis RJ.: **Role of JNK in tumor development.** *Cell Cycle.* 2003 May-Jun;2(3):199-201. Review.
510. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouyssegur J.: **Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway.** *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271(34):20608-16.
511. Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, Ambrosino C, Sauter G, Nebreda AR, Anderson CW, Kallioniemi A, Fornace AJ Jr, Appella E.: **Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity.** *Nat Genet.* 2002 Jun;31(2):210-5.
512. Bulavin DV, Phillips C, Nannenga B, Timofeev O, Donehower LA, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ Jr.: **Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway.** *Nat Genet.* 2004 Apr;36(4):343-50
513. Lafarga V, Cuadrado A, Nebreda AR.: **p18(Hamlet) mediates different p53-dependent responses to DNA-damage inducing agents.** *Cell Cycle.* 2007 Oct 1;6(19):2319-22
514. Van Laethem A, Van Kelst S, Lippens S, Declercq W, Vandenabeele P, Janssens S, Vandenheede JR, Garmyn M, Agostinis P.: **Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes.** *FASEB J.* 2004 Dec;18(15):1946-8.
515. Adachi S, Shimizu M, Shirakami Y, Yamauchi J, Natsume H, Matsushima-Nishiwaki R, To S, Weinstein IB, Moriwaki H, Kozawa O.: **(-)-Epigallocatechin gallate downregulates EGF receptor via phosphorylation at Ser1046/1047 by p38 MAPK in colon cancer cells.** *Carcinogenesis.* 2009 Sep;30(9):1544-52
516. Shankar S, Ganapathy S, Srivastava RK.: **Sulforaphane enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer orthotopic model through regulation of apoptosis, metastasis, and angiogenesis.** *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):6855-66.

517. Lim YC, Cha YY.: **Epigallocatechin-3-gallate induces growth inhibition and apoptosis of human anaplastic thyroid carcinoma cells through suppression of EGFR/ERK pathway and cyclin B1/CDK1 complex.** *J Surg Oncol.* 2011 Dec;104(7):776-80.
518. Vayalil PK, Katiyar SK.: **Treatment of epigallocatechin-3-gallate inhibits matrix metalloproteinases-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinases, c-jun and NF-kappaB in human prostate carcinoma DU-145 cells.** *Prostate.* 2004 Apr 1;59(1):33-42.
519. Kazi A, Smith DM, Zhong Q, Dou QP.: **Inhibition of bcl-x(I) phosphorylation by tea polyphenols or epigallocatechin-3-gallate is associated with prostate cancer cell apoptosis.** *Mol Pharmacol.* 2002 Oct;62(4):765-71.
520. Albrecht DS, Clubbs EA, Ferruzzi M, Bomser JA: **Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits PC-3 prostate cancer cell proliferation via MEK-independent ERK1/2 activation.** *Chem Biol Interact.* 2008 Jan 10;171(1):89-95.
521. Van Laethem A, Van Kelst S, Lippens S, Declercq W, Vandenabeele P, Janssens S, Vandenheede JR, Garmyn M, Agostinis P.: **Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes.** *FASEB J* 2004 18, 1946–1948
522. Cuadrado A, Lafarga V, Cheung PC, Dolado I, Llanos S, Cohen P, Nebreda AR.: **A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis.** *EMBO J.* 2007 Apr 18;26(8):2115-26
523. Concannon CG, Segura MF, Fernandez-Gomez FJ, Llecha N, Comella JX, Prehn JH, Jordan J, Gomez-Lazaro M, Galindo MF.: **6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA.**, *J Neurochem.* 2008 Mar;104(6):1599-612
524. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A.: **p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa.** *Science* 2003302, 1036–1038.
525. Reimertz C, Kogel D, Rami A, Chittenden T, Prehn JH.: **Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway.** *J. Cell Biol.* 2003 162, 587–597