



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Medicina e Chirurgia

XXXV Corso di Dottorato in Medicina Molecolare

***La spermina/spermidina acetiltransferasi (SSAT): un possibile bersaglio
farmacologico per aumentare la sensibilità delle cellule tumorali
prostatiche alla deplezione di folati.***

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

TUTOR:

Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

CORRELATORE:

Chiar.ma Prof.ssa Valeria Naponelli

DOTTORANDA:

Dott.ssa Simona Izzo

A.A. 2019/2020-2021/2022

Indice

Introduzione	7
Il cancro della prostata	8
Epidemiologia	8
Struttura e funzioni della ghiandola prostatica	10
Diagnosi	14
Trattamento e chemioprevenzione del carcinoma prostatico	16
Poliammine	17
Funzioni delle poliammine	18
Metabolismo delle poliammine	21
Trasporto delle poliammine	24
Poliammine e cancro	25
Poliammine e stress ossidativo	29
Analoghi delle poliammine	30

Metabolismo delle unità monocarbossiliche	31
Metabolismo della metionina	31
Funzioni della metionina	34
“Salvage pathway” della metionina e il metabolismo delle poliammine	36
Ciclo del folato	38
Folato e rischio di cancerogenesi	40
Ferroptosi	41
ROS	44
Ferroptosi e poliammine	47
<i>Scopo della tesi</i>	48
<i>Materiali e metodi</i>	52
Caratteristiche delle linee cellulari e condizioni di crescita	53
Calcolo del population doubling level	53
Curve di crescita e saggio con cristal violetto	54

Analisi FACS	55
Clonogenic Assay	55
Determinazione poliammine intra ed extra cellulari mediante HPLC	56
Estrazione e quantificazione dell'RNA	57
Retrotrascrizione	58
Real time PCR	58
Saggio enzimatico SSAT	59
Determinazione dei ROS e normalizzazione con cristal violetto	60
Determinazione del glutatione	61
Trattamento con il DENSpm	62
Saggio di vitalità	63
Analisi statistica	65
<i>Risultati</i>	66
Effetto della deplezione di folato sulla proliferazione delle cellule PC3 e BPH1	67
Effetto della deplezione di folato sulla capacità di formare colonie	69
Effetto della deplezione di folato sul ciclo cellulare	72
Effetto della deplezione di folato sui livelli di poliammine intra ed extracellulari	75

Effetto della deplezione di folato sui livelli di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo delle poliammine	77
Effetto della deplezione di folato sull'attività enzimatica di SSAT	79
Effetto della deplezione di folato sulla produzione di ROS	81
Effetto della deplezione di folato sullo stato di ossidazione del glutatione	83
Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSpm sulla proliferazione cellulare	85
Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSpm sulla vitalità cellulare	87
Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSpm sui livelli di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo delle poliammine	88
Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSpm sui livelli di poliammine intra cellulari	90
Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSpm sui livelli di poliammine extra cellulari	93
Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSpm sulla produzione di ROS	96
Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSpm sullo stato di ossidazione del glutatione	98
Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSpm sui livelli di espressione dei geni coinvolti nei meccanismi di attivazione della ferroptosi	100

Conclusioni

103

Bibliografia

108

Introduzione

1. Il cancro della prostata.

1.1. Epidemiologia.

Nell'ultimo decennio il carcinoma prostatico è divenuto il tumore più frequentemente diagnosticato nella popolazione maschile dei Paesi occidentali, compresa l'Italia dove rappresenta circa il 19% dei tumori maschili diagnosticati (Figura 1). Nel 2020 sono state stimate circa 36.000 nuove diagnosi. L'aumento del tasso di incidenza evidenziato negli ultimi decenni è associato ad una diminuzione del tasso di mortalità dei pazienti affetti da questa patologia: tale andamento è dovuto principalmente all'incremento dell'età media della popolazione e all'aumento della pressione diagnostica che ha permesso di identificare il carcinoma prostatico già dagli stadi iniziali della trasformazione neoplastica.

L'eziologia del carcinoma della prostata non è ancora stata chiarita, ma si tratta di una patologia multifattoriale che dipende dall'interazione di fattori ambientali, ormonali e genetici. I principali fattori di rischio correlati a questa malattia sono l'età avanzata, la razza e lo stile di vita. Il tasso di incidenza più elevato è stato riscontrato in America, Europa e Australia, mentre in Asia e Africa l'incidenza sembra essere piuttosto bassa. Queste differenze sono dovute alla suscettibilità genetica, allo stile di vita e allo stato socio-economico della popolazione, ma anche alla disponibilità e all'accesso alle cure mediche.¹⁻³

PROSTATA	
Incidenza	Nel 2020, sono state stimate circa 36.000 nuove diagnosi. Le neoplasie prostatiche sono le più frequenti nell'uomo (19% di tutti i tumori maschili). Le stime per il 2021 non sono disponibili
Mortalità	Nel 2021, sono stimati 7.200 decessi per tumori della prostata
Sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi	91%
Probabilità di vivere ulteriori 4 anni condizionata ad aver superato il primo anno dopo la diagnosi	94%
Prevalenza	Sono 564.000 gli uomini viventi in Italia dopo una diagnosi di tumore della prostata

Figura 1. Percentuali di incidenza e tasso di guarigione del tumore della prostata in Italia. Il carcinoma prostatico risulta uno dei tumori maggiormente diffusi nella popolazione generale (19% nel 2021). Nonostante la prevalenza alta, il tasso di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi risulta essere molto elevato (91%).³

1.2. *Struttura e funzione della ghiandola prostatica.*

La prostata è una ghiandola delle dimensioni di una noce che fa parte del sistema genitale maschile. Lo sviluppo e il normale funzionamento della ghiandola prostatica sono regolati dagli androgeni (testosterone e diidrotestosterone) che sono ormoni sessuali maschili responsabili del differenziamento e della maturazione degli organi riproduttivi. Il testosterone viene sintetizzato principalmente a livello del testicolo dalle cellule del Leydig e trasportato nei tessuti target dove viene convertito nella sua forma più attiva, cioè nel diidrotestosterone (DHT) che lega il recettore androgenico (AR) con maggiore affinità rispetto al testosterone. Nella prostata il AR, localizzato nella porzione epiteliale della ghiandola, controlla la proliferazione cellulare, il differenziamento e modula le funzioni metaboliche e secretorie della prostata; invece, le funzioni del AR con localizzazione stromale sono soprattutto legate alla produzione di fattori di crescita che stimolano la proliferazione delle cellule basali e inibiscono l'apoptosi delle cellule secretorie del lume.⁴

All'inizio il carcinoma prostatico si sviluppa generalmente all'interno della ghiandola e in seguito può diffondere localmente o dare metastasi a distanza diffondendo per via ematica e/o linfatica. La progressione del carcinoma prostatico è piuttosto imprevedibile ed in genere le forme indolenti organo confinate sono poco aggressive e solo una piccola parte delle forme neoplastiche evolve verso una forma aggressiva.

Il ruolo del AR nel cancro della prostata è di significativa importanza. Circa l'80-90% dei casi di tumore della prostata, inizialmente, sono dipendenti dagli androgeni e vengono trattati utilizzando una terapia di deprivazione ormonale che può essere ottenuta attraverso la castrazione chirurgica o chimica. Nella maggior parte dei casi il tumore risponde bene alle terapie di deprivazione androgenica.^{1,4,5}

La deprivazione androgenica provoca una perdita delle cellule tumorali in seguito all'attivazione di morte per apoptosi. Però nel 15% dei casi le cellule tumorali acquisiscono una forma di resistenza alle terapie di deprivazione androgenica che porta allo sviluppo di una forma di cancro resistente alla castrazione (CPRC). Le cellule tumorali, in questo caso, appaiono morfologicamente alterate, ma non in stato di necrosi o apoptosi. Questo meccanismo di resistenza permette alle cellule tumorali di continuare a proliferare.⁶

Attualmente le principali terapie in uso per il carcinoma prostatico sono l'ablazione chirurgica e la deprivazione androgenica preceduta da chemioterapia nei casi di tumore maligno, mentre per i casi di CPRC non esistono delle terapie, ma soltanto cure palliative.^{1,4,6}

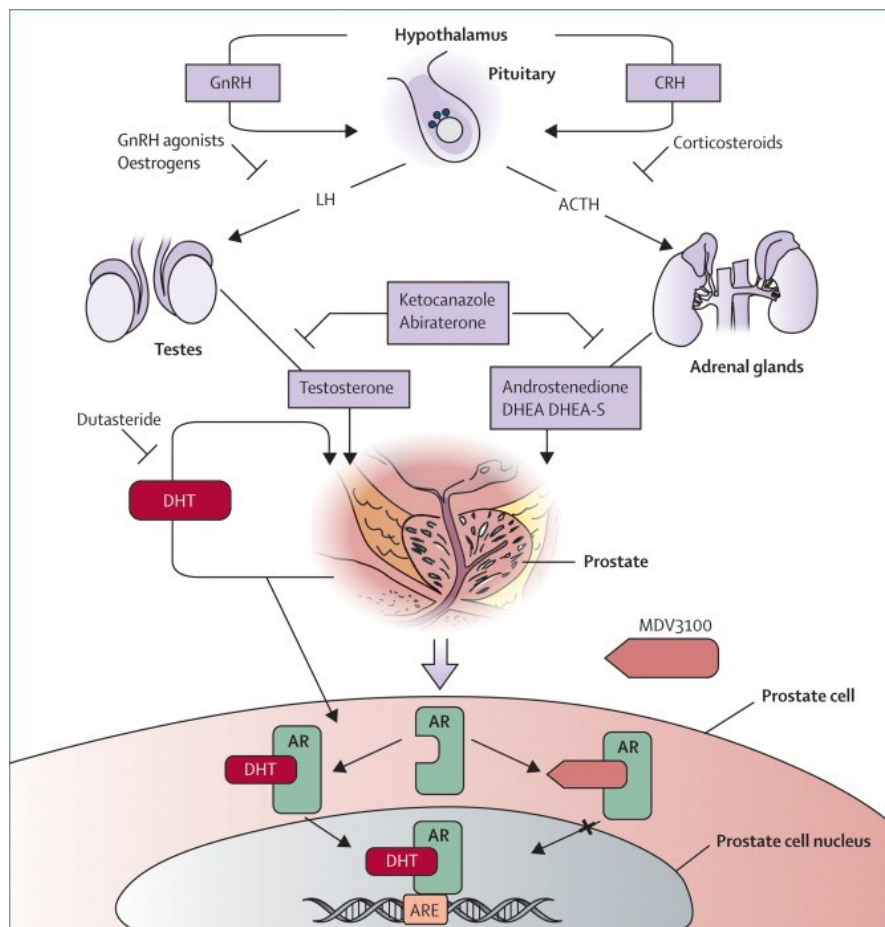


Figura 2. Meccanismi di regolazione AR dipendente e antagonisti AR. Il funzionamento e lo sviluppo della ghiandola prostatica sono dipendenti dagli ormoni androgeni che legano i recettori AR e promuovono l'espressione di geni implicati nella crescita e nel differenziamento.⁶

Studi di correlazione familiare hanno evidenziato una serie di geni responsabili del cancro della prostata ereditario, come *hpc1*, *pcap*, *hpcx*, *capb*, *hpc20*, *hoxb13*. Esiste un'associazione con le mutazioni *brca1* e *brca2* e l'aggressività del cancro della prostata. Alcuni geni, come *brca1*, *brca2*, *chek2*, *atm*, *palb2*, *mlh1*, *msh2*, *msh6* e *pms2*, coinvolti negli eventi di riparazione del danno al DNA, sono utilizzati come biomarker del cancro della prostata. Mutazioni in questi geni possono essere predittive della risposta del paziente ad alcuni tipi di chemioterapie a base di platino.⁷

I geni *brca1* e *brca2* sono conosciuti come principali biomarker per il tumore al seno e all'ovario. Questi geni codificano per delle proteine che agiscono come soppressori tumorali che intervengono nei processi di danno e riparazione al DNA. Nel 3% circa di pazienti affetti da cancro della prostata sono presenti delle mutazioni in questi geni.⁷

La maggior parte di queste mutazioni è correlata con una riduzione dell'efficienza della risposta alla terapia di deprivazione androgenica.⁷

Un elevato consumo di alimenti trasformati, carne, cibi ad alto contenuto di grassi e una minore assunzione di verdura e frutta sono associati ad un rischio più elevato di incidenza del cancro (Figura 3).^{8,9}

Numerosi studi hanno dimostrato che lo sviluppo del cancro della prostata è correlato con un aumento dell'IGF-1.⁸⁻¹⁰

I fattori di crescita insulino-simili (IGF-1 e IGF-2) sono coinvolti nella crescita, nella differenziazione e nella sopravvivenza delle cellule.¹⁰ L'elevata assunzione di proteine, soprattutto di origine animale, rappresenta lo stimolo principale per il rilascio di IGF-1 da parte del fegato. L'IGF-1 è implicato indirettamente come mediatore degli effetti dello squilibrio energetico.^{8,10} È stato dimostrato che una restrizione energetica associata a bassi livelli di IGF-1 attenua la progressione e la promozione del cancro, mentre la restrizione energetica e l'integrazione di IGF-1 hanno portato ad un aumento del volume tumorale. L'IGF-1 è anche un regolatore paracrino della crescita e agisce sullo sviluppo della prostata quando viene prodotto dallo stroma.⁸

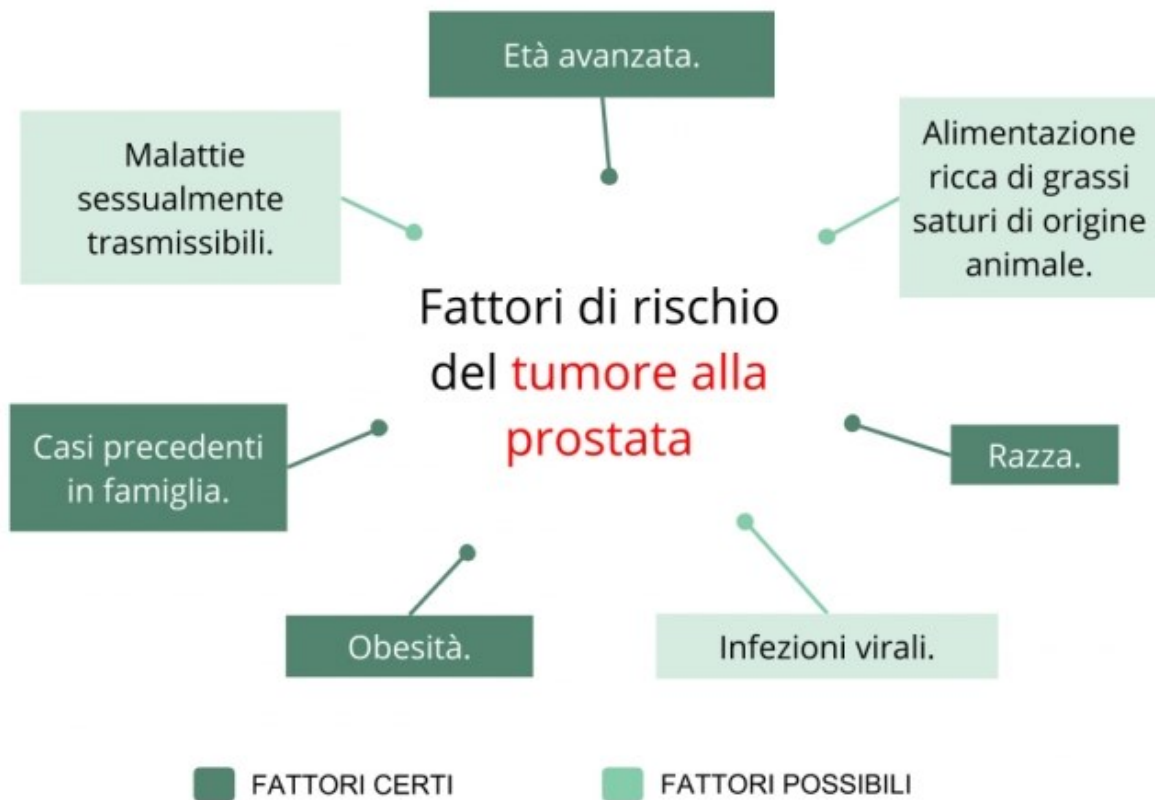


Figura 3. Fattori di rischio correlati al cancro della prostata. I principali fattori di rischio associati al cancro della prostata sono l'età avanzata, l'appartenenza a determinate popolazioni, l'obesità e l'ereditarietà. Altri fattori di rischio che probabilmente aumentano l'incidenza del cancro della prostata sono le malattie sessualmente trasmissibili, infezioni virali e il consumo eccessivo di grassi saturi di origine animale.¹¹

Il tumore della prostata, spesso nella sua forma precoce ma talvolta anche in quella più avanzata, può essere del tutto asintomatico. Quando invece sono presenti sintomi, essi generalmente includono dolore alla minzione, difficoltà ad iniziare ad urinare, necessità di urinare frequentemente, ematuria, dolore durante l'eiaculazione. Spesso questi stessi sintomi possono essere collegati anche a problemi prostatici di tipo benigno, come l'iperplasia prostatica benigna.

1.3. Diagnosi.

Il carcinoma della prostata è una patologia di solito a lenta progressione e con un periodo di latenza molto lungo. Quando la patologia diventa aggressiva e metastatica non è più curabile: per tale ragione è estremamente importante individuare la trasformazione neoplastica nei primi stadi della sua insorgenza e perciò protocolli di screening in grado di identificare lesioni precoci costituiscono la base delle procedure terapeutiche.

Le tecniche diagnostiche dovrebbero consentire la distinzione netta tra le patologie benigne della prostata ed il carcinoma e tra le forme latenti di tumore della prostata, che potenzialmente non progrediranno mai o molto tardivamente, e le forme più aggressive, che necessitano quindi di un trattamento immediato. Quelle che vengono attualmente utilizzate per la diagnosi del tumore della prostata sono (Figura 4):

- esame rettale digitale;
- livello sierico del PSA;
- biopsia tissutale, che rimane lo standard di cura per la diagnosi quando si sospetta un tumore della prostata.^{1,2}

Il PSA (antigene prostata specifico) è una glicoproteina che viene sintetizzata dalle cellule prostatiche ed è un costituente del fluido spermatico la cui funzione è quella di aiutare la motilità degli spermatozoi. È stata scoperta nel 1970, ma soltanto nel 1991 è stata dimostrata la correlazione tra l'aumento dei livelli di PSA nel sangue e la probabile presenza di cancro della prostata. Il solo valore di PSA non è indice della presenza di cancro, a questo, infatti, va sempre associata una biopsia o un'esplorazione rettale. Il valore limite di PSA nel sangue è di 4 µg/L.^{2,12}

Solitamente questa proteina si trova legata ad un'altra proteina o in forma libera. Un aumento dei livelli di PSA libero può essere correlato con la presenza di un'iperplasia benigna, mentre l'utilizzo del rapporto tra PSA associato a proteina e PSA libero è un parametro diagnostico aggiuntivo che può fornire indicazioni utili per limitare le biopsie non necessarie.^{1,2,12}

Il livello sierico del PSA rimane il biomarcatore più comunemente utilizzato, anche se questo test ha una specificità del 51-91%. Queste limitazioni causano molte diagnosi errate di carcinoma della prostata e solo il 25% viene confermato dalla biopsia tissutale.^{2,12}

Ad oggi, la maggiore limitazione nell'uso delle procedure diagnostiche descritte è quello di non consentire la distinzione netta tra tumori indolenti e quelli aggressivi.

Negli ultimi anni, le linee guida dell'EAU (European Association of Urology) hanno raccomandato l'utilizzo di algoritmi che tengono conto del livello di PSA, dell'età, dell'esame rettale digitale e del volume della prostata per migliorare la diagnosi di carcinoma prostatico.^{1,2,12-14}

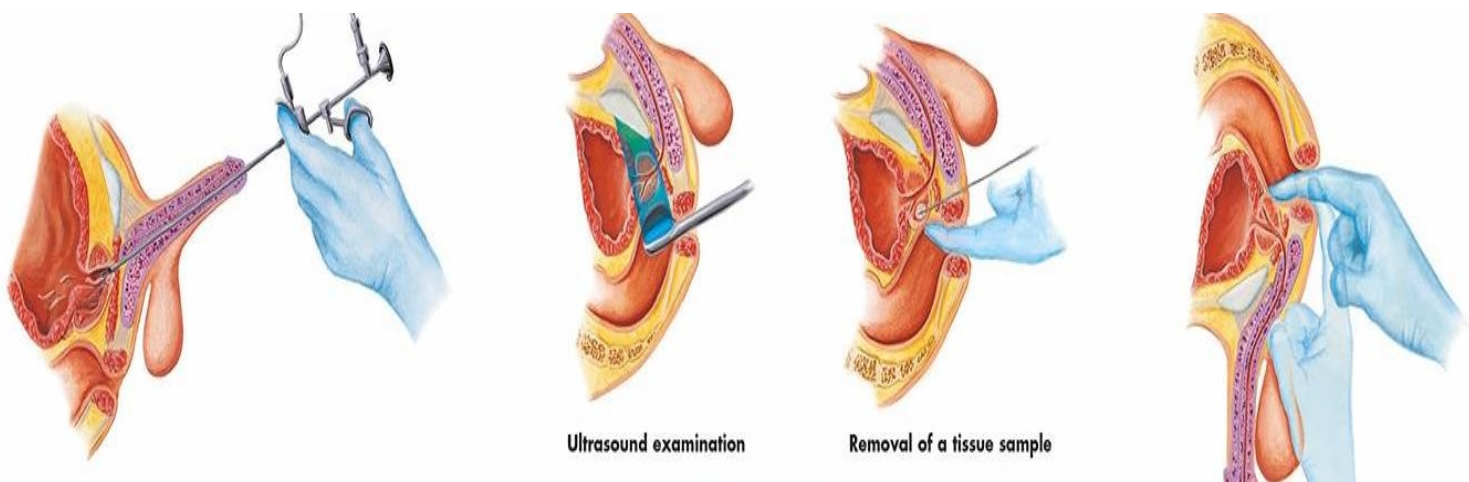


Figura 4. Principali metodologie per la diagnosi del carcinoma prostatico. Le metodologie maggiormente utilizzate per diagnosticare il cancro della prostata sono l'esplorazione trans-rettale e il dosaggio del PSA. Nel primo caso esistono delle limitazioni dovute all'impossibilità di rilevare la presenza di noduli di piccole dimensioni. Il dosaggio del PSA, invece, deve essere sempre accompagnato da un esame biptico per confermare la presenza di un cancro della prostata.¹⁴

1.4. *Trattamento e chemoprevenzione del carcinoma prostatico.*

La terapia di deprivazione androgenica è il trattamento più efficace per la cura del cancro della prostata.

Le forme di CPRC, invece, risultano essere resistenti a questo tipo di terapie. Solitamente pazienti che sviluppano forme di tumore maligno e resistente alla terapia di deprivazione ormonale vengono trattati con una terapia anti-ormonale addizionale che include la somministrazione di farmaci anti-androgenici come i corticosteroidi. Questo tipo di terapie hanno soltanto uno scopo palliativo.¹⁵

Soltanto il 15 % dei pazienti affetti da cancro della prostata sviluppa una forma di CPRC. La bassa progressione insieme alla lunga latenza della malattia rende il cancro della prostata un candidato ideale per i trattamenti chemopreventivi.¹⁶⁻¹⁸

Con il termine chemoprevenzione si intende l'utilizzo di alcune sostanze di origine naturale, biologica o sintetica che prevengono, sopprimono o permettono una reversione delle fasi iniziali del cancro.¹⁶⁻¹⁸

Il consumo di alcune sostanze presenti nella dieta, infatti, può ridurre l'insorgenza della malattia. In particolare, i flavonoidi sono tra gli antitumorali maggiormente studiati per le loro proprietà antitumorali e antinfiammatorie. Si è visto che numerosi flavonoidi come le catechine inducono l'apoptosi in differenti linee cellulari, tra cui le PC3, DU145 e LNCAP che sono linee tumorali di prostata.¹⁶⁻¹⁸

La somministrazione di differenti tipi di flavonoidi ha anche un effetto sulle modifiche epigenetiche che, spesso, sono alla base dell'insorgenza delle neoplasie.¹⁸

2.0. Poliammine.

Le poliammine sono piccoli policationi presenti in tutte le cellule eucariote. Queste molecole sono costituite da uno scheletro di atomi di carbonio a cui sono legati due o più gruppi amminici. Le principali poliammine nell'uomo sono putrescina, spermina e spermidina. Sono i maggiori costituenti del fluido spermatico e vengono sintetizzate in tutte le cellule del nostro organismo. In condizioni fisiologiche, le cellule epiteliali prostatiche producono la quantità di poliammine più elevata rispetto a tutte le altre cellule.^{19,20}

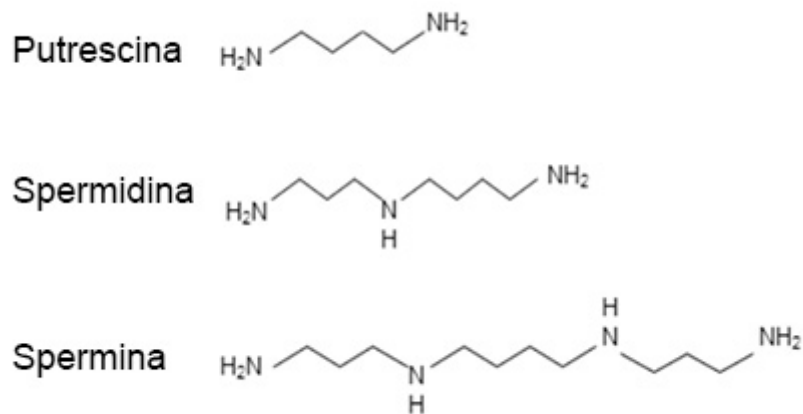


Figura 5. Struttura delle poliammine. Le poliammine sono piccoli policationi costituiti da un breve scheletro carbonioso a cui sono legati due o più gruppi amminici.²¹

2.1. Funzioni delle poliammine.

Le poliammine sono essenziali per la crescita, la sopravvivenza e la differenziazione cellulare. La loro carica positiva permette l'interazione con il DNA, l'RNA, i fosfolipidi e le proteine; infatti, le poliammine sono coinvolte nell'organizzazione della cromatina, nella replicazione del DNA, nella trascrizione, nella traduzione, nel trasporto degli ioni e nella dinamica delle membrane. Nelle cellule dei mammiferi il 90% delle poliammine si lega al DNA e all'RNA, mentre solo una piccola parte di poliammine si trova in forma libera.²⁰

Le poliammine attivano la sintesi proteica. È stato dimostrato che il legame delle poliammine alla regione dell'mRNA causa un cambiamento strutturale in una regione della sequenza Shine-Dalgarno e del codone di iniziazione AUG che facilita la formazione del complesso di traduzione.^{20,22}

Nelle cellule della mucosa intestinale, le poliammine regolano i processi di apoptosi e proliferazione modulando i livelli citoplasmatici di HUR. HUR è una proteina legante l'RNA che interagisce con le regioni 3' UTR degli mRNA bersaglio stabilizzandole. Si è visto che i livelli di poliammine regolano l'espressione di ATF2 (activating transcription factor 2), un regolatore della trascrizione, modulando i livelli citoplasmatici di HUR, che lega l'mRNA di ATF2 e lo stabilizza.^{22,23}

Le poliammine legano debolmente il DNA e l'ATP. Questi policationi riconoscono sequenze nucleotidiche specifiche sul DNA. È stato dimostrato che il legame delle poliammine con il DNA stimola la transizione conformazionale da B a Z della struttura dell'acido nucleico. La transizione conformazionale dipende dalla concentrazione di poliammine e in particolare di putrescina. Il complesso di poliammine e putrescina forma aggregati nucleari noti come NAP che hanno una maggiore affinità per gli elementi Alu ricchi di G-C.^{20,24}

È stato dimostrato che il legame delle poliammine al DNA stabilizza la condensazione delle fibre cromatiniche influenzando negativamente la trascrizione. La deplezione di poliammine è anche associata a un aumento dei livelli di espressione di SMAD, un fattore di trascrizione che determina un aumento della trascrizione.^{22,25}

Le poliammine sono necessarie per l'ipusinazione di eIF5A. eIF5A è un fattore specifico richiesto per la traduzione di un sottoinsieme di mRNA. L'ipusinazione è un processo importante che modifica la

capacità di eIF5a di legare i ribosomi e promuovere così la sintesi proteica. eIF5a è anche coinvolto nella fase di allungamento e terminazione della traduzione delle proteine.²⁵

L'ipusina è un aminoacido derivato dalla modifica di un residuo di lisina. La spermidina è necessaria per il processo di ipusinazione perché è un donatore di gruppi aminobutilici che vengono trasferiti al gruppo amminico del residuo di lisina per generare il residuo di deossipusina.¹⁵

Il ruolo delle poliammine nella progressione tumorale è ben noto (verrà descritto in seguito), a differenza del loro ruolo nel microambiente tumorale.²⁶ Si è visto che i livelli di poliammine possono influenzare la risposta immunitaria, il microambiente tumorale e la transizione epitelio mesenchimale.¹² Studi recenti sono focalizzati sull' utilizzo di cellule T e B per l'attivazione della risposta immunitaria adattativa contro le cellule tumorali. I linfociti T e B hanno un ruolo molto importante nei processi di soppressione tumorale: in particolare, i linfociti B sopprimono le cellule tumorali producendo anticorpi reattivi al tumore e attivando le cellule CD4⁺T e CD8⁺T.⁹

Le poliammine sono implicate nei meccanismi di attivazione dei linfociti T, della linfopoiesi e attivazione dei linfociti B. Questi processi vengono regolati dal gene *myc* che è un attivatore trascrizionale del gene *odc* che è coinvolto nella sintesi delle poliammine. L'arginina, inoltre, è un precursore dell'ornitina ed è richiesta anche per l'attivazione delle cellule T e per i meccanismi di segnalazione che coinvolgono il recettore TCR (T cell receptor). È stato dimostrato che la somministrazione di R-2-idrossiglutarato, un oncometabolita, alle cellule T provoca l'inibizione di ODC e la conseguente soppressione del segnale di TCR che si traduce in una riduzione dei livelli di cellule T.⁹

L'aumento della produzione di cellule T, invece, è correlato ad un incremento dei livelli di espressione del gene *odc*.⁹

La putrescina, invece, sembra avere un effetto diretto sulla modulazione dei macrofagi (Figura 5). In casi di colite ulcerosa si è visto un incremento dei macrofagi dovuto ad un incremento dei livelli di putrescina. Molto probabilmente ciò è da attribuire al legame della putrescina con il DNA e la modulazione dell'espressione genica.⁹

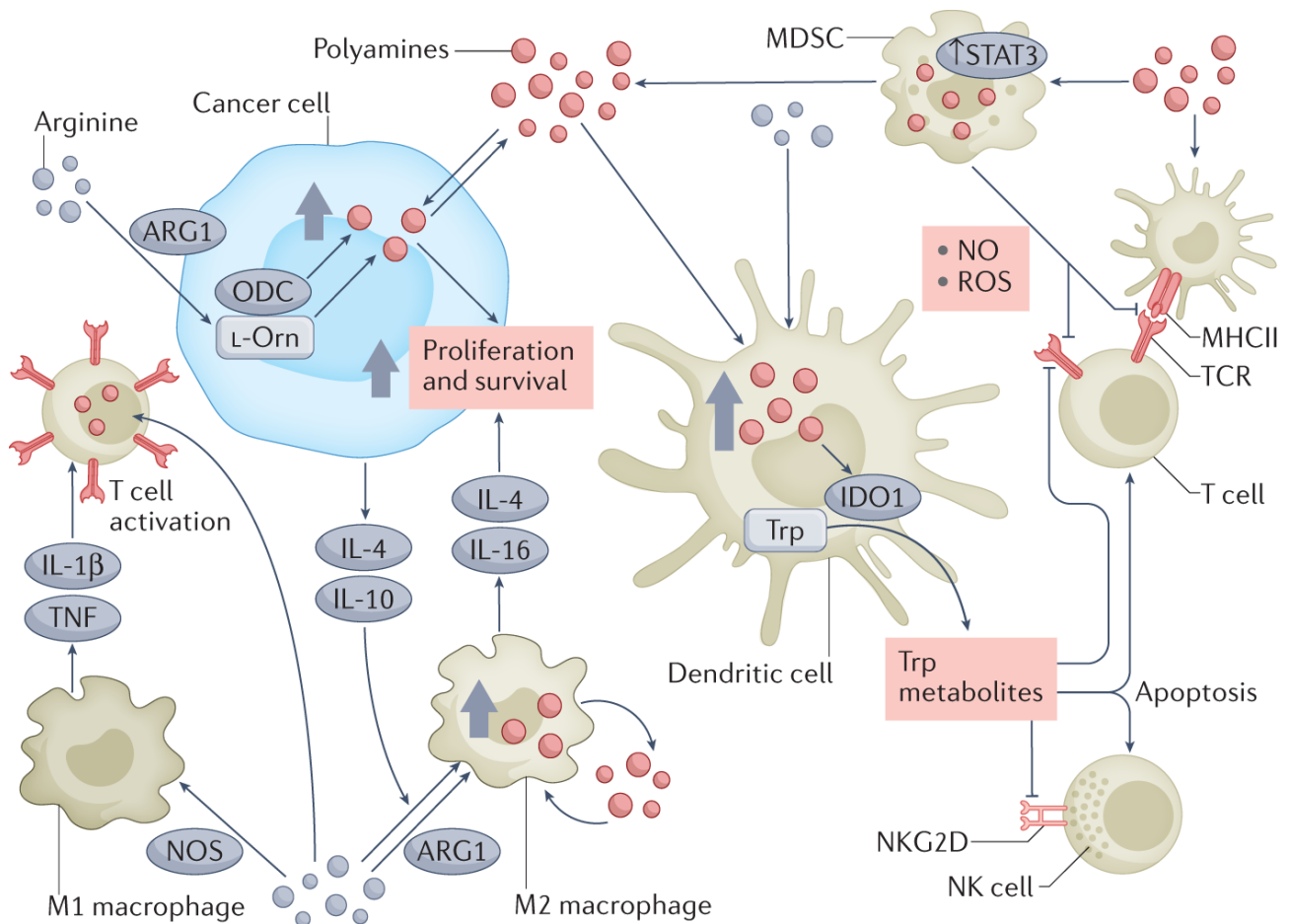


Figura 6. Meccanismi di regolazione delle poliammine nelle cellule tumorali. Le poliammine extra cellulari e l'arginina regolano l'espressione dei geni della biosintesi delle poliammine. Nelle cellule tumorali i livelli di poliammine risultano aumentati rispetto alle condizioni fisiologiche. L'incremento dei livelli di poliammine intracellulari provoca un aumento della proliferazione e della sopravvivenza delle cellule tumorali. Alti livelli di arginina inducono la polarizzazione dei macrofagi e la produzione di NOS (nitric oxidase species) che provocano l'attivazione dei macrofagi M1. Questi macrofagi attivano TNF e una serie di citochine, tra cui IL-4 e IL-10. queste citochine promuovono la polarizzazione dei macrofagi M2 che utilizzano l'arginina per produrre ornitina. I macrofagi M2 competono con le cellule T per la glutammina e l'arginina e producono citochine immunosoppressive. L'arginina e le poliammine rilasciate nel microambiente tumorale possono essere utilizzate dalle cellule dendritiche che partecipano alla produzione di citochine immunosoppressive.²⁶

2.2. *Metabolismo delle poliammine.*

Le fonti primarie di poliammine sono l'assunzione di cibo e la biosintesi cellulare. Le poliammine sono sintetizzate nel citoplasma di tutte le cellule.^{19,20}

Le principali poliammine presenti nelle cellule dei mammiferi sono putrescina, spermina e spermidina. La putrescina si forma per decarbossilazione dell'ornitina e questa reazione è catalizzata dall'enzima ODC (ornitina decarbossilasi). La spermina e la spermidina si formano dalla putrescina per trasferimento di residui aminopropilici dall' S-adenosilmetionina (SAM) decarbossilata. Queste reazioni sono catalizzate dall'enzima S-adenosilmetionina decarbossilasi (ADOMET) (Figura 7).^{23,27}

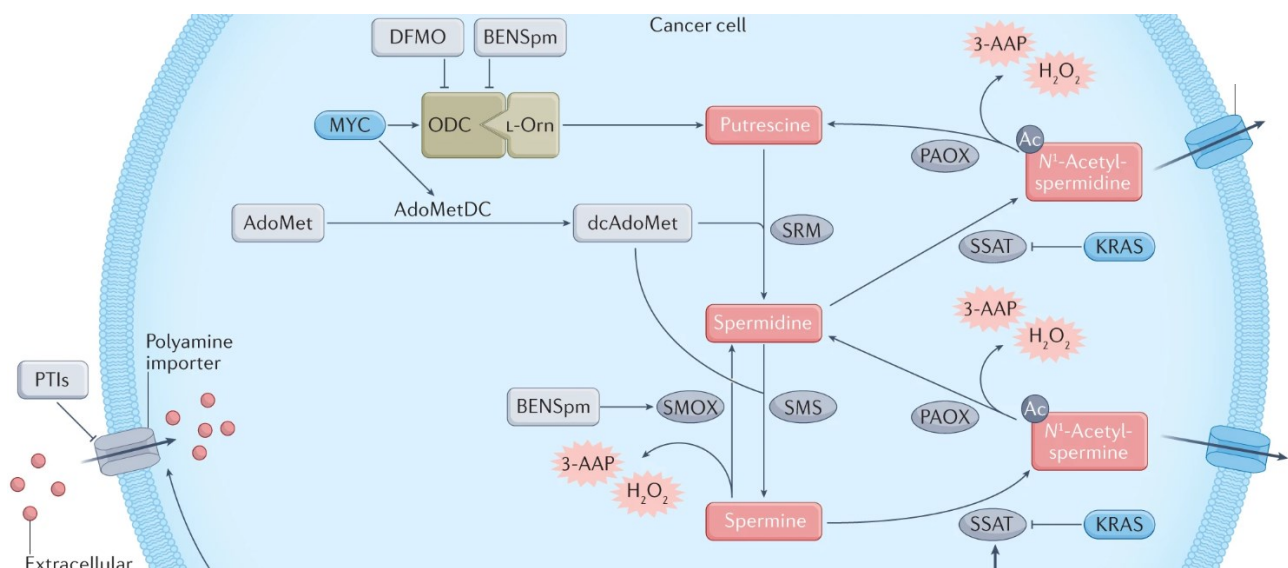


Figura 7. Metabolismo delle poliammine. Le poliammine vengono sintetizzate a partire dall'ornitina che va incontro ad una reazione di decarbossilazione catalizzata dall'enzima ornitina carbossilasi e porta alla formazione della putrescina. Alla putrescina vengono aggiunti gruppi metilici donati dall'S-adenosil-metionina. La reazione è catalizzata dall'enzima S-adenosil decarbossilasi e porta alla sintesi della spermidina e della spermina. Le reazioni che portano all'acetilazione delle poliammine sono catalizzate dall'enzima Spermidina/spermina N-acetil-transferasi. Il catabolismo delle poliammine può avvenire anche attraverso reazioni di ossidazione che sono catalizzate dagli enzimi spermina ossidasi e poliammine ossidasi.²⁶

Il catabolismo delle poliammine è essenziale per mantenere il rapporto di questi policationi.

Le poliammine possono essere degradate (catabolizzate) per:

- ossidazione della spermina da parte dell'enzima SMO (Spermina ossidasi) che produce spermidina, H₂O₂ e aldeide.^{23,27}
- acetilazione in posizione N1 da parte dell'enzima SSAT (Spermidina-Spermina N1 acetiltransferasi). Il gruppo acetile è fornito dall'acetil-CoA.

Questa reazione produce poliammine acetilate che escono dalla cellula o vengono utilizzate come substrati per l'ossidazione da parte dell'enzima PAO (poliammina ossidasi). L'enzima PAO catalizza la scissione delle poliammine acetilate e genera N-acetilaminopropanale e spermidina o putrescina, a seconda del substrato di partenza.^{23,27}

ODC è il primo enzima del metabolismo delle poliammine che catalizza la conversione dell'ornitina in putrescina. ODC è un enzima altamente regolato. I livelli di ODC rispondono a molti stimoli, tra cui ormoni, fattori di crescita e oncogeni.^{23,27}

L'enzima ODC è un omodimero con due siti attivi. L'attività di ODC è regolata da OAZ1 (antizima 1). OAZ1 è una proteina che lega i monomeri di ODC e ne impedisce l'omodimerizzazione. In questo modo l'attività di ODC viene bloccata e l'enzima viene degradato.^{23,27}

OAZ1 lega la regione PEST (prolina, acido glutammico, serina e treonina) in maniera reversibile della proteina ODC. La regione PEST è un segnale per la proteolisi e la degradazione.^{23,27}

Quando il complesso ODC/OAZ1 si lega al proteasoma 26S per la degradazione, le molecole di OAZ1 vengono rilasciate e riciclate. OAZ1 è regolato da AZI (inibitore antienzimatico) che lega OAZ1 e blocca la sua capacità di legarsi ai monomeri di ODC.²³

Gli androgeni, come il testosterone, inducono la trascrizione dell'mRNA, con conseguente aumento dei livelli proteici e dell'attività dell'enzima ODC. Nellesmann et al.²⁸ mostra come la somministrazione di antagonisti degli androgeni, come il flutamide, oltre a provocare una riduzione delle dimensioni della prostata provocano anche una riduzione dei livelli di ODC comparabile alla castrazione.²⁸

L'aumento dei livelli di espressione dell'enzima ODC ormone-dipendente è associato anche ad altri tipi di cancro come il cancro del seno e all'iperplasia benigna nel rene.²⁹

L'enzima SSAT (spermidina-spermina N1 acetiltransferasi) è normalmente presente a bassi livelli ed è indotto da un aumento delle concentrazioni di poliammine libere. In presenza di alti livelli di poliammine (o di analoghi delle poliammine) si verifica un aumento della trascrizione e della traduzione di SSAT, mentre la degradazione è ridotta.²³

Il gene *ssat* contiene una regione PRE (polyamine-responsive elements). La trascrizione di SSAT è regolata da Nrf-2 (nuclear erythroid related factor 2) e PMF-1 (polyamine modulated factor 1) che legano l'elemento responsivo alle poliammine PRE nella regione del promotore aumentandone la trascrizione. Un altro importante fattore che provoca un aumento dei livelli di trascrizione di *ssat* è p53.²³

A livello post-trascrizionale, SSAT è regolato dalle poliammine, dall'acroleina, dall'H₂O₂, dal 3-acetilaminopropanale e dai prodotti delle reazioni ossidative catalizzate da SMO o PAO.²³

SMO è un enzima inducibile e la sua espressione è aumentata in seguito a lesioni tissutali e infiammazioni. L'espressione di SMO può essere modulata anche da analoghi delle poliammine che possono legare elementi responsivi presenti nella regione 5' non tradotta.²³

2.3. Trasporto delle poliammine.

Le poliammine a pH fisiologico sono completamente protonate per questo non riescono ad oltrepassare la membrana cellulare attraverso la diffusione passiva. Nonostante gli effettori del sistema di trasporto delle poliammine non siano ancora noti, è stato chiarito che il sistema di trasporto è ATP dipendente.²³

Esistono diversi modelli per spiegare il trasporto delle poliammine alcuni dei quali propongono la presenza di permeasi che permettono l'attraversamento della membrana citoplasmatica di questi policationi.

Un altro modello, invece, propone il coinvolgimento di un trasportatore di soluti, SLC3A2, con selettività per la putrescina mentre un'altra possibile ipotesi prevede l'internalizzazione mediante endocitosi delle poliammine extracellulari.²³

Studi recenti hanno dimostrato che, molto probabilmente, ATP13A2 è coinvolto nel trasporto di poliammine nel compartimento endosomale tardivo/lisosomale. Questo trasportatore ha un'attività idrolitica e appartiene alla famiglia delle ATPasi. Van Veen ha dimostrato che vi è un aumento significativo dell'attività ATPasi di ATP13A2 in presenza di spermina e spermidina.^{23,30,31}

ATP13A2 rimuove spermina e spermidina dal lisosoma e può regolare il trasporto delle poliammine attraverso un meccanismo a due fasi ancora sconosciuto.^{23,30,31}

2.4. Poliammine e cancro.

Le poliammine sono state indicate come "olio per il motore del cancro", dato che questi metaboliti regolano l'attività di molti processi cellulari.³²

È stato dimostrato che il metabolismo delle poliammine è sregolato in diversi tipi di cancro.²³

Elevati livelli di poliammine sono associati alla progressione del neuroblastoma, del polmone, della prostata, della mammella e del cancro gastrico.²³

Si è visto che la sovraespressione di *odc* è generalmente associata ad una prognosi sfavorevole, mentre alti livelli di espressione di *ssat* sono associati ad una migliore sopravvivenza in pazienti con vari tipi di cancro.²³

odc e *adomet* sono coinvolti nella progressione del ciclo cellulare e sono attivati nella tarda fase G1 e nella transizione S-G2. La somministrazione di DFMO (difluoremetilornitina) causa l'arresto G1-S e il blocco G2-M nelle cellule di carcinoma mammario MDA-MB-435. È stato dimostrato che vi è un aumento dell'espressione di *p21* e la somministrazione di DFMO induce l'associazione di *p21* con *cdk-2*, una chinasi ciclina dipendente, che regola il ciclo cellulare.^{23,33}

È stato dimostrato che in cellule CRL-1555 (human epidermoid carcinoma A431) il trattamento con DFMO oltre a causare una riduzione dei livelli di ODC provoca anche una riduzione dei livelli di AKT ed ERK associato ad una diminuzione dei livelli della ciclina D1 e di Bcl-2. Questi fattori risultano essere alterati nella maggior parte dei tumori e sono responsabili di un aumento della proliferazione e della migrazione cellulare. Il trattamento delle cellule CRL-1555 con DFMO provoca, infatti, una regressione della migrazione e della proliferazione cellulare ed un decremento dei livelli di espressione della E-caderina, la cui sovraespressione è associata ad un aumento della transizione epitelio mesenchimale.^{34,35}

odc è indotto da MYC. È stato dimostrato che la famiglia MYC è attivata nel 70% dei tumori umani e regola anche *adomet*. MYC è implicato nel processo di traduzione attraverso la formazione di ipusina e l'espressione di eIF5A.²³

Nella prostata di topi transgenici che sovraesprimono c-MYC si è sviluppata una neoplasia intraepiteliale prostatica seguita da adenocarcinoma invasivo.³⁶ È stato dimostrato che PGC 1 alfa regola la via onco-metabolica guidata da c-MYC che promuove l'insorgenza del cancro alla prostata

attraverso la biosintesi di poliammine.³⁶ Nelle linee cellulari prostatiche PC3, DU145 e LNCAP sh-PGC 1 alpha, la downregulation di PGC 1 alpha è stata dimostrata come una delle principali cause dell'alterazione del metabolismo delle poliammine.³⁶ Questi studi hanno dimostrato che nelle cellule in cui è stata indotta la downregulation mediante l'utilizzo di sh-PGC1 alfa si verifica un aumento dell'espressione e dell'attività dell'enzima ODC e che, quando i livelli di PGC 1 alfa vengono riportati alle normali condizioni fisiologiche, i livelli di ODC ritornano di nuovo ai livelli fisiologici.^{36,37} La downregulation di PGC 1 alfa causa anche una diminuzione di c-MYC.³⁶ In linee di cellule prostatiche PC3, DU145 e LNCAP sh-PGC1 alfa è stato dimostrato che quando c-MYC viene inibito, gli effetti pro-migratori e pro-invasivi sono aboliti.³⁶

Recentemente, è stato dimostrato che ODC è un bersaglio di YAP/TAZ. YAP (oncogenic transcriptional coactivator Yes-associated protein) e TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) sono effettori nucleari della segnalazione di HIPPO che svolge un ruolo importante nel controllo delle dimensioni degli organi, nell'omeostasi dei tessuti e nella tumorigenesi.^{26,32} YAP/TAZ attivano l'enzima ODC e potenziano la biosintesi di poliammine.³² LSD1 (demetilasi dell'istone specifico della lisina) è stato identificato come un effettore a valle delle poliammine attraverso l'asse YAP/TAZ- poliammine- eIF5Ahyp/LSD1. LSD1 è un importante ponte tra le poliammine e le modificazioni epigenetiche.³²

Nel cancro alla prostata è stato dimostrato che LSD1 può regolare l'accessibilità degli enhancer mediati da AR attraverso l'interazione con FOXA1. FOXA1 è un fattore trascrizionale che facilita l'accesso alla cromatina per i recettori degli ormoni steroidei.³⁸

L'enzima ODC è anche un bersaglio di RAS. Il meccanismo di attivazione dell'enzima ODC da parte di RAS è molto complesso e comprende l'attivazione dei processi trascrizionali e di traduzione.^{39,40} Il primo passo per l'attivazione di ODC è il processo di iniziazione della traduzione. Il processo di traduzione inizia con il riconoscimento della sequenza m7GTP da parte di eIF4E.³⁹ eIF4E fosforila sé stesso e la proteina di legame eIF4E. Il processo di fosforilazione è favorito dalle chinasi PI3K (fosfoinositolo 3 fosfato), AKT, mTOR, ERK e p38 MAPK, tutte attivate da RAS.^{39,40}

L'enzima ODC presenta quattro regioni nel 5' UTR che sono varianti di splicing e tutte e quattro le regioni contengono una sequenza di traduzione mediata da IRES.³⁹ IRES è un sito di ingresso ribosomiale interno che regola il processo di traduzione. Nelle cellule trasformate da RAS, l'attività di IRES è più elevata e la via di segnalazione RAS/RAF/MEK/ERK regola la traduzione di ODC. L'attività IRES dell'ODC è regolata dalla de-fosforilazione e dallo stato di fosforilazione di eIF4E.³⁹ Quando la

via di segnalazione Ras/Raf/Mek/Erk è inibita, l'attività IRES dell'ODC è molto bassa e il ciclo cellulare si arresta nella fase G1.^{39,40}

L'enzima SSAT regola la crescita, la migrazione e l'invasione cellulare. Nelle cellule di epatocarcinoma la deplezione delle poliammine mediata da induzione di SSAT non solo attenua la proliferazione delle cellule tumorali, ma inibisce drasticamente la migrazione e l'invasione cellulare. L'aumento di SSAT è stato associato ad una riduzione dell'espressione di AKT.⁴¹

La diminuzione dei livelli di poliammine riduce anche il fattore nucleare β -catenina.⁴¹ La β -catenina è un fattore trascrizionale chiave che regola l'espressione di proteine pro-proliferazione/metastasi. In assenza di WNT, la β -catenina citoplasmatica è fosforilata in diversi residui di serina e treonina da un complesso che contiene GSK3 β , caseina chinasi 1 axin e APC che porta alla degradazione mediata da ubiquitina-proteasoma.⁴¹ La sovraespressione di SSAT diminuisce la p-GSK3 β e porta all'inibizione della traslocazione nucleare di β -catenina.⁴¹

La proteina SSAT interagisce con il fattore inducibile dell'ipossia 1, p65, integrina α 9 β 1. La regione promotrice del gene SSAT ha un sito proteico di legame per SP-1, AP-1, CCAT/enhancer binding protein β , cAMP response element binding protein (CREB), NF- κ B e PPAR γ (peroxisome proliferator activated protein).^{42,43}

Nrf-2 interagisce con PMF-1 (polyamine modulated factor 1) formando un complesso che lega il sito PRE (polyamines responsive element) presente sul gene *ssat* regolandone l'espressione. Nrf-2 è implicato nella risposta allo stress ossidativo.⁴⁴

RAS agisce anche sulla trascrizione di SSAT interferendo con l'attivazione da parte di PPAR γ .⁴²

Alcune molecole, come il resveratrolo, agiscono attivando PPAR γ che provoca un blocco della crescita cellulare e l'attivazione dell'apoptosi attraverso l'attivazione di *ssat* e l'inibizione di *odc*.⁴⁵

Nelle cellule di PCa con deficit di PTEN si osserva un aumento dei livelli di proteina AMD. È stato dimostrato che mTOR agisce sulla stabilizzazione del prozima AMD attraverso una fosforilazione al residuo S₂₉₈.^{23,26,27}

Una serie di studi ha suggerito che l'enzima SSAT svolge un ruolo critico nella regolazione della progressione tumorale e delle metastasi.^{23,26,27}

Studi recenti hanno dimostrato che agenti chemioterapici come il cisplatino possono indurre l'espressione di *ssat* e una diminuzione dei livelli di poliammine totali nelle cellule.⁴⁶

Nelle cellule tumorali si verifica una deregolazione metabolica. È stato riscontrato un aumento dell'ammoniaca che è regolato da p53.⁴⁷ Il soppressore tumorale p53 regola CPS1, ARG1 e OTC, tre enzimi che catalizzano la reazione dell'urea. La sintesi dell'urea è necessaria per eliminare l'ammoniaca prodotta dalla degradazione delle proteine o dalla sintesi di composti contenenti azoto nel corpo umano.⁴⁷ È stato dimostrato che p53 lega la regione genomica di questi geni e che la deplezione di p53 causa un aumento di CPS1, ARG1 e OTC e una diminuzione dei livelli di ammoniaca. I livelli di ammoniaca sono un importante regolatore della biosintesi delle poliammine.⁴⁷ Nelle linee cellulari deplete di p53 è stato riscontrato un forte aumento della putrescina, mentre vi è un modesto aumento dei livelli di spermina e spermina.⁴⁷ La perdita di p53 causa anche un aumento dei livelli di mRNA e dell'attività enzimatica di ODC. L'eliminazione di CPS1, ARG1 e OTC causa un aumento dei livelli di ammoniaca e un conseguente abbassamento dell'attività enzimatica di ODC e dei livelli di putrescina.⁴⁷

2.5. Poliammine e stress ossidativo.

Lo stress ossidativo è un'alterazione dell'equilibrio redox cellulare caratterizzata da un aumento del livello di specie reattive dell'ossigeno. Il danno ossidativo può essere la causa di varie malattie, tra cui il cancro. ⁴⁸

In condizioni fisiologiche, le poliammine agiscono come spazzini dei radicali liberi e proteggono dai danni ossidativi al DNA e ai fosfolipidi. ⁴⁸

È stato dimostrato che la deplezione di PA induce danni al DNA e apoptosi. Lo stress ossidativo attiva NRF2, che è coinvolto nell'attivazione della risposta antiossidante e nella traduzione dell'enzima ODC. ⁴⁸

Il catabolismo del PA coinvolge gli enzimi SMOX e PAOX che sono ossidasi. La reazione ossidativa prodotta da SMOX e PAOX genera H₂O₂ ed è stato dimostrato che SMOX genera un danno al DNA maggiore di quello prodotto da PAOX. ⁴⁸

2.6. Analoghi delle poliammine.

La via delle poliammine è un bersaglio per lo sviluppo di potenziali agenti antiproliferativi. Questi composti imitano i ruoli regolatori delle poliammine.^{49,50}

Gli analoghi delle poliammine possono essere suddivisi in diverse classi in base alla loro struttura chimica o alla loro funzione.⁴⁹⁻⁵¹

L'analogo più importante è il DFMO (α -difluorometilornitina), utilizzato come agente chemiopreventivo nell'uomo.⁵¹

Il DFMO inibisce l'enzima ODC (ornitina decarbossilasi) riducendo la disponibilità di poliammine, mentre altri analoghi delle poliammine come l'AMXT1501 (derivato della spermina) bloccano il trasporto delle poliammine.⁴⁹⁻⁵¹

La maggior parte di questi analoghi delle poliammine ha come bersaglio gli enzimi del catabolismo delle poliammine, come SSAT, PAO e SMO. L'aumento di SSAT e SMOX produce prodotti altamente tossici (come l'aldeide 3-aminopropanale e i ROS) e induce l'apoptosi guidata dai ROS.⁵²

SMO è inducibile da spermina e presenta isoforme citoplasmatiche e nucleari. L'induzione di SMO causa un aumento della produzione di H₂O₂ e del danno al DNA, inoltre l'aumento dell'espressione di SMO è legato a fattori epigenetici.⁵¹

SMO e PAO sono bersaglio di alcuni analoghi delle poliammine come BENSpm (N1, N11-bis(etil)norspermina), MDL 72527 (N1, N4-bis(2,3-butadienil-1,4-butanediamina) o altri derivati della butadienil-spermidina.⁵⁰

3.0. Il metabolismo delle unità monocarbossiliche.

Il metabolismo delle unità monocarbossiliche è costituito dal ciclo della metionina e dal ciclo del folato.⁵³ Ha un ruolo fondamentale in quanto interviene in diversi processi che avvengono all'interno della cellula.⁵³ Attraverso cofattori del folato, il metabolismo delle unità monocarbossiliche regola la biosintesi degli amminoacidi (metionina, glicina e serina), la biosintesi dei nucleotidi, la regolazione dell'espressione genica (epigenetica) e previene i danni provocati dallo stress ossidativo.⁵³

3.1. Metabolismo della metionina.

La metionina è un amminoacido essenziale che proviene in parte dalla dieta e in parte viene sintetizzata nel citoplasma di tutte le cellule. È uno dei quattro amminoacidi che contengono un atomo di zolfo ed è necessario per la crescita cellulare. Funge da iniziatore nella sintesi proteica sia negli organismi procariotici che eucariotici. Il metabolismo della metionina, inoltre, è coinvolto nella regolazione di numerosi metabolismi e nella regolazione epigenetica (Figura 8).⁵⁴

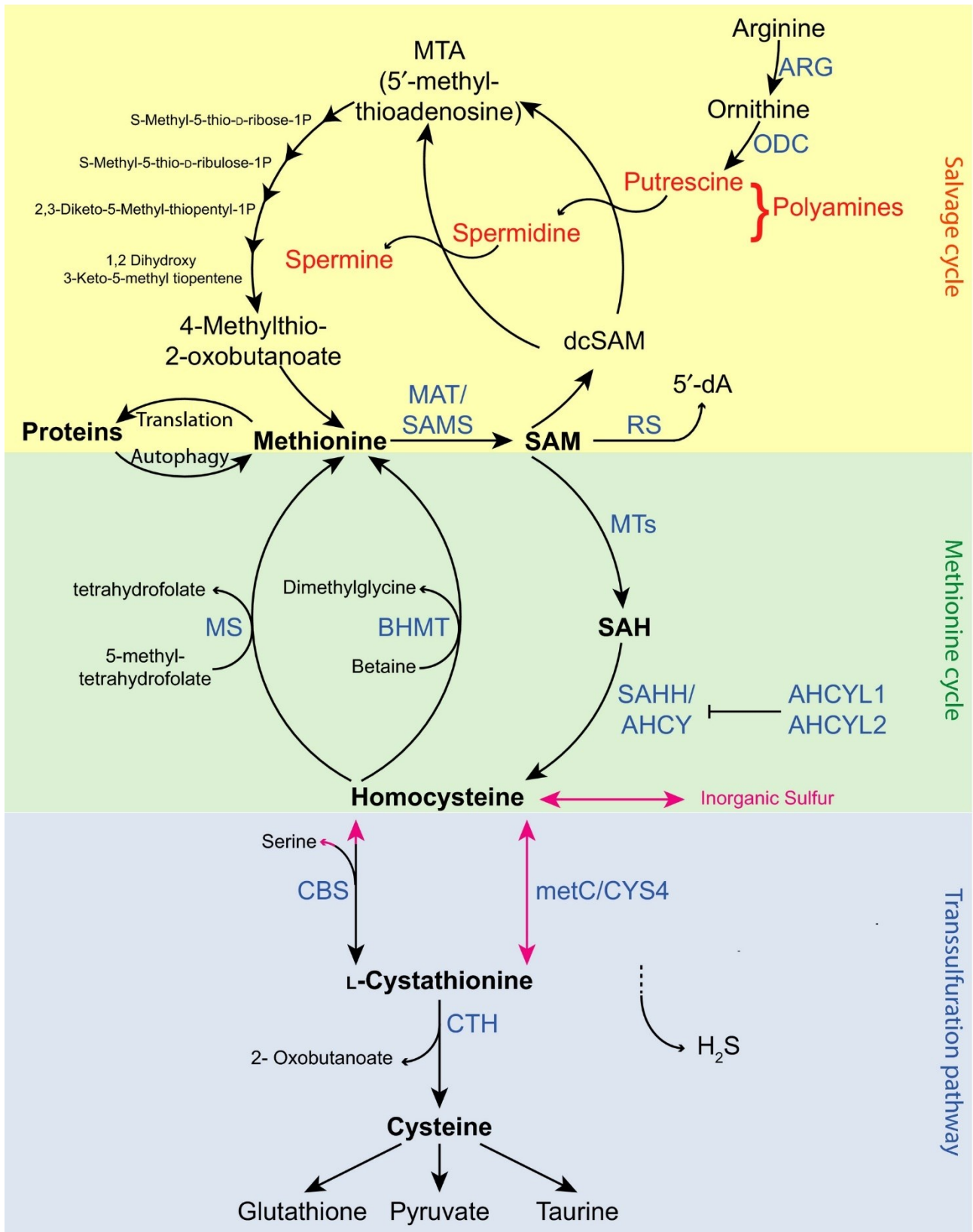


Figura 8. Metabolismo della metionina. Il metabolismo della metionina è essenziale per la sintesi del S-adenosil-metionina, donatore universale delle unità monocarbossiliche. La sintesi di S-adenosil-metionina è essenziale per la biosintesi delle poliammine.⁵⁵

Il ciclo della metionina costituisce il metabolismo delle unità monocarbossiliche insieme al ciclo del folato.

La sintesi del S-adenosilmetionina (SAM) è la prima reazione del ciclo della metionina ed è catalizzata dall'enzima adenosinametionintransferasi (MAT). Questa reazione richiede il consumo di una molecola di ATP. L'S-adenosilmetionina è il donatore universale di gruppi monocarbossilici che vengono donati a vari accettori (DNA, RNA, ornitina etc) in seguito a reazioni di decarbossilazione che portano alla sintesi dell'S-adenosilomocisteina (SAH). L'enzima che catalizza queste reazioni è l'S adenosilmetionina decarbossilasi (SAM DC). La SAH è il substrato dell'enzima S-adenosilomocisteina idrolasi che idrolizza la SAH in adenosina e L-omocisteina. Questa reazione è reversibile.^{55,56}

L'omocisteina può andare incontro a reazioni di metilazione ed essere riconvertita in metionina (che entra nuovamente nel ciclo della metionina) oppure entrare nel "transulfuration pathway", cioè il ciclo di transulfurazione.⁵⁵

La reazione di metilazione dell'omocisteina è catalizzata dall'enzima metionina sintasi che utilizza come donatore di unità monocarbossiliche il 5-metiltetraidrofolato.⁵⁵ Il ciclo di transulfurazione è necessario per la biosintesi della cisteina. L'omocisteina viene condensata con la serina in una reazione catalizzata dall'enzima cistationina β sintasi e porta alla sintesi della cistationina che viene poi idrolizzata da una liasi per produrre cisteina.^{55,56}

3.2. Funzioni della metionina.

Il ciclo della metionina è molto importante poiché interviene in molti processi di regolazione. Si è visto che il ciclo della metionina appare deregolato in numerosi tipi di malattie come le malattie metaboliche e in numerosi tipi di cancro come il cancro della prostata, il cancro del seno e il cancro dell'intestino.^{54,55,57}

La deplezione della metionina, inoltre, protegge da numerose malattie ed aumenta la sensibilità delle cellule cancerogene alle chemioterapie e radioterapie.⁵⁷

La metilazione del DNA, la sintesi delle poliammine e altri pathway strettamente legati alla metionina sono interconnessi con i processi di iniziazione e di sviluppo del tumore. Alcuni studi mostrano come negli stadi iniziali di un tumore la maggior parte degli enzimi coinvolti nel metabolismo della metionina risultano sovraespressi.⁵⁸

Il ciclo della metionina è coinvolto nei meccanismi epigenetici. I gruppi metilici necessari nelle reazioni di metilazione degli istoni sono forniti dalla SAM e negli ultimi anni si sta ponendo maggior attenzione su come lo stato nutrizionale e la biodisponibilità di SAM possano alterare i processi epigenetici che causano l'iniziazione del tumore.⁵⁸

Recenti studi mostrano che l'ipermetilazione del DNA nelle "CpG island" non è necessariamente associata ad una repressione dell'espressione genica e dipende principalmente dalla biodisponibilità di metionina (Figura 9). Anche l'ipometilazione del DNA è associato alla biodisponibilità di metionina. Entrambi questi eventi sono correlati con l'insorgenza del tumore e non è stato ancora chiarito in che modo il metabolismo della metionina impatti sulla metilazione del DNA e sull'insorgenza del cancro.⁵⁸

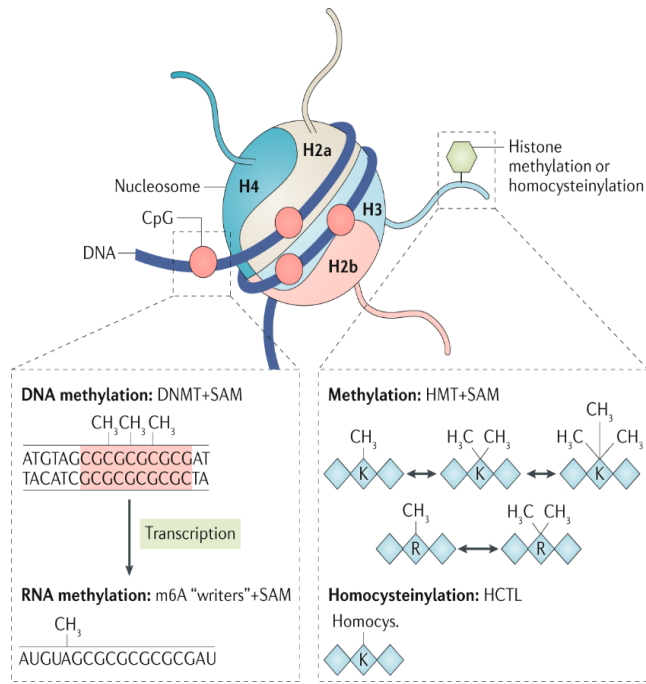


Figura 9. Funzioni della metionina. I gruppi metilici utilizzati nei meccanismi di regolazione dell'espressione genica provengono dall' S-adenosil-metionina.⁵²

3.3. “SALVAGE PATHWAY” della metionina e il metabolismo delle poliammine.

Il pathway di salvataggio della metionina, detto anche ciclo della 5-metiltioadenosina (MTA) è molto importante per il recupero della metionina. La 5-metiltioadenosina è un prodotto di scarto del metabolismo delle poliammine che viene convertita in 5-metiltioribosio 1 fosfato. La prima reazione può avvenire in un solo step catalizzato dalla 5-metiltioadenosina fosforilasi o in due reazioni catalizzate dagli enzimi 5-metiltioadenosina nucleosidasi e la 5-metiltioribosio chinasi che portano alla sintesi del 5-metiltioribosio 1 fosfato. Successivamente si hanno altre cinque reazioni che portano alla sintesi della 4-metiltio-2-ossibutirrato che rappresenta la forma deaminata della metionina. L'ultima reazione è una reazione di transaminazione che viene catalizzata dalle transaminasi.⁵⁹

Il recupero della metionina è di fondamentale importanza sia per un risparmio energetico della cellula, ma anche perché l'atomo di zolfo contenuto all'interno della metionina può essere riutilizzato per costituire altre molecole solforate essenziali per le funzioni cellulari (Figura 10).

In molti tipi di tumore è stata trovata una delezione nel gene che codifica per l'enzima 5-metiltioadenosina fosforilasi (MTAP), il primo enzima del metabolismo del recupero della metionina. Si è visto che l'attività di ODC è regolata da un intermedio del ciclo della 5-metiltioadenosina, il 2-keto-4 metiltiobutirrato (MTOB) e la sovraespressione di *odc* è stata riscontrata in seguito a delezione di *mtap* nel cancro del pancreas.⁶⁰

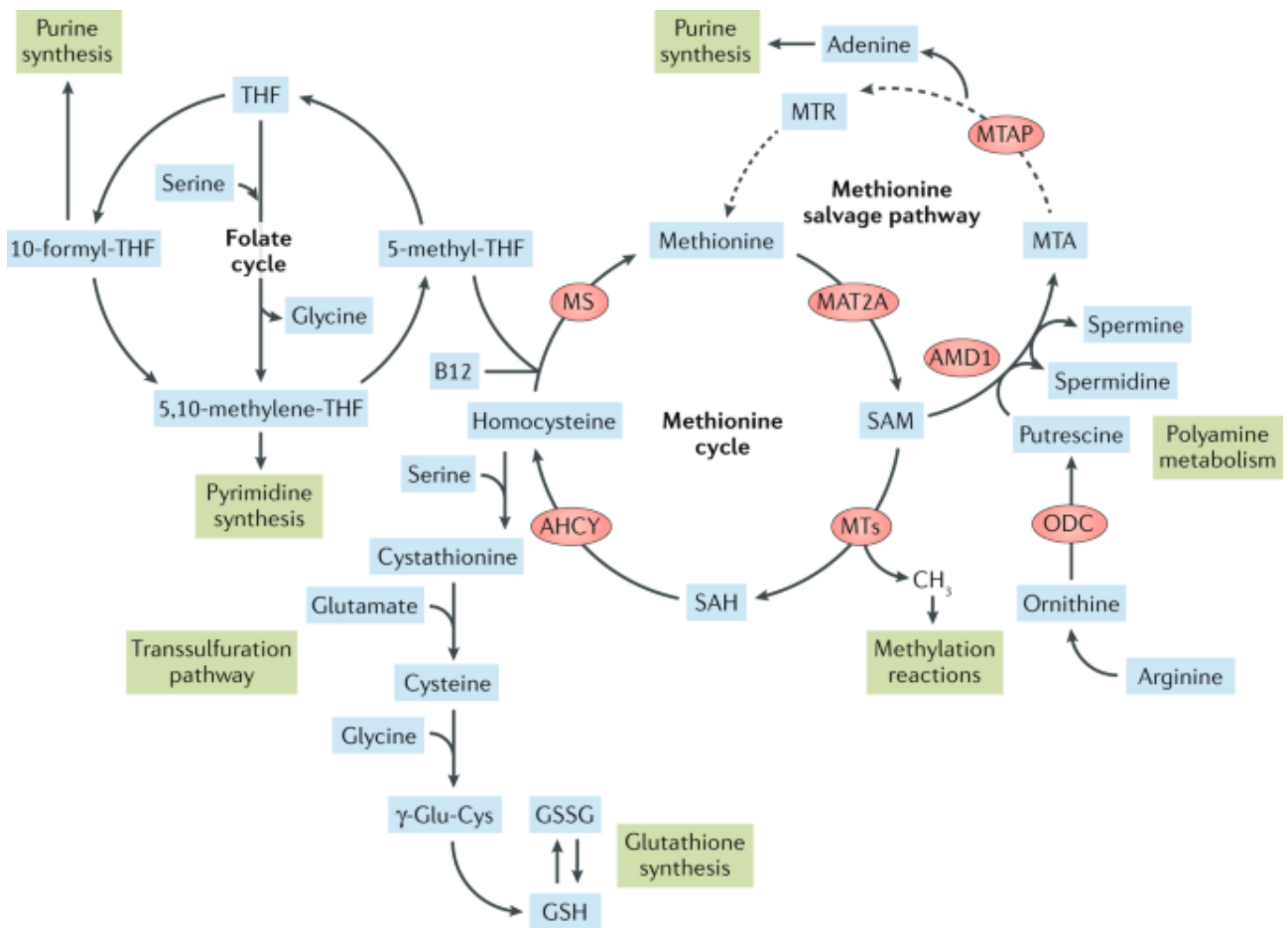


Figura 10. Interconnessione tra il metabolismo della metionina, il metabolismo dei folati e quello delle poliammine. La metionina è un aminoacido che interviene nella regolazione di numerosi processi. Il metabolismo della metionina è interconnesso al ciclo del folato, al metabolismo delle poliammine e alla sintesi del glutathione.⁵⁸

3.4. Il ciclo del folato.

Il folato è una molecola appartenente alla famiglia delle vitamine B. Non può essere sintetizzato dalle cellule, ma viene introdotto attraverso la dieta. La biodisponibilità di folato in una dieta equilibrata varia dal 10 al 98% ed è influenzata dal pH intestinale, l'attività enzimatica, disordini metabolici e presenza di alcool o altri inibitori che ne impediscono l'assorbimento.

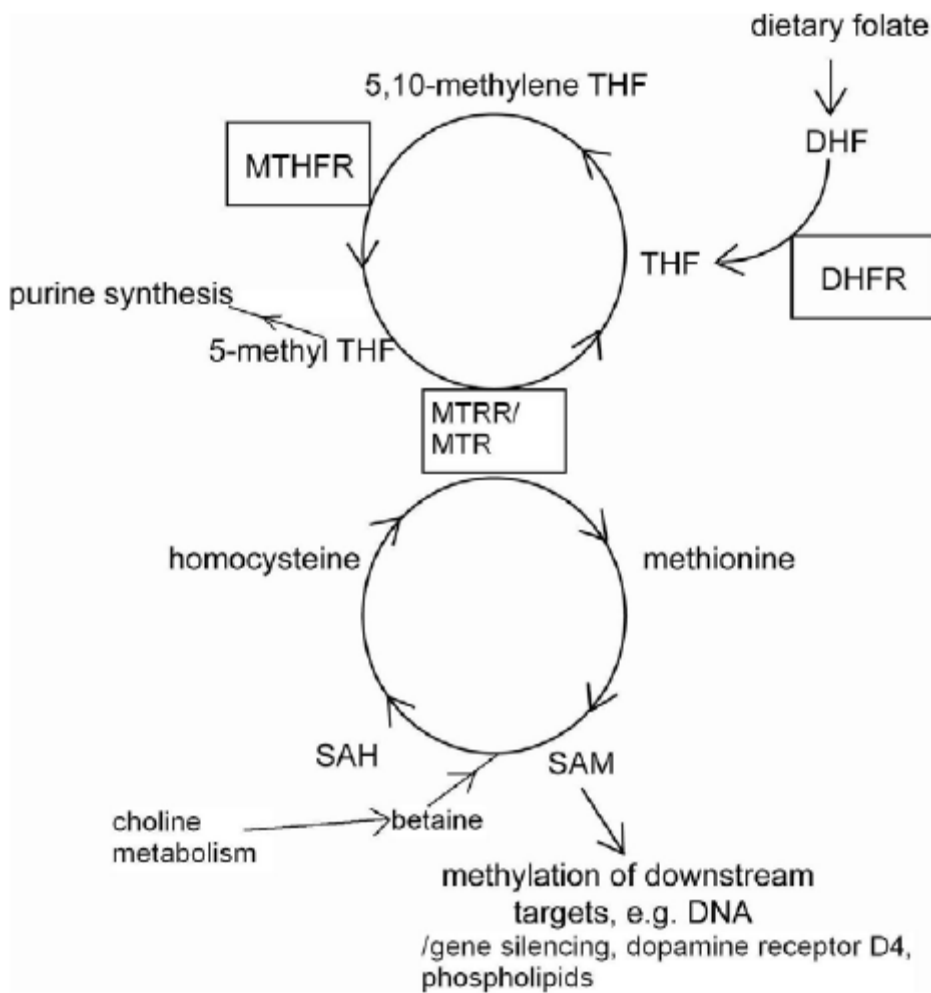


Figura 11. Il ciclo del folato.⁶³

Il folato viene assorbito in forma ridotta ed è legato all'acido glutammico. L'assorbimento prevede delle reazioni di idrolisi ed ossidazione che portano alla formazione dell'acido monopterilglutammico. Per poter essere utilizzato come donatore di unità monocarboniose, l'acido monopterilglutammico va incontro ad una serie di reazioni. ⁶¹

La prima reazione è costituita da due step catalizzati dall'enzima diidrofolato reduttasi I che riduce l'acido folico in tetraidrofolato, attraverso la formazione del diidrofolato (DHF). Successivamente l'enzima serina idrossimetiltransferasi I (SHMTI) catalizza la sintesi dell'acido 5,10 metilen-tetraidrofolico. Questo enzima utilizza la serina come donatore di gruppi metilici. Il 5,10 metilen-tetraidrofolato è il substrato della metilen tetraidrofolato reduttasi (MTHFR1) che catalizza la reazione di sintesi del 5 metiltetraidrofolato (Figura 11). ^{62,63}

Il 5-metiltetraidrofolato, insieme alla cobalamina, sono necessari per la conversione dell'omocisteina a metionina.

3.5. Folato e rischio di cancerogenesi.

L'eccesso e la mancanza di acido folico influiscono con i normali processi di crescita, di differenziamento cellulare e di replicazione del DNA contribuendo all'insorgenza di diverse malattie, tra cui il cancro. ⁶¹

Studi di metanalisi condotti su pazienti in sorveglianza attiva per il cancro della prostata hanno mostrato che nei pazienti che presentavano alti livelli di acido folico nel sangue c'è un aumento del 13% del rischio di sviluppare il cancro della prostata. Questi pazienti, inoltre, mostrano una più alta tendenza (130%) a sviluppare una forma maligna del cancro rispetto al controllo. ⁶⁴⁻⁶⁶

Il consumo di folato può anche essere associato ad un effetto protettivo per alcuni tipi di cancro, ma può avere effetti negativi o nulli per altri tipi di cancro. Ad esempio, nel caso di carcinoma a cellule squamose della testa e del collo si è visto che la somministrazione di folato riduce del 50% il rischio di cancro. Una significativa riduzione del rischio è stata valutata in caso di tumori oro-faringei, tumore dell'esofago, del pancreas e della vescica.⁵³ L'utilizzo di alcool in aggiunta ad un basso consumo di folato è associato con un rischio di cancro oro-faringeo e cancro al seno quattro volte superiore ai livelli normali. ⁶⁵

Per altri tipi di cancro, come il cancro endometriale e il cancro della prostata, il rischio aumenta in seguito ad un alto consumo di folato. ^{61,64}

Nel cancro della prostata abbiamo un incremento della richiesta di vitamina B12 dovuto ad un significativo incremento della biosintesi delle poliammine. Inoltre, si è visto che nel cancro della prostata alcuni geni del metabolismo del folato possono presentare delle alterazioni epigenetiche, ad esempio il gene *mrp1* (multidrug resistance protein gene) risulta sovraespresso in molti casi di cancro della prostata ed è responsabile del trasporto del folato nelle cellule. ⁶⁷

4.0. Ferroptosi.

La ferroptosi è un tipo di morte cellulare programmata ferro-dipendente. È caratterizzata da un cambiamento morfologico dei mitocondri che si presentano più piccoli, con una riduzione o scomparsa della cresta mitocondriale e la rottura della membrana mitocondriale esterna. Il nucleo delle cellule in ferroptosi rimane invece intatto. ⁶⁸⁻⁷⁰

Questo processo è caratterizzato da un aumento dei livelli dei ROS all'interno della cellula derivati dal metabolismo del ferro e ad un accumulo dei prodotti di perossidazione lipidica, l'inibizione del canale cisteina/glutammato ed una riduzione dell'attività dell'enzima glutazione perossidasi 4 che limita la produzione di ROS (Figura 12). ⁶⁸⁻⁷⁰

La ferroptosi è stata inoltre associata ad un aumento dei livelli di espressione ed un aumento dell'attività enzimatica della 15-lipossigenasi (ALOX15) e della ACSL4 (acyl-CoA sintetasi long chain family member 4) che catalizzano reazioni di ossidazione di arachidonoil e adrenoil fosfolipidi per produrre perossilipidi. ⁷⁰

Il ferro entra attraverso il recettore della transferrina (TFR1) sotto forma di Fe^{3+} e viene depositato negli endosomi dove viene convertito nello stato ferroso (Fe^{2+}). Il ferro fuoriesce dagli endosomi e viene rilasciato nel citosol attraverso i trasportatori DMT1 (divalent metal transporter 1) e viene poi utilizzato per formare la ferritina, la proteina di deposito di questo metallo. Diversi studi mostrano come il silenziamento degli IREB2 (iron responsive element binding protein 2) bloccano l'attivazione della ferroptosi indotta da erastina. Il ruolo del ferro nell'attivazione della ferroptosi rimane però non del tutto chiaro (Figura 12).⁶⁸

Nella regolazione della ferroptosi sono coinvolti anche dei microRNA e long non-coding RNA (lncRNA) come P53RRA che interagisce con un "RNA recognition motif" presente sulla proteina Ras GTPase-activating protein-binding 1 (G3BP1) attivandola. La proteina sequestra p53 all'interno del nucleo. ⁶⁹ p53 promuove l'attività trascrizionale favorendo l'aumento della respirazione ossidativa.

Mir-9, invece, agisce nelle cellule di melanoma G-361 e A375 bloccando la trascrizione dell'enzima GOT1, una transaminasi che catalizza la reazione di transaminazione della glutammina ad alfa chetoglutarato, e che può promuovere l'accumulo di ROS e provocare l'attivazione della ferroptosi. Alcuni studi mostrano che miR-27a, miR-26b e AS-SLC7A11 (lncRNA) possono sopprimere la trascrizione di SLC7A11, il trasportatore della Cys/Glu, bloccando l'entrata della cisteina e promuovendo l'attivazione della ferroptosi.⁶⁹ Il trasportatore della Cys/Glu è una proteina transmembrana costituita da due domini (SLC7A11 e SLC3A2). Questo trasportatore è il target dell'erastina, una molecola che regola positivamente la ferroptosi. L'inibizione dell'ingresso della cisteina determina una riduzione della sintesi del GSH che è un tripeptide contenente un tiolo e che necessita della cisteina per essere sintetizzato. Il blocco della sintesi del GSH causa una diminuzione dell'attività enzimatica dell'enzima glutatione perossidasi 4 (GPX4). L'enzima GPX4 catalizza la reazione di ossidazione del GSH rimuovendo l'eccesso di radicali e perossidi che vengono prodotti durante la respirazione cellulare e sono dannosi per le cellule.⁶⁸

Nelle cellule trattate con erastina, in cui è stata notata l'attivazione della ferroptosi, si è visto anche un decremento del flusso glicolitico e un aumento della respirazione mitocondriale con concomitante aumento dei livelli dei ROS. L'accumulo di ROS è responsabile del cambiamento morfologico dei mitocondri. Gli intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici sono dei regolatori positivi della ferroptosi.⁶⁸

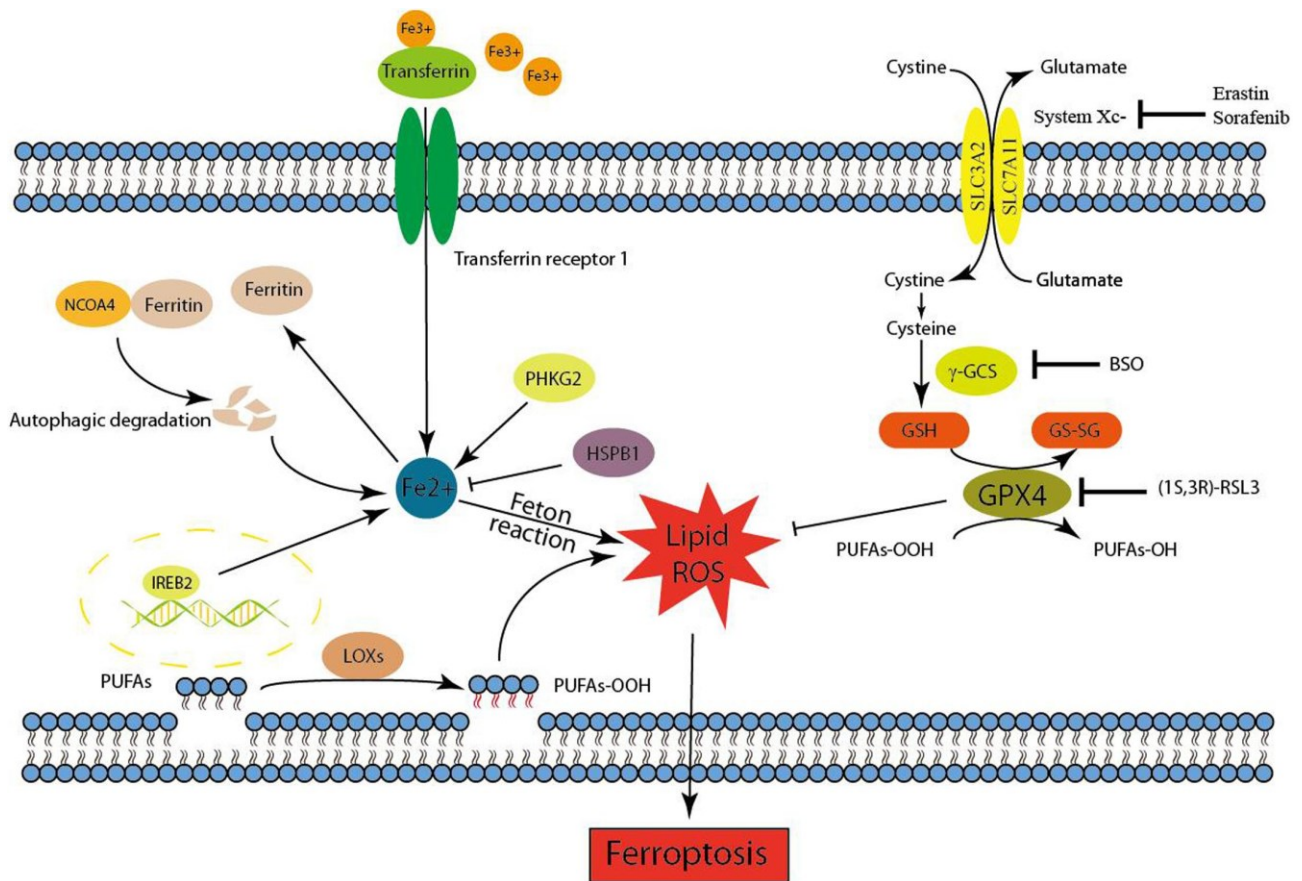


Figura 12. Meccanismi di attivazione della ferroptosi. L'attivazione del processo di morte programmata attraverso la ferroptosi ha inizio in seguito ad una deplezione della cisteina e/o una riduzione dell'attività dell'enzima glutatione perossidasi. Questo processo comporta una elevata produzione di ROS, prodotti in seguito all'ossidazione dei lipidi. ⁷¹

4.1 ROS.

I ROS sono specie reattive dell'ossigeno che comprendo radicali liberi dell'ossigeno molto instabili come il superossido o l'ossidrilico. Queste molecole vengono normalmente prodotte durante le reazioni del metabolismo cellulare dove è previsto il consumo di ossigeno, come il trasporto degli elettroni mitocondriale. I ROS sono molecole altamente instabili che possono interagire con le molecole biologiche come DNA, RNA, proteine e lipidi ed ossidarli. I ROS vengono prodotti da reazioni di metabolismo cellulare che prevedono l'ossidazione dell'ossigeno, ma anche da fonti esogene come fumo di sigaretta, inquinamento, farmaci, xenobiotici o radiazioni.⁷²⁻⁷⁴

Nelle cellule la maggior parte dei ROS è prodotta dai mitocondri in particolare durante la catena di trasporto degli elettroni in cui si ha la riduzione dell'ossigeno (figura 13). Parte dei ROS prodotti viene convertita in H₂O₂ dall'enzima superossido dismutasi. Le cellule si proteggono dai danni ossidativi dei ROS attraverso un sistema di difesa costituito da una serie di enzimi antiossidanti e da molecole antiossidanti non enzimatiche come: SOD (superossido dismutasi), CAT (catalasi), GPX (glutazione perossidasi), GR (glutazione reduttasi), GST (glutazione transferasi) e il GSH (glutazione), acido ascorbico e tocoferolo. Questi sistemi riescono a mantenere il corretto equilibrio tra la produzione e la neutralizzazione dei ROS.⁷⁵

Il GSH è un tripeptide sintetizzato a partire da glutammato, cisteina e glicina attraverso delle reazioni ATP dipendenti che avvengono nel citoplasma delle cellule. Ha un ruolo molto importante nella detossificazione da inquinamento, tossine e farmaci. Molti studi dimostrano che il GSH ha un ruolo nel determinare la resistenza da cisplatino, farmaco utilizzato in molti tipi di trattamenti contro il cancro. Differenti nuove strategie di cura mirano alla deplezione del GSH per migliorare la risposta delle cellule tumorali ai trattamenti chemioterapici.^{76,77} L'aumento dell'espressione di GSH e il conseguente aumento dei livelli di attività enzimatica della GPX 4 provocano l'inibizione della ferroptosi.

La biosintesi del GSH è regolata da Nrf2 che attiva anche la trascrizione di proteine coinvolte nei meccanismi di resistenza ai farmaci, come Mrp/aboc.⁷⁸

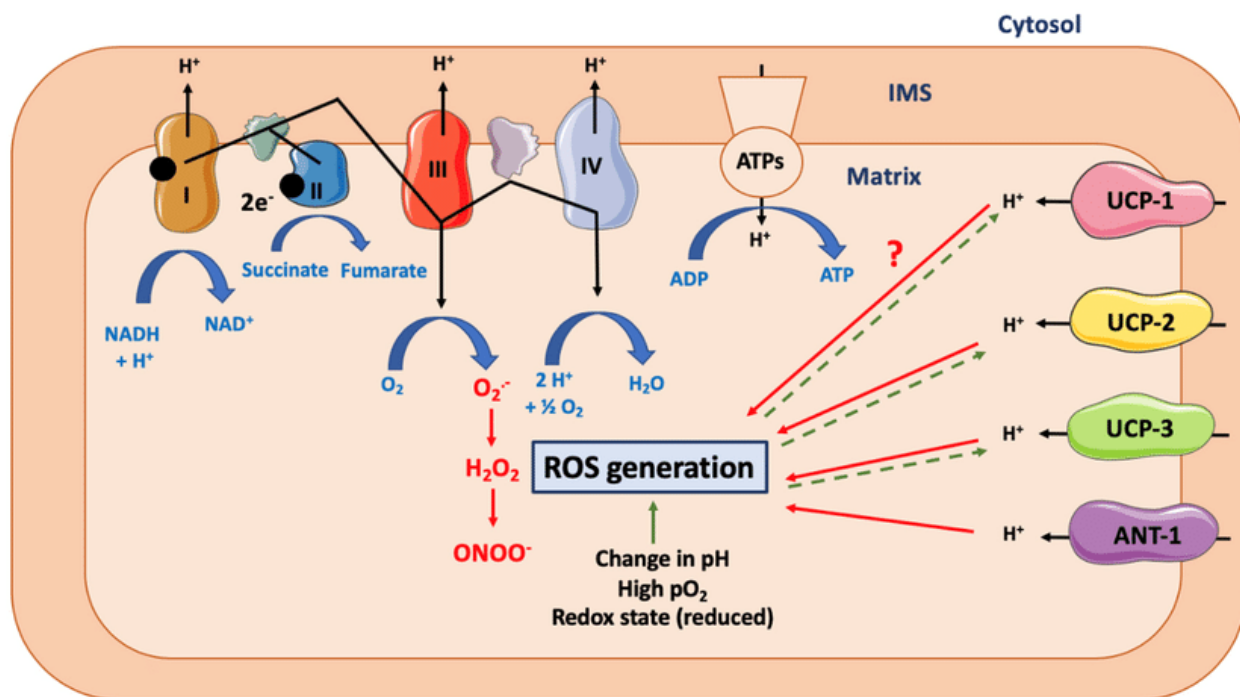


Figura 13. Meccanismi di produzione dei ROS. La catena di trasporto degli elettroni produce la maggiore quantità di ROS presenti all'interno delle cellule. I ROS vengono prodotti da tutte quelle reazioni che prevedono il consumo di ossigeno.⁷⁹

In condizioni fisiologiche i ROS regolano i processi di segnalazione e l'omeostasi delle cellule, intervenendo nei processi di differenziamento e crescita cellulare.^{75,77,78}

L'accumulo di ROS, detto anche stress ossidativo, è spesso associato con l'inizio della carcinogenesi e la sopravvivenza delle cellule tumorali. Numerose proteine come NF-κB, AKT, PI3K, AP-1 appaiono sovraesprese in seguito ad un elevato livello di ROS. Queste proteine sono tutte coinvolte in meccanismi di carcinogenesi, sopravvivenza cellulare e meccanismi di invasione.^{75,77,78}

Le reazioni catalizzate dagli enzimi appartenenti alla famiglia dei NOX (NADPH ossidasi) producono la più alta quantità di ROS. Di questa famiglia fanno parte NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 e NOX5. In cellule di glioblastoma si è visto che il knockdown di NOX4 determina la soppressione dell'angiogenesi con conseguente riduzione dei livelli di espressione di VEGF e HIF-1 alpha. Gli enzimi NOX regolano le vie di trasduzione del segnale di MAPK/ERK e PI3K/AKT/mTOR attraverso la produzione di H₂O₂. Il perossido d'idrogeno agisce inattivando PTEN in seguito all'ossidazione del residuo di cys 124 presente nel sito attivo.^{75,77,78}

I ROS sono coinvolti anche nei meccanismi di attivazione degli HIF (Hypoxia-inducible factors) che permettono l'adattamento delle cellule tumorali alle basse concentrazioni di ossigeno presenti nel microambiente tumorale. ^{75,77,78}

4.2. Ferroptosi e poliammine.

Il meccanismo di morte cellulare programmata ferro dipendente è regolato da p53. p53, infatti, regola i livelli di espressione di *slc7a11* (trasportatore della cisteina), di *ssat* e *gls2* (glutaminasi 2) che sono coinvolti nei meccanismi di attivazione della ferroptosi. Allo stesso modo, p53 può sopprimere la ferroptosi attraverso l'inibizione dell'attività di DPP4 (dipeptidil peptidasi 4) o attraverso l'induzione dell'espressione di CDKN1A7p21 (inibitore 1A della chinasi ciclina dipendente). p53 svolge un ruolo cruciale nella regolazione dei processi di sopravvivenza e morte cellulare ed interviene nella regolazione dei meccanismi di risposta delle cellule a vari tipi di stress, tra cui lo stress ossidativo.^{80,81}

Un aumento dei livelli di espressione di *ssat* è associato ad un aumentato catabolismo delle poliammine e una conseguente inibizione della crescita cellulare e induzione dell'apoptosi.

Recenti studi hanno mostrato che l'attività di SSAT è correlata con l'induzione della ferroptosi ed in particolare si è visto che la deplezione di SSAT inibisce la ferroptosi indotta da p53.^{80,81}

SSAT non sembra avere effetto sui livelli di espressione e sull'attività di SLC7A11 e GPX4, mentre è correlato con i livelli di espressione di ALOX 15, ma non di ALOX5 e ALOX12. ALOX15 è un effettore a valle di *ssat*, in quanto si è visto che il trattamento con PD146176 (inibitore di ALOX15) provoca una diminuzione della ferroptosi.⁸¹

In condizioni fisiologiche i livelli di espressione di *ssat* sono bassi, ma possono aumentare in seguito alla somministrazione di alcuni farmaci (tra cui il cisplatino), in risposta a meccanismi di stress, oppure possono essere aumentati da citochine, ormoni o prodotti naturali (tra cui il resveratrolo).

82

Scopo della tesi

Scopo della tesi

Le poliammine sono molecole necessarie per il normale sviluppo delle cellule e dei tessuti che vengono generalmente biosintetizzate nella cellula o assunte con la dieta. Tra le loro molteplici funzioni, le poliammine sono coinvolte nella regolazione dei meccanismi di apoptosi e di proliferazione cellulare. È emblematico che il metabolismo delle poliammine risulti alterato in molte tipologie di cancro. Infatti, il contenuto di poliammine in cellule tumorigeniche è maggiore rispetto alle cellule normali. A conferma di questa tendenza, anche nei pazienti oncologici la concentrazione delle poliammine nel sangue e nelle urine è spesso aumentata e correlata ad una prognosi infausta. La sintesi delle poliammine è regolata da una complessa rete di reazione di sintesi, catabolismo, assorbimento ed escrezione che dipende anche dai livelli di S-adenosil metionina (SAM) e di folato. SAM è il trasportatore universale delle unità monocarbossiliche che sono necessarie per la sintesi delle poliammine e di molte altre biomolecole come i nucleotidi e per i meccanismi di regolazione genica. Per la sintesi di questa molecola SAM è indispensabile l'apporto di folati, trasportatore di unità monocarboniose necessarie per la sintesi de novo di nucleotidi e altre molecole di importanza biologica, attraverso la dieta. Il folato, infatti, viene ridotto in 5-metil tetraidrofolato e insieme all'omocisteina partecipano alla reazione di sintesi della metionina che è catalizzata dall'enzima metionina sintasi (MTR). Quindi il metabolismo dei folati, il metabolismo della SAM e delle poliammine sono strettamente interconnessi tra loro tanto che la velocità di biosintesi delle poliammine è un fattore critico che influenza la sensibilità delle cellule alla deplezione di folato. Infatti, un elevato tasso di biosintesi delle poliammine aumenta la necessità e la dipendenza dal folato che serve a supportare la crescita cellulare.

Le cellule epiteliali prostatiche contengono, in condizioni fisiologiche, un livello di poliammine superiore a tutte le altre cellule dell'organismo. Queste poliammine vengono secrete nel fluido prostatico dove regolano la fluidità del fluido seminale. Nelle cellule tumorali prostatiche l'intensa attività proliferativa si accompagna ad una aumentata produzione di poliammine totali e questo accentua la dipendenza dal folato rispetto alle cellule normali o alle cellule tumorali non prostatiche. Questa caratteristica costituisce la base razionale per l'uso di antifolati in pazienti con CaP (cancro della prostata) come un approccio terapeutico perseguibile.

Questo progetto di dottorato è stato incentrato sullo studio dell'alterazione del metabolismo delle poliammine in risposta alla deplezione dei folati in linee cellulari prostatiche umane a differenti gradi

di trasformazione, BPH1 (immortalizzate) e PC3 (tumorigeniche). Le cellule BPH1 sono cellule di iperplasia benigna mentre le cellule PC3 hanno un'origine maligna. Le cellule BPH1 rappresentano una lesione precoce e non tumorigenica ed è per questo che in questo lavoro è stata utilizzata come controllo rispetto alla linea altamente metastatica.

Le due linee cellulari sono state fatte crescere in condizioni di deplezione di folato per verificare l'effetto del folato sulla proliferazione cellulare. Nelle cellule cresciute in condizioni di folato limitante e in condizioni standard sono stati valutati i livelli di poliammine sia intracellulari che extracellulari mettendo in relazione la quantità di poliammine alla variazione di espressione e dell'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo di queste importanti biomolecole.

Dal momento che l'insorgenza e la progressione del cancro sono eventi che spesso risentono dello stress ossidativo e che nel tumore della prostata così come in altri tumori è stato riscontrato un alto livello di ROS ^{83,84} sono state valutate le condizioni di stress ossidativo delle cellule cresciute in condizioni di deplezione di folato attraverso analisi dei ROS e del glutatione.

Con questo lavoro di tesi ci prefiggiamo di comprendere la complessa interazione tra deplezione di folati, metabolismo delle poliammine e crescita cellulare al fine di poter individuare specifici bersagli molecolari da colpire per ottenere con la deplezione del pool delle poliammine il blocco della crescita e della proliferazione delle cellule tumorali.

Per questo motivo nel progetto è stata sviluppata una strategia che prevede prima l'individuazione di un possibile bersaglio enzimatico da manipolare in maniera tale da esacerbare l'eventuale condizione di stress causata dalla deplezione di folato e alterare negativamente l'omeostasi del metabolismo delle poliammine nelle cellule tumorali PC3 e BPH1. L'alterazione dell'espressione genica verrà attuata utilizzando farmaci in grado di alterare l'attività dell'enzima bersaglio, come per esempio analoghi noti delle poliammine (DENSpm, BENSpm, ...).

In questo modo ci proponiamo di identificare una strategia che permetta di ridurre i livelli intracellulari di poliammine ed aumentare la sensibilità delle cellule tumorali prostatiche alla deplezione dei folati. Dal momento che la ghiandola prostatica ha necessità di sintetizzare elevati livelli di poliammine, questi vengono mantenuti anche in condizioni di deplezione di folato a discapito di altre vie metaboliche importanti, come quelle che determinano la proliferazione cellulare che viene rallentata o bloccata.

Nel trentennio appena trascorso la terapia con antifolati è stata ampiamente utilizzata per il trattamento di diverse forme di tumori, ma gli effetti degli antifolati sul tumore della prostata non sono stati completamente chiariti. Di sicuro l'alto livello di biosintesi delle poliammine che devono

essere secrete dalla ghiandola prostatica determina una condizione di stress del metabolismo delle unità monocarboniose e del ciclo della metionina che è fondamentale per la terapia con antifolati nel tumore prostatico. Il cancro della prostata potrebbe essere sensibile agli approcci con antifolati soprattutto se utilizzati nel trattamento precoce della patologia, quando le cellule sono ancora sensibili alla regolazione da parte degli androgeni. Infatti, gli enzimi responsabili della sintesi e esportazione delle poliammine sono regolati dall'azione androgenica.

Materiali e metodi

Materiali e metodi

1. Caratteristiche delle linee cellulari e condizioni di crescita.

Le linee cellulari PC3 e BPH1 sono state acquistate dall'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Entrambe le linee cellulari sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) contenente 2 mM L-glutammina addizionato di siero bovino fetale al 10%, penicillina 100 U/mL e streptomicina 100 µg/mL (Lonza, Basel, CH). Le cellule sono state mantenute in piastre Petri da 100 mm di diametro incubate a 37 °C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Prima di ogni esperimento, le cellule sono state raccolte mediante trattamento con tripsina, contate tramite camera di Bürker e seminate nel supporto di coltura più indicato alla densità cellulare specificata nei paragrafi successivi. Per tutti gli esperimenti abbiamo utilizzato terreno RPMI 1640 privo di acido folico (Gibco, Life Technologies) contenente 2 mM L-glutammina addizionato di siero bovino fetale dializzato al 10%, penicillina 100 U/mL e streptomicina 100 µg/mL (Lonza, Basel, CH). Al mezzo di coltura è stata aggiunta la quantità specificata di acido folico (FA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) solubilizzato nello stesso mezzo di coltura. Il siero fetale bovino dializzato non contiene folati e quindi l'unica fonte di FA disponibile per la crescita delle cellule è quella che viene aggiunta sperimentalmente nel mezzo di coltura.

2. Calcolo del population doubling level.

Con Population Doubling Level (PDL) si intende il numero totale di volte in cui le cellule si sono duplicate dalla loro prima semina in piastra. Il calcolo del PDL è stato fatto contando le cellule mediante camera di Bürker e applicando la formula: $PDL = X + 3,322 (\log Y - \log I)$, dove X è livello di population doubling di partenza (nel nostro caso è pari a 0), Y è il numero di cellule contate ad un determinato tempo ed I è il numero di cellule seminate al momento dell'allestimento della piastra. 245000 cellule sono state seminate in presenza di concentrazioni limitanti o non limitanti di acido

folico in piastre Petri da 100 mm di diametro e lasciate crescere fino al raggiungimento di un PDL pari a 6. Per gli esperimenti è stato contato il PDL per le cellule cresciute in condizioni di acido folico non limitante e quando queste hanno raggiunto un valore pari o superiore a 6 vengono raccolte sia quelle cresciute con acido folico non limitante che quelle corrispondenti, cioè piastrate nello stesso giorno e alla stessa densità ma cresciute in condizioni di acido folico limitante.

3. Curve di crescita e saggio con cristal violetto.

Le cellule sono state seminate in triplicato in piastre da 6 pozzetti ad una concentrazione di 3000 cellule per pozzetto con le quantità di acido folico specificate (0-10-20-50-100 nM FA e 2 μ M FA). Le piastre sono state poste in incubatore e dopo 24-48-96-168 e 416 ore le cellule sono state contate mediante saggio con cristal violetto, un colorante basico ad alta affinità per le specie acide come il DNA. Una volta penetrato all'interno delle cellule, il cristal violetto può essere estratto con sodio citrato e quantificato misurando l'assorbanza a 540 nm. Il valore di assorbanza misurato è proporzionale al numero di cellule presenti nel pozzetto. Brevemente il protocollo prevede che ai tempi definiti le cellule cresciute in adesione siano lavate per due volte con PBS prima di essere fissate con una soluzione di paraformaldeide al 3% in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo altri due lavaggi con PBS le cellule vengono poste a contatto con una soluzione contenente cristal violetto 0.5% (Sigma-Aldrich) in metanolo al 20% per 15 minuti. Si lavano accuratamente le piastre con H₂O corrente e dopo averle fatte asciugare si estrae il colorante penetrato nelle cellule attraverso una incubazione per 45 minuti in agitazione con soluzione di citrato di sodio 0.1 M in etanolo al 50%, pH 4.2. L'assorbanza è stata misurata mediante il lettore di piastre EnSpire (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

4. *Analisi FACS.*

Per la valutazione dell'andamento del ciclo cellulare, le cellule sono state trattate con ioduro di propidio e successivamente sottoposte ad analisi citofluorimetrica a flusso. Lo ioduro di propidio è un intercalante fluorescente del DNA. Esso lega l'acido nucleico con alta affinità e, dopo essere stato eccitato con una radiazione luminosa intorno a 480-550 nm, emette una fluorescenza nel rosso, intorno a 610 nm, la cui intensità sarà direttamente proporzionale alla quantità di colorante legato e quindi alla quantità di DNA. Le cellule coltivate in piastre da 150 mm di diametro cresciute per almeno 6 PDL in condizioni di deplezione di acido folico (50 nM FA) e di concentrazione standard di FA (2 μ M FA) sono state staccate mediante tripsina e contaminate in modo da isolare 500000 cellule, che sono state lavate in PBS e risospese in 1 mL di soluzione di colorazione contenente 0,5% di IGEPAL, 0,1% di citrato, 50 μ g/ml di ioduro di propidio in PBS. La colorazione del DNA è stata lasciata procedere al buio per tutta la notte a 4 °C. Il mattino seguente, è stata valutata la distribuzione della popolazione di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare mediante analisi citofluorimetrica a flusso, utilizzando il citometro Coulter FC500 (Coulter Co, Miami, FL, USA). Il principio base di questa tecnica consiste nel passaggio di cellule in sospensione in singola fila attraverso una camera di flusso nella quale incontrano un raggio laser, a questo punto le cellule riflettono/rifrangono la luce ed emettono in fluorescenza, in questo caso dovuta al legame dell'intercalante ioduro di propidio. La luce emessa viene raccolta, filtrata e convertita ad un valore digitale che viene inviato al computer. Sono stati utilizzati due parametri: Side scatter (SS) per le caratteristiche morfologiche e Forward scatter (FS) per le caratteristiche macroscopiche. Questi parametri forniscono una indicazione della modalità in cui la luce viene deviata dal campione. Le distribuzioni delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare sono state analizzate con FCS-Express Software.

5. *Clonogenic assay.*

Le cellule seminate in piastre 60x15 mm (3000 cellule/piastra) sono state lasciate crescere per 10 giorni nella condizione di deplezione di acido folico (50 nM FA) e nella condizione standard di acido folico (2 μ M FA) e fino alla formazione di colonie spazialmente separate l'una dall'altra. Una colonia

è formata da almeno 50 cellule. A questo punto, si è proceduto con la colorazione delle cellule mediante cristal violetto, secondo la procedura descritta nel paragrafo 3. Una volta lavate le piastre con acqua demineralizzata e fatte asciugare, le colonie sono state contate.

6. Determinazione poliammine intra- ed extra-cellulari mediante HPLC.

Le cellule cresciute per almeno 6 PDL in condizioni di deplezione di acido folico (50 nM FA) o di concentrazione standard di acido folico (2 μ M FA) e il loro mezzo di coltura sono stati analizzati per la determinazione delle poliammine intra- ed extracellulari.

Le cellule sono state lisate in HClO₄ 0.2 M in presenza di DAE (etilendiammina) 0,10 mM come standard interno per 60 minuti a 4 °C. Il lisato è stato centrifugato a 14000 rpm per 20 minuti a 4 °C e la frazione solubile trasferita in un nuovo tubo eppendorf. Il pellet invece è stato risospeso in NaOH 0.1 N e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per la notte per la successiva quantificazione proteica mediante il saggio colorimetrico DC Protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), seguendo le indicazioni del produttore. Per la costruzione della retta di taratura è stata utilizzata albumina serica bovina (Sigma-Aldrich) a una concentrazione compresa tra 0 e 2 mg/mL. La lettura dell'assorbanza a 750 nm è stata effettuata mediante il lettore di piastre EnSpire (PerkinElmer).

Il pH della frazione solubile è stato portato a un valore intorno alla neutralità mediante aggiunta di KOH 2 M e di Na₂CO₃ 1.5 M pH 10.0. Alla soluzione sono stati quindi aggiunti 150 μ L di cloruro di dansile (10 mg/mL in acetone). La dansilazione è stata lasciata procedere al buio per 12-16 ore a 25°C. I derivati dansilati sono stati trattati con prolina (100 mg/mL in H₂O) per eliminare il dansile in eccesso e quindi estratti mescolando la miscela con 100 μ L di cloroformio. Una miscela di standard contenente 12.5 nmol rispettivamente di Putrescina, Spermina, e Spermidina, con l'aggiunta di 6.5 nmol di DAE è stata trattata come i campioni.

Per la determinazione delle poliammine nel mezzo di coltura, 2 mL di mezzo di coltura sono stati portati a essiccazione a 100 °C per 24 ore. Il campione essiccato è stato quindi risospeso in 198 μ L di 0.5 M HClO₄ in presenza di 2 μ L di 10 mM DAE come standard interno e posto in rotazione a 4 °C per almeno 1 ora.

I derivati dansilati delle poliammine sono stati separati mediante HPLC utilizzando una colonna Kinetex Core-Shell Biphenyl della Phenomenex, 100 * 4.6 mm, porosità 5 μ m. I tamponi utilizzati

nella cromatografia sono 95% H₂O in acetonitrile (tampone A) e 5% H₂O in Acetonitrile (tampone B). La colonna è precedentemente equilibrata con 70% di tampone B ad un flusso di 1 mL/minuto. Le poliammine dansilate sono state eluite con un gradiente così programmato: 30% di tampone A per 3 minuti, poi gradiente lineare che arriva al 100% di B in 20 minuti e rimane in queste condizioni per 10 minuti prima di tornare al 30% di A che serve per equilibrare la colonna per la successiva iniezione. I picchi sono stati determinati con lettura UV a 210 nm.

7. Estrazione e quantificazione dell'RNA.

In seguito al raggiungimento di PDL uguale a 6, le cellule sono state raccolte in un 1 mL di TRIzol Reagent ed è stato estratto l'RNA attraverso l'utilizzo di PureLinkTM RNA mini Kit (Ambion). Il protocollo prevede di lasciare i campioni per 10 minuti a temperatura ambiente, poi di aggiungere 200 µL di cloroformio, agitare per inversione, incubare per 3 minuti a temperatura ambiente e centrifugare a 14000 rpm per 30 minuti a 4 °C. Successivamente la fase acquosa superiore, contenente l'RNA, è stata trasferita in un'eppendorf pulita. A questa è stato aggiunto un egual volume di etanolo al 70%, e la soluzione è stata agitata per inversione e incubata a temperatura ambiente per 3 minuti. A questo punto i campioni sono stati trasferiti in colonnine che contengono una membrana semipermeabile che trattiene l'RNA, mentre lascia passare il resto, che verrà raccolto nel tubo sottostante ("collection tube"). Dopo centrifugazione a 13300 rpm per 90 secondi a temperatura ambiente, l'eluato è stato scartato e la colonna è stata lavata con una soluzione di lavaggio (Washing Buffer 1). Il lavaggio è stato ripetuto per altre due volte con Washing Buffer 2 (fornito dal kit). Infine, una centrifugazione è stata eseguita per 5 minuti a 13300 rpm a temperatura ambiente per asciugare la membrana. La colonnina è stata quindi trasferita in una nuova eppendorf e l'RNA è stato eluito con 30 µL di H₂O MilliQ addizionata di 0,1% dietilpolicarbonato (H₂O-DEPC) e di 1 U/µL di inibitore di ribonucleasi RNasina (Promega, Fitchburg, WI, USA). L'RNA estratto dai campioni è stato quantificato mediante analisi spettrofotometrica eseguita mediante BioPhotometer (Eppendorf, Amburgo, DE). La qualità dell'RNA è stata valutata tramite il rapporto tra l'assorbanza a 260 e quella a 280 nm (rapporto considerato accettabile tra 1,8 e 2,0). I campioni di RNA sono stati conservati a -80 °C fino al successivo utilizzo.

8. Retrotrascrizione.

L'RNA è stato retrotrascritto mediante il kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Brevemente, a 500 ng di RNA sono stati aggiunti 1 µL di Random Hexamer primers 100 µM e H₂O-DEPC, raggiungendo un volume di reazione di 12 µL. La soluzione è stata incubata a 65 °C per 5 minuti e poi lasciata in ghiaccio per circa 1 minuto. Successivamente sono stati aggiunti i rimanenti reagenti: 4 µL di Reaction Buffer 5X, 2 µL di 10 mM dNTP Mix, 1 µL di RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) e H₂O-DEPC portando il volume di reazione a 20 µL finali. La miscela di reazione è stata incubata a 25 °C per 5 minuti ed infine a 42 °C per 60 minuti per permettere la sintesi e l'estensione del filamento di cDNA. Infine, la reazione è stata terminata riscaldando a 70 °C per 5 minuti. Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20 °C fino al suo utilizzo o a -80 °C per conservazione di lunga durata.

9. Real Time PCR.

Per ogni gene analizzato mediante Real-Time PCR, è stata allestita una miscela di reazione contenente 10 µL di SSO advanced universal syber green 2X ed i primers forward e reverse, questi ultimi a concentrazione 10 µM. Le sequenze dei primers utilizzati sono riportate in Tabella 1. Ad ogni reazione sono stati aggiunti 2 µL di cDNA diluito 1:1 con H₂O, raggiungendo un volume finale di reazione di 20 µL. La Real-Time PCR è stata effettuata utilizzando un termociclatore DNA Engine Opticon 4 (MJ Research, Walthman, MA, USA). Le condizioni di amplificazione prevedono una fase iniziale di attivazione della Taq polimerasi a 95 °C per 30 secondi, seguita da 40 cicli di amplificazione (denaturazione a 95 °C per 15 secondi, annealing a 60 °C per 20 secondi). I campioni sono stati analizzati in duplicato. Contemporaneamente al gene target, è stata amplificata anche la GAPDH, come gene di riferimento per la normalizzazione. Per ciascun campione, il ciclo soglia (Ct) relativo al gene d'interesse è stato normalizzato sottraendo il Ct del gene di riferimento (GAPDH) secondo la seguente formula: $\Delta Ct = Ct (\text{gene target}) - Ct (\text{gene di riferimento})$.

	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (3'-5')	Ref
ODC	CCTCCACTGCTGTAGTAA CC	GAAAGATTGTGATCCCTCTG	85
ADOMET	ATCACTCCAGAACCAGAAT	TAACAAACAAGGTGGTCACA	85
ODC	AGACCTTCGTGCAGGCAATC	AGGAAAGCCACCGCCAATAT	85
SSAT	GGTTGCAGAAGTGCCGAAAG	GTAACCTGCCAATCCACGGG	85
PAO	CCTACAGTTTGTGTGGGAGGA	ATGAATAGGAGCCACGGAAGT	85
SMO	CGCAGACTTACTTCCCCGGC	CGCTCAATTCCTCAACCACG	85
ALOX 15	AGCCTGATGGGAAACTCTTG	AGGTGGTGGGATCCTTGT	86
ALOX 5	CCTCAGGCTTCCCAAGT	GAAGATCACCACGGTCAAGGT	86
ALOX 12	GCTCCTGGAAGTGCCTAGAA	TCATCATCCTGCCAGCACT	86
GPX 4	TTCCCGTGTAAACCAGTTCG	CGGCGAACTCTTTGATCTCT	86
GAPDH	AACCTGCCAAATATGATGAC	TTGAAGTCAGAGGAGACCAC	85

Tabella dei primers utilizzati

10. Saggio enzimatico di Spermidina-spermina N-acetiltransferasi.

Per valutare l'attività enzimatica di SSAT le cellule sono state raccolte, lavate due volte in PBS e sospese in un tampone contenente 10 mM di Tris(idrossimetil)amminometano (pH 7.2) e 1 mM di ditiotreitolo. Questa sospensione è stata sottoposta a 2 cicli di congelamento-scongelo seguiti da breve sonicazione. Successivamente il lisato cellulare così ottenuto è stato incubato in 100 mM Tris (pH 8.0), 3 mM Spermidina e 0.5 nmol 1-[¹⁴C] acetil coenzyme A in un volume finale di 50 µL per 10 minuti a 30 °C. La reazione è stata bloccata aggiungendo 10 µL di 1 M NH₂OH e bollendo il campione per 3 minuti. I campioni sono stati posti su fogli di fosfocellulosa P-81 e la radioattività è stata misurata mediante scintillatore. La quantità di citosol aggiunto alla miscela di reazione finale è stata aggiustata per mantenere le concentrazioni di enzima/substrato entro un intervallo lineare. L'attività dell'enzima è espressa come pmol di [¹⁴C] acetilspermidina formata min⁻¹ mg⁻¹ di proteine.

11. Determinazione dei ROS e normalizzazione con cristal-violetto.

Le cellule sono state seminate in piastra 96-well nera specifica per saggi di fluorescenza ad una densità pari a 10000 cellule per pozzetto in un volume finale di 200 μ L di terreno di coltura contenente alternativamente 50 nM FA o 2 μ M FA. Le cellule sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37 °C e in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ per 48 ore. Successivamente è stata eseguita la determinazione dei ROS mediante trattamento con 2', 7'- dicloro fluoresceina diacetato (DCFDA). Il DCFDA è una molecola lipofila che ha la capacità di attraversare la membrana cellulare ed entrare così nella cellula. Qui viene ossidata dai ROS intracellulari ed in questo modo viene convertita nella molecola fluorescente DCF. La fluorescenza di quest'ultima, che è dunque direttamente proporzionale alla quantità di ROS presenti nella cellula, è stata misurata con il lettore di piastre Enspire (Perkin Elmer). Il protocollo ha richiesto i seguenti passaggi: il DCFDA inizialmente è stato sciolto in dimetilsolfossido (DMSO) ottenendo una soluzione a concentrazione 20 mM per poi essere successivamente diluita 1000 volte in tampone fosfato salino (PBS).

È stato rimosso il mezzo di coltura da tutti i pozzetti e sono stati eseguiti 2 lavaggi con PBS. A questo punto ad ogni pozzetto è stata aggiunta la soluzione di DCFDA diluita in PBS e le cellule sono state così incubate a 37 °C per 20 minuti. Alcuni pozzetti di cellule non sono stati trattati con la soluzione di DCFDA in modo da usarle come controllo. Sono seguiti poi 2 lavaggi con PBS ed infine è stata rilevata la fluorescenza a 535 nm dopo 0, 30 e 60 minuti. Il numero di cellule è stato valutato mediante saggio con cristal violetto secondo la procedura descritta nel paragrafo 3. Il valore del cristal violetto è stato utilizzato per la normalizzazione dei ROS per il numero di cellule presenti nel pozzetto.

12. Determinazione del glutatione.

Le cellule cresciute in 50 nM FA e in 2 μ M FA sono state seminate in piastra 96-well bianca in modo da avere 5000 cellule per pozzetto e mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C e in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ per 24 ore. Successivamente è stato eseguito il saggio GSH/GSSG-Glo™ Assay (Promega, Madison, WI, USA) che permette di ottenere il rapporto tra glutatione ridotto (GSH) e glutatione ossidato (GSSG). Il glutatione è un peptide con azione antiossidante che, in condizioni normali, viene mantenuto dalla cellula nella sua forma ridotta in modo tale che possa continuamente contrastare l'accumulo di ROS. Quando il glutatione ridotto interagisce con un radicale libero, lo inattiva trasformandosi nella sua forma ossidata (GSSG). Di conseguenza, un incremento dei livelli di GSSG nella condizione di deplezione di acido folico potrebbe essere indice della risposta cellulare allo stress ossidativo. Le determinazioni di GSSG e GSH+GSSG sono basate sullo stesso schema di reazione: la conversione GSH-dipendente della sonda luciferina-NT a luciferina mediante l'enzima glutatione S-transferasi, viene accoppiata alla reazione dell'enzima luciferasi dalla quale, a partire da ATP e luciferina appena prodotta, viene emessa luce che sarà direttamente proporzionale alla quantità di GSH. La luce emessa è stata misurata con il lettore di piastre EnSpire (PerkinElmer). Prima di tali test, le cellule vengono trattate diversamente a seconda che si voglia rilevare GSH+GSSG o GSSG. Brevemente, per la misura del GSH+GSSG viene aggiunto un reagente di lisi (Total Glutathione Lysis Reagent) che lisa le cellule riducendo allo stesso tempo il GSSG a GSH. Invece, per la misura del GSSG viene aggiunto un reagente di lisi (Oxidized Glutathione Lysis Reagent) il quale lisa le cellule preservando il GSH presente e riducendo il GSSG a GSH. Il protocollo ha previsto i seguenti passaggi: è stato rimosso il mezzo di crescita, sono stati aggiunti 50 μ L per pozzetto di Total Glutathione Lysis Reagent (composto da Luciferin-NT, Passive Lysis Buffer 5X e H₂O) oppure Oxidized Glutathione Lysis Reagent (composto da Luciferin-NT, 25 mM N-etilmaleimide) e Passive Lysis Buffer 5X e H₂O) e le cellule sono state lisate per 5 minuti a 25°C su agitatore rotante. Alla miscela sono stati aggiunti 50 μ L di Luciferin Generation Reagent (costituito da 100 mM DTT, Glutathione-S-Transferasi e Glutathione Reaction Buffer) mescolando per 1 minuto su agitatore rotante, incubando per 30 minuti a temperatura ambiente. Infine, sono stati aggiunti 100 μ L di Luciferin Detection Reagent (costituito da Reconstitution Buffer with Esterase e Luciferin Detection Reagent), mescolato per 1 minuto e dopo 15 minuti è stata misurata la luminescenza. Per il calcolo del rapporto GSH/GSSG, è stata applicata la formula:

$$\frac{\text{Glutatione totale} - \text{glutatione ossidato}}{\text{glutatione ossidato}/2}$$

13. Trattamento con N^1, N^{11} -Diethylnorspermine tetrahydrochloride.

Sono state seminate 20.000 cellule PC3 e BPH1 per pozzetto in piastra da 12 pozzetti in un volume totale di 2 mL e trattate con DENSpM (4A/207746, TOCRIS Bioscience, Bristol) a diverse concentrazioni (0- 20 μM) per 72h. Il DENSpM è un analogo delle poliammine che induce l'espressione del gene *ssat*. La vitalità cellulare è stata determinata con il saggio Cristal-violetto piastrando 7000 cellule in piastre da 12 well. Per l'estrazione di proteine e RNA le cellule PC3 e BPH1 sono state seminate ad una densità di 100.000 in piastre Petri da 10 mm di diametro in volume totale di 10 mL e trattate con DENSpM a concentrazione 10 μM (per le cellule PC3) e 1,5 μM (per le cellule BPH1).

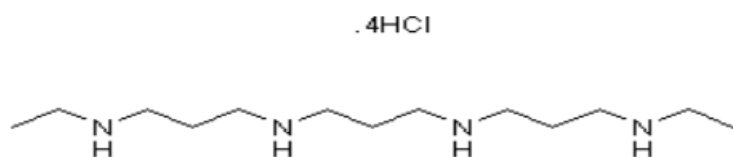


Figura 14. Struttura DENSPM. ⁸⁷

Le cellule sono raccolte mediante TRIZOL dopo 72h per estrazione dell'RNA e raccolte con scraper in PBS per estrazione di proteine.

14. Saggio di vitalità.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Milano, Italia) che misura la quantità intracellulare di ATP. In breve, è stato utilizzato il pellet di cellule PC3 e BPH1 trattate in precedenza con DENSp_m e cresciute in condizioni di deplezione di folato o di folato standard. Il pellet è stato risospeso in un volume finale di 400 µL con PBS. 100 µL della sospensione cellulare diluita è stata aliquotata in triplicato in una piastra a 96 pozzetti e lisata con 100 µL di soluzione di lisi contenuta nel kit (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay) per 2 minuti in un agitatore orbitale. La micropiastra è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente prima di misurare l'intensità della luminescenza con il lettore di piastre EnSpire Multimode (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). I dati di luminescenza, espressi in unità di luce relativa (RLU), sono stati normalizzati al contenuto proteico totale di ciascun campione, misurato con il DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

15. Analisi statistica.

La normale distribuzione dei dati è stata valutata dal test T di Student. Tutti i dati sono riportati come valori medi \pm deviazione standard. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato. Le differenze sono considerate statisticamente significative quando $p < 0.005$.

Risultati e discussione

1. Effetto della deplezione di folati sulla proliferazione delle cellule PC3 e BPH1.

Abbiamo determinato la dipendenza della crescita di cellule prostatiche, sia normali immortalizzate (BPH1) che tumorali metastatiche (PC3), alla presenza di folato nel mezzo di coltura. Il protocollo che abbiamo utilizzato si è basato sul numero di population doubling (PDL), cioè il numero di volte in cui la popolazione cellulare si duplica.

L'utilizzo della PDL, il cui tempo varia tra linee cellulari diverse, anziché di un periodo di tempo prestabilito ci ha permesso di confrontare la dipendenza delle cellule ai folati, dal momento che tutte le cellule avevano la stessa quantità di folati disponibili per cellula per ogni duplicazione nell'esperimento. La crescita cellulare è stata valutata mediante determinazione dell'assorbanza a 595 nm delle cellule precedentemente colorate mediante cristal violetto dopo 24, 48, 96, 168 e 216 ore dalla semina. Come evidenziato in figura 15, l'assorbanza determinata cresce in maniera proporzionale all'aumento del numero delle cellule adese alla piastra.

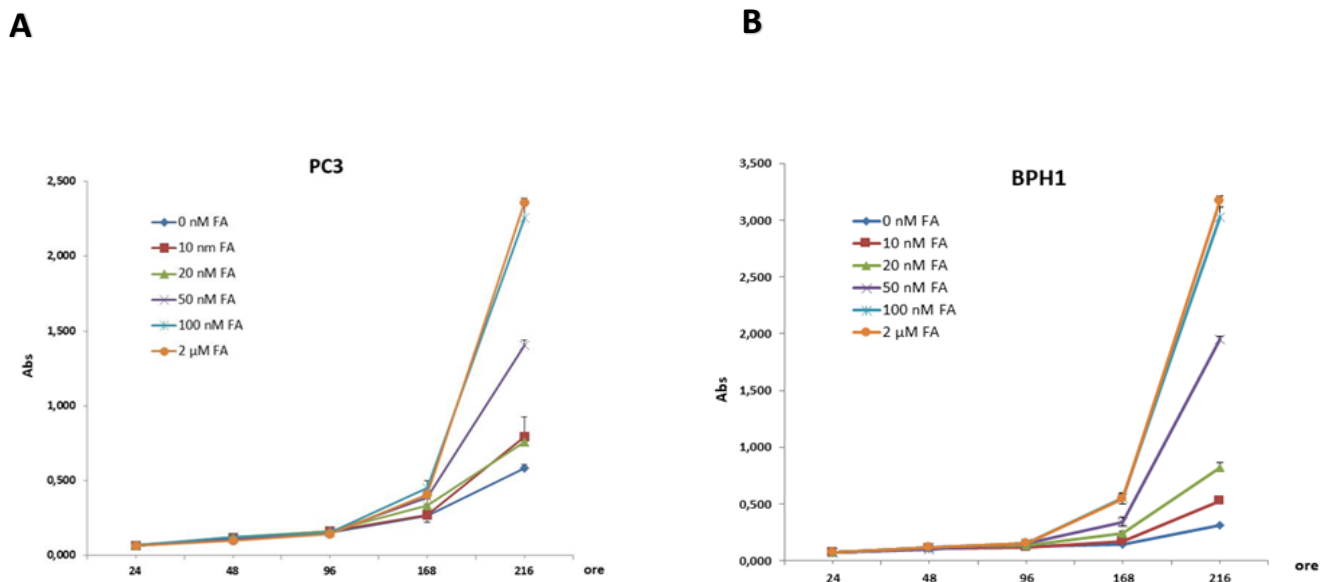


Figura 15. Effetto della deplezione dei folati sulla proliferazione cellulare. Le figure mostrano l'effetto della deplezione dei folati sul tasso di proliferazione cellulare di cellule PC3 (A) e cellule BPH1 (B). La deplezione di folato è stata ottenuta attraverso l'utilizzo di un terreno RPMI privo di folato supplementato con un siero fetale bovino FBS dializzato. Le cellule sono state fatte crescere in terreni contenenti concentrazioni crescenti di folato (FA) comprese tra 0 e 2 μ M. La concentrazione di FA 2 μ M rappresenta la concentrazione standard di folato normalmente presente nei terreni di coltura delle cellule. La proliferazione cellulare è stata valutata attraverso il saggio del Cristal violetto.

I grafici A e B ottenuti riportando il tasso di crescita delle linee cellulari (espresso come assorbanza del cristal violetto) a diverse concentrazioni di folato, mostrano pendenze significativamente diverse. Le linee cellulari utilizzate sono PC3 (tumori prostatici androgeno-indipendenti) e BPH1 (cellule di iperplasia benigna prostatica). Per valutare la proliferazione cellulare in relazione alla concentrazione di folati abbiamo utilizzato un terreno RPMI senza acido folico addizionato di siero fetale bovino (FBS) dializzato. La dialisi del siero si è resa necessaria per eliminare i folati presenti nel siero e di conseguenza valutare le variazioni del tasso di crescita in relazione alla sola concentrazione di folati da noi somministrata (RPMI 1640 privo di folati + 10% di FBS dializzato + quantità specifiche di FA).

Le figure 15 A e 15 B mostrano che entrambe le linee cellulari sono sensibili alla deplezione di acido folico. Le concentrazioni di acido folico utilizzate variano tra 0 e 2 μM . La concentrazione 2 μM rappresenta la concentrazione di folato che normalmente troviamo in un terreno di crescita, motivo per il quale è stata considerata come concentrazione di controllo.

Le concentrazioni di acido folico che vanno da 0 a 50 nM rappresentano condizioni limitanti in cui si evidenzia una crescita cellulare minore. Di conseguenza la concentrazione 50 nM FA è stata scelta come condizione limitante di folato per gli esperimenti successivi in quanto consente una crescita cellulare pari a circa il 50% in meno rispetto alla condizione di folato standard (2 μM FA). Dalle Figure 15 A e 15 B è possibile notare come la differenza nel tasso di crescita delle cellule BPH1 e PC3 diventa apprezzabile dopo un periodo di coltura sufficientemente lungo.

2. Effetto della deplezione di folati sulla capacità di formare colonie.

Per esaminare la capacità di proliferazione cellulare in condizioni di deplezione di folato o in condizioni standard, sono stati eseguiti saggi di formazione delle colonie (figure 16 A e B). Le cellule PC3 (A) e BPH1 (B) sono state lasciate crescere per 10 giorni in condizioni di folato limitanti (50 nM FA) e in condizioni di folato normali (2 μ M FA) fino alla formazione di colonie spazialmente separate. Le colonie sono state in seguito colorate con cristal violetto e l'assorbanza è stata misurata nel tempo.

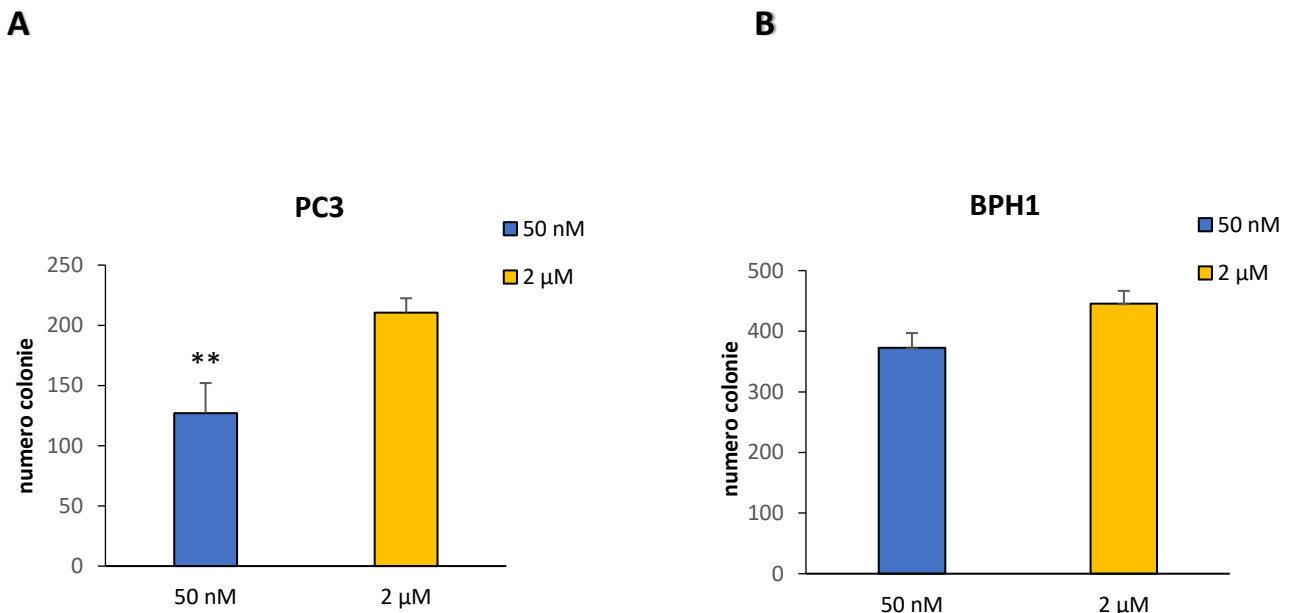


Figura 16. Effetto della deplezione dei folati sulla capacità di formazione di colonie. Le cellule PC3 (A) e BPH1 (B), cresciute in mezzo contenente 50 nM FA (barra blu) e 2 μ M FA (barra gialla), sono state lasciate crescere per 10 giorni fino alla formazione di colonie spazialmente separate. La conta delle colonie formate è stata fatta dopo colorazione delle cellule vitali con cristal violetto. Negli istogrammi è riportato il numero di colonie. Le barre d'errore rappresentano la deviazione standard di tre determinazioni indipendenti. (t test, ** $p < 0.01$)

È possibile vedere in entrambe le linee cellulari (PC3 e BPH1) una diminuzione della formazione di colonie associata ad una condizione di deplezione di folati. Nelle cellule PC3 (tumorigeniche) il dato risulta significativo (t test, ** $p < 0,01$) e ciò dimostra una maggiore sensibilità delle cellule PC3 rispetto alle cellule BPH1 (immortalizzate) alla deplezione dei folati.

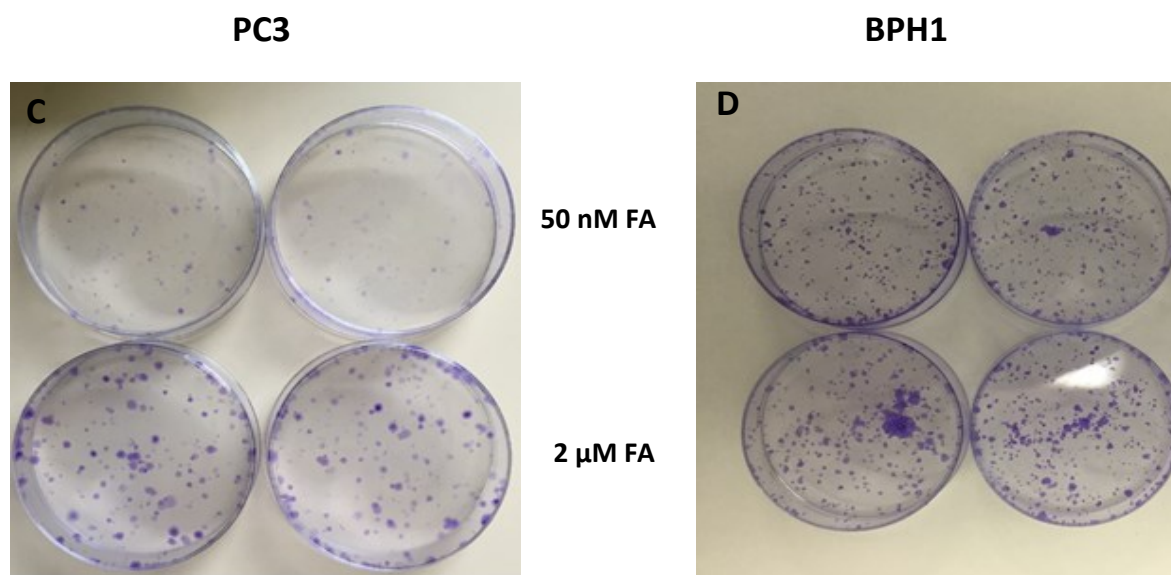


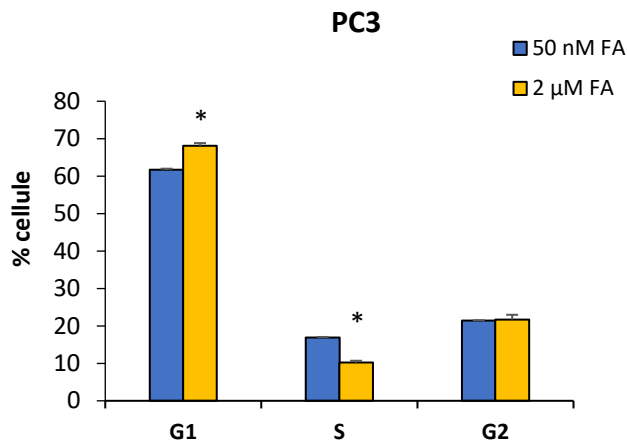
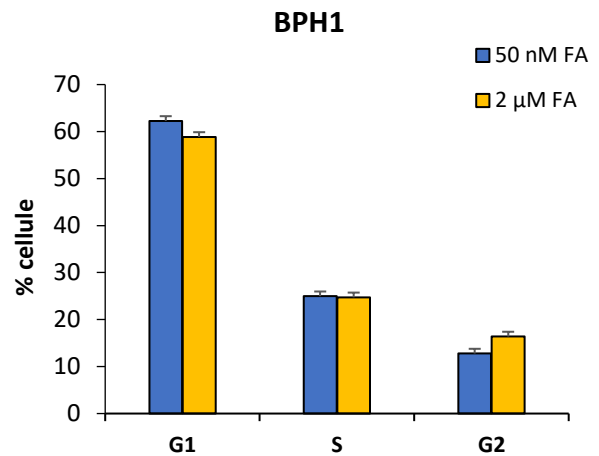
Figura 17. Clonogenic assay. Le figure C e D mostrano l'aspetto delle colonie formate dalle cellule PC3 (C) e cellule BPH1 (D) cresciute in condizione di deplezione di folato (50 nM FA) e in condizione di folato standard (2 μM FA) fino al raggiungimento delle 6 PDL. Le colonie sono state colorate con cristal violetto e contate.

Le figure 17 C e D, invece, mostrano l'aspetto delle colonie dell'esperimento appena descritto colorate con cristal violetto: possiamo vedere che nelle cellule cresciute in condizioni di deplezione di folato le colonie hanno dimensioni più piccole rispetto a quelle cresciute nella condizione di controllo in entrambe le linee cellulari.

3. Effetto della deplezione di folati sul ciclo cellulare.

Abbiamo eseguito l'analisi del ciclo cellulare nelle cellule cresciute in condizioni di deplezione di folato o in condizioni standard al fine di comprendere se la diminuzione della proliferazione fosse dovuta ad un aumento della mortalità oppure ad un blocco del ciclo cellulare causato da una scarsa disponibilità di folati nel mezzo di coltura. Le cellule PC3 e BPH1 sono state cresciute in condizioni di deplezione di folato (50 nM FA) e in condizione di folato normali (2 μ M FA) fino al raggiungimento delle 6 PDL e successivamente abbiamo valutato la distribuzione della popolazione di cellule nelle fasi G1, S e G2.

Nei grafici (Figura 18) sono mostrate le percentuali di cellule che si trovano nelle tre fasi in presenza di 50 nM FA (barra blu) e 2 μ M FA (barra gialla). Il ciclo cellulare è caratterizzato da quattro fasi durante le quali le cellule possono dividersi. Quando una cellula è danneggiata oltre la sua capacità di riparazione può andare in apoptosi. Si verificano in questo caso dei cambiamenti morfologici della cellula che portano alla sua digestione ed eliminazione. Questi cambiamenti possono essere evidenziati attraverso l'analisi al citofluorimetro attraverso la comparsa di un picco specifico che evidenzia la presenza di cellule apoptotiche. In nessuna delle due linee cellulari è stata rilevata presenza di apoptosi. L'effetto della deplezione dei folati sembra pertanto essere citostatico.

A**B**

	PC3 50 nM	PC3 2 μM	BPH1 50 nM	BPH1 2 μM
G1	61,52%	68,61%	61,13%	59,62%
S	17,00%	10,55%	26,26%	24,98%
G2	21,48%	20,84%	12,62%	15,40%

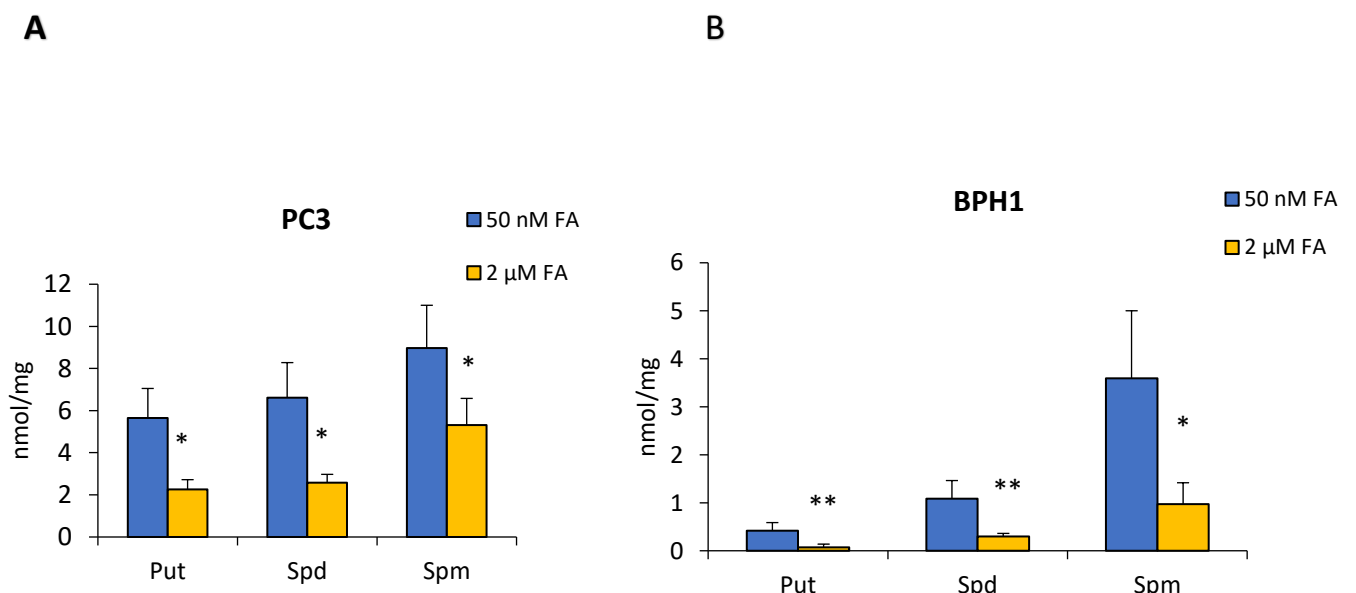
Figura 18. Effetto della deplezione dei folati sulla progressione del ciclo cellulare. Le cellule PC3 (A) e BPH1 (B) cresciute in mezzo contenente 50 nM FA (barra blu) e 2 μM FA (barra gialla) sono state trattate con l'intercalante fluorescente ioduro di propidio. L'analisi citofluorimetrica a flusso ha permesso di valutare la distribuzione della popolazione di cellule nelle fasi del ciclo cellulare (G1, S e G2). Le barre d'errore rappresentano la deviazione standard di due determinazioni indipendenti. (t test, * p<0.05)

Nelle cellule BPH1 (Figura 18 B) non notiamo alcun cambiamento significativo nella distribuzione delle cellule tra le diverse fasi del ciclo cellulare, mentre nelle cellule PC3 possiamo notare delle piccole, ma significative (t test, * p< 0,05) variazioni della distribuzione delle cellule nelle fasi G1 e S. In nessuna delle due linee cellulari è presente apoptosi e questa limitata variazione nelle fasi G1 e S (Figura 18 A) può essere interpretata come un rallentamento piuttosto che un blocco del ciclo cellulare. In condizione di deplezione di folati le cellule PC3 sembrano transitare in maniera più veloce dalla fase G1 alla fase S, in quanto abbiamo una diminuzione del 6% in fase G1 ed un aumento del 6% in fase S. In fase G2, invece, non c'è alcuna variazione tra le due condizioni. Questo dato è in accordo con la diminuzione dei livelli di proliferazione delle cellule cresciute in deplezione di folati. Il folato è necessario per la sintesi dei nucleotidi che vengono utilizzati in fase S per la sintesi del dTMP e dei nucleotidi purinici per cui si può ipotizzare che il rallentamento del ciclo cellulare in fase S possa essere causato da una diminuzione dei livelli di nucleotidi necessari alla sintesi del DNA.

Questi dati, inoltre, confermano una maggiore sensibilità alla deplezione dei folati delle cellule PC3 rispetto alle cellule BPH1. Questa maggiore sensibilità è plausibilmente legata alla maggiore capacità proliferativa delle cellule metastatiche rispetto a quelle normali e immortalizzate.

4. Effetto della deplezione di folati sui livelli di poliammine intra- ed extracellulari.

La sintesi delle poliammine nella ghiandola prostatica è molto attiva e nelle cellule tumorali questa via è ancora più accentuata dal momento che queste molecole sono necessarie per la crescita cellulare e la regolazione dei geni. Nella prostata le poliammine vengono secrete in grandi quantità nel fluido spermatico e per questo motivo è stata misurata anche la quantità di questi policationi nel mezzo di coltura. Dal momento che la sintesi delle poliammine è strettamente connessa con il metabolismo dei folati, abbiamo valutato i livelli di poliammine intra- ed extracellulari in cellule PC3 e BPH1 cresciute in condizioni di folato limitanti e normali mediante analisi HPLC. In figura 19 A e B vengono presentati i livelli di poliammine intracellulari, mentre in C e D quelli delle poliammine extracellulari.



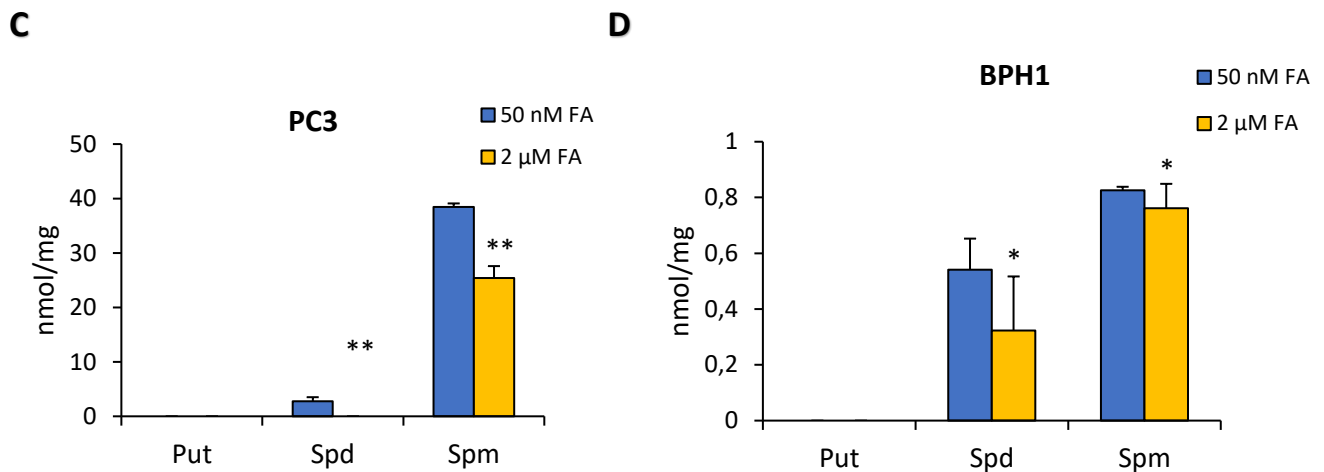


Figura 19. Effetto della deplezione dei folati sulla produzione di poliammine intra ed extra cellulari. Le figure A e B mostrano i livelli di poliammine intracellulari determinati attraverso analisi HPLC in cellule PC3 (A) e cellule BPH1 (B). Le cellule sono state fatte crescere in condizioni di folato limitante (barra blu) e in condizioni di folato standard (barra gialla) fino al raggiungimento delle 6 PDL. Le figure C e D mostrano, invece, i livelli di poliammine extra-cellulari determinati nel terreno di crescita di cellule PC3 (C) e BPH1 (D) fatte crescere in terreno RPMI 50 nM di acido folico (barra blu) e 2 μM di acido folico (barra gialla). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard di tre esperimenti indipendenti. (t test, * p<0.05; ** p<0.01).

Nei grafici (figura 19) sono rappresentate le concentrazioni, in nmol/mg di proteine, di putrescina, spermidina e spermina nelle due condizioni studiate. Possiamo notare un incremento significativo dei livelli di poliammine intracellulari in entrambe le linee cellulari quando sono cresciute in condizioni di folato limitanti (barra blu). Le cellule PC3 presentano un maggiore incremento dei livelli di poliammine rispetto alle cellule BPH1. L'incremento del livello di poliammine intracellulari è quindi una risposta delle cellule prostatiche alla condizione di deplezione di folato. L'accumulo di poliammine all'interno della cellula può dipendere da un'alterazione del metabolismo delle poliammine (incremento della biosintesi o inibizione della degradazione) oppure dall'inibizione del trasporto all'esterno della cellula.

Dal momento che una buona percentuale delle poliammine cellulari vengono escrete dalle cellule della prostata, abbiamo misurato anche la concentrazione delle poliammine extracellulari. I livelli di poliammine escrete nel terreno, invece, risultano leggermente aumentati per le cellule BPH1. Nelle cellule PC3, invece, ritroviamo un significativo aumento (t test, ** p<0,01) dei livelli di spermina e spermidina escrete quando le cellule sono cresciute in condizioni di folato limitanti. Siccome le poliammine che vengono escrete dalla cellula sono in forma acetilata, che non è separabile dalla forma non acetilata mediante questa analisi HPLC, assumiamo che tutte le poliammine rilevate nel mezzo di coltura siano in forma acetilata. Sono attualmente in corso esperimenti volti a separare le due forme dei policationi per ottenere una determinazione più precisa.

È possibile notare un incremento significativo dei livelli di poliammine extracellulari in entrambe le linee cellulari quando sono cresciute in condizioni di folato limitanti. Le cellule PC3 presentano un maggiore incremento dei livelli di poliammine rispetto alle cellule BPH1. I livelli di poliammine escrete nel terreno, invece, risultano leggermente aumentati, anche se non in maniera significativa, per le cellule BPH1. Nelle cellule PC3, invece, ritroviamo un significativo aumento (t test, * $p < 0,05$) dei livelli di spermina escreta in cellule PC3 cresciute in condizioni di folato limitanti.

La deplezione di folato all'interno del terreno di crescita delle cellule causa quindi un paradossale aumento dei livelli di poliammine intracellulari che si verifica in maniera significativa sia nelle cellule tumorigeniche (PC3) che in quelle immortalizzate (BPH1). Le cellule PC3 presentano un maggiore incremento dei livelli di poliammine rispetto alle cellule BPH1 quando sono in condizioni di deplezione di folato. Ciò indica che le cellule tumorali risultano essere molto più sensibili alla mancanza di folato nel terreno e mettono in atto un sistema di difesa che ha come scopo quello di ripristinare l'omeostasi cellulare. Il metabolismo delle poliammine nelle cellule PC3 sembra essere maggiormente alimentato rispetto alle cellule BPH1 probabilmente in virtù del fatto che le poliammine hanno un ruolo importante nella proliferazione e nella differenziazione cellulare ed intervengono nei meccanismi di attivazione tumorale.

5. Effetto della deplezione di folati sui livelli di espressione dei geni del metabolismo delle poliammine.

Per comprendere meglio la risposta adattativa delle cellule alla deplezione di folato, abbiamo esaminato il profilo di espressione di geni coinvolti nel metabolismo delle poliammine. Nelle due linee cellulari PC3 (A) e BPH1 (B) sono stati determinati i livelli di trascrizione di *oaz*, *samdc*, *odc*, *ssat*, *apao* e *smo* nella condizione di concentrazione limitante di folato (50 nM FA) ed in quella di controllo (2 μ M FA). I livelli di espressione dei geni sono stati valutati mediante RT-qPCR e nei grafici (figura 20) sono riportati per ogni gene il confronto tra il valore di Δ Ct (Ct gene in esame – Ct GAPDH) ottenuto nella condizione di folato limitante (barra blu) e nella condizione standard di folato (barra gialla). Dal momento che il Ct indica il numero di cicli di amplificazione necessari per raggiungere la fluorescenza soglia, il valore di Ct è inversamente proporzionale alla quantità di trascritto.

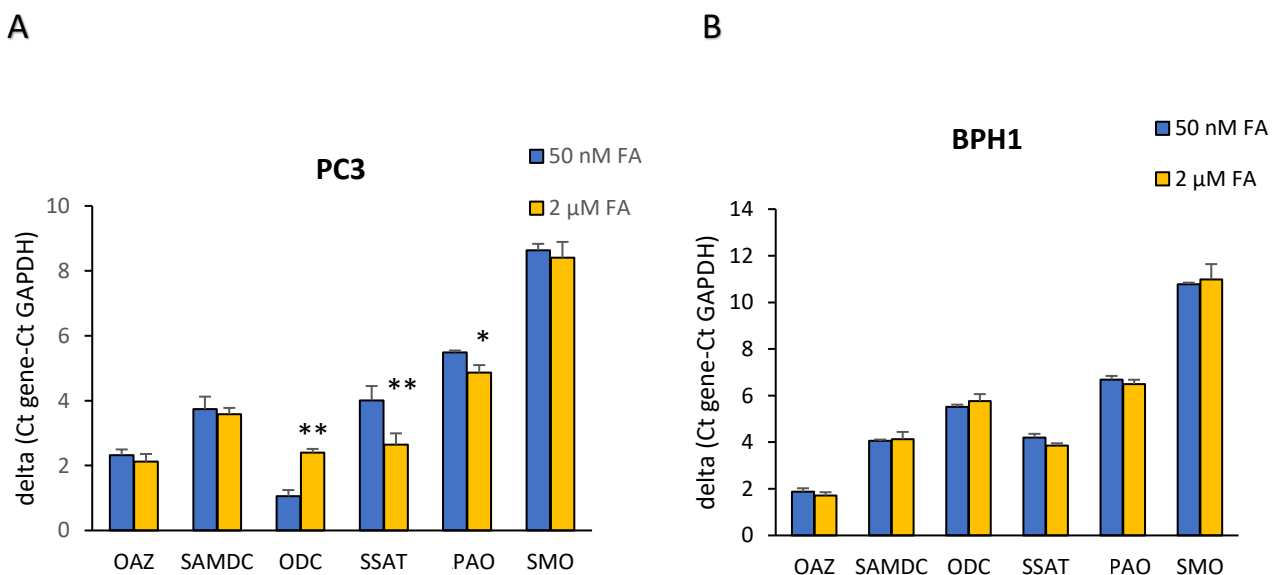


Figura 20. Effetto della deplezione del folato sui livelli di espressione dei geni del metabolismo delle poliammine. Nelle cellule PC3 (A) e BPH1 (B), cresciute in mezzo contenente 50 nM FA (barra blu) e 2 μ M FA (barra gialla), sono stati determinati i livelli di mRNA dei geni del metabolismo delle poliammine mediante REAL-TIME PCR. Per ciascun campione, il ciclo soglia (Ct) relativo al gene d'interesse è stato normalizzato sottraendo il Ct del gene di riferimento (GAPDH) secondo la seguente formula: Δ Ct = Ct (gene target) – Ct (gene di riferimento). Il valore di Ct è inversamente proporzionale alla quantità di trascritto. Le barre d'errore rappresentano la deviazione standard di tre determinazioni indipendenti. (t test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Nella linea cellulare PC3 (Figura 20A) si evidenzia un incremento significativo (t test, * $p < 0,05$) dei livelli di espressione del gene *odc* e una significativa riduzione dei livelli di espressione dei geni *ssat* e *pao* nella condizione di crescita 50 nM di acido folico rispetto alla condizione di crescita con concentrazione di folato standard.

La linea cellulare BPH1, invece, non presenta nessuna variazione dei livelli di espressione dei geni delle poliammine nelle due differenti condizioni di crescita.

Interessante sottolineare che nella maggior parte dei tumori si è visto che i livelli di espressione del gene *odc* risultano aumentati. La condizione di deplezione di folato nelle cellule PC3 causa un incremento dei livelli di *odc* che è il principale gene coinvolto nella biosintesi delle poliammine.

La deplezione di folato, inoltre, causa una paradossale riduzione dei livelli di espressione del gene *ssat* e del gene *pao*, tutti implicati nel catabolismo delle poliammine. Questo indica che il catabolismo delle poliammine risulta rallentato rispetto alla loro biosintesi.

Questi risultati suggeriscono che l'aumento della produzione di poliammine dipenda da una variazione dell'espressione degli enzimi del metabolismo delle poliammine.

L'induzione dell'espressione del principale gene biosintetico e la riduzione degli enzimi catabolici spiega l'aumento delle poliammine sia intracellulari che secrete che è stato descritto nelle cellule metastatiche cresciute in condizioni di vitamina limitante, ma rappresenta anche una risposta adattativa delle cellule alla mancanza di un componente necessario alla sintesi di questi policationi fondamentali per la proliferazione cellulare. Le cellule PC3, che sembrano essere maggiormente sensibili alla deplezione di folato, rispondono a questa condizione attraverso un rallentamento della secrezione delle poliammine. Una variazione del livello dell'espressione dell'mRNA dei geni del metabolismo delle poliammine deve essere confermata da una variazione dell'attività enzimatica degli enzimi stessi.

6. Effetto della deplezione di folato sull'attività enzimatica di SSAT.

Abbiamo valutato l'effetto della deplezione dei folati sull'attività enzimatica di SSAT attraverso un saggio radioattivo. Le cellule PC3 e le cellule BPH1 sono state fatte crescere in condizioni di deplezione di folato (barra blu figure 21 A e B) e in condizioni di folato standard (barra gialla figure 21 A e B). Nei grafici sono indicate le pmol di [¹⁴C] acetilspermina formata/min/mg di proteina formata nelle diverse condizioni.

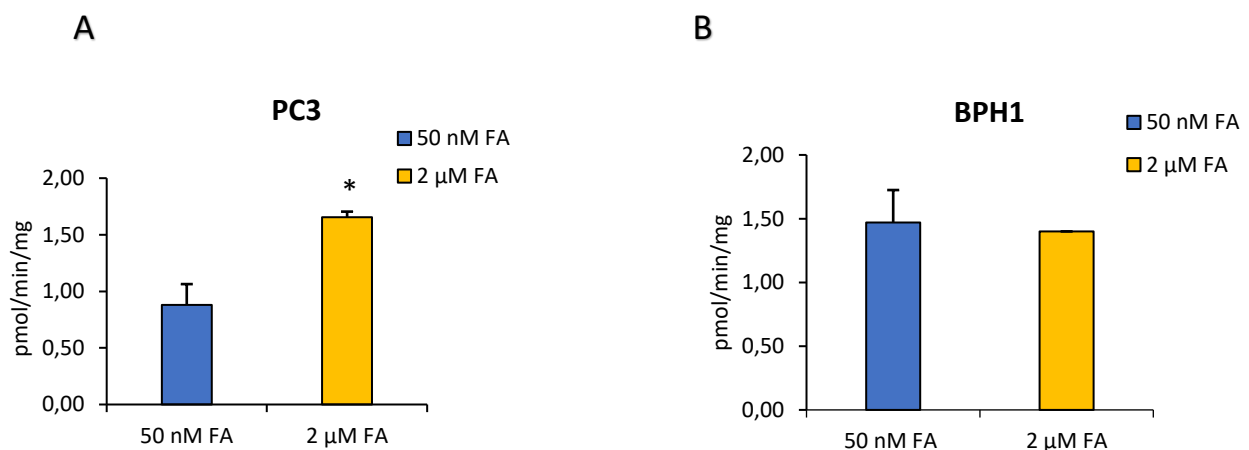


Figura 21. Effetto della deplezione del folato sull'attività enzimatica di SSAT. Nelle cellule PC3 (A) e BPH1 (B) cresciute in mezzo contenente 50 nM FA (barra blu) e 2 μM FA (barra gialla) è stata determinata l'attività enzimatica di SSAT attraverso un saggio radioattivo. Sull'asse delle ordinate sono indicate le pmol di [¹⁴C] acetilspermidina formata/min/mg di proteine nelle due condizioni studiate. Le barre d'errore rappresentano la deviazione standard di due determinazioni indipendenti. (t test, * p<0,05).

Le cellule PC3 mostrano una significativa riduzione (t test, * p<0,05) dell'attività enzimatica dell'SSAT come possiamo vedere nella figura A. L'attività enzimatica dell'SSAT nelle cellule BPH1, invece, non mostra alcun cambiamento.

L'abbassamento dei livelli di espressione del gene *ssat* si traduce inevitabilmente in una riduzione dell'attività dell'enzima nelle cellule PC3 cresciute in condizioni limitanti di folato (A). L'enzima SSAT

ha la funzione di acetilare la spermina e la spermidina che, una volta acetilate, vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare. La funzione delle poliammine acetilate non è ancora nota.

Questi dati confermano che nelle cellule metastatiche PC3 l'aumento del pool intracellulare delle poliammine in presenza di folato limitante può essere spiegato, almeno in parte, con la riduzione dell'attività dell'enzima catabolico SSAT.

7. Effetto della deplezione di folati sulla produzione di ROS.

Dal momento che le poliammine agiscono come molecole che contrastano lo stress ossidativo, abbiamo valutato l'effetto della deplezione di folato sullo stress ossidativo attraverso un saggio che quantifica la produzione di ROS intracellulari nelle cellule BPH1 e PC3. Nei grafici (figura 20), la quantità di ROS prodotta è rappresentata come fluorescenza DCFDA in tempi differenti (0, 30 e 60 minuti) in cellule PC3 e BPH1 fatte crescere in condizione di folato limitante (50 nM FA) e in condizione di folato standard.

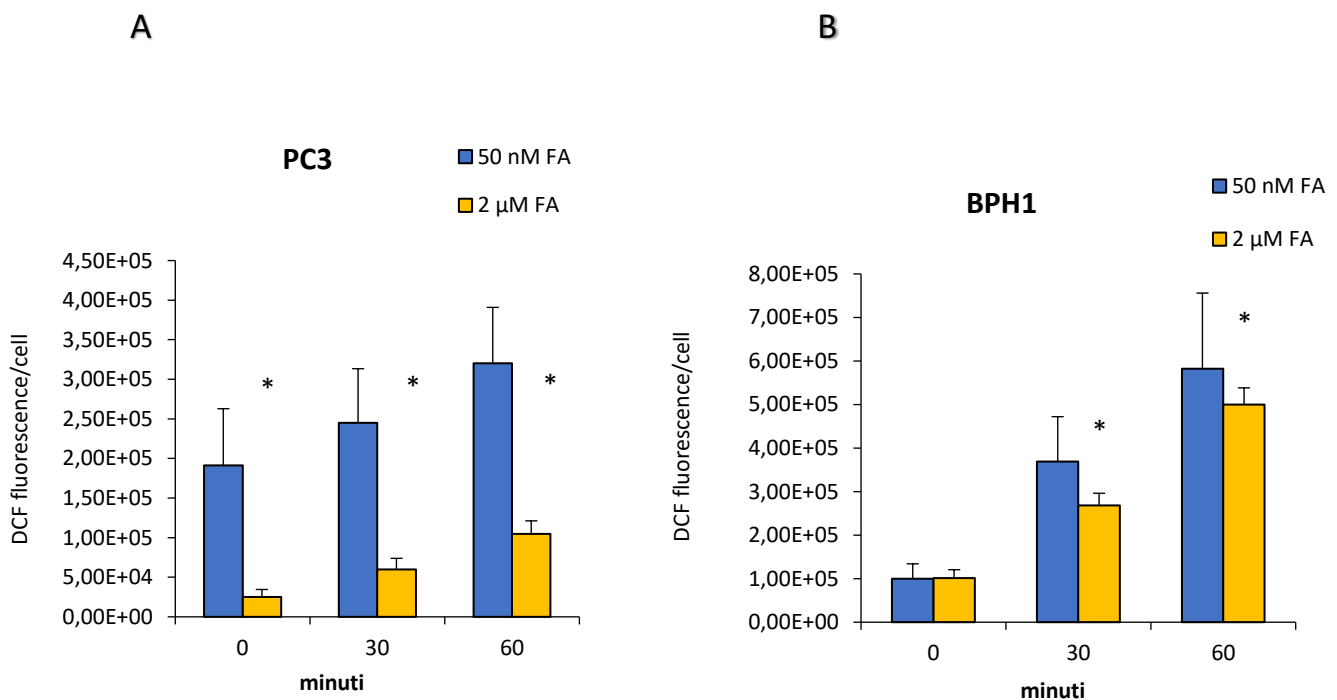


Figura 22. Effetto della deplezione dei folati sulla produzione di ROS. Nelle cellule PC3 (figura 22 A) e BPH1 (figura 22 B) cresciute in mezzo contenente 50 nM FA (barra blu) e 2 μM FA (barra gialla) sono stati determinati i livelli di ROS, rappresentati come fluorescenza a 535 nm della DCFDA ai tempi 0, 30 e 60 min. Le barre d'errore rappresentano la deviazione standard di tre determinazioni indipendenti. (t test, * $p < 0.05$).

I ROS indicano lo stato di stress ossidativo a cui sono sottoposte le cellule. Possiamo vedere che in entrambe le linee cellulari abbiamo un incremento significativo dei ROS quando le cellule sono cresciute in una condizione di deplezione di folato (barra blu).

Nelle cellule PC3 abbiamo un incremento maggiore dei livelli di ROS tra la condizione di CTRL con folato standard (barra gialla) e la condizione di deplezione di folato (barra blu) rispetto alle cellule BPH1, dove possiamo notare un minore, ma significativo aumento dei livelli di ROS nella condizione di deplezione di folato dopo 30 e 60 min (B).

Questi risultati indicano che le cellule, quando sono cresciute in condizioni di deplezione di folato, sono sottoposte ad una condizione di forte stress ossidativo. La carenza di folato, che è un nutriente essenziale per la crescita cellulare, è associata all'incremento dello stress ossidativo in cellule tumorali umane tanto che può portare all'attivazione della apoptosi.⁸⁸

Dal momento che le poliammine hanno una nota attività antiossidante, nelle cellule prostatiche cresciute in condizioni di folato limitante l'incremento del pool poliamminico può rappresentare un tentativo della cellula di contrastare e sopravvivere a questa condizione di stress. La differenza della produzione di ROS tra la condizione deplezione di acido folico e quella di controllo è maggiormente marcata nella linea cellulare PC3 rispetto a quella non tumorigenica: questo dato conferma la nostra ipotesi che le cellule metastatiche siano più sensibili alla minore disponibilità di FA rispetto alle cellule non tumorigeniche.

8. Effetto della deplezione del folato sullo stato di ossidazione del glutatione.

I livelli di glutatione ridotto (GSH) sono stati determinati per avere un'indicazione della risposta delle cellule allo stress ossidativo. La concentrazione di questa molecola è stata determinata in condizioni di deplezione di folato e in condizioni di folato standard.

Il glutatione è una molecola che in condizioni normali si trova nello stato ridotto e viene ossidata in risposta all'accumulo di ROS. Il suo ruolo principale è quello di contrastare lo stress ossidativo e l'accumulo di ROS.

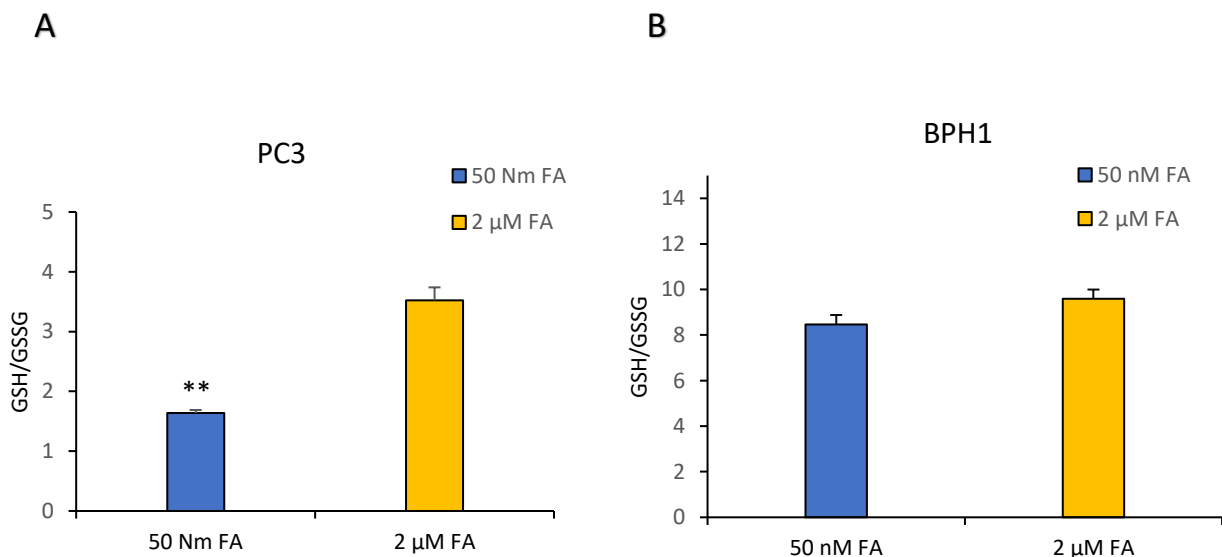


Figura 23. Effetto della deplezione dei folati sullo stato di ossidazione del glutatione. Le figure 23 A e 23 B rappresentano rispettivamente, l'effetto della deplezione dei folati sullo stato di ossidazione del glutatione in cellule PC3 e BPH1 cresciute in mezzo depleto di folato (barra blu) e mezzo con una concentrazione di folato standard (barra gialla). Lo stato di ossidazione del glutatione è determinato dal rapporto tra GSH e GSSG. Le barre d'errore rappresentano la deviazione standard di tre determinazioni indipendenti. (t test, ** $p < 0.01$)

Nella figura 23 A e B è mostrato il rapporto tra il glutatione in forma ridotta (GSH) e il glutatione ossidato (GSSG) nelle cellule PC3 (A) e nelle cellule BPH1 (B). In entrambe le linee cellulari il GSH diminuisce in risposta alla deplezione di folati (barra blu) che è associata all'accumulo di ROS come precedentemente dimostrato.

L'ossidazione del GSH è uno dei principali meccanismi che le cellule utilizzano per difendersi dall'accumulo di ROS che possono essere dannosi per la cellula. Nelle cellule PC3 l'analisi dei livelli di glutatione ha evidenziato una riduzione significativa (t test, ** $p < 0,01$) del GSH rispetto a quello ossidato che può essere dovuta alla risposta cellulare all'accumulo di ROS maggiore in condizioni di deplezione di folato rispetto alla condizione di folato standard. Nelle cellule BPH1, invece, non abbiamo una variazione significativa dei livelli del glutatione ridotto che potrebbe essere giustificato dal fatto che in queste cellule cresciute con 50 nM acido folico si verifica un minore accumulo dei ROS che quindi può essere gestito dalla cellula senza l'induzione del glutatione. Possiamo quindi dire che le cellule PC3 quando sono sottoposte ad una deplezione di folato vanno incontro ad un maggiore stress ossidativo che porta la cellula ad aumentare i livelli di GSH per difendersi da questa condizione.

9. Effetto della deplezione di folati e del trattamento con il DENSp_m sulla proliferazione cellulare.

Le linee cellulari PC3 e BPH1 cresciute in condizioni di folato limitante (50 nM FA) ed in condizione di folato standard (2 μ M FA), raggiunte le 6 PDL, sono state trattate con il DENSp_m, un analogo delle poliammine che è noto in letteratura come induttore dell'enzima SSAT.⁸⁹

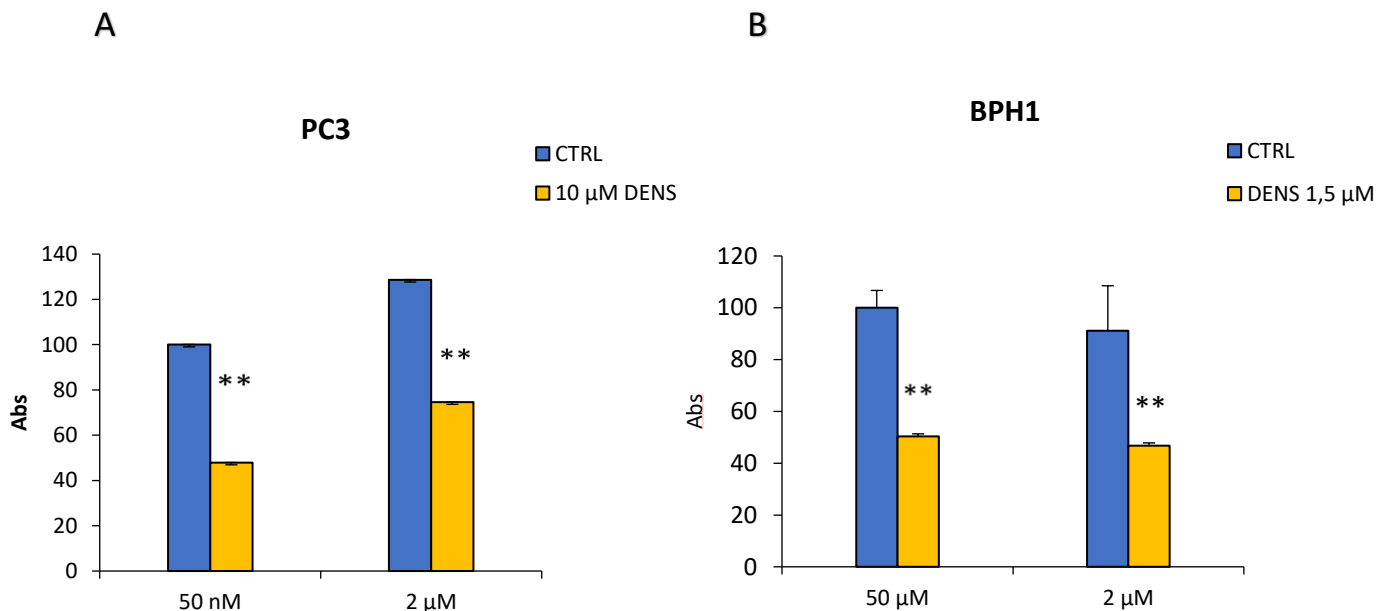


Figura 24. Effetto del trattamento con il DENSp_m in aggiunta alla deplezione dei folati sulla proliferazione cellulare. Le cellule PC3 (figura 24 A) e le cellule BPH1 (figura 24 B) fatte crescere in terreno RPMI in condizione di deplezione di folato (50 nM) e in condizione standard di folato (2 μ M) fino al raggiungimento delle 6 PDL sono state trattate con il DENSp_m per 72h ad una concentrazione 10 μ M per le PC3 e una concentrazione 1,5 μ M per le BPH1. I grafici mostrano l'effetto del trattamento con il DENSp_m in aggiunta alla deplezione dei folati sulla proliferazione cellulare ottenuta mediante colorazione delle cellule con cristal violetto. Le barre di errore mostrano la deviazione standard di due determinazioni indipendenti (t test, ** p<0.01).

Entrambe le linee cellulari sono state trattate con concentrazioni crescenti di DENSp_m per 72 h al fine di determinare la IC₅₀ che provoca una riduzione dell'attività proliferativa delle cellule del 50% circa. Per le cellule PC3 l'IC₅₀ è stato calcolato in 10 μ M DENSp_m, mentre per le cellule BPH1 l'IC₅₀ è di 1,5 μ M (dati non mostrati).

Questi valori sono in accordo con i dati pubblicati in letteratura in cui la dose utilizzata negli studi di Akyol et al.⁹⁰ in cui è stata utilizzato il DENSp_m a concentrazione 20 μ M su linee cellulari MCF-7.

In figura 24 è mostrata la proliferazione cellulare delle cellule PC3 (A) e BPH1 (B) dopo 72h di crescita in un mezzo contenente 50 nM di acido folico o 2 μ M di acido folico in assenza o in presenza dell'analogo delle poliammine. La proliferazione è valutata attraverso l'aumento dell'assorbanza del cristal violetto con il quale sono state colorate le cellule in seguito al trattamento con il DENSpm.

Nelle cellule PC3 (A) possiamo vedere come la condizione di deplezione di folato determina una maggiore sensibilità delle cellule al trattamento con il DENSpm. Il tasso di proliferazione, infatti, è maggiormente ridotto nelle cellule in condizioni di deplezione di folato (50 nM FA), mentre nella condizione di folato standard (2 μ M FA) abbiamo una riduzione di circa il 40% dopo trattamento con DENSpm.

Le cellule BPH1, invece, risultano maggiormente sensibili al trattamento con il DENSpm indipendentemente dalla concentrazione di folato nel mezzo di coltura. Il trattamento con 1,5 μ M di DENSpm effettuato per 72h dopo che le cellule sono state fatte crescere in condizioni di folato standard (2 μ M FA) e in condizioni di folato limitante (50 nM FA) determina una riduzione significativa (t test, ** $p < 0,01$) della proliferazione cellulare di circa il 50% in entrambe le condizioni (B).

Questi dati risultano in accordo con i dati di Tracy et al. che hanno dimostrato come le cellule metastatiche MDA-MB-231 rispondessero meglio al trattamento con il BENSpm (un analogo delle poliammine con una struttura simile al DENSpm) rispetto alle cellule non tumorigeniche MCF7-10 A e con il lavoro di McCloskey et al in cui sono stati effettuati trattamenti con CPENSpm su linee cellulari prostatiche PC3, DU145 e LNCAP ed è stato visto che le cellule DU145 hanno una maggiore sensibilità al trattamento con l'analogo poliamminico. ^{91,92}

10. Effetto della deplezione dei folati e del trattamento con il DENSp_m sulla vitalità cellulare.

Per valutare se l'effetto del DENSp_m nelle condizioni utilizzate per le due linee cellulari prostatiche sia citostatico o citotossico, abbiamo innanzitutto determinato la vitalità cellulare attraverso un saggio basato sulla quantificazione dell'ATP intracellulare presente.

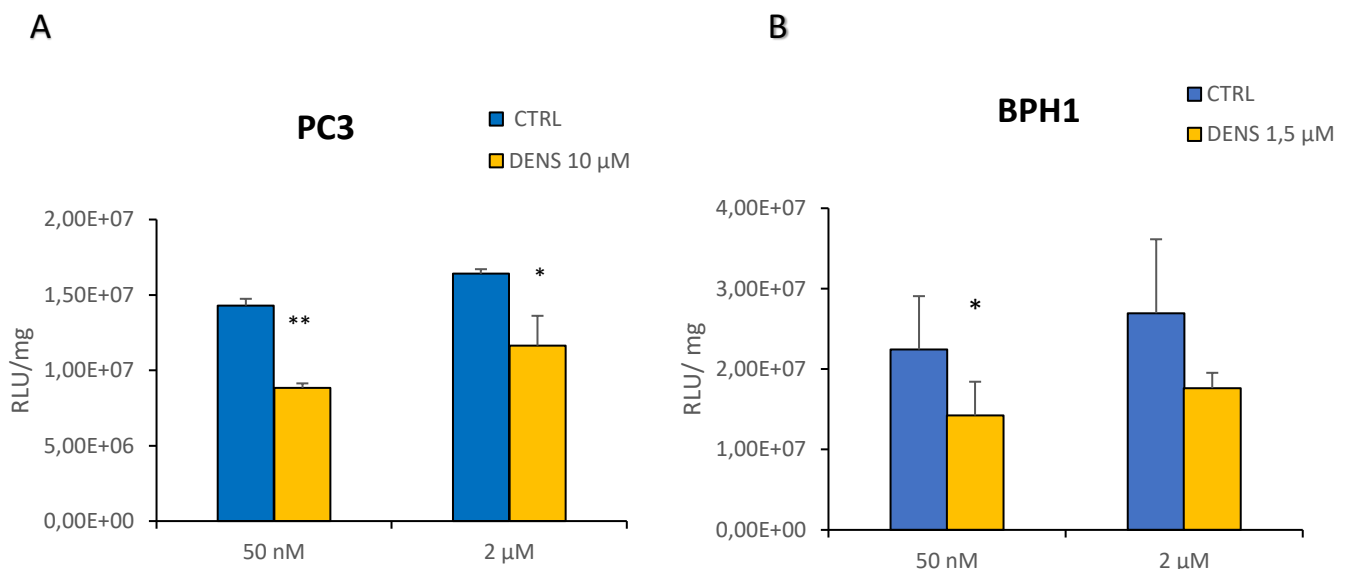


Figura 25. Effetto del trattamento con il DENSp_m in aggiunta alla deplezione dei folati sulla vitalità cellulare. Le cellule PC3 (figura 25 A) e le cellule BPH1 (figura 25 B) fatte crescere in terreno RPMI in condizione di deplezione di folato (50 nM) e in condizione standard di folato (2 μM) fino al raggiungimento delle 6 PDL sono state trattate con il DENSp_m per 72h ad una concentrazione 10 μM per le PC3 e una concentrazione 1,5 μM per le BPH1. I grafici mostrano l'effetto del trattamento con il DENSp_m in aggiunta alla deplezione dei folati sulla vitalità cellulare ottenuta mediante saggio in luminescenza CellTiter Glo cell viability assay. Le barre di errore mostrano la deviazione standard di due determinazioni indipendenti (t test, * p<0.05; ** p<0.01).

Le linee cellulari PC3 e BPH1 cresciute in condizioni di folato standard e in condizioni limitanti di folato sono state trattate con il DENSp_m ad una concentrazione pari a 10 μM (per le cellule PC3) e 1,5 μM (per le cellule BPH1). Abbiamo valutato il contenuto di ATP intracellulare utilizzando il saggio CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability (Promega) per avere un indice della attività metabolica cellulare. Nei grafici di figura 25 la quantità di ATP è riportata come luminescenza normalizzata per mg di proteine.

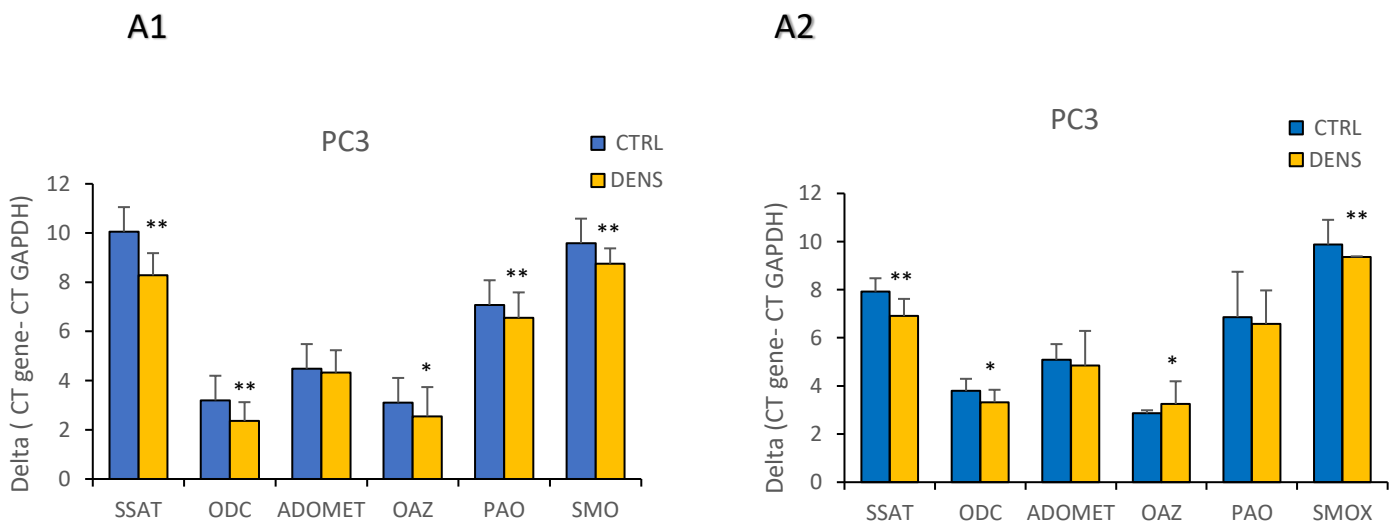
Nelle cellule PC3 (A) abbiamo una significativa (t test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) riduzione della vitalità cellulare quando le cellule sono trattate con il DENSpm. Nelle cellule BPH1 (B) abbiamo una riduzione della vitalità cellulare (circa il 40%) significativa soltanto nella condizione di folato limitante (50 nM FA).

La condizione di deplezione di folato (50 nM FA), in entrambe le linee cellulari, provoca una maggiore sensibilità delle cellule al trattamento con il DENSpm.

Come abbiamo visto la deplezione di folato provoca un blocco del ciclo cellulare con conseguente arresto della proliferazione. Il trattamento con il DENSpm, invece, sembra provocare anche una riduzione della vitalità oltre che della proliferazione cellulare.

11. Effetto del trattamento con il DENSp_m e della deplezione dei folati sui geni del metabolismo delle poliammine.

Abbiamo valutato se l'effetto del DENSp_m fosse dovuto ad una alterazione dell'espressione genica di enzimi coinvolti nel metabolismo delle poliammine attraverso l'analisi dei livelli di trascrizione dei geni *oaz*, *samdc*, *odc*, *ssat*, *apao* e *smo* nelle cellule cresciute in condizioni di folato limitante e in presenza di DENSp_m. I livelli di espressione dei geni sono stati valutati mediante RT-qPCR e in figura 26 sono riportati per ogni gene il confronto tra il valore di ΔCt (Ct gene in esame – Ct GAPDH) ottenuto nella condizione di folato limitante (barra blu) e nella condizione standard di folato (barra gialla). Dal momento che il Ct indica il numero di cicli di amplificazione necessari per raggiungere la fluorescenza soglia, il valore di Ct è inversamente proporzionale alla quantità di trascritto.



B1

B2

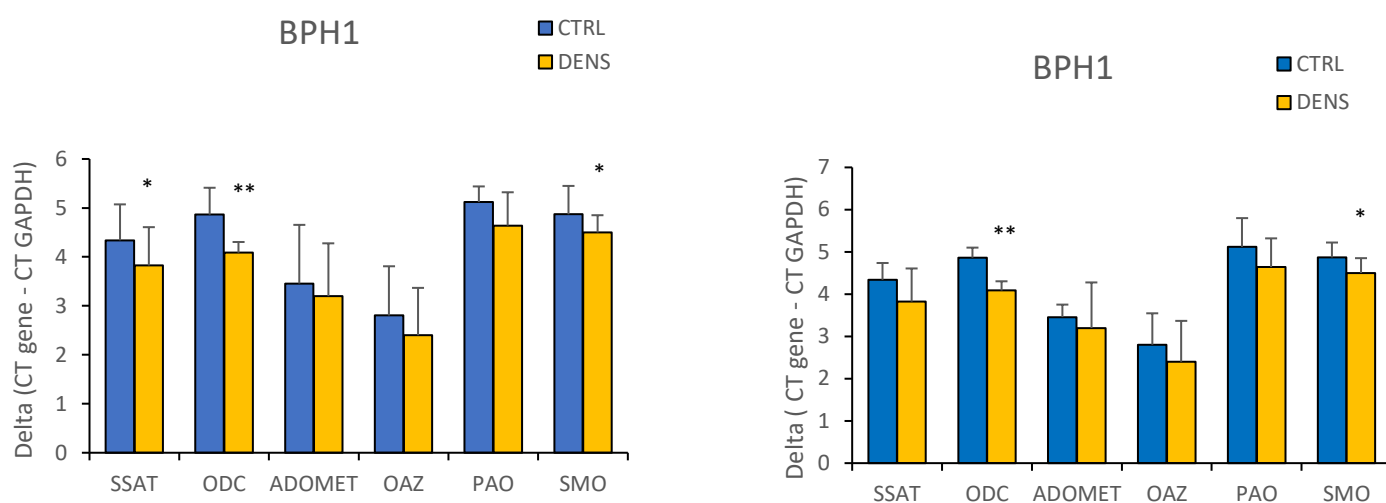


Figura 26. Effetto del trattamento con il DENSpm in aggiunta alla deplezione dei folati sui livelli di espressione dei geni del metabolismo delle poliammine. Nelle cellule PC3 (A1 e A2) e BPH1 (B1 e B2), cresciute in mezzo contenente 50 nM FA (A1 e B1) e 2 μM FA (A2 e B2), sono stati determinati i livelli di trascrizione dei geni del metabolismo delle PA mediante REAL-TIME PCR. Per ciascun campione, il ciclo soglia (Ct) relativo al gene d'interesse è stato normalizzato sottraendo il Ct del gene di riferimento (GAPDH) secondo la seguente formula: $\Delta Ct = Ct(\text{gene target}) - Ct(\text{gene di riferimento})$. Il valore di Ct è inversamente proporzionale alla quantità di trascritto. Le barre d'errore rappresentano la deviazione standard di tre determinazioni indipendenti. (t test, * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$).

Il grafico A1 mostra l'effetto del trattamento con il DENSpm quando le cellule PC3 sono cresciute in condizione di folato limitante (50 nM FA). Possiamo vedere che c'è un significativo (t test, ** $p < 0.01$) incremento dell'espressione del gene *ssat* quando le cellule sono trattate con il DENSpm (barra gialla). Il livello di espressione del gene *ssat* aumenta di circa sei volte rispetto al controllo (barra blu). Abbiamo, inoltre, un significativo aumento (t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) dei livelli di espressione dei geni *pao* e *smo* che sono anche essi geni del catabolismo delle poliammine. Inoltre, il gene *odc* aumenta di due volte nelle cellule PC3 trattate con 10 μM DENSpm e cresciute in una condizione limitante di folato (A1 barra gialla) e si nota anche un lieve, ma significativo (t test, * $p < 0.05$) aumento del gene *oaz*.

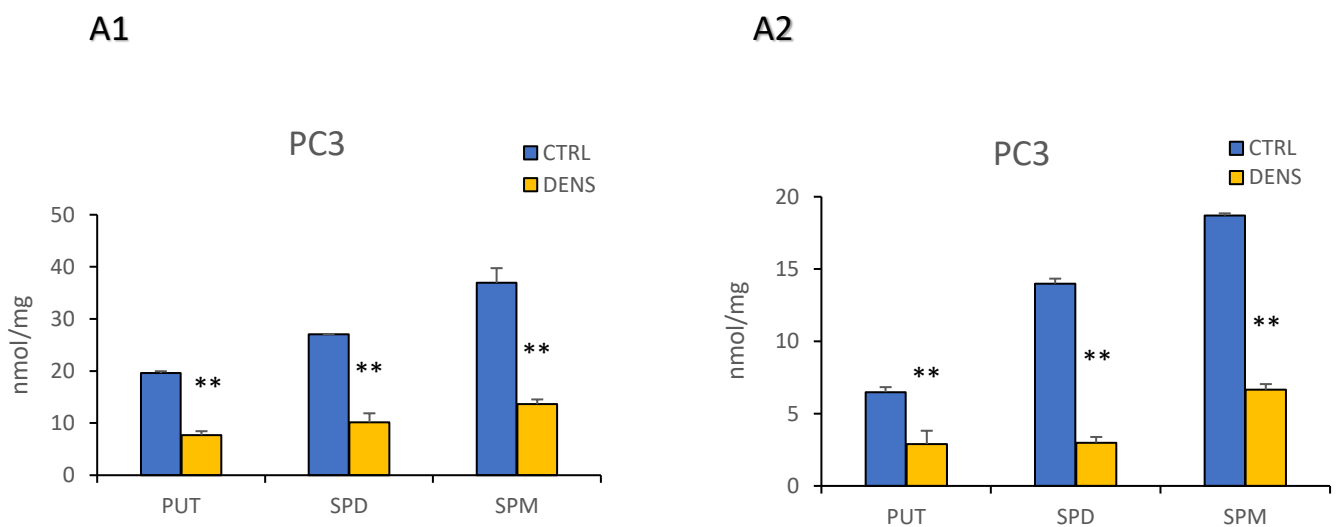
Nella condizione di folato standard (A2), invece, possiamo notare un aumento dei livelli di espressione del gene *ssat* che quando trattato con il DENSpm (barra gialla) aumenta significativamente (t test, ** $p < 0.01$) di circa due volte rispetto alla condizione di controllo (barra blu). Abbiamo anche un lieve incremento dei livelli di espressione del gene *odc* e dei geni *pao* e *smo*.

Questo dato conferma il fatto che le cellule PC3 cresciute in condizioni di deplezione di folato sembrano essere molto più sensibili al trattamento con il DENSpm rispetto alle cellule cresciute in condizioni di folato standard (2 μ M FA). Si può ipotizzare che l'aumento dell'escrezione delle poliammine, determinato soprattutto dall'azione dell'enzima SSAT i cui livelli sono aumentati dalla presenza di DENSpm, porta la cellula ad aumentare l'espressione dei geni biosintetici delle poliammine, come tentativo per contrastare la perdita di questi policationi. L'aumento però rimane molto limitato in confronto ai livelli di espressione raggiunti dagli enzimi catabolici.

Nelle cellule BPH1 (B1) cresciute in condizioni di folato limitante (50 nM FA), invece, abbiamo un incremento significativo (t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) dei livelli di espressione dei geni *ssat*, *odc* e *smo*. In risposta al trattamento con il DENSpm e alla deplezione dei folati, nelle cellule BPH1 possiamo notare che i livelli di espressione dei geni della biosintesi delle poliammine sono molto più elevati rispetto ai geni legati al catabolismo delle poliammine. Bisogna ricordare che le poliammine sono anche dei regolatori dell'attività trascrizionale e inducono l'espressione sia del gene *odc* che del gene *ssat*. Nelle cellule BPH1 l'attivazione dell'enzima SSAT induce un aumento della biosintesi delle poliammine che molto probabilmente ha come scopo quello di ripristinare l'omeostasi cellulare. Nella condizione di folato standard (B2) abbiamo un significativo aumento dei livelli di espressione dei geni *ssat*, *odc* e *smo*. Il DENSpm provoca un lieve incremento dei livelli di espressione del gene *ssat* e dei geni del catabolismo delle poliammine e un maggiore aumento dei livelli di espressione del gene *odc*, la cui espressione risulta essere aumentata di circa tre volte rispetto al controllo.

12. Effetto della deplezione del folato e del trattamento con il DENSp_m sui livelli di poliammine intracellulari.

In figura 27 viene mostrato l'effetto della deplezione dei folati in aggiunta al trattamento con il DENSp_m sui livelli di poliammine intracellulari in cellule PC3 (A1 e A2) e BPH1 (B1 e B2).



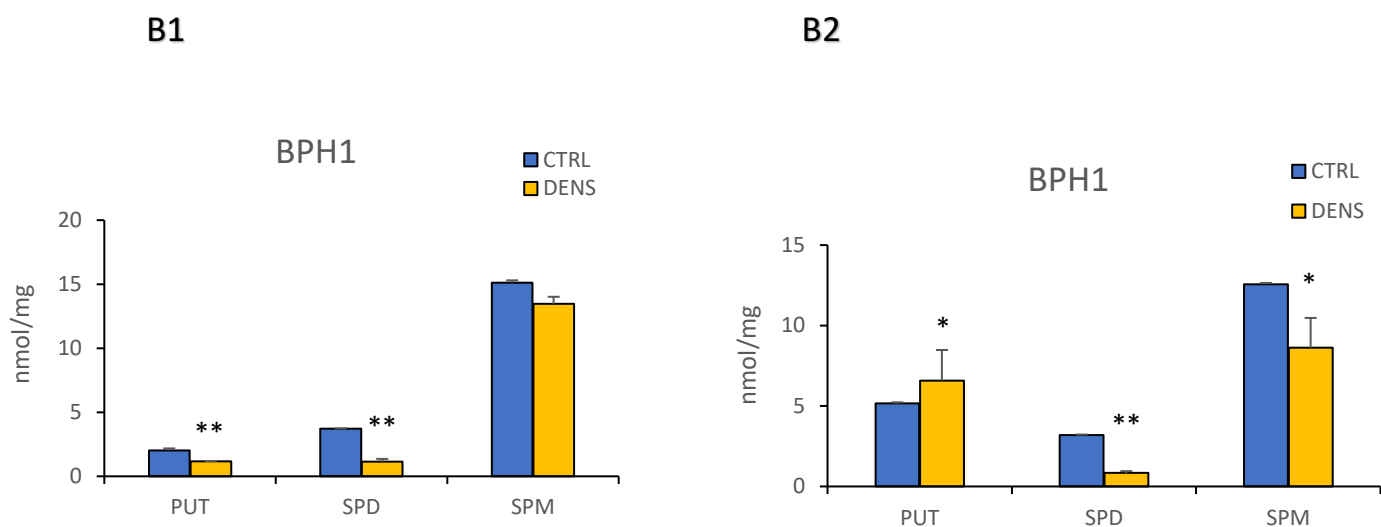


Figura 27. Effetto del trattamento con il DENSpm in aggiunta alla deplezione dei folati sui livelli di poliammine intracellulari. Le figure A e B mostrano l'effetto del trattamento con il DENSpm in aggiunta alla deplezione dei folati su cellule PC3 e BPH1. Le cellule sono state fatte crescere in un terreno RPMi 50 nM di acido folico (A1 e B1) e in un terreno RPMi con concentrazione standard di acido folico (A2 e B2) e trattate con il DENSpm per 72h dopo il raggiungimento delle 6 PDL. Le barre mostrano i livelli di poliammine intracellulari ottenuti mediante analisi HPLC. Le barre di errore indicano la deviazione standard calcolata su tre determinazioni indipendenti (t test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

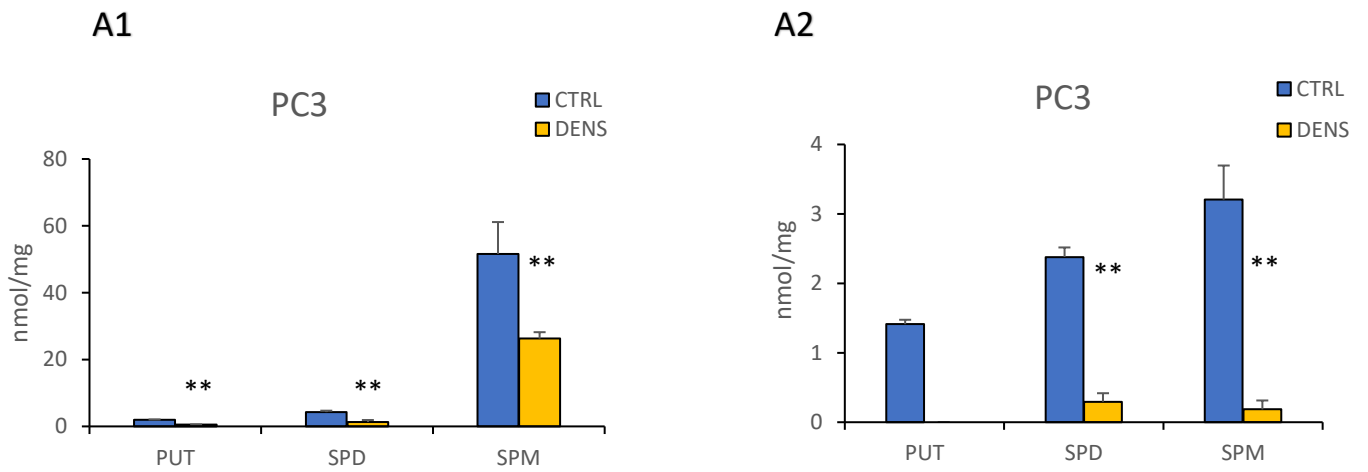
Le cellule PC3 sono state fatte crescere in una condizione di folato limitante (50 nM FA) e in una condizione di folato standard (2 μ M FA) fino al raggiungimento delle 6 PDL e trattate successivamente con una concentrazione 10 μ M di DENSpm. Tramite analisi HPLC è stata calcolata la quantità di poliammine intracellulari presenti dopo trattamento con il DENSpm alle diverse concentrazioni di folato. In entrambe le condizioni di crescita (A1 e A2) possiamo notare che il trattamento con il DENSpm provoca un importante e significativo (t test, ** $p < 0.01$) decremento dei livelli di poliammine. Da notare che nelle cellule PC3, la condizione di folato limitante, provoca un ulteriore aumento della sensibilità all'effetto del DENSpm. Come possiamo vedere in A1 abbiamo un notevole decremento dei livelli di spermina e spermidina intracellulari quando le cellule sono trattate con il DENSpm. Infatti, i livelli di espressione del gene *ssat* e dei geni implicati nel catabolismo delle poliammine, come *smo* e *pao*, risultano essere notevolmente incrementati. Le poliammine, quindi, vengono escrete e diminuisce la loro concentrazione intracellulare. Confrontando questi dati con quelli ottenuti facendo crescere le cellule in condizioni di folato standard possiamo vedere che la deplezione di folato aumenta l'effetto del DENSpm nelle cellule tumorali (PC3).

Nelle cellule BPH1 il trattamento con DENSpm provoca un decremento significativo dei livelli di spermina e spermidina, sia nella condizione di folato limitante (B1) sia nella condizione di folato standard (B2). In queste cellule, inoltre, abbiamo anche una lieve, ma significativa (t test, * $p < 0.05$) diminuzione dei livelli di putrescina nelle cellule cresciute in condizioni di deplezione di folato (B1), mentre un significativo aumento (t test, ** $p < 0.01$) dei livelli di putrescina nelle cellule cresciute in condizioni di folato standard (B2).

In queste cellule, l'aumento dell'espressione dell'enzima SSAT indotta dal DENSpm provoca un aumento dei livelli di espressione del gene *odc* (come abbiamo visto nel paragrafo precedente). Ciò potrebbe giustificare un aumento dei livelli di putrescina nella condizione di crescita di folato standard.

13. Effetto della deplezione del folato e del trattamento con il DENSpm sui livelli di poliammine extracellulari.

I grafici in Figura 28 mostrano l'effetto del trattamento con il DENSpm in aggiunta alla deplezione dei folati sulla produzione di poliammine extracellulari.



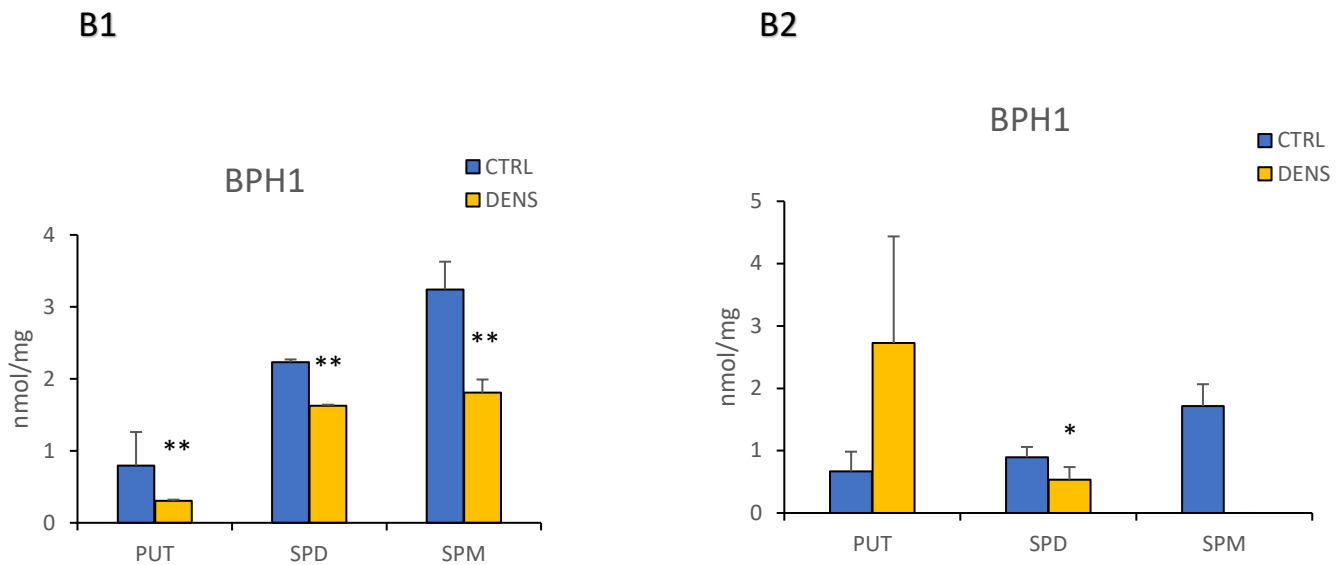


Figura 28. Effetto del trattamento con il DENSpm in aggiunta alla deplezione dei folati sui livelli di poliammine extra cellulari. Le fig. 28 A e 28 B mostrano l'effetto del trattamento con il DENSpm in aggiunta alla deplezione dei folati su cellule PC3 e BPH1. Le cellule sono state fatte crescere in un terreno RPMI 50 nM di acido folico (A1 e B1) e in un terreno RPMi con concentrazione standard di acido folico (A2 e B2) e trattate con il DENSpm per 72h dopo il raggiungimento delle 6 PDL. Le barre mostrano i livelli di poliammine extra cellulari ottenuti mediante analisi HPLC. Le barre di errore indicano la deviazione standard calcolata su tre determinazioni indipendenti (t test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Le cellule PC3 (A) e le cellule BPH1 (B) sono state fatte crescere in una condizione di deplezione di folato (50 nM FA) e in una condizione di folato standard (2 μ M FA) fino al raggiungimento delle 6 PDL e trattate successivamente con il DENSpm ad una concentrazione di 10 μ M per la linea cellulare PC3 e 1,5 μ M per la linea cellulare BPH1.

Il trattamento con il DENSpm provoca in entrambe le linee cellulari un decremento significativo (t test, $p < 0.01$) dei livelli di poliammine extracellulari.

Nelle cellule PC3 possiamo vedere come il DENSpm abbia un effetto maggiore sulle cellule fatte crescere in una condizione di folato limitante (A1). In questo caso, infatti, abbiamo una riduzione significativa (t test, ** $p < 0.01$) dei livelli delle poliammine di circa il 40%.

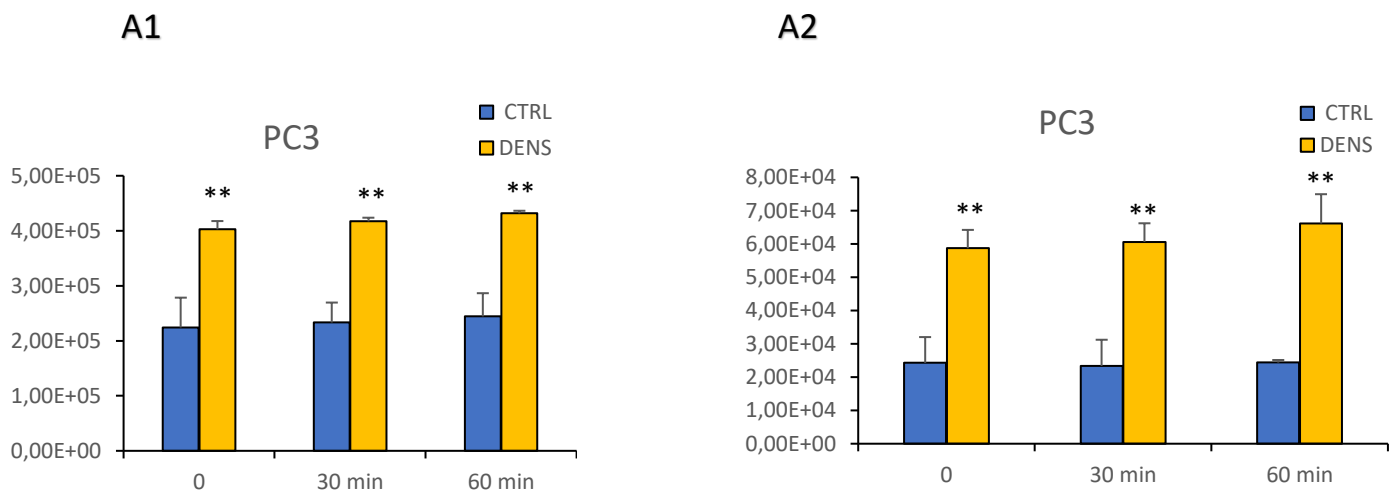
Nelle cellule BPH1, invece, abbiamo una riduzione significativa (t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) dei livelli di poliammine extracellulari in cellule cresciute in condizioni di deplezione di folato. Nelle cellule BPH1 fatte crescere in condizione di folato standard (B2) abbiamo un aumento non significativo dei livelli di putrescina. Questo dato è giustificato da un aumento dei livelli di espressione del gene *odc* nelle cellule BPH1 cresciute in condizione di folato standard e trattate con 1,5 μ M di DENSpm. Il

gene *odc*, infatti, codifica per l'enzima ornitina decarbossilasi che catalizza la reazione di decarbossilazione dell'ornitina che porta alla sintesi della putrescina.

I dati risultano essere in accordo con Vargiu et al ⁹³ che hanno mostrato come il trattamento con agmatina, un intermedio della biosintesi delle poliammine, provocasse un aumento dei livelli di espressione dell'SSAT che determina una diminuzione dei livelli di spermina e spermidina e un conseguente aumento dei livelli di putrescina che potrebbe regolare l'espressione del gene *odc* e del gene *adomet*.

14. Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSpm sulla produzione dei ROS.

Per valutare lo stato di stress ossidativo delle cellule PC3 e BPH1 abbiamo analizzato la produzione di ROS a seguito del trattamento con DENSpm nelle due condizioni di crescita, standard o depleta, di FA. Le cellule sono state cresciute in condizione di deplezione di folato e in condizione standard di folato fino al raggiungimento delle 6 PDL e successivamente trattate con il DENSpm ad una concentrazione di 10 μM (per le cellule PC3) e 1,5 μM (per le cellule BPH1) per 72h. I ROS sono stati determinati mediante misurazione della luminescenza della DFDCA.



B1

B2

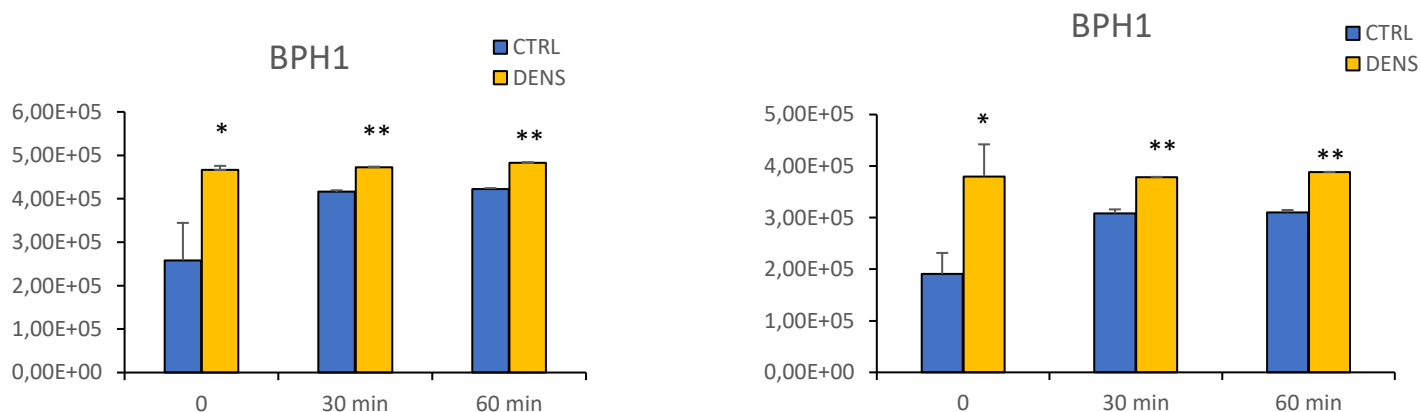


Figura 29. Effetto del trattamento con il DENSpm in aggiunta alla deplezione dei folati sulla produzione di ROS. Nelle cellule PC3 (A1 e A2) e BPH1 (B1 e B2) cresciute in mezzo contenente 50 nM FA (A1 e B1) e 2 μ M FA (A2 e B2) e trattate con il DENSpm per 72h sono stati determinati i livelli di ROS, rappresentati come fluorescenza a 535 nm della DCFDA ai tempi 0, 30 e 60 min. Le barre d'errore rappresentano la deviazione standard di tre determinazioni indipendenti. (t test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

In entrambe le linee cellulari (Figura 29 A e B) abbiamo un significativo aumento (t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) della produzione di ROS. Le cellule PC3 cresciute in condizione di folato limitante e in condizione di folato standard trattate con il DENSpm (A1 e A2, barra gialla) risentono maggiormente del trattamento con il DENSpm rispetto alle cellule BPH1, in cui abbiamo un aumento significativo (t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) del livello dei ROS, ma minore rispetto alle cellule PC3.

Nelle cellule PC3 possiamo vedere come il DENSpm provochi un maggiore aumento del livello dei ROS già esacerbato dalla condizione di folato limitante.

15. Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSp_m sull'ossidazione del glutatione.

Abbiamo quindi determinato la condizione di stress ossidativo nelle cellule trattate con DENSp_m misurando il glutatione ridotto rapportato al glutatione totale come indice dello stato di stress a cui è sottoposta la cellula. Questa determinazione è stata condotta in cellule cresciute in condizioni di folato standard o folato limitante in presenza o meno del DENSp_m.

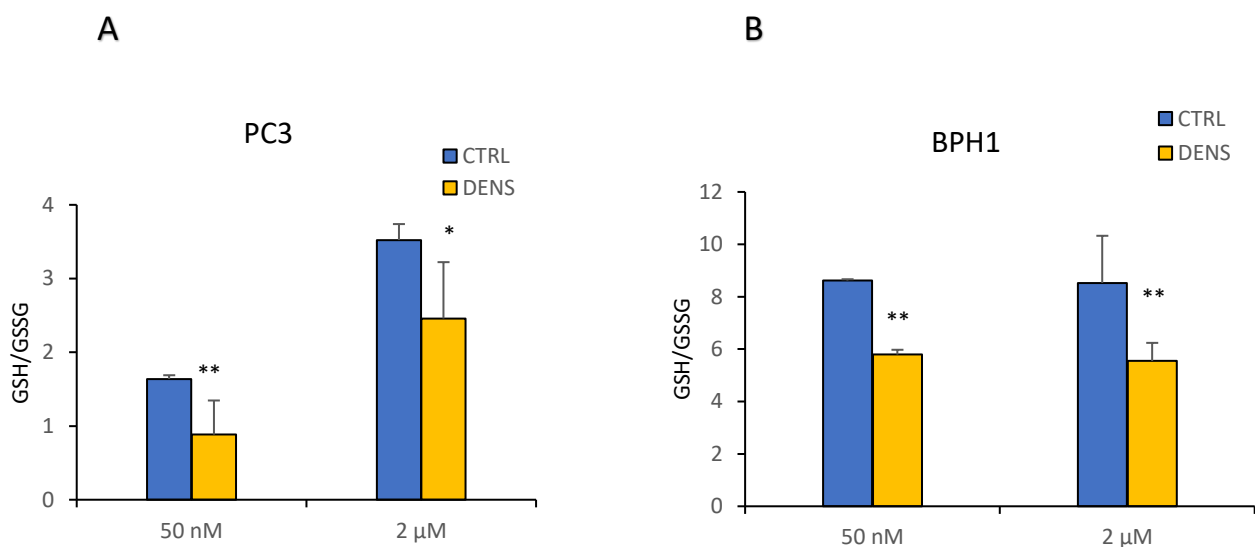


Figura 30. Effetto del trattamento con il DENSp_m in aggiunta alla deplezione dei folati sullo stato di ossidazione del glutatione. Le cellule PC3 (figura 30 A) e BPH1 (figura 30 B) sono state fatte crescere in condizioni di deplezione di folato (50 nM) e in condizioni standard di folato (2 μM) fino al raggiungimento delle 6 PDL e trattate con il DENSp_m per 72h. Le barre mostrano il rapporto tra il GSH e GSSG. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard calcolata su tre determinazioni indipendenti (t test, * p<0.05; ** p<0.01).

I grafici di Figura 30 A e B mostrano l'effetto della deplezione di folato in aggiunta al trattamento con il DENSp_m sullo stato di ossidazione del glutatione rispettivamente nelle cellule PC3 e BPH1.

In entrambe le linee cellulari possiamo vedere che il trattamento con il DENSp_m (barra gialla) in aggiunta alla deplezione di folato (50 nM FA) provoca un significativo (t test, * p<0,05, ** p<0.01) aumento dello stress ossidativo. Le cellule PC3 (A) sembrano essere maggiormente sensibili

all'effetto del DENSpm quando si trovano in una condizione di deplezione di folato rispetto ad una condizione di folato standard.

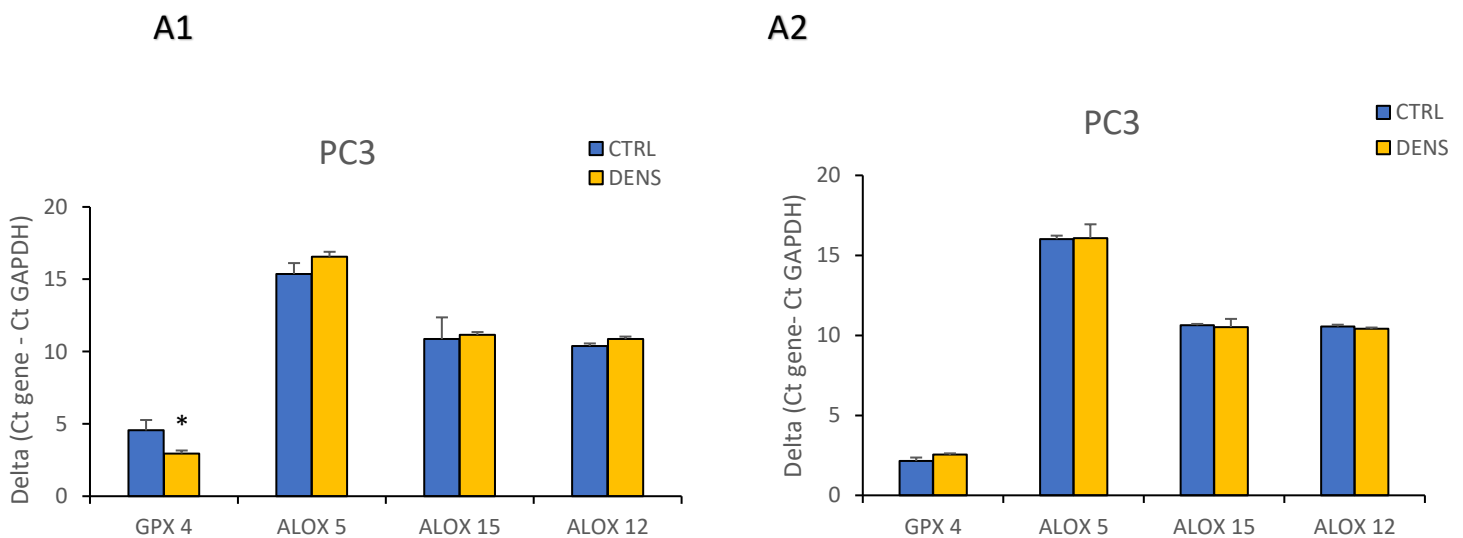
L'aumento del glutathione ridotto rispetto al glutathione totale, nelle cellule BPH1 (B), sembrerebbe essere influenzato esclusivamente dal trattamento con il DENSpm dato che le cellule rispondono nella stessa maniera sia con 50 nM acido folico che con la concentrazione più elevata della vitamina.

Le cellule rispondono alla condizione di stress ossidativo utilizzando il glutathione come protezione e per questo motivo il rapporto tra la forma ridotta e la forma ossidata di questa molecola diminuisce dove le condizioni di stress ossidativo sono esacerbate.

16. Effetto della deplezione di folato e del trattamento con il DENSp_m sui livelli di espressione dei geni coinvolti nel meccanismo di attivazione della ferroptosi.

Alcuni studi hanno dimostrato che la ferroptosi è associata alla patogenesi del tumore della prostata e che alcune piccole molecole sono capaci di indurre la ferroptosi nelle cellule tumorali prostatiche.⁹⁴ Questo processo è caratterizzato da un aumento dei livelli dei ROS all'interno della cellula derivati dal metabolismo del ferro e ad un accumulo dei prodotti di perossidazione lipidica, l'inibizione del canale cisteina/glutammato ed una riduzione dell'attività dell'enzima glutatione perossidasi 4 che limita la produzione di ROS.⁶⁸⁻⁷⁰

Per valutare la ferroptosi nel nostro modello sperimentale abbiamo verificato un'eventuale variazione nei livelli di espressione dei geni coinvolti nei meccanismi di attivazione di questo fenomeno.



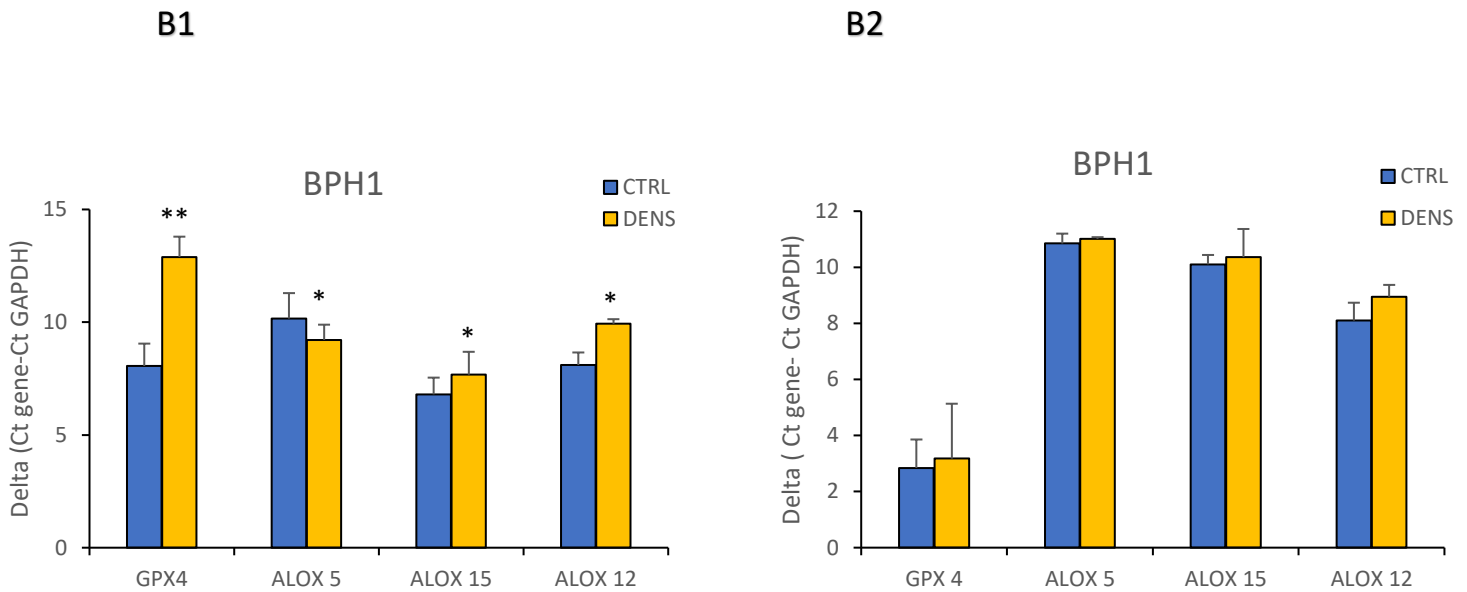


Figura 31. Effetto del trattamento con il DENSpm in aggiunta alla deplezione dei folati sui geni coinvolti nel meccanismo di attivazione della ferroptosi. Le cellule PC3 e BPH1 (A e B) sono state fatte crescere in un terreno RPMI 50 nM di acido folico (A1 e B1) e in un terreno RPMI 2 μ M di acido folico (A2 e B2) fino al raggiungimento delle 6 PDL e successivamente sono state trattate con una concentrazione di DENSpm pari a 10 μ M (per le PC3) e 1,5 μ M (per le BPH1) per 72 h. I grafici mostrano l'effetto del trattamento con il DENSpm in aggiunta alla deplezione dei folati sui livelli di espressione dei geni coinvolti nel meccanismo di attivazione della ferroptosi. Per ciascun campione, il ciclo soglia (Ct) relativo al gene d'interesse è stato normalizzato sottraendo il Ct del gene di riferimento (GAPDH) secondo la seguente formula: $\Delta Ct = Ct(\text{gene target}) - Ct(\text{gene di riferimento})$. Il valore di Ct è inversamente proporzionale alla quantità di trascritto. Le barre d'errore rappresentano la deviazione standard di tre determinazioni indipendenti. (t test, * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$)

In particolare, l'attivazione di questa via di morte programmata provoca generalmente un decremento dei livelli di espressione del gene *gpx4* ed un aumento dei livelli di espressione del gene *alox15*⁸⁶. Da notare che i geni *alox15*, *alox12* e *alox5* codificano per delle lipossigenasi che risultano sotto espressi in molti tipi di cancro. Un aumento dei livelli di espressione di questi geni è indicativo dell'attivazione della ferroptosi.

Nei grafici di Figura 31 A e B sono mostrati i ΔCt dei geni *alox5*, *alox15*, *alox12* e *gpx4* in cellule PC3 e BPH1 cresciute in condizioni di deplezione di folato (A1, B1) e in condizioni di folato standard (A2, B2). Si può vedere come nelle cellule PC3 cresciute in condizione di folato limitante (A1) ci sia un significativo (t test, * $p < 0.05$) aumento dei livelli di espressione del gene *gpx4* quando le cellule sono

trattate con il DENSpm. Il gene *gpx4* codifica per l'enzima glutatione perossidasi che ha un ruolo nell'attivazione della ferroptosi. L'inibizione di questo enzima provoca la morte cellulare per via ferroptotica. L'aumento dei livelli di espressione di *gpx4* è dovuto ad un aumento dello stress ossidativo a cui sono sottoposte le cellule. Anche nella condizione di folato standard (A2) si nota una piccola diminuzione dei livelli di espressione del gene *gpx4* che non risulta statisticamente significativa.

Non c'è, invece, nessun cambiamento nei livelli di espressione degli altri geni, per cui possiamo escludere una attivazione della ferroptosi.

Nelle cellule BPH1 cresciute in una condizione di folato limitante e trattate con 1,5 μ M di DENSpm per 72h (B1) abbiamo una significativa (t test, ** $p < 0.01$) riduzione dei livelli di espressione del gene *gpx4* ed una piccola ma significativa (t test, * $p < 0.05$) riduzione dei livelli di espressione dei geni *alox15* e *alox12*, mentre abbiamo un aumento significativo (t test, * $p < 0.05$) dei livelli di espressione del gene *alox5*. La riduzione dei livelli di espressione del gene *gpx4* indica che le cellule si trovano in un forte stato di stress ossidativo. Di converso, nella condizione di folato standard (B2) abbiamo una tendenza non significativa al decremento dei livelli di espressione del gene *gpx4*.

Conclusioni

Conclusioni

Durante questo progetto di dottorato abbiamo valutato l'effetto della deplezione dei folati sulla proliferazione cellulare e sul metabolismo delle poliammine in linee cellulari prostatiche umane PC3 (tumorigeniche) e BPH1 (benigne immortalizzate). I risultati ottenuti mostrano che la deplezione di folato causa una significativa riduzione della proliferazione cellulare e una riduzione della capacità di formare colonie che risulta essere più accentuata nelle cellule tumorigeniche rispetto alle cellule benigne.

In seguito, abbiamo caratterizzato i livelli di poliammine in cellule cresciute in condizioni di deplezione di folato e in condizioni di folato standard. I nostri dati mostrano che in entrambe le linee cellulari studiate si riscontra un paradossale aumento dei livelli di poliammine intra ed extra cellulari quando le cellule sono cresciute in restrizione di folato. La sintesi delle poliammine sembra essere una priorità per la sopravvivenza delle cellule prostatiche e questo le rende ancora più dipendenti dalla presenza di folato nel mezzo. In particolar modo le cellule tumorali sono caratterizzate da un flusso delle unità monocarboniose fornite dai folati verso la produzione di SAM (S-adenosilmetionina), che rappresenta il donatore del gruppo metile nella via biosintetica delle poliammine. Nelle PC3 abbiamo trovato un aumento del rapporto SAM/SAH (S-adenosilomocisteina) quando le cellule sono fatte crescere a concentrazioni limitanti di folato (dati non mostrati).

I nostri dati suggeriscono che la via biosintetica delle poliammine risulta essere maggiormente attiva anche in carenza dei propri specifici precursori. L'aumento delle poliammine può essere in parte dovuto ad una riduzione dei livelli di espressione e dell'attività enzimatica di SSAT che è implicato nel catabolismo delle poliammine. Nelle cellule BPH1 la diminuzione dei livelli di espressione del gene *ssat* non è correlata ad una riduzione dell'attività enzimatica e ciò giustifica un minore aumento dei livelli di poliammine rispetto alle cellule PC3.

La deplezione di folato, inoltre, determina un aumento dello stress ossidativo delle cellule BPH1 e PC3 che può essere evidenziato come un aumento della produzione di ROS e una diminuzione della disponibilità di glutazione ridotto.

Quindi da questi dati è stato possibile dimostrare che la sola deplezione dei folati non risulta sufficiente a ridurre la sintesi delle poliammine nelle linee cellulari prostatiche: queste, infatti, rispondono alla riduzione della disponibilità dei folati attraverso l'incremento delle vie di recupero dell'unità monocarboniosa e attraverso l'inibizione della via catabolica e l'aumento delle vie anaboliche.

Attraverso la nostra analisi abbiamo identificato due possibili bersagli enzimatici, che potrebbero essere manipolati per aumentare la condizione di stress cellulare in condizioni di deplezione di folato e alterare negativamente l'omeostasi del metabolismo di poliammine nelle cellule tumorali. Il primo bersaglio è rappresentato dalla metiltioadenosina fosforilasi (MTAP), un enzima che recupera la 5'-metiltioadenosina (MTA) prodotta in seguito alla decarbossilazione di SAM, per rigenerare di nuovo SAM (Figura 10)⁹⁵. Uno studio recente ⁹⁶ ha dimostrato che l'espressione di MTAP nelle cellule tumorali prostatiche aumenta in condizione di deplezione di folato. Di conseguenza, l'inibizione di questo enzima potrebbe impedire alla cellula tumorale di mantenere un'adeguata riserva di SAM indispensabile per la sintesi delle poliammine e quindi vitale per la sopravvivenza cellulare. Tuttavia, riteniamo che questa strategia potrebbe essere compensata da una riduzione della dipendenza da folato esogeno, dal momento che le cellule avrebbero meno necessità di produrre SAM usando folato come precursore. Un secondo possibile target potrebbe essere l'enzima SSAT che è regolato diversamente nelle cellule tumorali rispetto alle BPH1 in condizioni di deplezione di folato.

Abbiamo dunque attuato una strategia che potesse aumentare la sensibilità delle cellule tumorali alla deplezione dei folati aumentando il catabolismo delle poliammine. L'attività enzimatica di SSAT può essere aumentata attraverso l'utilizzo di analoghi delle poliammine come il DENSpm. È dunque possibile ipotizzare che proprio in virtù di un aumento del catabolismo, la cellula tumorale cerchi di ripristinare una condizione di omeostasi della concentrazione intracellulare di PA aumentandone, in modo compensativo, la sintesi. Questo potrebbe verosimilmente produrre una situazione di scompenso fra l'aumentato fabbisogno di poliammine e la ridotta disponibilità di precursori che avrebbe come duplice conseguenza l'aumento della sensibilità a terapie con antifolati e la riduzione del pool intracellulare di poliammine che a questo punto non supporterebbe più la proliferazione cellulare. In queste condizioni è ragionevole pensare che possa venire esacerbata la condizione di stress ossidativo che abbiamo evidenziato nelle cellule tumorali cresciute in deplezione di folato dal momento che la cellula avrebbe a disposizione una limitata riserva di poliammine, cui si attribuisce una forte azione antiossidante tesa a contrastare l'effetto dannoso dei ROS in particolare nei termini

di ossidazione del DNA. Sempre in queste condizioni la cellula tumorale avrebbe minori capacità di sintetizzare il glutathione, altra arma per contrastare l'effetto dei ROS, dal momento che tenderebbe a deviare le unità monocarboniose trasportate da folati nella via di biosintesi delle poliammine, nel tentativo di mantenere una adeguata concentrazione intracellulare delle stesse.

Trattando le due linee cellulari con il DENSpm abbiamo ottenuto un aumento dei livelli di espressione dei geni implicati nel metabolismo delle poliammine ed una significativa riduzione dei livelli di poliammine intra- ed extracellulari in entrambe le linee cellulari, BPH1 e PC3. Dai risultati ottenuti è possibile notare come il trattamento con il DENSpm abbia un effetto maggiore quando le cellule sono cresciute in condizioni di folato limitanti. Le cellule PC3, inoltre, risultano maggiormente sensibili al trattamento con il DENSpm in aggiunta alla deplezione dei folati. Abbiamo riscontrato un aumento dei livelli dei ROS ed una diminuzione del glutathione ridotto che risulta essere significativamente maggiore nelle cellule cresciute in condizioni di deplezione di folato rispetto alle cellule cresciute in condizioni di folato standard.

Una condizione di stress ossidativo elevato e prolungato potrebbe costituire l'innescò di una desiderata citotossicità tumorale attraverso l'attuazione di programmi di morte cellulare programmata convenzionale o non convenzionale.

Abbiamo ipotizzato che un aumento dei livelli di espressione del gene *ssat* dovuto alla somministrazione di DENSpm potesse provocare l'attivazione della ferroptosi, una via di morte cellulare programmata. L'attivazione della ferroptosi può essere riscontrata in seguito alla riduzione di glutathione totale dovuta ad una riduzione dei livelli di espressione del gene *gpx4* che codifica per l'enzima glutathione perossidasi in aggiunta ad un aumento dei livelli di espressione del gene *alox15* che codifica per una lipossigenasi. La ferroptosi è caratterizzata anche da una riduzione della cisteina. Attraverso esperimenti di RT-PCR abbiamo valutato i livelli di espressione dei geni coinvolti nei meccanismi di attivazione della ferroptosi. I risultati mostrano una diminuzione dei livelli di espressione del gene *gpx4* (glutathione perossidasi), ma non abbiamo evidenziato un aumento dei livelli di espressione del gene *alox15*. Ciò potrebbe indicare che le cellule si trovano in un forte stato di stress ossidativo, il quale risulta maggiore nella condizione di deplezione di folato in aggiunta alla somministrazione di DENSpm, ma che non necessariamente porta all'attivazione di un meccanismo di morte di tipo ferroptotico. Dobbiamo ancora individuare il meccanismo di morte che potrebbe essere attivato nelle condizioni descritte.

Lo sviluppo di analoghi delle poliammine che mimano la loro struttura ma non le loro funzioni ha riscosso molto interesse sull'utilizzo di questi composti come chemioterapici. Ad oggi, però, la monoterapia non ha riscontrato i successi sperati soprattutto a causa dell'attivazione di meccanismi compensatori che permettono di ripristinare la normale omeostasi di questi policationi nelle cellule tumorali che continuano a proliferare.

I nostri risultati hanno dimostrato che la somministrazione di DENSp_m provoca una diminuzione della proliferazione e della vitalità cellulare che risulta essere maggiore quando le cellule sono cresciute in condizioni di deplezione di folato. Ciò è dovuto ad un aumento significativo dei livelli di espressione del gene *ssat* che si traducono in una maggiore quantità dell'enzima SSAT dimostrata da una significativa riduzione dei livelli di poliammine sia intra che extra cellulari. Anche i ROS risultano aumentati in seguito al trattamento con DENSp_m molto probabilmente in risposta al calo delle poliammine e quindi del loro effetto antiossidante. L'aumento del catabolismo delle poliammine ha come conseguenza un aumento dello stato di stress ossidativo delle cellule che possono portare all'attivazione di specifiche vie di morte cellulare programmata.

I risultati ottenuti mostrano, inoltre, che le cellule PC3 risultano essere maggiormente sensibili alla deplezione dei folati in aggiunta al trattamento con DENSp_m rispetto alle cellule BPH1. Questi risultati sono in accordo con la letteratura e possono dare speranza per l'individuazione di una terapia antitumorale specifica.

Bibliografia

1. Schatten, H. Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies. in 1–14 (2018). doi:10.1007/978-3-319-95693-0_1.
2. Grozescu, T. & Popa, F. Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *J Med Life* **10**, 5–12.
3. <https://www.epicentro.iss.it/tumori/registri>.
4. Chang, A. J., Autio, K. A., Roach, M. & Scher, H. I. High-risk prostate cancer-classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **11**, 308–23 (2014).
5. Chen, Y., Clegg, N. J. & Scher, H. I. Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. *Lancet Oncol* **10**, 981–991 (2009).
6. Heinlein, C. A. & Chang, C. Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocr Rev* **25**, 276–308 (2004).
7. Vietri, M. T. *et al.* Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention. *Int J Mol Sci* **22**, 3753 (2021).
8. Oczkowski, M., Dziendzikowska, K., Pasternak-Winiarska, A., Włodarek, D. & Gromadzka-Ostrowska, J. Dietary Factors and Prostate Cancer Development, Progression, and Reduction. *Nutrients* **13**, (2021).
9. Platz, E. A. Energy imbalance and prostate cancer. *J Nutr* **132**, 3471S-3481S (2002).
10. Okuyama, T., Kyohara, M., Terauchi, Y. & Shirakawa, J. The Roles of the IGF Axis in the Regulation of the Metabolism: Interaction and Difference between Insulin Receptor Signaling and IGF-I Receptor Signaling. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
12. Holbert, C. E., Cullen, M. T., Casero, R. A. & Stewart, T. M. Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* **22**, 467–480 (2022).
15. Teo, M. Y., Rathkopf, D. E. & Kantoff, P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med* **70**, 479–499 (2019).
16. Ranjan, A. *et al.* Role of Phytochemicals in Cancer Prevention. *Int J Mol Sci* **20**, 4981 (2019).
17. MOKBEL, K., WAZIR, U. & MOKBEL, K. Chemoprevention of Prostate Cancer by Natural Agents: Evidence from Molecular and Epidemiological Studies. *Anticancer Res* **39**, 5231–5259 (2019).
18. Izzo, S., Naponelli, V. & Bettuzzi, S. Flavonoids as Epigenetic Modulators for Prostate Cancer Prevention. *Nutrients* **12**, 1010 (2020).
19. Igarashi, K. & Kashiwagi, K. The functional role of polyamines in eukaryotic cells. *Int J Biochem Cell Biol* **107**, 104–115 (2019).
20. Igarashi, K. & Kashiwagi, K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 39–51 (2010).

21. Samad, M. bin, Maddeboina, K., Rodrigues de Almeida, N. & Conda-Sheridan, M. Facile Protocol for the Synthesis of Self-assembling Polyamine-based Peptide Amphiphiles (PPAs) and Related Biomaterials. *Journal of Visualized Experiments* (2018) doi:10.3791/57908.
22. Xiao, L. *et al.* Polyamines regulate the stability of activating transcription factor-2 mRNA through RNA-binding protein HuR in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* **18**, 4579–90 (2007).
23. Casero, R. A., Murray Stewart, T. & Pegg, A. E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* **18**, 681–695 (2018).
24. Xiao, L. *et al.* Polyamines regulate the stability of activating transcription factor-2 mRNA through RNA-binding protein HuR in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* **18**, 4579–90 (2007).
25. Zahedi, K., Barone, S. & Soleimani, M. Polyamines and Their Metabolism: From the Maintenance of Physiological Homeostasis to the Mediation of Disease. *Med Sci (Basel)* **10**, (2022).
26. Holbert, C. E., Cullen, M. T., Casero, R. A. & Stewart, T. M. Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* **22**, 467–480 (2022).
27. Novita Sari, I. *et al.* Metabolism and function of polyamines in cancer progression. *Cancer Lett* **519**, 91–104 (2021).
28. Nellemann, C., Dalgaard, M., Holst, B., Bonefeld-Jørgensen, E. C. & Vinggaard, A. M. Gene expression changes in rat prostate after activation or blocking of the androgen and estrogen receptor. *Mol Cell Endocrinol* **237**, 25–35 (2005).
29. Grzelakowska-Sztabert, B., Dudkowska, M. & Manteuffel-Cymborowska, M. Nuclear and membrane receptor-mediated signalling pathways modulate polyamine biosynthesis and interconversion. *Biochem Soc Trans* **35**, 386–90 (2007).
30. van Veen, S. *et al.* ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export. *Nature* **578**, 419–424 (2020).
31. Sim, S. I., von Bülow, S., Hummer, G. & Park, E. Structural basis of polyamine transport by human ATP13A2 (PARK9). *Mol Cell* **81**, 4635-4649.e8 (2021).
32. Li, H. *et al.* YAP/TAZ drives cell proliferation and tumour growth via a polyamine-eIF5A hypusination-LSD1 axis. *Nat Cell Biol* **24**, 373–383 (2022).
33. Hu, X., Washington, S., Verderame, M. F. & Manni, A. Interaction between Polyamines and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in the Regulation of Cell Cycle Variables in Breast Cancer Cells. *Cancer Res* **65**, 11026–33 (2005).
34. Serrano-Gomez, S. J., Maziveyi, M. & Alahari, S. K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol Cancer* **15**, 18 (2016).
35. Arumugam, A. *et al.* Inhibiting Cyclooxygenase and Ornithine Decarboxylase by Diclofenac and Alpha-Difluoromethylornithine Blocks Cutaneous SCCs by Targeting Akt-ERK Axis. *PLoS One* **8**, e80076 (2013).
36. Kaminski, L. *et al.* PGC1 α Inhibits Polyamine Synthesis to Suppress Prostate Cancer Aggressiveness. *Cancer Res* **79**, 3268–3280 (2019).

37. Guo, T. *et al.* PGC-1 α inhibits polyamine metabolism in Cyclin E1-driven ovarian cancer. *Cancer Med* **8**, 7754–7761 (2019).
38. Gao, S. *et al.* Chromatin binding of FOXA1 is promoted by LSD1-mediated demethylation in prostate cancer. *Nat Genet* **52**, 1011–1017 (2020).
39. Origanti, S. & Shantz, L. M. Ras Transformation of RIE-1 Cells Activates Cap-Independent Translation of Ornithine Decarboxylase: Regulation by the Raf/MEK/ERK and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways. *Cancer Res* **67**, 4834–4842 (2007).
40. Origanti, S. *et al.* Ornithine decarboxylase mRNA is stabilized in an mTORC1-dependent manner in Ras-transformed cells. *Biochemical Journal* **442**, 199–207 (2012).
41. Wang, C. *et al.* Spermidine/spermine N1-acetyltransferase regulates cell growth and metastasis via AKT/ β -catenin signaling pathways in hepatocellular and colorectal carcinoma cells. *Oncotarget* **8**, 1092–1109 (2017).
42. Linsalata, M., Giannini, R., Notarnicola, M. & Cavallini, A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene expressions are significantly correlated in human colorectal cancer. *BMC Cancer* **6**, 191 (2006).
43. Ulrich, S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a molecular target of resveratrol-induced modulation of polyamine metabolism. *Cancer Res* **66**, 7348–54 (2006).
44. Stephenson, A. H. & Seidel, E. R. Analysis of the interactions of Nrf-2, PMF-1, and CSN-7 with the 5'-flanking sequence of the mouse 4E-BP1 gene. *Life Sci* **79**, 1221–7 (2006).
45. Ulrich, S. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ as a Molecular Target of Resveratrol-Induced Modulation of Polyamine Metabolism. *Cancer Res* **66**, 7348–7354 (2006).
46. Stachurska, A., Dudkowska, M., Czopek, A., Manteuffel-Cymborowska, M. & Grzelakowska-Sztabert, B. Cisplatin up-regulates the in vivo biosynthesis and degradation of renal polyamines and c-Myc expression. *Biochim Biophys Acta* **1689**, 259–66 (2004).
47. Li, L. *et al.* p53 regulation of ammonia metabolism through urea cycle controls polyamine biosynthesis. *Nature* **567**, 253–256 (2019).
48. Murray Stewart, T., Dunston, T. T., Woster, P. M. & Casero, R. A. Polyamine catabolism and oxidative damage. *J Biol Chem* **293**, 18736–18745 (2018).
49. di Paolo, M. L. *et al.* Exploring the activity of polyamine analogues on polyamine and spermine oxidase: methoctramine, a potent and selective inhibitor of polyamine oxidase. *J Enzyme Inhib Med Chem* **34**, 740–752 (2019).
50. Huang, Y., Marton, L. J., Woster, P. M. & Casero, R. A. Polyamine analogues targeting epigenetic gene regulation. *Essays Biochem* **46**, 95–110 (2009).
51. Wallace, H. M. & Fraser, A. v. Polyamine analogues as anticancer drugs. *Biochem Soc Trans* **31**, 393–6 (2003).
52. Holbert, C. E. *et al.* Polyamine-Based Nanostructures Share Polyamine Transport Mechanisms with Native Polyamines and Their Analogues: Significance for Polyamine-Targeted Therapy. *Med Sci (Basel)* **10**, (2022).

53. Annibal, A. *et al.* Regulation of the one carbon folate cycle as a shared metabolic signature of longevity. *Nat Commun* **12**, 3486 (2021).
54. Xu, Q. *et al.* HNF4 α regulates sulfur amino acid metabolism and confers sensitivity to methionine restriction in liver cancer. *Nat Commun* **11**, 3978 (2020).
55. Parkhitko, A. A., Jouandin, P., Mohr, S. E. & Perrimon, N. Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. *Aging Cell* **18**, (2019).
56. Li, A. M. & Ye, J. Reprogramming of serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1866**, 165841 (2020).
57. Ouyang, Y., Wu, Q., Li, J., Sun, S. & Sun, S. S-adenosylmethionine: A metabolite critical to the regulation of autophagy. *Cell Prolif* **53**, e12891 (2020).
58. Sanderson, S. M., Gao, X., Dai, Z. & Locasale, J. W. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nat Rev Cancer* **19**, 625–637 (2019).
59. Albers, E. Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5 β -methylthioadenosine. *IUBMB Life* **61**, 1132–1142 (2009).
60. Subhi, A. L. *et al.* Loss of Methylthioadenosine Phosphorylase and Elevated Ornithine Decarboxylase Is Common in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* **10**, 7290–7296 (2004).
61. Pieroth, R., Paver, S., Day, S. & Lammersfeld, C. Folate and Its Impact on Cancer Risk. *Curr Nutr Rep* **7**, 70–84 (2018).
62. Annibal, A. *et al.* Regulation of the one carbon folate cycle as a shared metabolic signature of longevity. *Nat Commun* **12**, 3486 (2021).
63. Spellacy, C. J. *et al.* Folate Metabolism Gene 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Is Associated with ADHD in Myelomeningocele Patients. *PLoS One* **7**, e51330 (2012).
64. Collin, S. M. Folate and B12 in prostate cancer. *Adv Clin Chem* **60**, 1–63 (2013).
65. Ullevig, S. L. *et al.* Feasibility of dietary folic acid reduction intervention for men on active surveillance for prostate cancer. *Clin Nutr ESPEN* **44**, 270–275 (2021).
66. Price, A. J. *et al.* Circulating Folate and Vitamin B12 and Risk of Prostate Cancer: A Collaborative Analysis of Individual Participant Data from Six Cohorts Including 6875 Cases and 8104 Controls. *Eur Urol* **70**, 941–951 (2016).
67. Collin, S. M. *et al.* Circulating folate, vitamin B12, homocysteine, vitamin B12 transport proteins, and risk of prostate cancer: a case-control study, systematic review, and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**, 1632–42 (2010).
68. Wang, H., Liu, C., Zhao, Y. & Gao, G. Mitochondria regulation in ferroptosis. *Eur J Cell Biol* **99**, 151058 (2020).
69. Mou, Y. *et al.* Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *J Hematol Oncol* **12**, 34 (2019).

70. Li, D. & Li, Y. The interaction between ferroptosis and lipid metabolism in cancer. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 108 (2020).
71. Lu, B. *et al.* The Role of Ferroptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Front Pharmacol* **8**, (2018).
72. Prasad, S., Gupta, S. C. & Tyagi, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett* **387**, 95–105 (2017).
73. Mittler, R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci* **22**, 11–19 (2017).
74. Trombetti, S. *et al.* Oxidative Stress and ROS-Mediated Signaling in Leukemia: Novel Promising Perspectives to Eradicate Chemoresistant Cells in Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci* **22**, 2470 (2021).
75. Diwanji, N. & Bergmann, A. An unexpected friend – ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: Implications for regeneration and cancer. *Semin Cell Dev Biol* **80**, 74–82 (2018).
76. Niu, B. *et al.* Application of glutathione depletion in cancer therapy: Enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy. *Biomaterials* **277**, 121110 (2021).
77. Su, L.-J. *et al.* Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 5080843 (2019).
78. Dodson, M., Castro-Portuguez, R. & Zhang, D. D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biol* **23**, 101107 (2019).
79. Demine, Renard & Arnould. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells* **8**, 795 (2019).
80. Ou, Y., Wang, S.-J., Li, D., Chu, B. & Gu, W. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6806–E6812 (2016).
81. Kang, R., Kroemer, G. & Tang, D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network. *Free Radic Biol Med* **133**, 162–168 (2019).
82. Mou, Y., Zhang, L., Liu, Z. & Song, X. Abundant expression of ferroptosis-related SAT1 is related to unfavorable outcome and immune cell infiltration in low-grade glioma. *BMC Cancer* **22**, 215 (2022).
83. Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R. B. & Koul, H. K. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res* **68**, 1777–85 (2008).
84. Dakubo, G. D., Parr, R. L., Costello, L. C., Franklin, R. B. & Thayer, R. E. Altered metabolism and mitochondrial genome in prostate cancer. *J Clin Pathol* **59**, 10–6 (2006).
85. Rizzi, F. *et al.* A Novel Gene Signature for Molecular Diagnosis of Human Prostate Cancer by RT-qPCR. *PLoS One* **3**, e3617 (2008).
86. Ou, Y., Wang, S.-J., Li, D., Chu, B. & Gu, W. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, (2016).
87. <https://www.bio-techne.com/>.

88. Chern, C. L., Huang, R. F., Chen, Y. H., Cheng, J. T. & Liu, T. Z. Folate deficiency-induced oxidative stress and apoptosis are mediated via homocysteine-dependent overproduction of hydrogen peroxide and enhanced activation of NF-kappaB in human Hep G2 cells. *Biomed Pharmacother* **55**, 434–42 (2001).
89. Tian, Y. *et al.* Overexpression of SSAT by DENSPM treatment induces cell detachment and apoptosis in glioblastoma. *Oncol Rep* **27**, 1227–32 (2012).
90. Akyol, Z., Çoker-Gürkan, A., Arisan, E. D., Obakan-Yerlikaya, P. & Palavan-Ünsal, N. DENSPm overcame Bcl-2 mediated resistance against Paclitaxel treatment in MCF-7 breast cancer cells via activating polyamine catabolic machinery. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **84**, 2029–2041 (2016).
91. Pledge-Tracy, A. *et al.* The role of the polyamine catabolic enzymes SSAT and SMO in the synergistic effects of standard chemotherapeutic agents with a polyamine analogue in human breast cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **65**, 1067–1081 (2010).
92. McCloskey, D. E., Woster, P. M., Casero, R. A. & Davidson, N. E. Effects of the polyamine analogues N1-ethyl-N11-((cyclopropyl)methyl)-4,8-diazaundecane and N1-ethyl-N11-((cycloheptyl)methyl)-4,8-diazaundecane in human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* **6**, 17–23 (2000).
93. Vargiu, C. *et al.* Agmatine modulates polyamine content in hepatocytes by inducing spermidine/spermine acetyltransferase. *Eur J Biochem* **259**, 933–938 (2001).
94. Xu, T. *et al.* Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy. *J Cell Mol Med* **23**, 4900–4912 (2019).
95. Gao, X., Reid, M. A., Kong, M. & Locasale, J. W. Metabolic interactions with cancer epigenetics. *Mol Aspects Med* **54**, 50–57 (2017).
96. Bistulfi, G. *et al.* The essential role of methylthioadenosine phosphorylase in prostate cancer. *Oncotarget* **7**, 14380–93 (2016).

Appendice

Publicazioni:

- 1) *Flavonoids as Epigenetic Modulators for Prostate Cancer Prevention.***

Simona Izzo, Valeria Naponelli and Saverio Bettuzzi. Nutriens, 2020.

- 2) *In Vivo Treatment with a Standardized Green Tea Extract Restores Cardiomyocyte Contractility in Diabetic Rats by Improving Mitochondrial Function through SIRT1 Activation.***

Rocchina Vilella*, Simona Izzo*, Valeria Naponelli, Monia Savi, Leonardo Bocchi, Cristina Dallabona, Maria Carla Gerra, Donatella Stilli, Saverio Bettuzzi. Pharmaceuticals, 2022.

****these authors contributed equally to this work.***

RINGRAZIAMENTI

A questi lunghi anni trascorsi a Parma lontano dagli affetti più cari. A questa bellissima esperienza che mi ha permesso di crescere, non solo professionalmente, ma soprattutto personalmente. In questi anni ho avuto modo di conoscere tantissime persone, alcune uscite dalla mia vita e altre che spero restino a lungo.

Voglio ringraziare i miei amici Lorenza, Cecilia, Giorgia, Tiziano e Andrea con i quali ho condiviso “le gioie e i dolori” di questo percorso di dottorato. Grazie per tutte le pause pranzo trascorse insieme, per le belle serate e gli aperitivi.

Lorenza, Cecilia e Giorgia grazie per la trasferta napoletana.

Sarebbe impossibile menzionare tutti i bei momenti trascorsi insieme. Avrò sempre una camera per voi.

Un ringraziamento va a Marina, fianco a fianco fin dal primo giorno. In questi tre anni ci siamo sostenute sempre senza mai dubitare l’una dell’altra. Ci è bastato poco tempo per capire quanto fossimo simili e per far nascere un’amicizia che andrà oltre ogni distanza. Mi mancheranno le nostre risate e le nostre “brevi” chiacchierate. Tu e Gianluigi avrete una sfogliatella riservata ogni volta che volete.

Ringrazio la mia tutor Valeria, il mio punto di riferimento, che mi ha insegnato tutto ciò che so. Grazie per avermi dato sempre tanta fiducia e per l'umanità che ci metti nello svolgere il tuo lavoro.

Volevo ringraziare i miei genitori che mi hanno sostenuto sempre e spero di essere sempre all'altezza delle vostre aspettative.

Infine, voglio ringraziare Federico. Grazie perché sei rimasto sempre nonostante sapessi che non sarebbe stato semplice. Grazie per aver creduto in me molto più di quanto abbia sempre fatto io e per avermi sostenuto in ogni scelta.