

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biologia e Patologia Molecolare

Ciclo XXVIII

Alterazione della proteostasi a livello del reticolo
endoplasmatico: un potenziale target terapeutico nel
carcinoma prostatico

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Valeria Dall'Asta

Tutor:

Chiar.mo Prof. Saverio Bettuzzi

Chiar.ma Prof.ssa Federica Maria Angela Rizzi

Dottoranda: Alice Modernelli

INDICE

ABSTRACT	1
RIASSUNTO	3
INTRODUZIONE	7
1. Carcinoma della prostata.....	7
1.1. Sviluppo e diagnosi del carcinoma prostatico	8
1.2. Trattamento e chemioprevenzione del carcinoma prostatico	12
2. Proteostasi	15
2.1. Chaperon molecolari.....	15
2.2. Controllo di qualità del reticolo endoplasmatico: ERAD e UPR.....	17
2.3. Sistema ubiquitina-proteasoma.....	21
2.4. Autofagia.....	23
2.5. Proteostasi nel tumore	27
3. Catechine del tè verde	30
3.1. Catechine del tè verde e carcinoma prostatico.....	31
3.2. Meccanismi molecolari delle catechine del tè verde nel carcinoma prostatico	32
SCOPO DELLA TESI	39
MATERIALI E METODI	41
4. Reagenti ed altri materiali	41
5. Modelli cellulari e condizioni di crescita	41
6. Saggi di vitalità cellulare.....	42
6.1. Saggio WST-1.....	42
6.2. Saggio ATPlite.....	43
7. Preparazione di lisati cellulari e quantificazione delle proteine estratte	44
8. SDS-PAGE e Western blot	44
9. Estrazione e quantificazione dell'RNA.....	46
10. Retrotrascrizione	46

11. Real-time PCR.....	47
12. Trasfezione transiente del plasmide EGFP-LC3	48
13. Analisi statistica	50
RISULTATI - PARTE 1	51
14. Polyphenon E, effetti sulla vitalità di cellule di carcinoma prostatico.....	51
15. Polyphenon E, effetti sull'induzione della cascata di attivazione delle caspasi.....	52
16. Polyphenon E, effetti sullo stress del reticolo endoplasmatico	54
RISULTATI - PARTE 2	57
17. EGCG ed inibitori del proteasoma, effetti sulla vitalità cellulare	57
18. EGCG ed inibitori del proteasoma, effetti sull'induzione della cascata apoptotica.....	60
19. EGCG ed inibitori del proteasoma, effetti sull'inibizione del proteasoma e sullo stress del reticolo endoplasmatico.....	61
20. EGCG ed inibitori del proteasoma, attivazione del processo autofagico.....	65
21. L'autofagia come meccanismo di sopravvivenza favorito dall'EGCG	70
DISCUSSIONE	73
BIBLIOGRAFIA	81

ABSTRACT

Proteostasis impairment at the level of the endoplasmic reticulum: a potential therapeutic target for prostate cancer.

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed neoplasia and the third leading cause of cancer-related death among men. Different therapeutic strategies are available for treatment of PCa but, as demonstrated by the persistent high mortality, they are often ineffective, mainly because of the development of resistant cancer cells. Researchers are focusing on the characterization of these resistance mechanisms and also on identifying new therapeutic combinations that can be more effective and able to overcome the resistance of cancer cells.

Tumor cells are highly dependent on protein homeostasis (proteostasis) because they are continuously exposed to stressful conditions (such as hypoxia, nutrient deprivation, acidosis, chemotherapeutic treatments, etc.) and are characterized by a high translational activity; therefore, they are much more prone to accumulate misfolded and/or unfolded proteins. For the maintenance of proteostasis, eukaryotic cells have developed a complex protein quality control system, which is mainly comprised of molecular chaperons, the endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation (ERAD), the unfolded protein response (UPR) and the two major protein degradation systems, i.e. the proteasome system and autophagy. One of the potential therapeutic target in secretory cells, such as PCa cells, is the ER, an intracellular organelle that plays a central role in the synthesis, folding and post-translational modification of secreted and membrane proteins. Proteostasis impairment at the level of the ER induces the UPR, which plays a dual role in cells: it mainly acts as a homeostatic and pro-survival mechanism, but it can also induce pro-death pathway when the proteostasis can not be restored and the UPR signalling becomes chronic. Therefore, the UPR is a two-faced response that can be exploited to selectively target tumor cells. In cancer, the inhibition of the UPR could abrogate the adaptative and pro-survival response, whereas its overloading could trigger the activation of pro-apoptotic pathways.

Green tea catechins are polyphenolic compounds extracted from leaves of *Camellia sinensis* and have many antitumor effects. Green tea catechins inhibit cell proliferation, increase cancer cell death and reduce the invasion, angiogenesis and metastasis of different kind of tumors, including PCa. The ER has been characterized as a target of green tea catechins. Especially, recent studies in a PCa animal model performed by our research group have

highlighted that Polyphenon E (a standardized green tea extract) causes the collapse of Golgi and interferes with the glycosylation capacity of the ER, causing the accumulation of immature proteins within the lumen, thus triggering ER stress. In the present study on two different PCa cell lines (DU145 and LNCaP) and in a previous study by us on two other cell lines (PNT1a and PC3), we confirm that Polyphenon E is able to induce ER stress and, consequently, UPR signalling, which can act as a early prosurvival mechanism, but can also contribute to the activation of pro-death pathways, as evidenced in PC3 cells.

Taking into consideration the ability of green tea catechins to induce UPR, we hypothesized whether the combination of these bioactive polyphenols with proteasome inhibitors (well known UPR inducers) can trigger a synergistic overloading of the UPR, thus inducing UPR-mediated pro-apoptotic pathway (such as via the PERK-p-eIF2 α -ATF4-CHOP pathway). Therefore, in PC3 cells, we tested the combination of epigallocatechin-3-gallate (EGCG, the main green tea catechin) with two different proteasome inhibitors, bortezomib (BZM) and MG132. Surprisingly, the combination treatments did not trigger a synergistic or additive effect. Instead, EGCG when combined with BZM resulted in an antagonistic-like effect: the combination caused a reduction of the cytotoxicity and proteasome inhibition as compared to the single treatment with BZM. Moreover, the association of EGCG and BZM reduced the induction of the ER stress and the UPR, as shown by the lower levels of GRP78, p-eIF2 α and CHOP compared to the single treatment with BZM. Conversely, the combination of EGCG with MG132 did not alter the cytotoxicity, proteasome inhibition and UPR induction triggered by MG132 when used as a single agent. Since autophagy is a compensative mechanism that can be induced as a consequence of proteasome inhibition and ER stress induction, we studied the role played by autophagy in the antagonistic-like response observed in PC3 cells treated with EGCG and BZM. Our results showed that EGCG increased the activation of the autophagic flux induced by BZM. Through the inhibition of autophagy by chloroquine co-administration, we demonstrated that EGCG-induced autophagy is a pro-survival mechanism that suppresses the UPR triggered by BZM.

In conclusion, our results prove that the co-administration of green tea catechins and BZM should be avoided in patient with PCa. Moreover, in future combinatorial studies of EGCG, it will be important to verify the role of autophagy as a potential pro-survival and resistance mechanism.

RIASSUNTO

Nel sesso maschile il carcinoma della prostata (CaP) è la neoplasia più frequente ed è tra le prime cause di morte per tumore. Ad oggi, sono disponibili diverse strategie terapeutiche per il trattamento del CaP, ma, come comprovato dall'ancora alta mortalità, spesso queste sono inefficaci, a causa soprattutto dello sviluppo di fenomeni di resistenza da parte delle cellule tumorali. La ricerca si sta quindi focalizzando sulla caratterizzazione di tali meccanismi di resistenza e, allo stesso tempo, sull'individuazione di combinazioni terapeutiche che siano più efficaci e capaci di superare queste resistenze.

Le cellule tumorali sono fortemente dipendenti dai meccanismi connessi con l'omeostasi proteica (proteostasi), in quanto sono sottoposte a numerosi stress ambientali (ipossia, carenza di nutrienti, esposizione a chemioterapici, ecc.) e ad un'aumentata attività trascrizionale, entrambi fattori che causano un accumulo intracellulare di proteine anomale e/o mal ripiegate, le quali possono risultare dannose per la cellula e vanno quindi riparate o eliminate efficientemente. La cellula ha sviluppato diversi sistemi di controllo di qualità delle proteine, tra cui gli chaperon molecolari, il sistema di degradazione associato al reticolo endoplasmatico (ERAD), il sistema di risposta alle proteine non ripiegate (UPR) e i sistemi di degradazione come il proteasoma e l'autofagia. Uno dei possibili bersagli in cellule tumorali secretorie, come quelle del CaP, è rappresentato dal reticolo endoplasmatico (RE), organello intracellulare deputato alla sintesi, al ripiegamento e alle modificazioni post-traduzionali delle proteine di membrana e secrete. Alterazioni della proteostasi a livello del RE inducono l'UPR, che svolge una duplice funzione nella cellula: primariamente funge da meccanismo omeostatico e di sopravvivenza, ma, quando l'omeostasi non è più ripristinabile e lo stimolo di attivazione dell'UPR cronicizza, può attivare vie di segnalazione che conducono alla morte cellulare programmata. La bivalenza, tipica dell'UPR, lo rende un bersaglio particolarmente interessante per promuovere la morte delle cellule tumorali: si può, infatti, sfruttare da una parte l'inibizione di componenti dell'UPR per abrogare i meccanismi adattativi e di sopravvivenza e dall'altra si può favorire il sovraccarico dell'UPR con conseguente induzione della via pro-apoptotica.

Le catechine del tè verde sono composti polifenolici estratti dalle foglie di *Camellia sinensis* che possiedono comprovati effetti antitumorali: inibiscono la proliferazione, inducono la morte di cellule neoplastiche e riducono l'angiogenesi, l'invasione e la metastatizzazione di diversi tipi tumorali, tra cui il CaP. Diversi studi hanno osservato come il RE sia uno dei

bersagli molecolari delle catechine del tè verde. In particolare, recenti studi del nostro gruppo di ricerca hanno messo in evidenza come il Polyphenon E (estratto standardizzato di catechine del tè verde) sia in grado, in modelli animali di CaP, di causare un'alterazione strutturale del RE e del Golgi, un deficit del processamento delle proteine secretorie e la conseguente induzione di uno stato di stress del RE, il quale causa a sua volta l'attivazione delle vie di segnalazione dell'UPR. Nel presente studio su due diverse linee cellulari di CaP (LNCaP e DU145) e in un nostro precedente studio su altre due linee cellulari (PNT1a e PC3) è stato confermato che il Polyphenon E è capace di indurre lo stress del RE e di determinare l'attivazione delle vie di segnalazione dell'UPR, le quali possono fungere da meccanismo di sopravvivenza, ma anche contribuire a favorire la morte cellulare indotta dalle catechine del tè verde (come nel caso delle PC3).

Considerati questi effetti delle catechine del tè verde in qualità di induttori dell'UPR, abbiamo ipotizzato che la combinazione di questi polifenoli bioattivi e degli inibitori del proteasoma, anch'essi noti attivatori dell'UPR, potesse comportare un aggravamento dell'UPR stesso tale da innescare meccanismi molecolari di morte cellulare programmata. Abbiamo quindi studiato l'effetto di tale combinazione in cellule PC3 trattate con epigallocatechina-3-gallato (EGCG, la principale tra le catechine del tè verde) e due diversi inibitori del proteasoma, il bortezomib (BZM) e l'MG132. I risultati hanno dimostrato, diversamente da quanto ipotizzato, che l'EGCG quando associato agli inibitori del proteasoma non produce effetti sinergici, ma che anzi, quando viene addizionato al BZM, causa una risposta simil-antagonistica: si osserva infatti una riduzione della citotossicità e dell'effetto inibitorio sul proteasoma (accumulo di proteine poliubiquitinate) indotti dal BZM, inoltre anche l'induzione dell'UPR (aumento di GRP78, p-eIF2 α , CHOP) risulta ridotta nelle cellule trattate con la combinazione di EGCG e BZM rispetto alle cellule trattate col solo BZM. Gli stessi effetti non si osservano invece nelle cellule PC3 trattate con l'EGCG in associazione con l'MG132, dove non si registra alcuna variazione dei parametri di vitalità cellulare e dei marcatori di inibizione del proteasoma e di UPR (rispetto a quelli osservati nel singolo trattamento con MG132). Essendo l'autofagia un meccanismo compensativo che si attiva in seguito all'inibizione del proteasoma o allo stress del RE, abbiamo valutato che ruolo potesse avere tale meccanismo nella risposta simil-antagonistica osservata in seguito al co-trattamento con EGCG e BZM. I nostri risultati hanno evidenziato, in cellule trattate con BZM, l'attivazione di un flusso autofagico che si intensifica quando viene addizionato l'EGCG. Tramite l'inibizione dell'autofagia mediante co-somministrazione di cloroquina, è stato

possibile stabilire che l'autofagia indotta dall'EGCG favorisce la sopravvivenza delle cellule sottoposte al trattamento combinato tramite la riduzione dell'UPR.

Queste evidenze ci portano a concludere che per il trattamento del CaP è sconsigliabile associare le catechine del tè verde con il BZM e che in futuri studi di combinazione di questi polifenoli con composti antitumorali sarà importante valutare il ruolo dell'autofagia come possibile meccanismo di resistenza.

INTRODUZIONE

1. CARCINOMA DELLA PROSTATA

In Europa, il carcinoma prostatico (CaP) rappresenta, nel maschio adulto, la neoplasia più frequentemente diagnostica (22,8%) e la terza causa di morte (9,5%), dopo il tumore del polmone e del colon-retto [1]. L'incidenza del CaP è in costante aumento, ciò è dovuto, in parte, all'incremento dell'età media della popolazione, ma soprattutto all'aumentata pressione diagnostica conseguente all'introduzione del dosaggio dell'antigene prostatico specifico (PSA) come test di screening.

È ormai consolidato che l'eziologia del CaP sia multifattoriale, essendo il risultato di una complessa interazione di fattori genetici ed ambientali. I principali fattori di rischio, secondo le linee guida dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica [2], sono:

- età (> 50 anni);
- razza nera;
- fattori ormonali (elevati livelli di androgeni circolanti);
- storia familiare di CaP;
- fattori genetici (9% forme ereditarie; 43% nei pazienti con età < 55 anni);
- stile di vita e dieta.

È importante notare che l'incidenza del CaP risulta essere piuttosto variabile nelle diverse aree geografiche del mondo: il tasso di incidenza è più alto in Nord America, Australia, Europa settentrionale ed occidentale, mentre i tassi più bassi si osservano in Giappone e nei paesi del sud-est asiatico. Differenze nella dieta, nello stato socio-economico e nei livelli di androgeni circolanti sembrano contribuire a questa variabilità. In particolare, nelle popolazioni asiatiche, la bassa incidenza è stata messa in relazione con la dieta povera di lipidi, ma ricca di antiossidanti, fibre e fitoestrogeni [1]. L'identificazione dei fattori protettivi, oltre che dei fattori di rischio, rappresenta un importante obiettivo al fine di ottimizzare nuove strategie preventive e terapeutiche per questo tipo di tumore.

1.1. Sviluppo e diagnosi del carcinoma prostatico

Il CaP origina in più del 70% dei casi nella zona periferica della ghiandola prostatica, mentre i restanti casi si localizzano nella zona di transizione (~ 20%) o nella zona centrale (1-5%) (**Figura 1**) [2]. L'adenocarcinoma rappresenta circa il 95% dei tumori della prostata, perciò di seguito verrà inteso come CaP solo questo tipo di tumore. Il CaP si sviluppa inizialmente all'interno della ghiandola e successivamente può diffondere localmente verso le vescicole seminali, la vescica o i tessuti circostanti e può dare metastasi a distanza diffondendo per via ematica e/o linfatica. La progressione del CaP è piuttosto imprevedibile: l'invasione locale organo-confinata e la formazione di metastasi non si verificano necessariamente in modo consecutivo ed in relazione all'accrescimento della massa tumorale. I sintomi del CaP includono dolore alla minzione, 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. Inoltre, bisogna considerare che spesso il CaP nella sua forma precoce e talvolta anche in quella più avanzata può essere del tutto asintomatico. Le forme indolenti organo-confinata del CaP risultano essere spesso poco aggressive e solo una ristretta parte evolve verso una forma clinicamente manifesta e potenzialmente letale; in letteratura, l'incidenza del CaP clinicamente insignificante varia dal 2,3% ad oltre il 25% [3].

Il CaP è una patologia a lenta progressione e con un lungo periodo di latenza, le forme aggressive e metastatiche di questo tumore sono sostanzialmente incurabili. Per questi motivi si rende necessaria la messa a punto di protocolli di screening e diagnostici che possano individuare precocemente il CaP, in modo da attuare procedure terapeutiche o preventive che ne riducano lo sviluppo e la progressione nel tempo. Le tecniche diagnostiche dovrebbero consentire la distinzione netta tra le patologie benigne della prostata ed il CaP e tra le forme latenti di CaP, che potenzialmente non progrediranno mai, se non molto tardivamente, e le forme di CaP più aggressive, che necessitano quindi di un trattamento immediato.

Le procedure diagnostiche attualmente in uso (**Tabella 1**) presentano il grosso limite di non distinguere efficacemente allo stadio precoce i tumori che rimarranno latenti e indolenti da quelli che si svilupperanno con un andamento aggressivo. Al momento, la definizione della scelta terapeutica e della prognosi del paziente si basa sulla valutazione combinata di diversi fattori: i livelli di PSA, la classificazione istopatologica, la stadiazione del tumore e la speranza di vita del paziente (età avanzata o comorbidità con elevata letalità). Il sistema di riferimento internazionale utilizzato per la definizione del grado istologico (differenziamento

istologico) è la classificazione secondo Gleason, che prende in considerazione il grado di differenziamento cellulare ed il tipo di infiltrazione, assegnando ai due aspetti strutturali più rappresentati un grado da 1 a 5 (**Tabella 2**), la somma di questi due identifica il punteggio complessivo (Gleason score da 2 a 10) [4]. Per la stadiazione, cioè per la definizione dell'estensione della patologia, si utilizza il sistema di stadiazione internazionale TNM, che considera tre parametri: l'estensione locale del tumore (T), l'eventuale interessamento dei linfonodi loco-regionali (N) e la presenza di metastasi a distanza (M) [5]. Per la stadiazione si deve far ricorso, oltre che alle tecniche diagnostiche indicate in **Tabella 1**, anche alla tomografia computerizzata, alla risonanza magnetica, alla scintigrafia ossea e ad altre tecniche di *imaging* per individuare le localizzazioni secondarie [2].

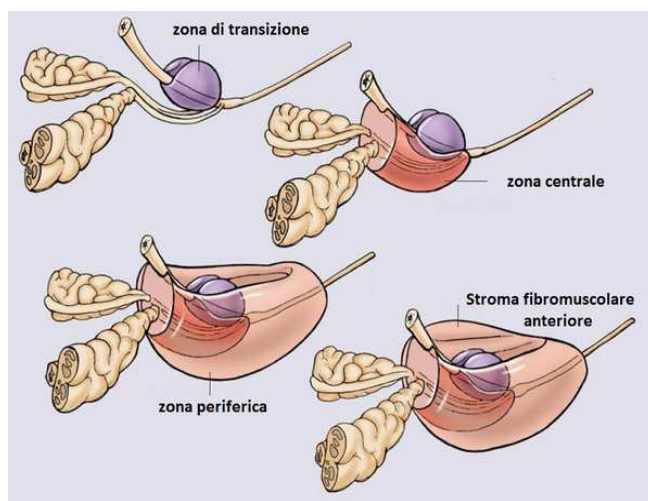
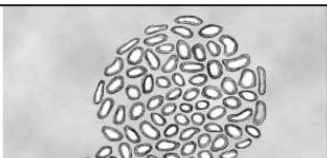
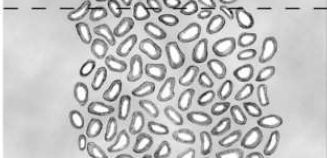
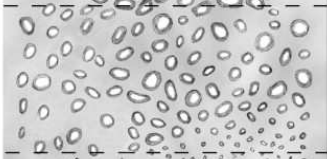
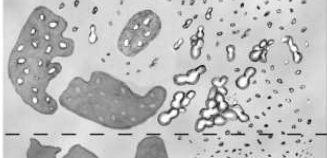
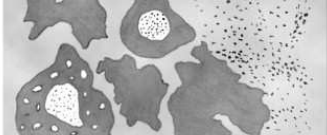


Figura 1 - Anatomia della prostata. La prostata è un organo ghiandolare e fibromuscolare che circonda l'uretra, localizzandosi appena al di sotto della vescica, anteriormente al retto. Il tessuto ghiandolare può essere suddiviso in 3 zone: la zona centrale (25% del tessuto ghiandolare), che circonda i dotti eiaculatori, la zona periferica (70% del tessuto ghiandolare), che occupa la parte posteriore e laterale della prostata, e tra queste due la zona di transizione (10% del tessuto ghiandolare). Infine, nella parte anteriore della prostata si localizza lo stroma fibromuscolare.

Tabella 1 – Principali tecniche diagnostiche per il CaP.

TECNICHE DIAGNOSTICHE PER IL CaP	
Esplorazione digito-rettale (DRE)	Esame ambulatoriale che permette l'individuazione di noduli o di un indurimento localizzato nella zona periferica della ghiandola, ossia quella più colpita dal CaP; tuttavia non consente di individuare tumori di piccole dimensioni o localizzati in altre zone.
Dosaggio sierico dell'antigene prostatico specifico (PSA)	<p>Utilizzato come screening in uomini di età ≥ 50 anni. I livelli di PSA aumentano con l'età, tuttavia incrementi notevoli e sopra la norma si osservano in caso di sviluppo di CaP, ma anche in caso di iperplasia prostatica benigna e prostatiti. Il valore soglia più utilizzato per il sospetto di CaP è 4 ng/mL, tuttavia c'è da considerare che oltre il 20% dei soggetti affetti da CaP presentano livelli fisiologici di PSA, ossia < 3 ng/mL. Per aumentarne la sensibilità e la specificità vengono impiegati diversi approcci che prevedono la combinazione dei valori di PSA con altri parametri:</p> <ul style="list-style-type: none"> - PSA normalizzato per l'età del paziente; - PSA density: PSA rapportato alle dimensioni della prostata misurate ecograficamente; - PSA <i>velocity</i>: variazioni dei livelli di PSA nel tempo; - PSA libero/PSA totale: rapporto tra i livelli di PSA circolanti in forma libera con i livelli totali che comprendono anche il PSA legato a proteine di trasporto (soprattutto l'anti-chimotripsina e l'α-2-macroglobulina). <p>L'avvento del dosaggio del PSA ha permesso di aumentare la diagnosi di tumori prostatici ancora organo-confinati ed asintomatici, tuttavia la sua reale utilità è ancora fonte di dibattito, sia per la sua aspecificità che per il rischio di sovra-diagnosi, essendo in grado di individuare anche forme di CaP latenti che potrebbero non evolvere mai verso forme aggressive e letali. Inoltre permane il problema della mancata discriminazione delle forme di CaP PSA negative.</p>
Ecografia prostatica transrettale (TRUS)	Fornisce informazioni sulla morfologia, le dimensioni e la struttura della ghiandola prostatica, consentendo di individuare lesioni tumorali locali o già diffuse al di fuori della prostata. Permette quindi di aumentare la sensibilità diagnostica quando associato al dosaggio del PSA o alla DRE.
Agobiopsia prostatica ecoguidata	Eseguita in caso di un riscontro anomalo alla DRE o alla TRUS o quando si rilevano alti valori di PSA (sempre indicata per valori > 10 ng/mL). Tale esame è l'unico che permette una diagnosi certa, identificando la presenza di cellule tumorali e definendo il grado istopatologico della neoplasia.

Tabella 2 – Grado istologico, classificazione secondo Gleason.

GRADI DI GLEASON (2005 ISUP modified Gleason system [4])		
Grado 1	Nodulo circoscritto di acini fitti ma distinti, uniformi, rotondi od ovali, di medie dimensioni (più grandi del grado 3)	① 
Grado 2	Come il grado 1, piuttosto circoscritto, con possibili minime infiltrazioni ai margini del nodulo. Le ghiandole sono disposte in modo meno serrato e uniforme rispetto al grado 1.	② 
Grado 3	Unità ghiandolari discrete, solitamente più piccole rispetto ai gradi 1 e 2. Infiltrati presenti tra gli acini non neoplastici. Notevole variabilità di forma e dimensione dei noduli, talora con aspetti cribriformi.	③ 
Grado 4	Ghiandole micro-acinari confluenti, mal definibili, con lume ghiandolare scarsamente formato. Ampie ghiandole cribriformi, alcune delle quali con bordi irregolari. Aspetti ipernefrotoidi.	④ 
Grado 5	Assenza di differenziazione ghiandolare, composti da fogli solidi, cordoni o singole cellule. Comedocarcinoma con necrosi centrale circondata da masse papillari, cribriformi o solide.	⑤ 

Brunbaugh

1.2. Trattamento e chemioprevenzione del carcinoma prostatico

L'avvento del dosaggio del PSA, come test di screening, ha causato un incremento delle diagnosi di CaP a fronte di una stabilità della mortalità per questo tumore. Considerando che circa il 40% dei pazienti con diagnosi di neoplasia prostatica sono destinati a morire per cause non connesse con il tumore, il rischio di sovra-diagnosi risulta elevato. Per queste ragioni, al fine di ridurre i costi e gli effetti collaterali del sovra-trattamento, conseguente alla sovra-diagnosi, per i pazienti con CaP intracapsulare ben differenziato (Gleason score < 6), con PSA \leq 10 ng/mL e con una prognosi migliore viene preferita una politica di vigile attesa o di sorveglianza attiva [2]. La vigile attesa viene indicata soprattutto per pazienti con un'aspettativa di vita inferiore a 10 anni e prevede di non sottoporre a trattamento il paziente, rinviando al momento dell'eventuale comparsa dei sintomi la scelta di una terapia palliativa. Per i soggetti con un'aspettativa superiore ai 10 anni si preferisce invece attuare una sorveglianza attiva che prevede un *follow up* costante con ripetuti dosaggi del PSA e biopsie prostatiche atte a monitorare l'andamento della patologia e ad adeguare la strategia terapeutica in base al comportamento biologico del tumore. Il trattamento di tipo radicale viene indicato in quei pazienti in cui si osserva un aumento nel tempo dei livelli di PSA o un peggioramento del *grading*. Infine, per soggetti che già alla diagnosi presentano un alto grado istologico con un interessamento linfatico e/o la presenza di metastasi, si procederà immediatamente con l'attuazione di una terapia radicale e/o palliativa.

Attualmente, le strategie terapeutiche principali per il CaP sono le seguenti [2]:

- **Prostatectomia radicale:** intervento di asportazione chirurgica della prostata e delle vescicole seminali. Questa tecnica ha il vantaggio di poter eradicare la malattia organo-confinata, tuttavia possono derivare delle complicanze funzionali (incontinenza urinaria e disfunzione erettile) che possono peggiorare la qualità di vita del paziente.
- **Radioterapia:** può essere impiegata come trattamento radicale in alternativa alla prostatectomia; inoltre la radioterapia postoperatoria adiuvante viene raccomandata in caso di margini di resezione positivi. La radioterapia può essere utile anche come strategia di “salvataggio” nei casi di ricaduta post-operatoria, oppure come terapia palliativa per alleviare i sintomi delle metastasi ossee.
- **Terapia endocrina:** il CaP è un tumore androgeno-dipendente, la cui crescita è fortemente stimolata dal diidrotestosterone (DHT), un potente androgeno che deriva dalla conversione del testosterone da parte della 5α -reduttasi. Sia il testosterone che il DHT si legano al recettore degli androgeni (AR), inducendo la trascrizione di una serie di geni

chiave per la proliferazione e la sopravvivenza cellulare . Una strategia terapeutica efficace consiste quindi nel ridurre i livelli di questi ormoni nei tessuti tumorali, ciò si può ottenere tramite diverse vie: deprivazione androgenica tramite orchietomia bilaterale o tramite castrazione farmacologica mediante l'impiego di analoghi agonisti o di antagonisti dell'ormone rilasciante l'ormone luteinizzante (LH-RH), oppure mediante somministrazione di antiandrogeni, farmaci che competono con il DHT per il legame con il recettore per gli androgeni (AR) [2, 6]. La terapia endocrina può essere impiegata sia come monoterapia che come adiuvante. La maggior parte dei pazienti risponde bene alla terapia endocrina, tuttavia dopo un periodo di risposta, in alcuni casi, il CaP evolve verso una forma androgeno-indipendente, riprendendo la sua crescita. La terapia di deprivazione androgenica può infatti portare alla selezione positiva di cloni di cellule tumorali androgeno-indipendenti, in grado cioè di proliferare senza lo stimolo androgenico [7]. Il CaP resistente alla castrazione risulta essere particolarmente aggressivo e ben poche sono le terapie efficaci a disposizione per il trattamento di questo tumore.

In caso di ricaduta o di mancata risposta a questi trattamenti di prima linea, il paziente viene sottoposto a terapie di seconda linea, che prevedono l'utilizzo principalmente di chemioterapici (prevalentemente docetaxel o cabazitaxel), nuovi farmaci inibitori della via di segnale degli androgeni (come abiraterone acetato e enzalutamide) o radioisotopi (radio-223) [8]. Questi trattamenti hanno dimostrato di aumentare l'*overall survival*, tuttavia i risultati sono modesti essendo l'incremento della sopravvivenza di solo 3-5 mesi in media [8]. Per queste ragioni è in corso una continua ricerca di nuovi farmaci e strategie terapeutiche, sia per ridurre le ricadute e lo sviluppo del CaP refrattario alla castrazione, sia per trattare efficacemente le forme più aggressive e resistenti di CaP.

Considerando i livelli ancora alti della letalità del CaP e la scarsa disponibilità di farmaci efficaci nell'eradicare le forme più aggressive, la ricerca clinica sta puntando anche sullo sviluppo di strategie chemiopreventive. Per chemioprevenzione si intende l'utilizzo di sostanze naturali o sintetiche con lo scopo di prevenire o rallentare lo sviluppo e la progressione del tumore [9]. La chemioprevenzione si localizza quindi tra la prevenzione primaria e la terapia antitumorale. I composti chemiopreventivi sono caratterizzati, in genere, da un basso costo e da effetti avversi modesti o nulli. Nel caso del CaP, i soggetti sottoponibili a trattamenti chemiopreventivi sono i soggetti ad alto rischio di sviluppare tumori della prostata, ossia quelli che presentano lesioni sospette fortemente predittive di

successiva diagnosi di CaP, come la proliferazione acinare atipica (ASAP) o la neoplasia prostatica intraepiteliale ad alto grado (HG-PIN) [10]. Per i soggetti ad alto rischio ed eventualmente anche per quei pazienti per i quali è prevista la vigile attesa o la sorveglianza attiva, l'utilizzo di agenti chemiopreventivi potrebbe rappresentare una valida opzione di trattamento finalizzato a ritardare il più possibile la comparsa e/o la progressione sintomatica del CaP.

2. PROTEOSTASI

La funzionalità e la vitalità cellulare dipendono fortemente dall'integrità del proteoma. Le cellule eucariotiche dispongono quindi di una serie di sistemi che controllano la sintesi, la stabilità conformazionale e funzionale, nonché la degradazione delle proteine. Il *network* che mantiene l'omeostasi proteica (proteostasi), sia in condizioni normali che in condizioni di stress, permette di evitare la formazione e l'accumulo di proteine anomale, mal ripiegate (*misfolded*) e tendenti a formare aggregati, le quali sono potenzialmente tossiche per la cellula. Il controllo della proteostasi in una cellula normale avviene a diversi livelli, a partire dalla fase di sintesi fino alla fase di smaltimento e degradazione delle proteine. Per un adeguato mantenimento della proteostasi, è fondamentale che nella cellula avvengano: una corretta sintesi proteica a livello ribosomiale, appropriate modificazioni post-traduzionali delle proteine, un corretto ripiegamento, il mantenimento della conformazione funzionale e infine la rapida eliminazione di eventuali proteine anomale o non più utili. Nel processo di conservazione della proteostasi intervengono quindi una serie di sistemi di controlli di qualità, tra cui i principali sono gli chaperon molecolari, il sistema di controllo di qualità del reticolo endoplasmatico (RE) e i due principali sistemi di degradazione proteica, il sistema ubiquitina-proteasoma e l'autofagia [11].

Squilibri nella proteostasi sono stati osservati in numerose patologie cronico-degenerative, inclusi i tumori. La comprensione dei meccanismi alla base del mantenimento della proteostasi, nonché l'individuazione di farmaci capaci di modularla possono rappresentare nuove strategie nella lotta ai tumori.

2.1. Chaperon molecolari

Gli chaperon molecolari sono proteine che interagiscono, stabilizzano e aiutano altre proteine ad acquisire la corretta conformazione nativa. Oltre a questo ruolo fondamentale, gli chaperon molecolari intervengono nel mantenimento della proteostasi assistendo la formazione di macrocomplessi molecolari, il trasporto e la degradazione di proteine *misfolded*, la dissociazione di aggregati proteici ed il ripiegamento di proteine denaturate. Gli chaperon molecolari costituiscono la prima linea di difesa nei confronti del *misfolding* proteico e dei fenomeni di aggregazione. Gli chaperon molecolari più studiati sono quelli appartenenti alla famiglia delle proteine dello stress o *heat shock protein* (Hsp), così chiamate perché la loro sintesi è aumentata in situazioni di stress (come lo stress ossidativo o da calore) che possono

destabilizzare la struttura tridimensionale di numerose proteine [12]. Le Hsp sono classificate in famiglie in base al peso molecolare dei monomeri (Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp110 e le piccole Hsp), anche se la maggior parte di esse esiste sotto forma di oligomero. Questi chaperon molecolari agiscono legandosi ai residui idrofobici delle proteine non ripiegate, prevenendone il *misfolding* e l'aggregazione, eventi favoriti dall'ambiente intracellulare altamente affollato di proteine ed altre macromolecole. Inoltre, le Hsp possono favorire il trasporto delle proteine da un compartimento ad un altro e possono dirigere proteine *misfolded* verso la degradazione proteolitica. Gli chaperon molecolari si trovano, di fatto, al centro dell'intero sistema di controllo di qualità delle proteine, mettendo in comunicazione i diversi attori della proteostasi (**Figura 2**) [13].

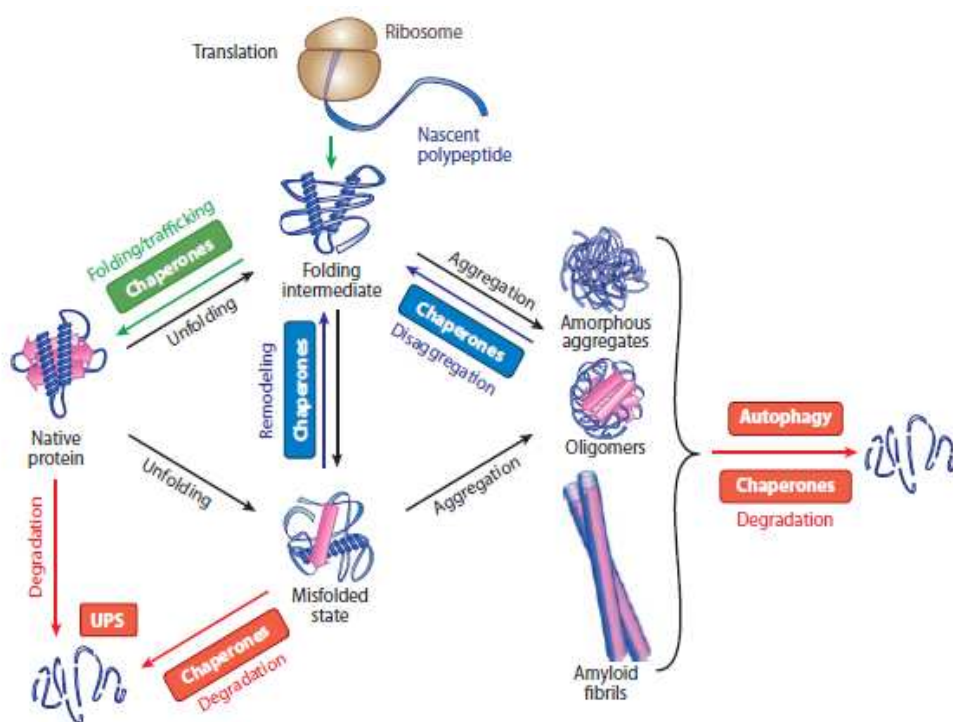


Figura 2 - Ruolo centrale degli chaperon molecolari nella proteostasi (tratto da Kim Y.E. et al. [13]).

2.2. Controllo di qualità del reticolo endoplasmatico: ERAD e UPR

Circa un terzo del proteoma viene sintetizzato nel RE: questo organello intracellulare è il sito deputato alla sintesi, al ripiegamento e alle modificazioni post-traduzionali delle proteine di membrana e secrete. Il RE possiede un sistema di controllo di qualità intrinseco che verifica che solo le proteine correttamente ripiegate e funzionanti lascino il RE, mentre proteine *misfolded* o anomale vengono trattenute e poi indirizzate allo smaltimento. Il sistema di controllo che interviene in questa fase è noto col nome di degradazione associata al RE (ERAD). L'ERAD è un processo tramite il quale proteine danneggiate o irreparabilmente *misfolded*, localizzate nel lume o sulla membrana del RE, sono indirizzate alla degradazione proteasomale. L'ERAD prevede diversi step: (1) il riconoscimento delle proteine anomale, promosso in parte da chaperon molecolari come la *Glucose Regulated Protein 78* (GRP78), una foldasi ATP-dipendente localizzata nel RE; (2) il trasporto delle proteine target attraverso la membrana del RE (retrotraslocazione) e la loro ubiquitinazione, processi mediati da un complesso E3 ligasi; (3) il distacco dalla membrana del RE dei substrati ubiquitinati, catalizzato dal complesso ATPasico p97; (4) la degradazione tramite il sistema ubiquitina-proteasoma [14].

In situazioni di stress e di perturbazione della proteostasi, la capacità di ripiegamento proteico e di smaltimento delle proteine *misfolded* del RE può non essere più in grado di sopperire all'incrementata domanda, così che si instaura una situazione di sofferenza (stress del RE) conseguente all'accumulo luminale di proteine non ripiegate o mal ripiegate. Le cellule eucariotiche hanno sviluppato un sistema di controllo, noto con il nome di *Unfolded Protein Response* (UPR), che ha il compito di contrastare gli effetti potenzialmente dannosi dello stress del RE. L'UPR è un processo che porta alla regolazione dei meccanismi di espressione genica, al fine di ridurre il carico proteico a livello del RE; inoltre induce un aumento della capacità di ripiegamento proteico promuovendo l'espressione di chaperon molecolari e di enzimi catalizzatori del ripiegamento proteico residenti nel RE. Queste risposte promuovono il ripristino della proteostasi e del normale funzionamento del RE; tuttavia, in caso di stress cronico o estremamente acuto, l'UPR è anche in grado di condurre la cellula verso l'apoptosi, trasformando una risposta iniziale di sopravvivenza in un segnale di morte volto ad eliminare cellule irreparabilmente danneggiate. L'UPR è indotto da tre principali sensori di stress localizzati sulle membrane del RE, i quali attivano altrettante vie di segnalazione: *PKR-like ER kinase* (PERK), *Inositol-Requiring Enzyme 1* (IRE1) e *Activating Transcription Factor 6* (ATF6) (**Figura 3**) [15]. Nella regolazione dell'attivazione dell'UPR interviene lo chaperon

molecolare GRP78 che agisce come sensore di proteine *misfolded*: GRP78, in condizioni normali, lega i domini luminali di PERK, IRE1 e ATF6 inibendone l'attivazione; in situazioni di stress del RE, le proteine *misfolded* si accumulano e GRP78 si lega saldamente a queste, dissociandosi dai sensori dell'UPR, i quali sono così liberi di attivarsi con le modalità di seguito riportate.

L'attivazione di PERK avviene per oligomerizzazione e autofosforilazione una volta che GRP78 si è dissociato dal suo dominio luminale. PERK fosforila l'*eukariotic translation Initiation Factor 2-alpha* (eIF2 α) portando alla riduzione globale della trascrizione. La conseguente inibizione della sintesi proteica porta ad una rapida riduzione dell'accumulo di proteine nel RE, favorendo il ripristino della proteostasi. Dall'altro lato l'inibizione di eIF2 α causa l'induzione dell'*Activating Transcription Factor 4* (ATF4), un fattore di trascrizione che promuove la risposta di sopravvivenza tramite la modulazione dell'espressione di geni coinvolti nel ripiegamento proteico, nella risposta antiossidante, nell'autofagia e nel metabolismo degli amminoacidi [15]. ATF4 è anche indispensabile per la transizione da una risposta di tipo adattivo ad una pro-apoptotica: ATF4 induce infatti la trascrizione di *C/EPB homologous protein* (CHOP), un fattore di trascrizione che porta la cellula alla morte per apoptosi. Prevalentemente CHOP è in grado di modulare l'espressione di diversi membri della famiglia *B-cell CLL/lymphoma 2* (BCL-2): in particolare riduce i livelli di BCL-2 e di *Myeloid Cell leukemia sequence 1* (MCL-1), entrambe proteine anti-apoptotiche, mentre induce componenti pro-apoptotici, come *BCL-2 Interacting mediator of cell death* (Bim), *p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis* (PUMA) e *BCL-2-associated X protein* (Bax) [16]. CHOP sembra promuovere anche la via estrinseca dell'apoptosi tramite l'induzione dell'espressione dei recettori di morte di membrana, come il *Death Receptor 5* [17]. Un altro importante bersaglio trascrizionale di CHOP è il gene codificante per la proteina *Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34* (GADD34), che promuove la defosforilazione di eIF2 α , generando un meccanismo a feedback negativo che ripristina la trascrizione e la sintesi proteica (**Figura 3**). In caso di stress del RE irrisolto la riattivazione della sintesi proteica porta ad un aggravamento della situazione, con formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e induzione di vie di segnalazione pro-apoptotiche [16].

Il secondo braccio dell'UPR è coordinato da ATF6, un fattore di trascrizione transmembrana, che in seguito a stress del RE viene traslocato tramite vescicole di trasporto nell'apparato del Golgi, dove subisce un taglio da parte di due differenti proteasi, S1P e S2P (proteasi del sito 1 e del sito 2) [18]. In seguito al doppio taglio proteolitico, il dominio N-terminale

citoplasmatico di ATF6 viene liberato e può essere traslocato nel nucleo, dove attiva la trascrizione di una serie di geni target dell'UPR, tra cui diversi chaperon molecolari, come GRP78 e la *Glucose Regulated Protein 94* (GRP94), e catalizzatori del ripiegamento, come le proteine disolfuro isomerasi [15]. Modulando i livelli di proteine coinvolte nel ripiegamento proteico, ATF6 gioca un ruolo chiave nel ripristino della proteostasi a livello del RE.

Il terzo braccio dell'UPR è rappresentato dalla via attivata da IRE1. In risposta allo stress del RE, IRE1 dimerizza e si autofosforila, il cambio conformazionale che ne deriva attiva il suo dominio intracellulare con attività endoribonucleasica. IRE1 attivato taglia diversi RNA ed in particolare determina lo *splicing* non convenzionale (rimozione di 26 nucleotidi) dell'mRNA della *X-box Binding Protein 1* (XBP1), permettendo così la sintesi della proteina XBP1s. Questa proteina, generata dalla variante di *splicing*, è un fattore di trascrizione che controlla l'espressione di geni coinvolti nel ripiegamento proteico (come GRP78 e GRP94), nella secrezione, nell'ERAD e nella sintesi dei lipidi [15]. IRE1 ha come effetto principale quello di promuovere la sopravvivenza cellulare, tuttavia, questo sensore di stress del RE può anche contribuire all'attivazione di segnali pro-apoptotici. In particolare IRE1 richiama il *Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor-2* (TRAF-2) sulla membrana del RE e il complesso che ne deriva attiva la *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), la quale induce una via di segnalazione che porta all'inibizione di proteine anti-apoptotiche, come BCL-2, BCL-XL e MCL-1, e all'attivazione di BIM e del *BH3 interacting-domain death agonist* (BID), entrambi induttori dell'apoptosi [16]. La segnalazione persistente di IRE1 può quindi supportare la risposta di morte cellulare promossa dalla via PERK-p-eIF2 α -ATF4-CHOP.

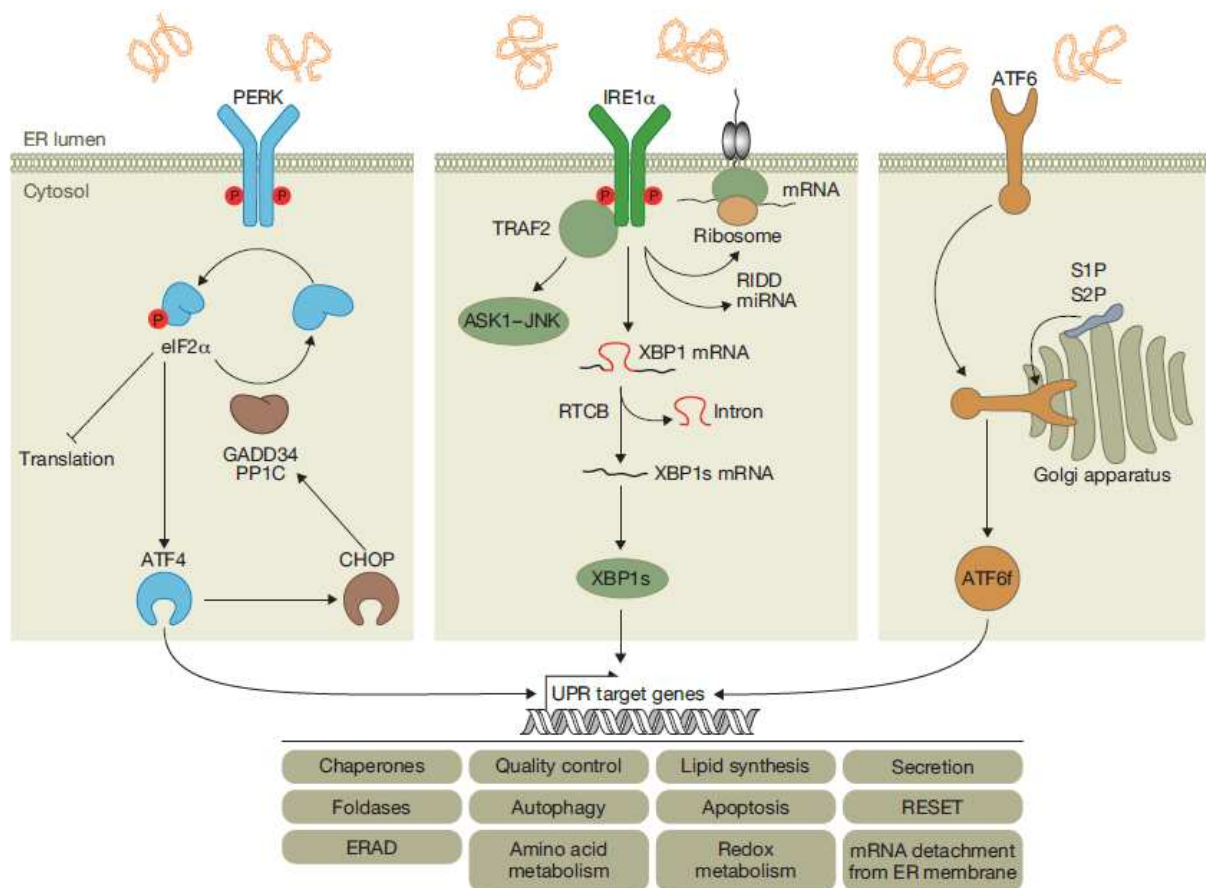


Figura 3 - Le tre vie di segnalazione dell'UPR (tratto da Hetz C. et al. [15]).

2.3. Sistema ubiquitina-proteasoma

Il sistema ubiquitina-proteasoma è deputato alla degradazione di proteine *misfolded* citoplasmatiche o, come illustrato nel paragrafo precedente, derivate dal RE e di piccole proteine a breve emivita, come quelle coinvolte nella progressione del ciclo cellulare, nella risposta allo stress, nel riparo del DNA, nel differenziamento, etc. Essendo responsabile della degradazione di proteine chiave delle principali vie di segnalazione intracellulare, il proteasoma è una componente fondamentale della regolazione delle funzioni e della sopravvivenza della cellula.

Le proteine per essere riconosciute e degradate dal proteasoma devono essere poliubiquitinate, cioè legate covalentemente ad una catena composta da almeno quattro molecole di ubiquitina (peptidi conservati di 76 amminoacidi). La poliubiquitinazione delle proteine richiede tre fasi, ognuna catalizzata da una diversa classe di enzimi (**Figura 4a**): inizialmente l'ubiquitina viene legata dall'enzima ATP-dipendente di attivazione dell'ubiquitina (E1), nella seconda fase l'ubiquitina viene trasferita su un membro della famiglia di enzimi di coniugazione dell'ubiquitina (E2) e infine interviene la famiglia di ubiquitina-proteina ligasi (E3) che catalizza il trasferimento della molecola di ubiquitina su un residuo di lisina della proteina bersaglio [19]. Successive molecole di ubiquitina possono essere legate alla lisina-48 dell'ubiquitina già connessa al substrato, determinando la formazione di una catena di 4 o più molecole di ubiquitina che funge da segnale di degradazione [20]. La proteina poliubiquitinata è quindi riconosciuta dal proteasoma, il quale degrada la proteina bersaglio, mentre le molecole di ubiquitina vengono rimosse e riciclate.

Il proteasoma è un complesso multimerico (26S), in cui si distinguono tre principali componenti: il complesso catalitico (20S), che comprende una struttura cilindrica centrale con attività proteolitica, e i due complessi regolatori (19S), i quali possiedono attività ATPasica e sono coinvolti nel riconoscimento e nel distacco delle catene di ubiquitina. Il complesso centrale 20S ha una struttura cilindrica creata dall'assemblaggio di quattro anelli, due esterni composti ciascuno da sette diverse subunità α e due anelli interni costituiti da sette subunità β (**Figura 4b**). L'attività proteolitica del proteasoma è svolta da tre delle subunità β : la subunità β_1 ha attività caspatica (taglia dopo amminoacidi acidi), la β_2 mostra attività triptica (rimuove amminoacidi basici) e la β_5 possiede attività chimotriptica (agisce sugli amminoacidi idrofobici) [21]. I complessi 19S sono divisi in due parti: la base, composta da sei proteine con attività ATPasica (Rpt1-5) e cinque proteine non-ATPasiche (Rpn1, Rpn2, Rpn10 e Rpn13), e il coperchio, composto solamente da proteine non-ATPasiche (Rpn3,

Rpn5-9, Rpn11 e Rpn12) (**Figura 4b**) [22]. Le proteine Rpn sono coinvolte nel riconoscimento dell'ubiquitina, inoltre Rpn11 possiede un'attività isopeptidasi, che le consente di staccare l'ubiquitina dalla proteina, permettendone il riciclo [11, 22]. Le proteine Rpt con proprietà ATPasica sono invece deputate a denaturare le proteine e a favorire il loro ingresso nel canale del complesso 20S del proteasoma [22].

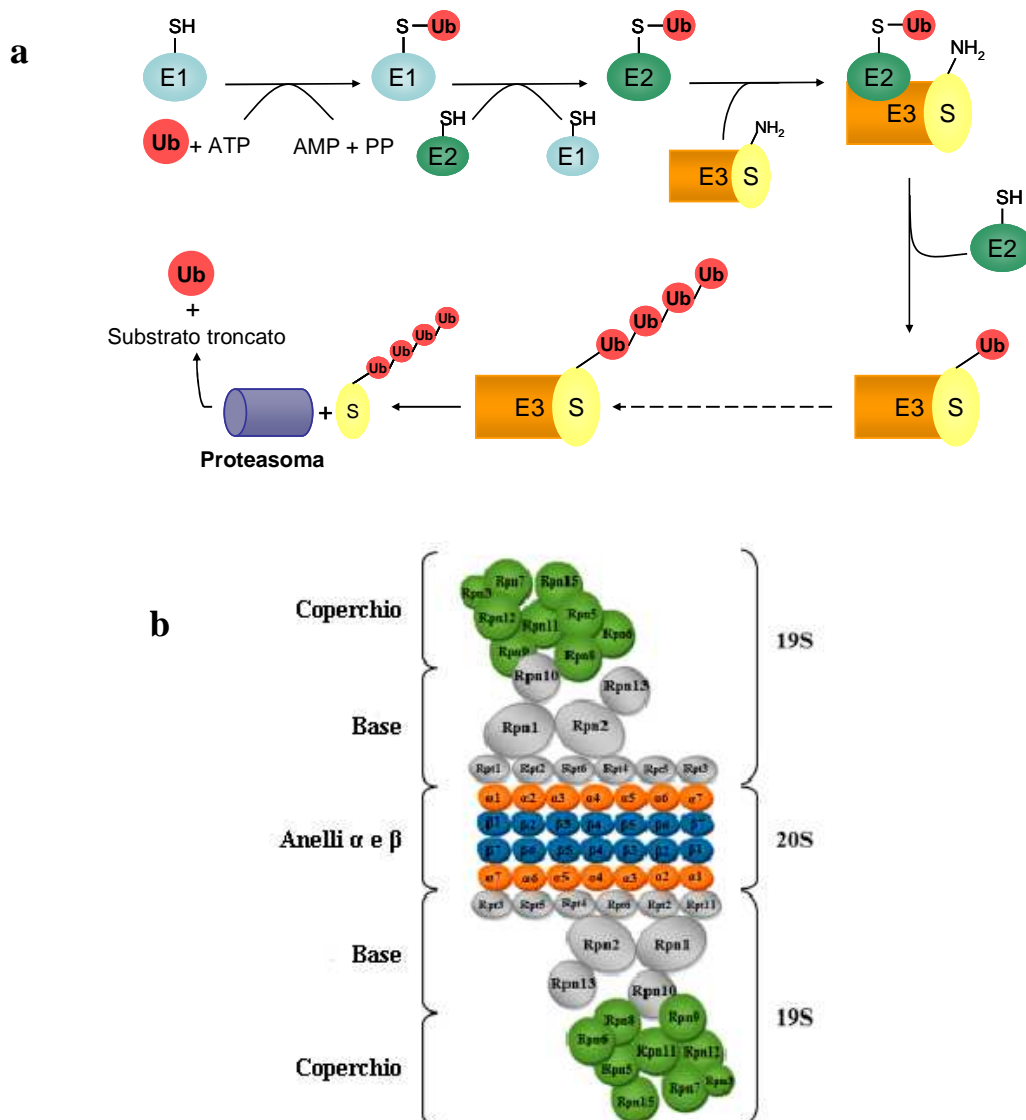


Figura 4 – Poliubiquitinazione e struttura del proteasoma. (a) L'ubiquitina (Ub) viene legata all'enzima di attivazione (E1) tramite una reazione ATP-dipendente; successivamente l'ubiquitina viene trasferita su una cisteina dell'enzima di coniugazione (E2). L'ubiquitina-proteina ligasi (E3) è in grado d'interagire in modo specifico con il substrato proteico da ubiquitinare (S) e con E2 e catalizza il trasferimento dell'ubiquitina da E2 al substrato. Il ciclo può riprendere ed ulteriori molecole di ubiquitina vengono legate, formando una catena. Il substrato poliubiquitinato può quindi essere riconosciuto dal proteasoma, dove viene degradato in piccoli frammenti di 2-22 amminoacidi, mentre l'ubiquitina, una volta rimossa, viene riciclata. (b) Struttura del proteasoma (modificato da Diaz-Villanueva J.F. et al. [16]).

2.4. Autofagia

L'autofagia è un processo attraverso il quale proteine a lunga emivita, aggregati proteici, organelli danneggiati ed altro materiale intracellulare di rifiuto vengono indirizzati alla degradazione lisosomiale. Sono stati caratterizzati tre principali tipi di autofagia:

- microautofagia: l'invaginazione della membrana lisosomiale ingloba piccole porzioni di citoplasma [23];
- autofagia mediata da chaperon molecolari: proteine con una sequenza pentapeptidica KFERQ vengono riconosciute dalla proteina *Heat-shock cognate protein of 70 kDa* (Hsc70) e internalizzate dal lisosoma grazie al trasporto mediato dalla proteina associata alla membrana lisosomiale 2A (LAMP2A) [24];
- macroautofagia: un processo non selettivo che porta al sequestro e alla conseguente degradazione di materiale citoplasmatico, anche di grosse dimensioni, come organelli citoplasmatici.

La macroautofagia (di seguito indicata solo come autofagia) è la via autofagica meglio caratterizzata (**Figura 5**). Essa inizia con la fase di nucleazione del fagoforo (doppia membrana d'isolamento), il quale successivamente si allunga e si espande inglobando i materiali di rifiuto della cellula. Al termine della fase di allungamento, il fagoforo si chiude portando alla formazione dell'autofagosoma. In fase di maturazione l'autofagosoma può fondersi con gli endosomi formando una vescicola intermedia nota con il nome di anfisoma. L'ultimo *step* prevede la fusione con il lisosoma, con la conseguente formazione dell'autolisosoma, all'interno del quale il materiale sequestrato viene degradato; le macromolecole che ne derivano sono restituite al citoplasma tramite permeasi per poter essere riutilizzate per la sintesi di ATP o per l'anabolismo cellulare. In questo articolato processo intervengono numerose proteine che si associano in un ordine ben preciso una volta che l'autofagia viene indotta (**Figura 5**). Inizialmente, per la nucleazione della struttura a doppia membrana, vengono reclutati due complessi: il primo è il complesso ULK (*Uncoordinated-51-Like Kinase*), il quale contribuisce a richiamare il secondo complesso, detto complesso PI3KCIII (*Class III PhosphoInositide-3 Kinase*) [25]. Il complesso PI3KCIII comprende Vps34, una proteina con attività chinasi, che contribuisce all'arricchimento del fagoforo con il fosfatidilinositolo-3-fosfato (PI3P), componente essenziale per la corretta nucleazione della doppia membrana del fagoforo e per il reclutamento di altre proteine connesse con l'autofagia (proteine Atg). Nella fase di elongazione del fagoforo e di maturazione dell'autofagosoma intervengono due sistemi di coniugazione: il complesso multimerico

Atg12-Atg5-Atg16L e il complesso di LC3 (*microtubule-associated protein 1 Light Chain 3*) coniugato con la fosfatidiletanolamina [25]. Entrambi questi complessi si formano durante l'attivazione dell'autofagia e si vanno a localizzare sulla doppia membrana nascente contribuendo all'allungamento del fagoforo e alla maturazione dell'autofagosoma. Il complesso Atg12-Atg5-Atg16L, una volta assemblato, si situa sulla membrana esterna e si distacca poco prima del completamento dell'autofagosoma. Tale complesso inoltre facilita l'attività di Atg7 e Atg3, due proteine che cooperano per mediare la coniugazione della forma citosolica di LC3 (LC3-I) con la fosfatidiletanolamina, portando alla sintesi della forma lipidata (LC3-II) che localizza sul fagoforo in allungamento, sia sulla membrana interna che su quella esterna (**Figura 5 e 6**) [25]. Una volta che l'autofagosoma ha completato la sua maturazione, le molecole di LC3-II situate sulla faccia citoplasmatica sono rimosse per idrolisi della fosfatidiletanolamina da parte della proteasi Atg4 e vengono quindi riciclate, mentre quelle localizzate sulla faccia interna dell'autofagosoma sono degradate con il resto del contenuto dell'autofagolisosoma [25].

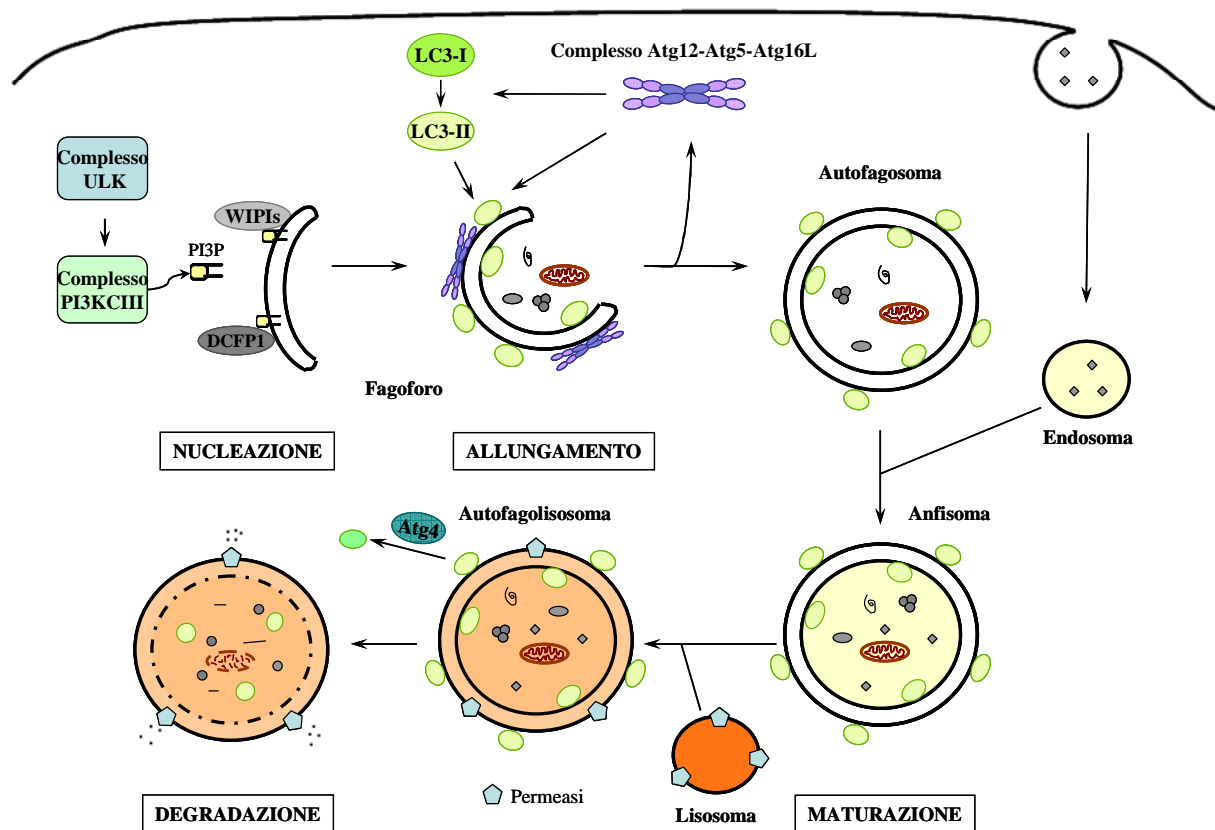


Figura 5 - Macroautofagia (modificato da Naponelli V. et al. [26]). Rappresentazione schematica delle varie fasi del processo autofagico: nucleazione ed allungamento del fagoforo, chiusura del fagoforo con formazione dell'autofagosoma; fusione con l'endosoma e maturazione dell'autofagolisoma; finale degradazione del materiale inglobato nell'autofagolisoma.

L'autofagia è costitutivamente attiva nelle cellule, ma viene fortemente indotta da situazioni di stress metabolico, come in caso di deprivazione di nutrienti o fattori di crescita, stress ossidativo, ipossia, etc. In condizioni di stress, l'autofagia agisce primariamente come meccanismo protettivo volto al ripristino dell'omeostasi cellulare tramite la degradazione di organelli danneggiati o lo smaltimento di proteine anomale e/o aggregate che potrebbero risultare dannose per la cellula; l'autofagia contribuisce inoltre al mantenimento della produzione di ATP e all'anabolismo, tramite il riciclo degli amminoacidi. Pur essendo principalmente un meccanismo di sopravvivenza, diverse evidenze suggeriscono un ruolo dell'autofagia anche nei processi di morte cellulare caspasi-indipendente, tant'è che è stato coniato il termine di morte cellulare programmata di tipo II o legata all'autofagia [27].

L'induzione dell'autofagia è caratterizzata dalla rapida modificazione post-traduzionale di una serie di proteine, tra cui numerose proteine Atg, e da una successiva risposta a lungo termine di regolazione trascrizionale di geni coinvolti nell'autofagia [28]. Le vie di regolazione dell'autofagia meglio caratterizzate sono due: la via del complesso 1 del bersaglio della rapamicina nel mammifero (mTORC1) e la via della chinasi attivata dall'adenosina monofosfato (AMPK) (**Figura 6**). La proteina mTORC1 è un sensore dello stato energetico e nutrizionale della cellula ed è regolato da numerosi segnali, tra cui fattori di crescita, amminoacidi e agenti di stress. In condizioni nutrizionali adeguate, mTORC1 interagisce direttamente con ULK1, componente essenziale del complesso ULK, impedendo la sua interazione con gli altri componenti del complesso. In seguito a condizioni di carenza di nutrienti o di stress, mTORC1 viene inibito e si dissocia da ULK1, il quale può quindi traslocare dal citosol al fagoforo per dare il via al processo autofagico assemblandosi con gli altri componenti del complesso ULK [29]. Anche AMPK agisce come sensore energetico, è infatti attivato dall'aumento del rapporto AMP/ATP che si verifica in caso di carenza di nutrienti o ipossia. AMPK regola positivamente il complesso ULK, sia tramite una diretta fosforilazione di ULK1, sia tramite l'inibizione di mTORC1 [29]. Come illustrato in **Figura 6**, oltre ad ULK1, numerosi sono i possibili punti di regolazione dell'autofagia. Ad esempio, l'assemblaggio del complesso PI3KCIII è regolato da una serie di proteine che agiscono come inibitori (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 e Rubicon) ed altre che favoriscono la formazione del complesso (Atg14, UVRAG, Ambra-1, Bif-1 e VMP-1) [30, 31]. Inoltre, numerose chinasi regolano l'autofagia tramite la modificazione post-traduzionale di proteine Atg o proteine connesse con la modulazione dell'autofagia: ad esempio, la fosforilazione di Beclin 1, componente chiave del complesso PI3KCIII, da parte della protein-chinasi morte-associata

(DAPK) ne causa la dissociazione dal complesso Beclin 1-Bcl-XL/Bcl-2, favorendo l'interazione con Vps34 e quindi l'attivazione dell'autofagia; la fosforilazione di Bcl-2 dalla c-Jun chinasi N-terminale (JNK-1) o dalla chinasi regolata da segnali extracellulari (ERK) riduce l'interazione con Beclin 1 promuovendo l'autofagia; infine, la fosforilazione di LC3 da parte della protein-chinasi A e C (PKA e PKC) porta ad un'inibizione della via autofagica [32].

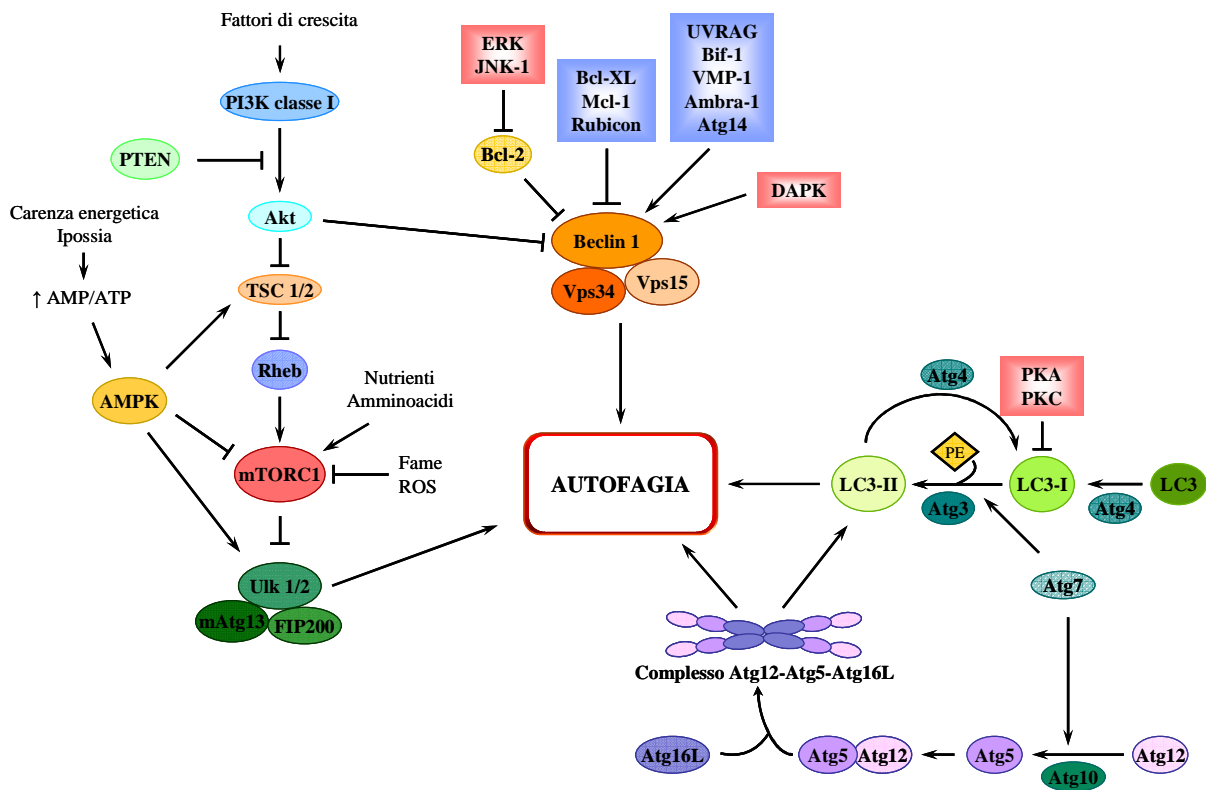


Figura 6 - Rappresentazione schematica dei principali meccanismi di regolazione dell'autofagia (modificato da Naponelli V. et al. [26]). Beclin 1-Vps34-Vps15 = complesso PI3KCIII; Ulk1/2-mATG13-FIP200 = complesso ULK; PTEN = omologo della tensina e della fosfatasi; Akt = proteina nota anche come protein-chinasi B; TSC1/2 = sclerosi tuberosa complesso 1/2; Rheb = Ras omologo arricchito nel cervello; ROS = specie reattive dell'ossigeno; PE = fosfatidiletanolamina. Proteine che interagiscono con il complesso PI3KCIII (riquadri blu): Bcl-XL = B-cell linfoma-extra large; Mcl-1 = leucemia a cellule mieloidi 1; Rubicon; UVRAG = gene associato alla resistenza alle radiazioni UV; Bif-1 = fattore 1 interagente con Bax; VMP-1 = proteina della membrana vacuolare 1; Ambra-1 = regolatore 1 dell'autofagia/Beclin-1; Atg14 = proteina associata all'autofagia 14. Chinasi coinvolte nell'autofagia (riquadri rossi): ERK; JNK-1; DAPK; PKA; PKC.

2.5. Proteostasi nel tumore

L'omeostasi cellulare è costantemente sottoposta a perturbazioni a causa dei continui cambiamenti dell'ambiente. In particolare, le cellule tumorali risultano essere sottoposte ad enormi stress: la rapida proliferazione cellulare e l'inadeguata vascolarizzazione portano ad una carenza di nutrienti e causano ipossia, situazioni che hanno un impatto significativo sull'omeostasi cellulare ed in particolare sulla proteostasi. In aggiunta, le cellule tumorali presentano numerose mutazioni ed un'attività trascrizionale aumentata che causano un accumulo di proteine anomale e/o mal ripiegate. Per queste ragioni le cellule trasformate risultano essere fortemente dipendenti dai meccanismi di mantenimento della proteostasi.

Come risposta adattativa agli stress ambientali, le cellule tumorali aumentano l'efficacia dei meccanismi di controllo della proteostasi, ad esempio i livelli di GRP78 e di alcune delle più importanti Hsp (Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70 e Hsp90) risultano essere incrementati in molti tipi di tumori; l'attività di questi chaperon molecolari correla con la proliferazione, nonché con la capacità di invasione e metastatizzazione delle cellule tumorali [33]. Gli stress ambientali alterano in special modo l'omeostasi del RE, il quale, di fatto, agisce come sensore di stress: la carenza di glucosio, l'acidosi, l'ipossia e la produzione di ROS inducono infatti l'attivazione dell'UPR come meccanismo adattativo e di sopravvivenza delle cellule cancerose. Diverse evidenze hanno dimostrato come l'UPR svolga un ruolo importante nella crescita e nello sviluppo del tumore attraverso diversi meccanismi: (1) contrasta l'accumulo di proteine *misfolded* modulando la trascrizione ed inducendo chaperon molecolari ed enzimi coinvolti nei meccanismi di controllo di qualità delle proteine; (2) promuove la risposta allo stress ossidativo tramite la regolazione dell'espressione di enzimi antiossidanti, ad esempio tramite la via PERK-Nrf2 (*Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2*) [34]; (3) promuove la trascrizione di fattori pro-angiogenetici, come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) attraverso la via PERK-p-eIF2 α -ATF4 [35]. La capacità di modulare a proprio favore l'UPR rende il tumore particolarmente adatto a sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli, come in presenza di agenti chemioterapici. Tuttavia, come già detto nel paragrafo 2.2, l'UPR è una risposta bivalente della cellula sottoposta a stress del RE: un lieve stress attiva la via di sopravvivenza, mentre uno stress estremamente acuto o uno stress cronico inducono l'attivazione della via pro-apoptotica dell'UPR, prevalentemente tramite la via PERK-p-eIF2 α -ATF4-CHOP. Questa bivalenza rende l'UPR un possibile interessante bersaglio per promuovere la morte delle cellule tumorali: si può sfruttare da una parte l'inibizione di componenti dell'UPR per abrogare i meccanismi adattativi e di sopravvivenza

e dall'altra si può favorire il sovraccarico dell'UPR con conseguente induzione della via pro-apoptotica. Tra l'altro, la forte dipendenza delle cellule tumorali da questo meccanismo di risposta allo stress del RE rende l'UPR un bersaglio selettivo e specifico. In aggiunta, diversi agenti antitumorali sono in grado di indurre lo stress del RE, rendendo le cellule tumorali ancor più dipendenti dai meccanismi dell'UPR. L'utilizzo di strategie terapeutiche che combinino inibitori/attivatori dell'UPR con agenti chemioterapici convenzionali potrebbe quindi ridurre la resistenza ed incrementare la sensibilità al trattamento.

Nello sviluppo di nuovi farmaci che agiscono sull'UPR, bisogna tenere in considerazione che questo meccanismo di risposta è strettamente connesso con gli altri sistemi di regolazione della proteostasi, tra cui, come già detto, il proteasoma, ma anche l'autofagia. L'autofagia, come l'UPR, è un meccanismo sfruttato dalle cellule per adattarsi agli stress ambientali: ipossia, carenza di nutrienti (glucosio e amminoacidi) e danni da stress ossidativi sono i principali stimoli attivanti l'autofagia. Come accennato nel paragrafo 2.4, anche l'autofagia ha un doppio ruolo: da una parte agisce favorendo la sopravvivenza cellulare grazie alla sua capacità di rimuovere aggregati proteici e organelli danneggiati e di ripristinare l'omeostasi energetica, dall'altra parte risulta essere un meccanismo di morte cellulare attivato in risposta a danni irreparabili della cellula. Nelle cellule tumorali questo duplice ruolo è ancor più evidente: in molti tumori si è osservato una riduzione dei livelli di Beclin 1, inoltre, molti altri geni Atg (Atg4, Atg5, Atg7, UVRAG, Bif-1) e regolatori dell'autofagia (p53, PTEN, DAPK) sono considerati soppressori del tumore e risultano spesso ipoespressi nei tumori [36]. Queste evidenze dimostrano un ruolo antitumorale dell'autofagia, che può essere associato alla sua capacità di eliminare organelli danneggiati, soprattutto i mitocondri, riducendo così lo stress ossidativo e impedendo che queste alterazioni possano contribuire all'instabilità genomica della cellula e quindi alla trasformazione oncogenica e progressione tumorale. Dall'altra parte, però, l'autofagia risulta essere attivata nelle fasi più avanzate della carcinogenesi; in particolare tale attivazione si osserva nelle zone interne della massa tumorale, ossia quelle più esposte agli stress ambientali connessi allo scarso apporto di sangue [37]. Inoltre, è stato dimostrato che molti agenti chemioterapici inducono l'autofagia come meccanismo di sopravvivenza e di resistenza al trattamento [38].

Nell'individuare nuove strategie di trattamento antitumorale che abbiano come bersaglio la proteostasi bisogna quindi tenere in considerazione l'interconnessione esistente tra i diversi *pathway* di regolazione della proteostasi. Una volta acquisite le conoscenze su tali

interconnessioni esistenti nel tumore in analisi, sarebbe vantaggioso puntare ad utilizzare combinazioni di farmaci che vadano a regolare diverse vie contemporaneamente.

3. CATECHINE DEL TÈ VERDE

Il tè, una bevanda ottenuta dall'infusione in acqua di foglie di *Camellia sinensis*, è la seconda bevanda più bevuta al mondo dopo l'acqua. Il tè è particolarmente noto per il suo alto contenuto di antiossidanti polifenolici, in particolare di flavan-3-oli e flavonoli, ed è da lungo tempo considerato dall'antica medicina cinese una bevanda curativa e benefica.

I tre principali tipi di tè consumati, il tè nero, il tè verde e il tè oolong, si differenziano per i processi di lavorazione a cui vengono sottoposte le foglie di tè. Per il tè nero e oolong le foglie vengono essiccate e poi macerate, queste procedure causano l'attivazione del processo di fermentazione operato da enzimi (come la polifenolo ossidasi) contenuti all'interno delle foglie stesse, i quali ossidano rapidamente la maggior parte dei polifenoli semplici trasformandoli in composti polifenolici più complessi, quali teaflavine e tearubigine [39]. Per produrre il tè verde invece, le foglie, prima di essere essiccate, vengono passate rapidamente al vapore, in modo da inattivare gli enzimi ossidanti. Il tè verde, non subendo alcun processo di ossidazione durante la lavorazione, mantiene una composizione chimica molto simile a quella delle foglie: esso risulta quindi particolarmente ricco (25-35% del peso secco) di composti fenolici, soprattutto di flavan-3-oli semplici, chiamati anche catechine (90% della frazione polifenolica totale) [40]. Questi polifenoli contenuti nel tè sono potenti antiossidanti con comprovati effetti benefici sulla salute umana. Diversi studi epidemiologici e clinici hanno messo in evidenza come l'assunzione di tè verde e dei suoi costituenti polifenolici sia in grado di ridurre il rischio di sviluppare numerose patologie, tra cui malattie cardiovascolari, malattie neurodegenerative, sindrome metabolica e diversi tipi di tumori [41]. Questi effetti risultano essere principalmente mediati dalle catechine del tè verde. Le quattro principali catechine del tè verde (**Figura 7**) sono l'epigallocatechina-3-gallato (EGCG), l'epigallocatechina, l'epicatechina-3-gallato e l'epicatechina; tra queste la principale e maggiormente attiva dal punto di vista biologico risulta essere l'EGCG [42]. Le catechine del tè verde possiedono molteplici attività biologiche dimostrate da diversi studi in vitro ed in vivo, come l'attività antiossidante, antibatterica, anti-infiammatoria, ipocolesterolemizzante, antimutagena e antitumorale.

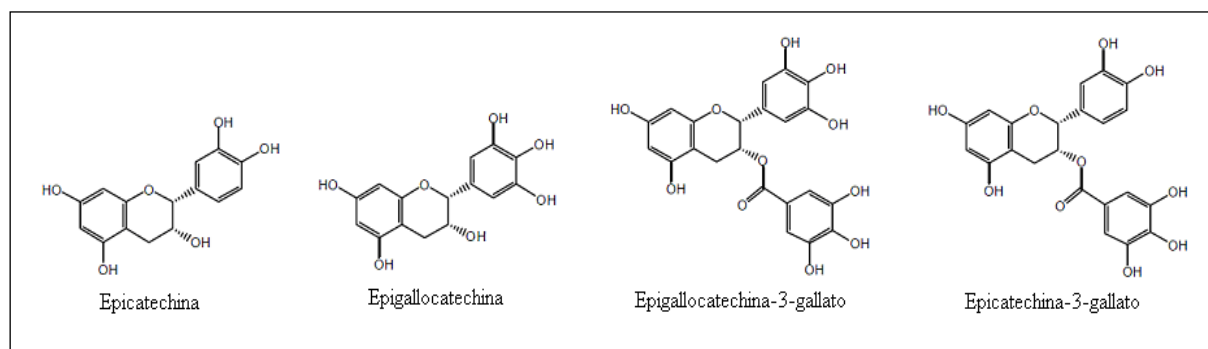


Figura 7 - Struttura chimica delle principali catechine contenute nel tè verde.

3.1. Catechine del tè verde e carcinoma prostatico

Diversi studi epidemiologici hanno analizzato l'associazione tra consumo di tè e rischio di sviluppo del CaP: una recente meta-analisi conferma che un elevato consumo di tè risulta essere correlato con una minore incidenza del CaP [43]. L'efficacia delle catechine del tè verde nel ritardare lo sviluppo del tumore e la sua progressione metastatica è stata dimostrata da studi in diversi modelli animali, soprattutto topi TRAMP (*TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*), modello transgenico di carcinogenesi prostatica spontanea [44-47]. Questi studi preclinici, in associazione alle evidenze epidemiologiche, hanno aperto la strada a studi clinici volti ad indagare il potenziale effetto antitumorale e chemiopreventivo delle catechine del tè verde sul CaP. In questi studi, per ridurre gli effetti collaterali (dovuti principalmente alla caffeina contenuta nel tè verde) e per garantire l'assunzione di quantità esatte di catechine del tè verde, sono state utilizzate principalmente compresse di EGCG purificato o compresse di estratti di tè verde standardizzati (come il Polyphenon E), contenenti oltre il 50% di EGCG e caratterizzati da un basso contenuto di caffeina (< 1%). Studi clinici di fase I/II hanno dimostrato una buona tollerabilità di dosi fino a 1600 mg al giorno di EGCG [48, 49] e fino a 800 mg al giorno di estratti di tè verde [49, 50]. In seguito ad una regolare assunzione per 4 settimane di Polyphenon E o EGCG puro (pari a 800 mg/die di EGCG) è stato dimostrato che è possibile raggiungere livelli plasmatici massimi di EGCG pari a circa 0,3-0,6 μM [51]. In studi clinici di fase II a breve termine, gli estratti di tè verde non hanno mostrato significativi effetti antitumorali in pazienti affetti da CaP avanzato e androgeno-indipendente [52-54]. Del tutto incoraggianti sono invece i risultati riportati dal primo studio clinico di fase II randomizzato e in doppio cieco dove è stato valutato l'effetto chemiopreventivo di estratti di tè verde in uomini con lesioni premaligne (HG-PIN) di CaP [55]. In questo studio la somministrazione di 600 mg di estratti di tè verde (200 mg per 3

volte al giorno) a 30 uomini con HG-PIN ha determinato, ad un anno dall'inizio del trattamento, una riduzione di oltre l'80% dell'insorgenza di CaP, rispetto al gruppo placebo. Inoltre, un successivo follow-up di 2 anni ha mostrato come questo effetto protettivo venga mantenuto nel tempo, nonostante l'interruzione dell'assunzione degli estratti di tè verde [56]. In uno studio più recente con un disegno sperimentale simile (studio caso-controllo, randomizzato, in doppio cieco), che prevedeva la somministrazione di Polyphenon E (2 capsule al giorno contenenti 200 mg di EGCG ciascuna) in uomini con lesioni prostatiche pre-maligne, non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra il gruppo trattato ed il gruppo placebo per quanto riguarda l'incidenza del CaP a un anno dall'inizio del trattamento [57]. In questo studio, a differenza del precedente, la popolazione analizzata includeva non solo pazienti con lesioni HG-PIN, ma anche pazienti con ASAP [57].

In generale, questi studi suggeriscono come le catechine del tè verde possono giocare un ruolo importante nella lotta al CaP, soprattutto se utilizzati come agenti chemiopreventivi. Tuttavia, recentemente, diversi studi hanno messo in evidenza l'effetto antitumorale sinergico che si sviluppa dall'associazione dell'EGCG con altri composti chemioterapici e ciò ha notevolmente accresciuto l'interesse verso l'utilizzo dell'EGCG anche come terapeutico/adiuvante da associare ai più tradizionali trattamenti o ai composti di nuova generazione [58, 59].

3.2. Meccanismi molecolari delle catechine del tè verde nel carcinoma prostatico

Le catechine del tè verde sono in grado di modulare diverse fasi della carcinogenesi del CaP: studi in vitro, pre-clinici e clinici hanno dimostrato come le catechine del tè verde agiscano riducendo la proliferazione cellulare, inducendo l'apoptosi, limitando l'angiogenesi, l'invasione e la metastatizzazione del tumore. I principali meccanismi d'azione delle catechine del tè verde sono di seguito dettagliate e riassunte in **Tabella 3**.

Modulazione di vie di trasduzione del segnale ed inibizione della proliferazione cellulare

È stato dimostrato che il recettore per la laminina di 67 kDa (67LR) rappresenta un target specifico dell'EGCG [60]. Il 67LR è un recettore di membrana che lega ad alta affinità la laminina-1, componente della matrice extracellulare e principale glicoproteina della lamina basale [61]. Questo recettore è quindi coinvolto nell'interazione diretta della cellula con la matrice extracellulare ed è anche coinvolto nella trasduzione dei segnali che derivano da

questa interazione: la sua attivazione determina ad esempio un aumento della motilità cellulare ed una modulazione dell'espressione genica. Fisiologicamente, tale recettore agisce principalmente nei processi di angiogenesi, neovascolarizzazione e mobilitazione delle cellule staminali ematopoietiche [61]. Il 67LR è un recettore iperespresso in una grande varietà di cellule tumorali, tra cui le cellule di CaP, ed il suo livello di espressione correla con un aumentato rischio di invasione e metastatizzazione tumorale [61]. L'interazione EGCG-67LR ed il diverso livello di espressione di questo recettore sembrano spiegare la maggiore sensibilità all'EGCG delle cellule tumorali rispetto alle cellule non trasformate. L'interazione dell'EGCG con il 67LR ha un ruolo importante nell'attività antitumorale di questa catechina del tè verde. Tachibana H. e colleghi hanno infatti dimostrato che l'inibizione della proliferazione cellulare da parte dell'EGCG viene ridotta quando è impedito il suo legame con il 67LR [60]. Kumazoe M. e colleghi hanno inoltre caratterizzato una via di segnalazione attraverso la quale si attua l'effetto citotossico dell'interazione EGCG-67LR: è stato dimostrato che l'attivazione del 67LR da parte dell'EGCG determina l'induzione di processi di morte attraverso la via di segnalazione Akt-eNOS-NO-cGMP-PKC δ [62]. Il 67LR è un recettore che si localizza nei *lipid rafts*, regioni della membrana cellulare, particolarmente ricche di colesterolo e sfingolipidi, in cui numerose proteine di membrana tendono ad associarsi per svolgere le loro funzioni, tra cui trasduzione del segnale, traffico vescicolare attraverso la via endocitica e secretoria, interazione col citoscheletro, etc. Diverse evidenze riportano la capacità dell'EGCG di alterare la struttura dei *lipid rafts* e questo effetto comporta l'alterazione dell'attività di recettori tirosin-chinasici ivi localizzati, come l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) e c-Met (entrambi recettori per fattori di crescita) [63, 64] oltre che del 67LR [60, 65].

Le catechine del tè verde ed in particolare l'EGCG agiscono anche modulando due vie di segnalazione particolarmente importanti per la proliferazione del CaP: la via del AR e la via del fattore di crescita insulino-simile (IGF). Come già esposto nel paragrafo 1.2, soprattutto nelle prime fasi di sviluppo della malattia, le cellule di CaP sono particolarmente sensibili agli stimoli proliferativi promossi dagli androgeni (testosterone e DHT). Studi in vitro hanno dimostrato che l'EGCG è un potente inibitore della 5 α -reduttasi, enzima che converte il testosterone nel più potente DHT [66, 67]. In aggiunta, in linee di LNCaP, sia androgeno-responsive che androgeno-indipendenti, l'EGCG agisce inibendo l'espressione di AR, riducendone inoltre la sua attività trascrizionale, come dimostrato dalla diminuita espressione di geni bersagli del AR [68, 69].

Il sistema dell'IGF gioca un ruolo importante nel regolare crescita, differenziazione, sopravvivenza, trasformazione e metastatizzazione dei tumori. Tale sistema comprende due ligandi (IGF-1 e IGF-2), due recettori di membrana (IGF-1R e IGF-2R) e sei diverse proteine leganti IGF (IGFBP), che contribuiscono alla modulazione dell'attività dell'IGF stesso [70]. Ad esempio IGFBP-3 riduce l'attività mitogenica di IGF-1, mentre IGFBP-2 promuove l'effetto di induzione della proliferazione e l'effetto anti-apoptotico sia di IGF-1 che di IGF-2 [70]. Studi clinici in pazienti affetti da CaP hanno osservato un aumento dei dosaggi serici di IGF-1, rispetto ai soggetti sani [71]. Inoltre, è stato evidenziato un aumento dei livelli di IGFBP-2 ed un parallelo decremento di IGFBP-3 sia nel siero che nel tessuto tumorale di pazienti affetti da CaP [71]. In generale, quindi, si può affermare che il sistema dell'IGF risulta alterato nel CaP. Alcune evidenze riportano che cellule di CaP sottoposte a trattamento con EGCG presentano una ridotta proliferazione indotta dall'IGF-1 ed una diminuita attività tirosin-chinasi del recettore per l'IGF-1 [72, 73]. Studi su topi TRAMP hanno inoltre rilevato una riduzione dei livelli di IGF-1 ed un'induzione di IGFBP-3, a livello sierico e tissutale, in seguito alla somministrazione di EGCG o estratti di catechine del tè verde [44, 74, 75]. Uno studio interventistico ha inoltre dimostrato che il Polyphenon E induce una significativa riduzione dei livelli serici di IGF-1 e del rapporto IGF-1/IGFBP-3 in pazienti con CaP [54]. Queste evidenze riportano una significativa modulazione del sistema dell'IGF da parte delle catechine del tè verde nel CaP.

Arresto del ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è un processo altamente regolato e numerose proteine sono dedicate al controllo della sua progressione: la transizione da una fase all'altra del ciclo cellulare è regolata dalle cicline, proteine che promuovono l'attività delle chinasi ciclina-dipendenti (CDK). I livelli delle diverse cicline variano significativamente durante il ciclo cellulare, portando alla formazione di specifici complessi ciclina-CDK che permettono alla cellula di attraversare i vari *check-point* del ciclo cellulare. L'attività dei complessi ciclina-CDK è inoltre regolata dall'attività di regolatori negativi, gli inibitori delle CDK (CKI). L'attenta regolazione della sintesi e degradazione di queste proteine è il punto chiave del controllo del ciclo cellulare. Il trattamento con l'EGCG di cellule di CaP induce una deregolazione del ciclo cellulare con arresto in fase G0/G1, conseguentemente all'aumento dei livelli di CKI, come p21, p27, p16 e p18, in associazione ad una riduzione delle cicline E e D1 e delle CDK

2, 4 e 6 [76, 77]. Il blocco del ciclo cellulare rappresenta uno dei principali meccanismi attraverso il quale le catechine del tè verde inibiscono la proliferazione di cellule di CaP.

Induzione dell'apoptosi

L'apoptosi risulta essere uno dei principali meccanismi di morte cellulare indotto in cellule di CaP esposte alle catechine del tè verde. Nelle cellule LNCaP (con p53 *wild type*), l'EGCG induce l'apoptosi mediante due principali meccanismi: (1) la stabilizzazione di p53 tramite l'induzione della sua fosforilazione in specifici residui serinici e tramite la regolazione negativa di *Murine Double Minute 2* (MDM2), un'ubiquitina ligasi che agisce su p53 indirizzandolo alla degradazione proteasomale; (2) la riduzione dell'attività trascrizionale del fattore nucleare kappa B (NF- κ B), fattore trascrizionale che gioca un ruolo essenziale nella regolazione dell'apoptosi e che risulta essere costitutivamente espresso in cellule di CaP [78, 79]. La modulazione di questi fattori trascrizionali da parte dell'EGCG si ripercuote sull'espressione di proteine della famiglia Bcl-2: si verifica infatti un aumento dei livelli della proteina pro-apoptotica Bax e una riduzione di Bcl-2, con conseguente attivazione della cascata apoptotica [78]. In aggiunta l'EGCG induce nelle LNCaP un aumento di Bax e Bak (pro-apoptotiche) e una riduzione di Bcl-XL, della forma fosforilata di Bad (anti-apoptotiche), nonché di inibitori dell'apoptosi, come *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP), *cellular inhibitor of apoptosis protein-1* (cIAP-1), survivina e Smac/Diablo [80]. Lo sbilanciamento del rapporto di queste proteine regolatrici dell'apoptosi indotto dall'EGCG favorisce la morte cellulare programmata in cellule di CaP. Un recente studio ha inoltre messo in evidenza come l'EGCG sia in grado di favorire la via estrinseca dell'apoptosi tramite l'induzione dell'espressione del recettore di morte di membrana DR4 e la concomitante riduzione dei livelli di *Fas-Associated protein with Death Domain* (FADD), proteina che funge da ponte tra il recettore di morte e la procaspasi 8, e di *FLICE-inhibitory protein* (FLIP), regolatore che inibisce l'attivazione della caspasi 8 da parte dei recettori di morte di membrana [80].

Riduzione dell'angiogenesi e della metastatizzazione

L'angiogenesi è di fondamentale importanza per garantire un sufficiente apporto di ossigeno e di nutrienti al tumore, favorendo così la sua crescita e sopravvivenza. I fattori pro-angiogenici come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) vengono indotti in condizioni di ipossia, in seguito all'attivazione del fattore 1α indotto dall'ipossia (HIF- 1α). Sia HIF- 1α che

VEGF risultano essere aumentati nel CaP rispetto al tessuto prostatico normale e all'iperplasia prostatica benigna [81, 82]; inoltre, nei pazienti affetti da CaP si osservano livelli plasmatici di VEGF significativamente più alti rispetto a soggetti sani o con iperplasia prostatica benigna [83]. Il trattamento con EGCG riduce i livelli di VEGF e di angiopoietina 1 e 2 (fattori di crescita angiogenici) in cellule LNCaP [80]. L'EGCG riduce inoltre la secrezione di VEGF e di *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) da parte di fibroblasti stromali isolati da tumori prostatici [54, 84]. Queste evidenze in vitro, sono confermate dagli esiti della somministrazione di EGCG o estratti di catechine del tè verde in vivo: sia in topi TRAMP che in PC3 xenograft in topi atimici si è osservata una riduzione dei livelli plasmatici di VEGF e una riduzione dell'angiogenesi [74, 85]. Infine, uno studio interventistico ha riportato un calo di VEGF e HGF plasmatico anche in pazienti trattati con Polyphenon E [54].

L'angiogenesi gioca un ruolo anche nella metastatizzazione del tumore, ma deve essere necessariamente accompagnata dall'acquisizione da parte della cellula tumorale di un fenotipo migratorio ed invasivo. Le cellule tumorali metastatizzanti sono caratterizzate dalla perdita delle giunzioni intercellulari mediate dall'E-caderina, da una crescita ancoraggio-indipendente e dalla capacità di penetrare la membrana basale ed invadere la matrice interstiziale. Duhon D. e colleghi hanno dimostrato che, l'EGCG è in grado di bloccare la via di segnalazione di c-Met/HGF in cellule prostatiche DU145 [63]. L'iperpressione del recettore di membrana c-Met, tipica di diverse cellule tumorali, tra cui quelle di CaP, correla con una minore differenziazione cellulare ed una maggiore metastatizzazione tumorale [86, 87]. L'HGF secreto dalle cellule stromali si lega a c-Met sulle cellule tumorali vicine determinando l'attivazione di vie di segnalazione intracellulare che stimolano la proliferazione, motilità, invasione e metastatizzazione. L'EGCG somministrato alle DU145 blocca completamente questi effetti mediati da HGF: riduce infatti l'internalizzazione della E-caderina, la motilità e l'invasività cellulare [63]. In studi in topi TRAMP è stato dimostrato che i livelli di E-caderina si riducono col progredire dello sviluppo del CaP, tuttavia la somministrazione di polifenoli del tè verde riduce significativamente questa perdita di E-caderina nel tempo [88]. Le catechine del tè verde agiscono inoltre riducendo la capacità d'invasione delle cellule di CaP, la quale è legata alla produzione di metalloproteasi (MMP) ed altri enzimi capaci di degradare i componenti della matrice extracellulare. L'EGCG è in grado di limitare la migrazione e l'invasione di cellule di CaP tramite la riduzione dei livelli di MMP-2, -3 e -9 prodotte dalle cellule tumorali, accompagnata da un aumento dei livelli dell'inibitore tissutale delle MMP (TIMP-1) [80, 89]. Le MMP-2 e -9, entrambe fondamentali

per la progressione del CaP, sono risultate essere ridotte in diversi modelli murini di CaP trattati con EGCG o estratti di catechine del tè verde [74, 85]. Inoltre, la somministrazione di catechine del tè verde, sia in vitro che in vivo, riduce i livelli dell'urochinasi attivante il plasminogeno (uPA), altro fattore che promuove la metastatizzazione del CaP [74, 80].

Modulazione della proteostasi

In letteratura è riportata la capacità delle catechine del tè verde di inibire l'attività del proteasoma, sia in saggi in vitro che impiegano la subunità 20S del proteasoma purificata, sia in studi che utilizzano estratti cellulari totali o colture cellulari [90, 91]. L'inibizione dell'attività chimotriptica del proteasoma è stata dimostrata anche in diverse linee cellulari di CaP (PC3, LNCaP e DU145) trattate con EGCG [91]. Tale inibizione causa un accumulo di diverse proteine normalmente degradate dal proteasoma, come diversi CKI (ad es. p21 e p27), l'inibitore di NF- κ B (I κ B α) e Bax, proteina pro-apoptotica della famiglia Bcl-2, contribuendo quindi in modo sostanziale all'inibizione della proliferazione e all'induzione della morte cellulare [90-92]. Le catechine del tè verde, inoltre, svolgono il loro effetto anti-tumorale modulando le funzioni del RE [93]. Esse sono infatti in grado di interferire con l'omeostasi del calcio e con funzioni chiave nel processo di maturazione delle glicoproteine e nel controllo di qualità a livello del RE: ad esempio, inibiscono l'attività della glucosidasi-II, un enzima chiave sia nel processamento delle glicoproteine che nel controllo di qualità del RE [93, 94]. Inoltre, l'EGCG lega ed inattiva la proteina glucosio-regolata di 78 kDa (GRP78), chaperon molecolare fondamentale per il controllo di qualità delle proteine a livello del RE [95]. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato, in topi TRAMP, che l'assunzione di estratti di tè verde causa un'alterazione strutturale del RE e del Golgi, con un conseguente deficit del processamento delle proteine secretorie [96]. Inoltre, in uno studio in vitro su diverse linee cellulari di CaP è stato evidenziato che il Polyphenon E è capace di indurre lo stress del RE e l'attivazione delle vie di segnalazione dell'UPR, processi che precedono temporalmente l'induzione dei meccanismi di morte cellulare [77]. Queste evidenze provano la capacità delle catechine del tè verde di modulare diverse proteine o complessi molecolari coinvolti nei processi di mantenimento della proteostasi.

Tabella 3 – Sintesi dei principali meccanismi d'azione delle catechine del tè verde nel CaP.

Meccanismi d'azione delle catechine del tè verde nel CaP	Riferimenti bibliografici
Inibizione della proliferazione cellulare <ul style="list-style-type: none"> • interazione con il 67LR • deregolazione della via del AR: ↓ livelli e attività trascrizionale di AR; ↓ 5α-reduttasi • deregolazione della via dell'IGF-1: ↓ attività tirosin-chinasica dell'IGF-1R; ↓ livelli plasmatici di IGF-1; ↓ rapporto IGF1/IGFBP-3 	[44, 54, 60, 66-69, 72-75]
Arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 <ul style="list-style-type: none"> • ↑ p21, p27, p16 e p18 • ↓ cicline E e D1 • ↓ CDK2, 4 e 6 	[76, 77]
Induzione dell'apoptosi <ul style="list-style-type: none"> • stabilizzazione di p53 • ↑ Bak • ↓ Bcl-2, Bcl-xL, -Bad • ↓ inibitori dell'apoptosi (XIAP, cIAP1, Survivin and Smac/Diablo) • ↓ FADD e FLIP • ↑ DR4 	[78, 80]
Riduzione dell'angiogenesi <ul style="list-style-type: none"> • ↓ HIF-1α • ↓ VEGF • Angiopoietina 1 e 2 	[54, 74, 80, 82]
Soppressione dell'invasione e della metastatizzazione <ul style="list-style-type: none"> • ↓ HGF • ↓ attività c-Met • ↑ E-caderina • ↓ MMP-2, -3 e -9 • ↓ uPA • ↑ TIMP-1 	[63, 80, 88, 89]
Modulazione della proteostasi <ul style="list-style-type: none"> • inibizione del proteasoma • alterazione strutturale del RE e del Golgi • induzione dell'UPR 	[77, 96]

SCOPO DELLA TESI

Lo studio descritto in questa tesi di dottorato si inserisce all'interno di un più ampio progetto volto ad approfondire la conoscenza sui meccanismi d'azione delle catechine del tè verde in cellule di CaP, con particolare attenzione sugli effetti esercitati da questi polifenoli sulla proteostasi. In uno studio in vitro su una linea cellulare di CaP (PC3, cellule metastatiche e androgeno-indipendenti, che non esprimono p53) e su una linea di cellule di epitelio prostatico benigne ma immortalizzate con SV40 (PNT1a) il nostro gruppo di ricerca ha evidenziato che il Polyphenon E è capace di indurre lo stress del RE e l'attivazione delle vie di segnalazione dell'UPR, processi che contribuiscono a condurre le cellule verso la morte programmata [77].

Nella **prima parte** di questa tesi sperimentale abbiamo quindi valutato l'effetto del Polyphenon E su altre 2 linee cellulari di CaP, le LNCaP (androgeno-responsive, con p53 *wild-type*) e le DU145 (metastatiche, androgeno-indipendenti, con p53 mutato), al fine di capire se l'induzione dello stress del RE fosse un meccanismo comune attivato in cellule di CaP in seguito all'esposizione al Polyphenon E.

Le cellule di CaP, come molte altre cellule secretorie, risultano essere particolarmente sensibili alla perturbazione della proteostasi. Per questo motivo, abbiamo ipotizzato che l'associazione delle catechine del tè verde (capaci di provocare stress del RE e UPR) con farmaci induttori dell'UPR potesse indurre un effetto sinergico di perturbazione della proteostasi, con una conseguente attivazione del braccio pro-apoptotico dell'UPR. Ad oggi, i farmaci capaci di indurre l'UPR più sicuri e largamente impiegati sono gli inibitori del proteasoma [97]. Tra i farmaci di questo tipo, il più studiato e caratterizzato è il Bortezomib (BZM), un peptide boronico con capacità di inibire in modo specifico e reversibile l'attività chimotriptica del proteasoma [98, 99]. Il BZM possiede un effetto citotossico su numerosi tipi di tumori, come il carcinoma della mammella, il carcinoma ovarico, pancreatico, prostatico e del colon-retto. Il BZM rappresenta il primo inibitore del proteasoma con comprovati effetti antitumorali in clinica; esso è approvato dalla *Food and Drug Administration* statunitense e dall'Agenzia Europea dei Medicinali per il trattamento di pazienti con mieloma multiplo o linfoma a cellule mantellari. In saggi in vitro, come inibitore del proteasoma, viene ampiamente utilizzato anche l'MG132, un peptide aldeidico, che blocca, in modo reversibile, l'attività chimotriptica del proteasoma [98, 99].

Quindi nella **seconda parte** di questo studio, per valutare la nostra ipotesi sul possibile effetto sinergico di catechine del tè verde ed induttori dell'UPR, abbiamo analizzato in cellule di CaP (PC3) l'effetto della combinazione dell'EGCG con due diversi inibitori del proteasoma (BZM ed MG132). In particolare, abbiamo valutato l'impatto di queste combinazioni sulla vitalità cellulare e sui meccanismi molecolari coinvolti nel controllo della proteostasi, nell'induzione della risposta di stress del RE e nell'attivazione dei processi di morte cellulare programmata.

MATERIALI E METODI

4. REAGENTI ED ALTRI MATERIALI

Il Polyphenon E, estratto standardizzato di tè verde (composizione in **Tabella 4**) è stato fornito dalla Polyphenon Pharma (New York, NY, USA). Una soluzione madre di 5 mg/mL di Polyphenon E in acqua deionizzata è stata preparata fresca ogni volta, sterilizzate per filtrazione e quindi subito diluita in terreno di coltura completo alla concentrazione finale richiesta per ogni esperimento. Il BZM e l'MG132 sono stati acquistati rispettivamente da Millennium Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, MA, USA) e Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Sia il BZM che l'MG132 sono stati disciolti in DMSO in modo da avere una soluzione madre a una concentrazione di 10 mM, questa è stata conservata a -80°C e, al momento dell'uso, è stata scongelata e diluita in terreno di coltura completo. L'EGCG e la clorochina sono stati acquistati da Sigma-Aldrich; questi composti sono stati dissolti in terreno di coltura completo alla concentrazione desiderata e sterilizzati per filtrazione immediatamente prima dell'uso.

Tabella 4 – *Composizione del Polyphenon E*

Polyphenon E	
EGCG	65%
Epigallocatechina	4%
Epicatechina	9%
Epacatechina-3-gallato	6%
Gallocatechina-3-gallato	4%
Catechina-3-gallato	0,2%
Gallocatechina	0,2%
Altre catechine	1,1%
Caffeina	0,7%

5. MODELLI CELLULARI E CONDIZIONI DI CRESCITA

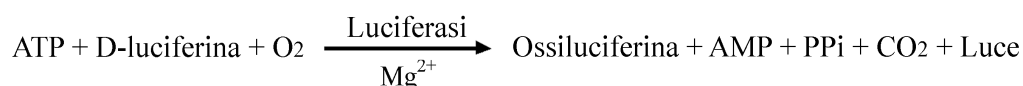
Le linee cellulari PC3, LNCaP e DU145 sono state acquistate dall'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Le PC3 sono state coltivate in terreno DMEM/Ham's F12, ossia da una miscela (1:1) di Dulbecco's Modified Eagle's Medium e Ham's F12 (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), addizionato di siero bovino fetale (FBS) al 10%, L-glutammina 2 mM, penicillina 100 U/mL e streptomicina 100 µg/mL (Lonza, Basel, CH). Le

Il formazano prodotto è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali e può essere quantificato misurando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda tra 420 e 480 nm (assorbanza massima a circa 450 nm).

Il protocollo prevede la rimozione del terreno di coltura e la sua sostituzione con terreno fresco addizionato di reagente WST-1 al 10% (v/v). Dopo 1 ora di incubazione a 37°C, la produzione di formazano è stata quantificata tramite la determinazione dell'assorbanza a 450 nm effettuata con il lettore di piastre EnSpire® (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Per ogni trattamento è stata ottenuta una curva dose-risposta, da cui si sono ricavati i valori di concentrazione inibente la vitalità cellulare per il 50% (IC₅₀) tramite analisi di regressione non-lineare (funzione logistica a quattro parametri) utilizzando il programma SigmaPlot (versione 12.0). I valori di IC₅₀ così calcolati sono stati utilizzati nei successivi esperimenti.

6.2. Saggio ATPlite

Le cellule PC3 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di 1×10^4 cellule per pozzetto. Dopo 24 ore, sono state trattate con 200 µL di terreno DMEM/Ham's F12 completo addizionato di BZM o MG132, in associazione o meno con 5 o 50 µM di EGCG. Dopo 48 ore di trattamento, è stata valutata la quantità di adenosina trifosfato (ATP) intracellulare tramite il kit ATPlite™ Luminescence Assay System (PerkinElmer). L'ATP è un marcatore di vitalità cellulare essendo presente in tutte le cellule metabolicamente attive, inoltre la sua quantità cala rapidamente quando le cellule vanno incontro a necrosi o apoptosi. Il monitoraggio dell'ATP permette quindi di determinare l'effetto citocida, citostatico o proliferativo di farmaci. Il saggio sfrutta la reazione catalizzata dalla luciferasi di lucciola (*Photinus pyralis*), un enzima ATP-dipendente che converte la D-luciferina in ossiluciferina con contemporanea produzione di luce secondo la seguente reazione:



La luce prodotta da questo sistema risulta essere direttamente proporzionale alla quantità di ATP intracellulare.

Il protocollo prevede che ad ogni pozzetto venga aggiunto un volume di 50 µL di soluzione di lisi per cellule di mammifero, successivamente la piastra viene agitata per 5 minuti a 700 rpm su agitatore orbitale. Quindi si aggiungono 50 µL per pozzetto di soluzione contenente la luciferasi e la D-luciferina. La piastra viene nuovamente agitata per 5 minuti a 700 rpm e

successivamente incubata al buio per 10 min. L'intensità della luminescenza viene infine misurata con il lettore di piastre EnSpire® (PerkinElmer).

7. PREPARAZIONE DI LISATI CELLULARI E QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE ESTRATTE

Le cellule sono state seminate in piastre Petri da 60 mm di diametro a una concentrazione di 5×10^5 cellule per piastra. Il giorno seguente, le cellule sono state trattate con Polyphenon E o con le diverse combinazioni di farmaci. Dopo 6-48 ore, le cellule trattate e non trattate sono state lavate 2 volte con tampone fosfato salino (PBS) freddo, quindi sono state raccolte con tampone di lisi RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl) addizionato di inibitori di proteasi e di fosfatasi (*phosphatase inhibitor cocktail 2 e 3 e protease inhibitor cocktail* della Sigma-Aldrich). I campioni sono stati mantenuti un'ora in agitazione a 4°C e poi centrifugati a 12000 xg per 20 minuti a 4°C. Sul surnatante è stata determinata la concentrazione proteica mediante il saggio colorimetrico *DC Protein assay* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), seguendo le indicazioni del produttore. Per la costruzione della retta standard 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).

8. SDS-PAGE E WESTERN BLOT

Per ogni campione, a 75 µg di proteine è stato aggiunto ditiotreitolo 0,1 mM e tampone di caricamento (Laemmli sample buffer 5X: Tris HCl 50 mM, pH 6,8, sodio dodecil solfato 2%, blu di bromofenolo 0,02%, glicerolo 10%), il tutto è stato bollito 5 minuti a 100°C. I campioni sono quindi stati sottoposti a separazione elettroforetica su gel di poliacrilamide al 12% in condizioni denaturanti (tampone di corsa elettroforetica: Tris base 25 mM, glicina 190 mM, sodio dodecil solfato 0,1%). Le proteine così separate sono state trasferite mediante elettrotrasferimento su membrane di polivinildenfluoride (PVDF) (EMD Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DE). Il trasferimento sulla membrana di PVDF è stato effettuato in tampone di trasferimento (Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, metanolo 10%) per circa 18 ore a 4°C ad un voltaggio costante di 30 Volt. Le membrane sono state successivamente colorate con una soluzione di Rosso Ponceau S (Ponceau S Red 0,1%, acido acetico 5%) per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine.

I siti aspecifici di legame sulle membrane di PVDF sono stati bloccati tramite incubazione per 1-5 ore in TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) contenente latte scremato in polvere al 5% (p/v) (Sigma-Aldrich) o Blocking Reagent Solution all'1% (Roche). Le membrane sono state successivamente incubate con l'anticorpo primario specifico (diluito nella stessa soluzione usata per il bloccaggio) per tutta la notte a 4°C in costante agitazione.

Per l'analisi dei Western blot sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-GRP78/BiP (GL-19) policlonale di coniglio (diluito 1:100) e anti-p21^{waf1/Cip1} clone CP74 monoclonale di topo (diluito 1:200) della Sigma-Aldrich; anti-ubiquitina policlonale di coniglio (diluito 1:200), anti-NF-kB p65 (F-6) monoclonale di topo (diluito 1:200), anti-PARP-1 (F-2) monoclonale di topo (diluito 1:1000) e anti- β -actina monoclonale di topo (diluito 1:500) della Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-caspase 8 (1C12) monoclonale di topo (diluito 1:500), anti-caspase 9 policlonale di coniglio (diluito 1:1000), anti-caspase 7 policlonale di coniglio (diluito 1:1000), anti-CHOP (L63F7) monoclonale di topo (diluito 1:1000) e anti-LC3B (D11) policlonale di coniglio (diluito 1:1000) della Cell Signaling Technology (Danvers, MA; USA); anti-p-eIF2 α monoclonale di coniglio (diluito 1:500) e anti-ATF4 policlonale di coniglio (diluito 1:500) dell'Abcam (Cambridge, UK).

In seguito all'ibridizzazione con l'anticorpo primario, le membrane sono state lavate con TBS-T e poi incubate 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano: anti-mouse IgG (1:5000) o anti-rabbit IgG (1:200000) entrambi della Sigma-Aldrich. Le bande immunoreattive sono state rilevate mediante il reattivo chemiluminescente BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate (POD) (Roche) e le lastre fotografiche Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks, UK). L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata con il programma Quantity One[®] 1-D (version 4.6.3) (Bio-Rad): l'immagine delle lastre è stata acquisita mediante scansione digitale e tramite il programma Quantity One[®] 1-D è stato determinato l'intensità in pixel di ogni banda, a cui è stato sottratto successivamente il contenuto in pixel del background (fondo della lastra). Il valore dell'intensità di ciascuna banda, corrispondente alla proteina d'interesse, è stato normalizzato dividendolo per l'intensità della banda della β -actina (utilizzata come controllo quantitativo di caricamento per ciascun campione).

9. ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA

Le cellule sono state seminate in piastre Petri da 60 mm di diametro a una concentrazione di 5×10^5 cellule per piastra. Dopo 6-48 ore di trattamento, i monostrati cellulari sono stati lavati una volta con PBS e poi lisati con 1 mL di TRIzol Reagent (Ambion[®], Life Technologies). Dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente, a ciascun campione è stato aggiunto un volume di 200 μ L di cloroformio. I campioni sono stati agitati per inversione per 15 secondi, quindi incubati a temperatura ambiente per 3 minuti, successivamente sono stati centrifugati a 12000 xg per 15 minuti a 4°C. La fase acquosa superiore, contenente l'RNA, è stata trasferita in tubi *RNase-free* ed è stata miscelata con un uguale volume di isopropanolo, la soluzione è stata quindi incubata a temperatura ambiente per 10 minuti e poi centrifugata a 12000 xg per 10 minuti a 4°C. Il pellet di RNA è stato lavato con etanolo al 75% in H₂O-DEPC (H₂O MilliQ trattata con 0,1% di dietilpolicarbonato) e nuovamente centrifugato a 7500 xg per 10 minuti a 4°C. Il pellet è stato infine risospeso in 20 μ L di H₂O-DEPC addizionata di 1 U/ μ L di inibitore di ribonucleasi RNasin[®] (Promega, Fitchburg, WI, USA). L'RNA estratto dai campioni è stato quantificato mediante analisi spettrofotometrica eseguita mediante strumento 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.

10. RETROTRASCRIZIONE

L'RNA, estratto secondo la procedura sopra descritta, è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando il kit ImProm-II[™] Reverse Transcription System (Promega). A 1 μ g di RNA totale sono stati aggiunti 0,5 μ g di primer Oligo(dT)₁₅, il tutto è stato portato a un volume di 5 μ L con H₂O-DEPC-RNasin[®]. Il campione è stato prima scaldato a 70°C per 5 minuti, poi incubato in ghiaccio per altri 5 minuti, quindi sono stati aggiunti a ciascun campione 14 μ L di miscela di retrotrascrizione costituita da 1X ImProm-II Reaction Buffer, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTP mix e H₂O-DEPC-RNasin[®]. Dopo un'incubazione a 42°C per 2 minuti, è stato aggiunto 1 μ L di Improm-II Reverse Transcriptase, è seguita un'incubazione a 42°C per 60 minuti. Infine la retrotrascrittasi è stata inattivata riscaldando il campione a 70°C per 15 minuti. Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20°C fino al suo utilizzo.

11. REAL-TIME PCR

Per la Real-Time PCR, sono stati utilizzati 2 μ L di cDNA, a cui sono stati aggiunti 5 pmoli di primer forward e reverse e 1X SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc, Shiga, JP), per un volume finale di reazione di 25 μ L. Le sequenze dei primer utilizzati sono riportate in **Tabella 5**. La Real-Time PCR è stata effettuata nel termociclatore DNA Engine Opticon 4 (MJ Research, Waltham, MA, USA). Le condizioni prevedevano 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 5 secondi, annealing a 60°C per 30 secondi, estensione a 72°C per 30 secondi). I campioni sono stati analizzati in duplicato. Sulla stessa piastra, oltre al gene target, è stata amplificata anche la GAPDH, come gene di riferimento per la normalizzazione. Il prodotto della Real-Time PCR è stato quantificato in maniera relativa con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [100], utilizzando come riferimento il cDNA ottenuto da cellule non trattate. Brevemente, 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: $\Delta Ct = Ct$ (gene target) – Ct (gene di riferimento). Successivamente, ciascun campione è stato normalizzato rispetto al controllo (campione non trattato), quindi: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (campione) – ΔCt (controllo). Infine, la quantità di cDNA target in ciascun campione è stata calcolata come $2^{-\Delta\Delta Ct}$. In questo modo, la quantità di trascritto amplificato nelle cellule trattate è espressa come incremento relativo rispetto alla quantità di mRNA amplificato nelle cellule di controllo.

Tabella 5 – Sequenze dei primer utilizzati per la Real-Time PCR.

	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')
CHOP	CTTCTCTGGCTTGGCTGACT	TCCCTTGGTCTTCCTCCTCT
GRP78	GCCGTCCTATGTGCGCCTTC	TTTGTTTGCCACCTCCAAT
GAPDH	AACCTGCCAAATATGATGAC	TTGAAGTCAGAGGAGACCAC

12. TRASFEZIONE TRANSIENTE DEL PLASMIDE EGFP-LC3

Le cellule PC3 sono state seminate in piastre da 24 pozzetti ad una confluenza pari all'80% (8×10^4 cellule per pozzetto). Le cellule sono state trasfettate con il plasmide chimerico codificante per la proteina LC3B fusa con la *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) (EGFP-LC3, Addgene plasmid # 11546, **Figura 8**) [101]. Per la trasfezione è stato usato il reagente di trasfezione FuGENE HD (Roche) ed un rapporto 2:5 di DNA plasmidico e FuGENE HD in un volume di reazione di 25 μ L (375 ng di DNA plasmidico e 0,9 μ L di FuGENE HD per ciascuna reazione). Inizialmente è stato miscelato il reattivo di trasfezione con mezzo di coltura DMEM/HAM's F12 senza FBS, la soluzione è stata miscelata ed incubata 5 minuti a temperatura ambiente, quindi è stato aggiunto il DNA plasmidico. Dopo un'incubazione di 45 minuti a temperatura ambiente, la miscela di reazione è stata diluita con DMEM/HAM's F12 completo di FBS 10% ed è stata posta a contatto col monostrato cellulare. Dopo 6 ore, il mezzo di coltura contenente il FuGENE HD è stato sostituito con terreno di coltura completo fresco. Il mattino successivo le cellule sono state trattate con le diverse combinazioni di farmaci diluiti in DMEM/HAM's F12 completo. La formazione di punti fluorescenti di EGFP-LC3 è stata osservata tra le 6 e le 48 ore dal trattamento, utilizzando il microscopio fluorescente Zeiss Axiovert 200 dotato di fotocamera AxioCam HRc e il programma di acquisizione di immagini AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen, DE).

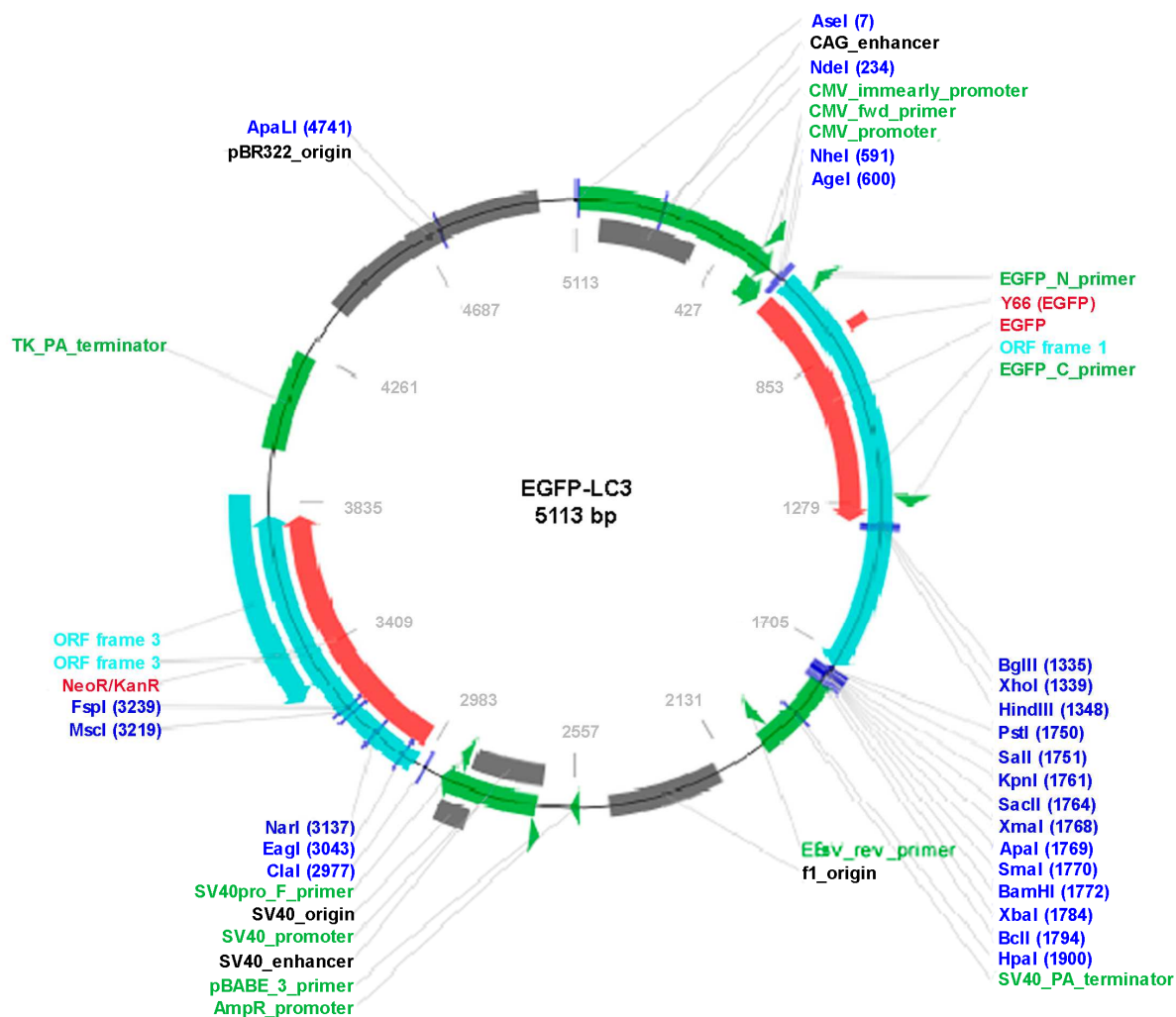


Figura 8 - Mappa del plasmide EGFP-LC3. Il gene codificante per EGFP-LC3 è posto sotto il controllo del promotore per i geni immediati-precoci (immediate-early promoter) del citomegalovirus (CMV) (tratto da www.addgene.org).

13. ANALISI STATISTICA

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (DS) di almeno 3 esperimenti indipendenti. Negli esperimenti con il Polyphenon E, l'analisi statistica è stata effettuata applicando il test t di Student mediante il software Microsoft Office Excel 2003; valori $P \leq 0,05$ sono stati considerati significativi. Negli esperimenti di combinazione dell'EGCG con gli inibitori del proteasoma, l'analisi statistica dei dati per confrontare i gruppi di trattamento è stata effettuata utilizzando la *One-way analysis of variance* (One-way ANOVA) seguita da un test di comparazione multipla, utilizzando il software Sigma Plot versione 12.0; valori $P \leq 0,05$ sono stati considerati significativi.

RISULTATI - PARTE 1

14. POLYPHENON E, EFFETTI SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI CARCINOMA PROSTATICO

Le cellule LNCaP e DU145 sono state trattate con concentrazioni crescenti di Polyphenon E (da 0 a 50 $\mu\text{g/mL}$ per le LNCaP e da 0 a 300 $\mu\text{g/mL}$ per le DU145). La vitalità cellulare è stata valutata dopo 24 ore mediante saggio WST-1. Si è ottenuta una curva dose-risposta in cui si osserva come il Polyphenon E presenti un effetto citotossico dose-dipendente su entrambe le linee cellulari (**Figura 9**). Tramite analisi di regressione non lineare (funzione logistica a quattro parametri) è stata calcolata l' IC_{50} , che è risultata essere pari a 17 $\mu\text{g/mL}$ per le LNCaP e 130 $\mu\text{g/mL}$ per le DU145. Le cellule LNCaP sono quindi risultate notevolmente più sensibili all'attività citotossica del Polyphenon E rispetto alle DU145.

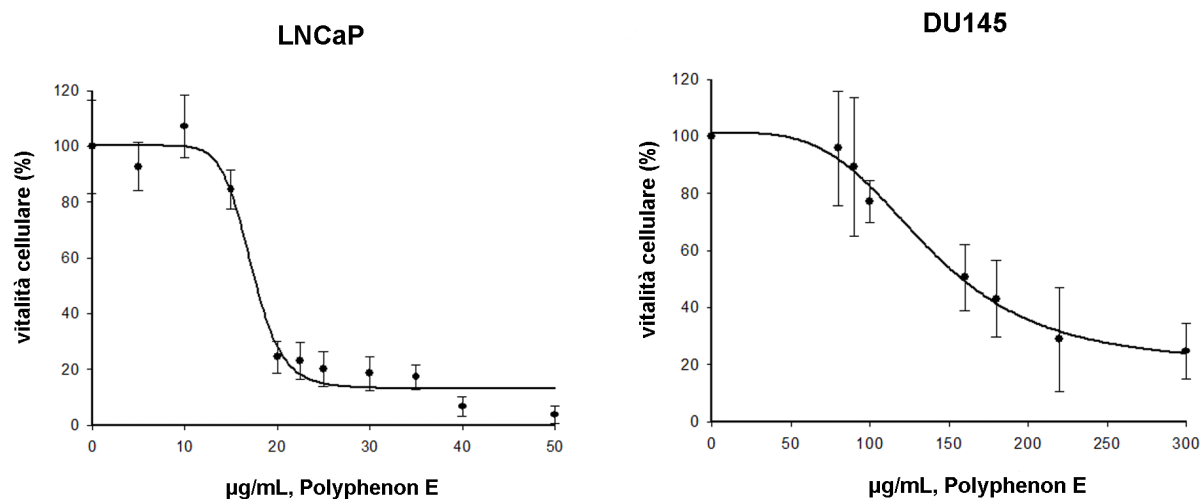


Figura 9 - Citotossicità del Polyphenon E in cellule LNCaP e DU145. La vitalità cellulare delle cellule LNCaP e DU145 è stata determinata mediante saggio WST-1, dopo 24 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di Polyphenon E. I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo ed è riportata sul grafico la media \pm DS di quattro determinazioni indipendenti effettuate ciascuna in triplicato. Le curve dose-risposta e le IC_{50} sono state calcolate mediante analisi di regressione non-lineare (funzione logistica a quattro parametri) utilizzando il programma Sigma Plot versione 12.0.

15. POLYPHENON E, EFFETTI SULL'INDUZIONE DELLA CASCATA DI ATTIVAZIONE DELLE CASPASI

Le caspasi sono delle cisteina-endoproteasi sintetizzate come zimogeni che vengono attivati in seguito a stimoli pro-apoptotici: inizialmente sono attivate le caspasi iniziatrici (caspasi 2, 8 e 9), le quali con un effetto a cascata attivano tramite proteolisi le caspasi effettrici (caspasi 3, 6 e 7) [102]. Quest'ultime agiscono tagliando diverse proteine, il taglio proteolitico può causare l'attivazione o l'inattivazione dei bersagli delle caspasi. Uno dei principali substrati delle caspasi effettrici è la *poly (ADP ribose) polymerase-1* (PARP-1), un enzima principalmente coinvolto nella riparazione del DNA. Il taglio proteolitico della PARP-1 operato dalle caspasi genera un frammento C-terminale di 89 kDa, incapace di legare il DNA e con un'attività catalitica ridotta, ed un frammento N-terminale di 24 kDa, che invece si lega irreversibilmente al DNA danneggiato impedendo l'azione della forma non tagliata della PARP-1 [103]. L'inibizione dell'attività di questa e di altre proteine coinvolte nella riparazione del DNA sfocia nella frammentazione del DNA tipica del processo apoptotico. In questo studio abbiamo quindi valutato l'espressione delle pro-forme e delle forme attive delle caspasi e i livelli della PARP-1, sia integra che tagliata, come marcatori di induzione della cascata apoptotica.

Le cellule LNCaP e DU145 sono state trattate con concentrazioni pari all'IC₅₀ di Polyphenon E. Tramite Western blot, è stato determinato il livello di espressione della caspasi 7 e della PARP-1 dopo 30 minuti, 1, 6, 12, 24 e 48 ore di trattamento. Come riportato in **Figura 10**, nelle cellule LNCaP, dopo trattamento con Polyphenon E non si osserva l'attivazione della caspasi 7, ma già dopo 1 ora di trattamento è visibile la frazione troncata di 89 kDa della PARP-1, che mostra un picco di espressione a 24 ore. Nelle cellule DU145, il Polyphenon E induce sia l'attivazione della caspasi 7 che il taglio della PARP-1 tra le 24 e 48 ore di trattamento (**Figura 10**).

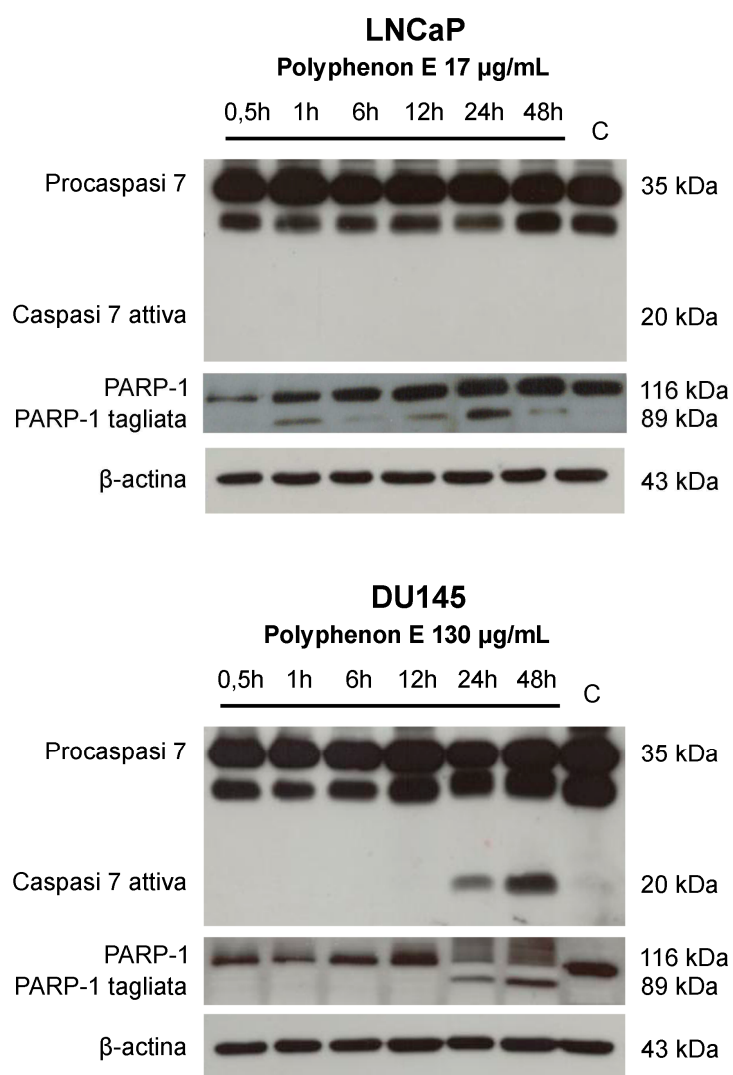


Figura 10 - Induzione dell'apoptosi in seguito a trattamento con Polyphenon E. Le cellule LNCaP e DU145 sono state trattate con dosi pari all'IC₅₀ di Polyphenon E. Dopo 30 minuti, 1, 6, 12, 24 e 48 ore di trattamento, i livelli di espressione di marcatori di apoptosi, quali caspasi 7 e PARP-1, sono stati determinati tramite Western blot, usando la β-actina come controllo di caricamento. C = estratti di cellule di controllo (non trattate) a 48 ore.

16. POLYPHENON E, EFFETTI SULLO STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO

Le cellule LNCaP e DU145 sono state trattate con concentrazioni pari all'IC₅₀ di Polyphenon E. Quindi, a diversi tempi, è stato determinato il livello di espressione di marcatori di stress del RE e di UPR (in particolare della via PERK-p-eIF2 α -ATF4-CHOP), sia tramite Real-Time PCR (**Figura 11**) che mediante Western blot (**Figura 12**).

Nelle cellule LNCaP, il Polyphenon E induce un aumento marcato dei livelli di mRNA di GRP78 già dopo 6 ore di trattamento; sebbene l'espressione dell'mRNA di GRP78 tenda a calare col passare del tempo, i suoi livelli si mantengono, fino alle 48 ore, significativamente più alti rispetto a quelli osservati nelle cellule non trattate (**Figura 11a**). Per quanto riguarda i marcatori di UPR, nelle cellule LNCaP, si osserva un incremento dei livelli di p-eIF2 α precoce (già dopo 30 minuti di trattamento), tali livelli si mantengono marcatamente elevati fino alle 6 ore per poi ritornare ai livelli basali alle 48 ore di trattamento. I livelli di ATF4, principale effettore della via PERK-p-eIF2 α , aumentano percettibilmente dopo un'ora di trattamento con Polyphenon E e si mantengono costanti fino alle 24 ore, mentre a 48 ore tornano ai livelli basali osservati nei controlli (**Figura 12**). I livelli di mRNA di CHOP, principale esecutore del braccio pro-apoptotico dell'UPR, presentano livelli significativamente più elevati rispetto ai controlli ($P \leq 0,05$) a tutti i tempi analizzati (6, 24 e 48 ore), come dimostrato mediante quantificazione relativa mediante Real-Time PCR (**Figura 11b**). I risultati presentati in **Figura 12** dimostrano come, a livello di proteina, CHOP aumenti dopo un'ora di trattamento e si mantenga costantemente elevato fino alle 24 ore, con un ritorno a livelli basali dopo 48 ore di trattamento con Polyphenon E.

Nelle cellule DU145, il Polyphenon E induce un aumento progressivo dei livelli di mRNA di GRP78 fino alle 48 ore di trattamento (**Figura 11a**). Inoltre, si evidenzia un analogo aumento dei livelli di mRNA di CHOP, i quali già a partire dalle 6 ore si innalzano significativamente rispetto al controllo non trattato ($P \leq 0,05$) e continuano ad aumentare fino alle 48 ore di trattamento (**Figura 11b**). I livelli di espressione delle proteine p-eIF2 α e ATF4, in questa linea cellulare, crescono parallelamente a partire dalle 6 ore di trattamento con Polyphenon E, con un picco dopo 12 ore (**Figura 12**). Allo stesso modo CHOP, a livello di proteina, aumenta progressivamente a partire dalle 6 ore di trattamento con il Polyphenon E (**Figura 12**). Tuttavia, i livelli di espressione di queste proteine a 48 ore, ad eccezione di quelli di p-eIF2 α , non si discostano marcatamente da quelli osservati nel controllo non trattato.

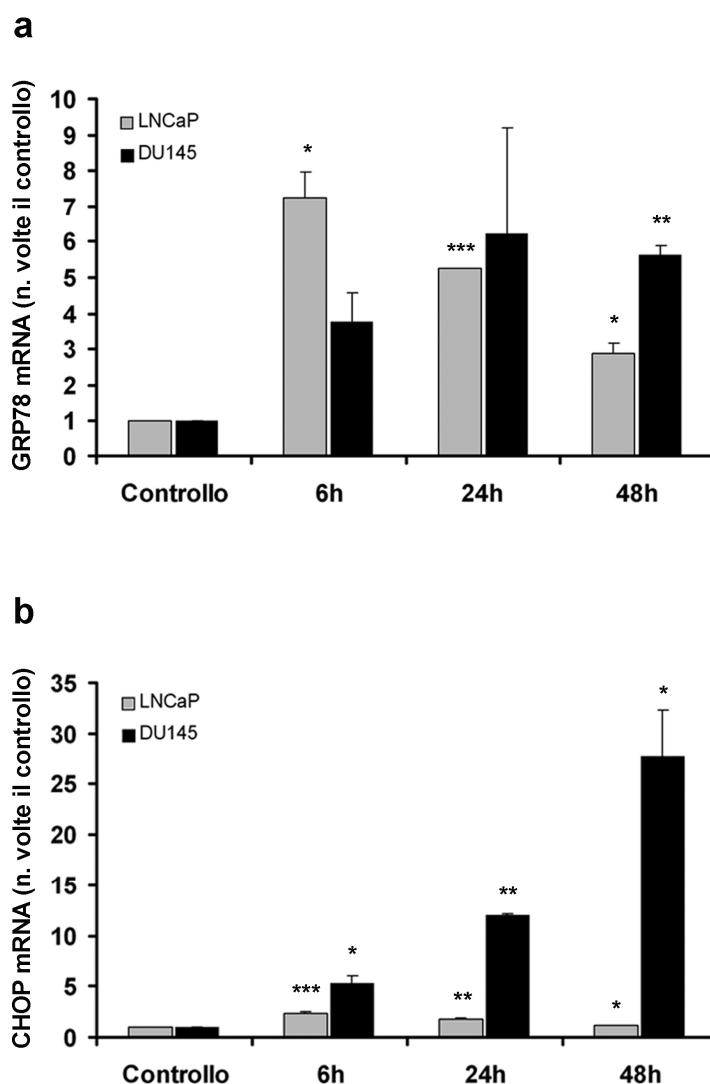


Figura 11 - Livelli di espressione di mRNA di GRP78 e CHOP in cellule LNCaP e DU145 trattate con Polyphenon E. Le cellule LNCaP e DU145 sono state trattate con dosi pari all'IC₅₀ di Polyphenon E. Dopo 6, 24 e 48 ore di trattamento, i livelli di mRNA di GRP78 (a) e di CHOP (b) sono stati valutati mediante quantificazione relativa tramite Real-Time PCR, utilizzando la GAPDH come gene di riferimento. Il livello di espressione dell'mRNA di GRP78 o CHOP nel campione di controllo (cellule non trattate) è posto uguale a 1. I risultati sono espressi come media \pm DS di tre determinazioni indipendenti. Analisi statistica mediante test t di Student: *P \leq 0,05, **P \leq 0,01, ***P \leq 0,001, rispetto al controllo (cellule non trattate).

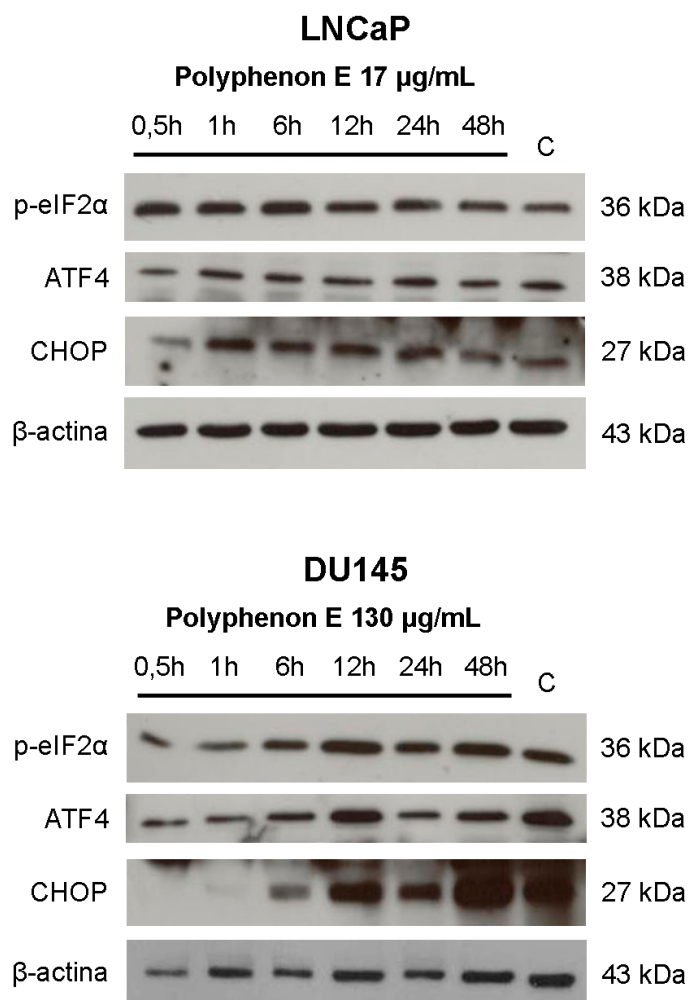


Figura 12 - Livelli di espressione di marcatori di UPR in cellule LNCaP e DU145 dopo trattamento con Polyphenon E. Le cellule LNCaP e DU145 sono state trattate con dosi pari all'IC₅₀ di Polyphenon E. Dopo 30 minuti, 1, 6, 12, 24 e 48 ore di trattamento, i livelli di espressione di marcatori di UPR, quali p-eIF2α, ATF4 e CHOP, sono stati determinati tramite Western blot, usando la β-actina come controllo di caricamento. C = estratti di cellule di controllo (non trattate) a 48 ore.

RISULTATI - PARTE 2

17. EGCG ED INIBITORI DEL PROTEASOMA, EFFETTI SULLA VITALITÀ CELLULARE

Le cellule PC3 sono state trattate con concentrazioni crescenti di EGCG (da 0 a 350 μM) per 48 ore. La vitalità cellulare è stata successivamente valutata mediante saggio WST-1. I risultati sulla vitalità cellulare rivelano un effetto citotossico dose-dipendente dell'EGCG, con un'IC₅₀ pari a 120 μM (**Figura 13**). Successivamente, le cellule PC3 sono state trattate con concentrazioni crescenti di BZM (da 0 a 30 nM) o di MG132 (da 0 a 1,2 μM), in presenza o in assenza di EGCG alla concentrazione di 5 o 50 μM . Sono state scelte queste due concentrazioni di EGCG perché 5 μM rappresenta una concentrazione vicina a quella fisiologicamente raggiungibile nel plasma umano in seguito alla somministrazione di estratti di tè verde [51], mentre 50 μM è una concentrazione dieci volte più alta, quindi sopra-fisiologica ma non citotossica per le PC3, corrispondendo a meno della metà dell'IC₅₀ misurata. Sempre mediante saggio WST-1, è stata determinata la vitalità cellulare dopo 48 ore di trattamento con gli inibitori del proteasoma usati singolarmente o in combinazione con EGCG. Le curve dose-risposta ottenute mostrano come entrambi gli inibitori del proteasoma siano efficaci nell'inibire la vitalità cellulare in modo dose-dipendente, con valori di IC₅₀ pari a 8 nM per il BZM e 0,32 μM per l'MG132 (**Figura 14a e 14b**). L'aggiunta di 5 μM di EGCG al BZM causa uno spostamento verso destra della curva dose-risposta, indicando una riduzione della tossicità complessiva (effetto simil-antagonistico) (**Figura 14a**). Inoltre, l'EGCG alla concentrazione di 50 μM sopprime completamente la citotossicità del BZM (**Figura 14a**). Diversamente, la citotossicità dell'MG132 non risulta essere modificata in modo sostanziale dall'aggiunta dell'EGCG, indipendentemente dalla concentrazione utilizzata (**Figura 14b**). Le IC₅₀ calcolate per EGCG, BZM ed MG132 (**Tabella 6**) sono state utilizzate in tutti i successivi esperimenti.

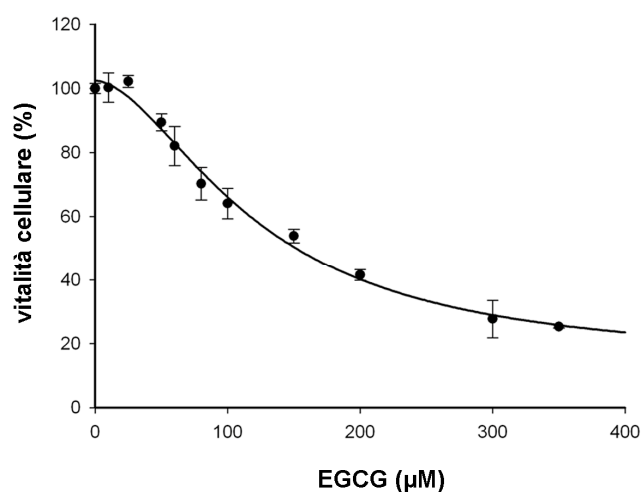


Figura 13 – Citotossicità dell'EGCG in cellule PC3. La vitalità cellulare è stata determinata mediante saggio WST-1, dopo 48 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di EGCG. I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo ed è riportata sul grafico la media \pm DS di quattro determinazioni indipendenti effettuate ciascuna in triplicato. La curva dose-risposta è stata calcolata mediante analisi di regressione non-lineare (funzione logistica a quattro parametri) utilizzando il programma Sigma Plot versione 12.0.

Tabella 6 - Valori di IC_{50} calcolati tramite analisi di regressione non lineare (funzione logistica a quattro parametri). Dati espressi come $IC_{50} \pm$ Errore standard. ND = non determinabile.

	Trattamento singolo	+ 5 µM EGCG	+ 50 µM EGCG
EGCG	120 \pm 20 µM	-	-
BZM	8 \pm 0,31 nM	10,25 \pm 0,43 nM	ND
MG132	0,32 \pm 0,01 µM	0,36 \pm 0,01 µM	0,31 \pm 0,01 µM

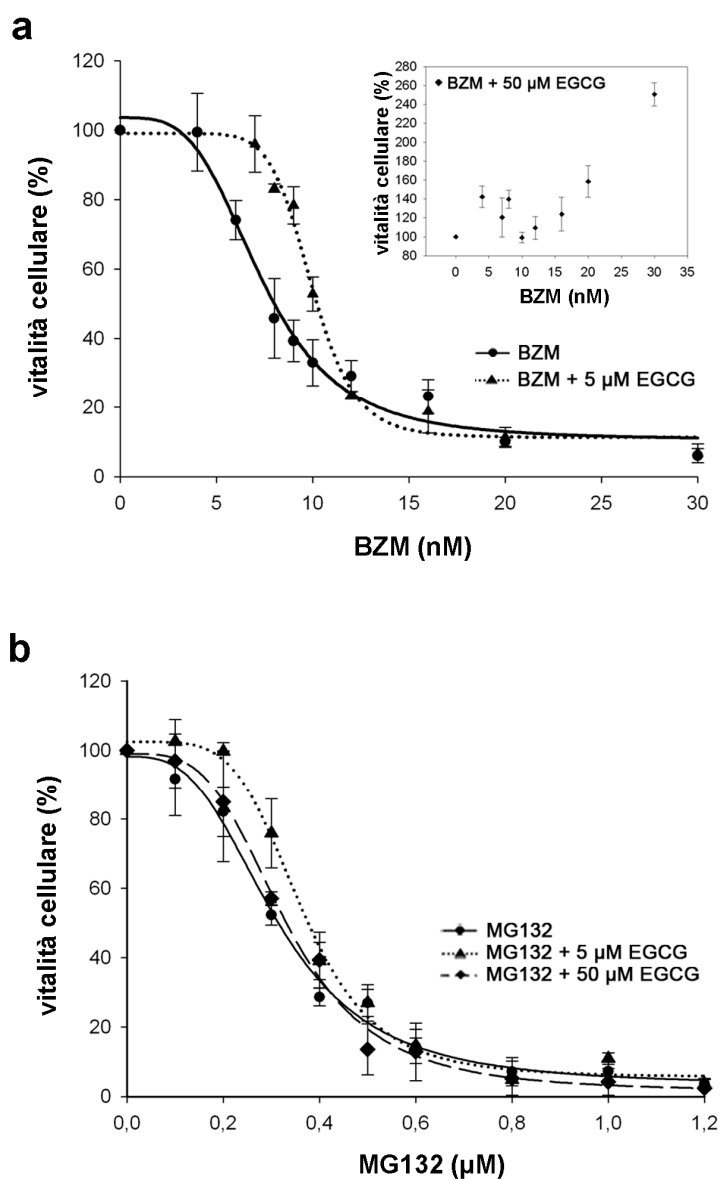


Figura 14 - L'EGCG contrasta l'effetto citotossico del BZM, ma non quello dell'MG132. La vitalità cellulare delle cellule PC3 è stata determinata mediante saggio WST-1, dopo 48 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di BZM (a) o di MG132 (b) in presenza o assenza di EGCG (5 o 50 µM). I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo ed è riportata sul grafico la media \pm DS di quattro determinazioni indipendenti effettuate ciascuna in triplicato. Le curve dose-risposta sono state calcolate mediante analisi di regressione non-lineare (funzione logistica a quattro parametri) utilizzando il programma Sigma Plot versione 12.0.

18. EGCG ED INIBITORI DEL PROTEASOMA, EFFETTI SULL'INDUZIONE DELLA CASCATA APOPTOTICA

Le cellule PC3 sono state trattate per 48 ore con concentrazioni pari all'IC₅₀ di EGCG, BZM o MG132, in assenza o in presenza di EGCG (5 o 50 µM). Tramite Western blot è stato determinato il livello di espressione delle forme attivate delle caspasi 8 e 9 e del frammento di 89 kDa della PARP-1 tagliata, marcatori di attivazione della cascata delle caspasi. I risultati riportati in **Figura 15** mostrano come sia il BZM che l'MG132 siano in grado di attivare la cascata delle caspasi con taglio finale della PARP-1. In particolare il BZM determina l'attivazione della caspasi 8, mentre l'MG132 attiva sia la caspasi 8 che la 9. L'EGCG, alla concentrazione pari all'IC₅₀, non induce invece l'attivazione delle caspasi, infatti sia la caspasi 8 che la 9, così come la PARP-1, non subiscono alcun taglio proteolitico (**Figura 15**). I risultati mostrano inoltre come l'associazione dell'EGCG con l'MG132 non alteri la capacità dell'MG132 di indurre la cascata delle caspasi; al contrario, quando l'EGCG viene aggiunto al BZM, non si osserva il taglio proteolitico né delle caspasi 8 e/o 9 né dell'enzima PARP-1 (**Figura 15**).

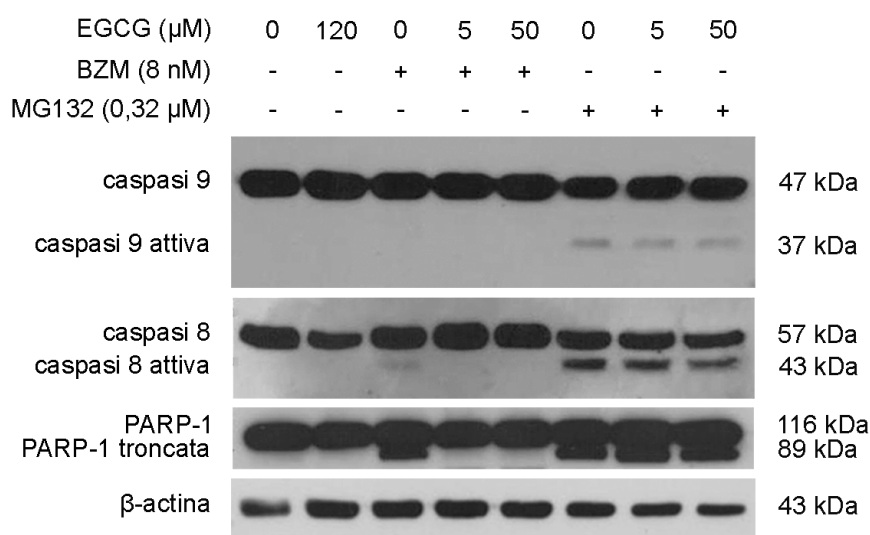


Figura 15 - L'EGCG contrasta l'apoptosi indotta dal BZM, ma non quella indotta dall'MG132. Le cellule PC3 sono state trattate per 48 ore con dosi pari all'IC₅₀ di EGCG, BZM o MG132. Il BZM e l'MG132 sono stati inoltre testati in combinazione con l'EGCG a concentrazioni pari a 5 o 50 µM. I livelli di espressione di caspasi 8 e 9 e di PARP-1 (forme intere e troncate) sono stati analizzati mediante Western blot. La β-actina è stata utilizzata come controllo di caricamento dei campioni.

19. EGCG ED INIBITORI DEL PROTEASOMA, EFFETTI SULL'INIBIZIONE DEL PROTEASOMA E SULLO STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO

BZM, MG132 ed EGCG sono noti inibitori del proteasoma [90, 91]. In questo studio abbiamo voluto, da una parte, confermare il loro effetto sul proteasoma nel nostro modello cellulare e, dall'altra, analizzare l'effetto dell'associazione dell'EGCG con i singoli inibitori del proteasoma. Sono stati quindi valutati, tramite Western blot, i livelli di proteine poliubiquitinate in cellule PC3 trattate per 48 ore con EGCG, BZM o MG132 a concentrazioni pari all'IC₅₀. Inoltre, BZM e MG132 sono stati testati anche in associazione con 5 o 50 µM di EGCG. Oltre all'accumulo di proteine poliubiquitinate, marcatore di inibizione dell'attività del proteasoma, sono stati valutati anche i livelli di proteine il cui turnover è regolato principalmente attraverso la degradazione proteasomale, come p21 ed NF-kB (p65) [104-106]. I nostri risultati confermano che dosi pari all'IC₅₀ sia di BZM che di MG132 sono in grado di inibire efficacemente il proteasoma nelle cellule PC3, come dimostrato dall'accumulo intracellulare di proteine poliubiquitinate, di p21 e di NF-kB (p65) (**Figura 16**). I nostri risultati mostrano anche come, sebbene in minor misura rispetto agli inibitori del proteasoma, l'EGCG (a dosaggi pari all'IC₅₀) inibisca la degradazione proteasomale delle proteine poliubiquitinate, senza però influenzare significativamente i livelli di p21 e di NF-kB (p65), i quali sono simili a quelli del controllo (cellule non trattate). I risultati riportati in **Figura 16** dimostrano inoltre che l'EGCG (5 o 50 µM) quando associato al BZM produce un minor accumulo di proteine poliubiquitinate, di p21 e di NF-kB (p65) nelle PC3 sottoposte al trattamento combinato, come conseguenza della riduzione dell'inibizione del proteasoma. Lo stesso effetto non si osserva nelle cellule PC3 trattate con l'MG132 addizionato di EGCG 5 o 50 µM, dove l'inibizione del proteasoma rimane invariata rispetto al singolo trattamento con MG132 (**Figura 16**).

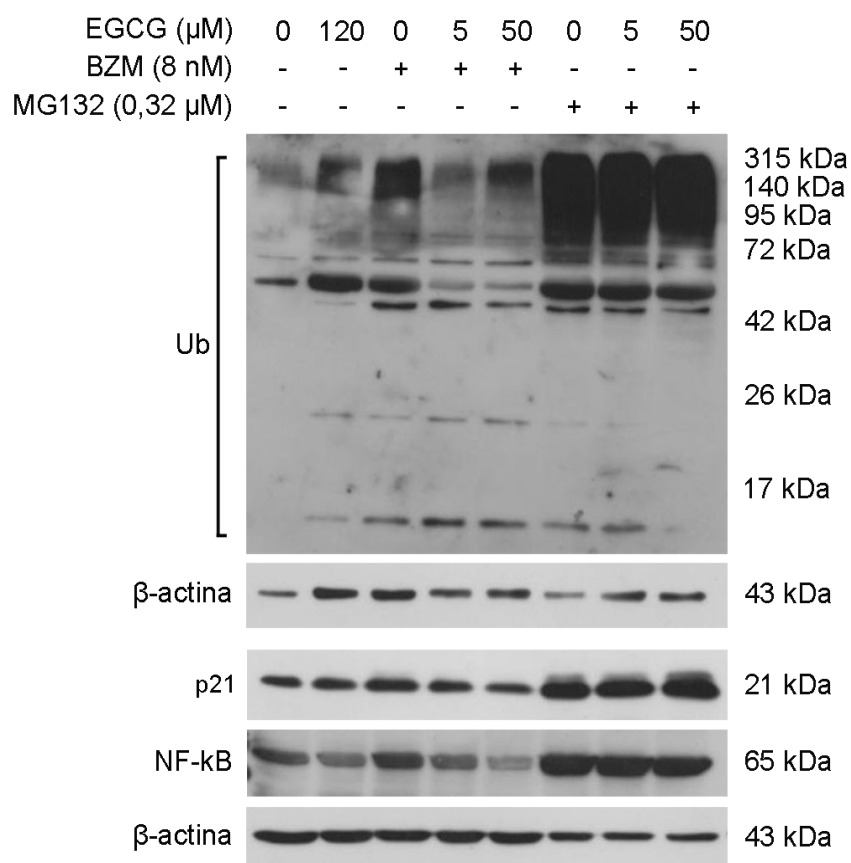


Figura 16 - *L'EGCG previene l'inibizione del proteasoma quando associato al BZM.* Le cellule PC3 sono state trattate per 48 ore con dosi pari all' IC_{50} di EGCG, BZM o MG132. Il BZM e l'MG132 sono stati inoltre testati in combinazione con l'EGCG (5 o 50 μM). Tramite Western blot è stato valutato l'accumulo intracellulare delle proteine poliubiquitinate (Ub), di p21 e di NF-kB (p65). La β -actina è stata utilizzata come controllo di caricamento.

È stato successivamente valutato l'effetto dei trattamenti suddetti sull'induzione dello stress del RE. Tramite Western blot sono stati analizzati i livelli di espressione di marcatori di stress del RE e di attivazione dell'UPR: la proteina GRP78, il fattore di trascrizione CHOP e la forma fosforilata di eIF2 α .

Nelle cellule PC3, i livelli di GRP78 aumentano in seguito al trattamento per 48 ore con gli inibitori del proteasoma o con l'EGCG (a concentrazioni pari all'IC₅₀) (**Figura 17a**). L'associazione dell'EGCG (5 o 50 μ M) con il BZM causa una riduzione di questo marcatore di stress dell'ER rispetto al trattamento con il solo BZM. Come mostrato in **Figura 17a**, i livelli di p-eIF2 α aumentano significativamente dopo il trattamento con il singolo EGCG o con l'MG132 (indipendentemente dall'aggiunta o meno dell'EGCG), mentre in cellule PC3 trattate con BZM non si osserva un aumento così marcato dei livelli di p-eIF2 α e l'aggiunta di EGCG riduce la fosforilazione di eIF2 α indotta dal BZM.

Per quanto concerne l'espressione di CHOP, a livello di trascritto si osserva un significativo incremento ($P \leq 0,001$) in cellule trattate con MG132, indipendentemente dalla presenza di EGCG. Il BZM causa un aumento, anche se non statisticamente significativo, dell'espressione di CHOP a livello di mRNA e l'aggiunta di EGCG riporta i valori di questo marcatore ai livelli basali (**Figura 17b**). A livello di proteine si osserva un andamento simile, con un incremento più marcato del segnale di CHOP in cellule trattate con MG132, in assenza ed in presenza di EGCG (**Figura 17a**).

In cellule PC3, l'MG132 induce un marcato stress del RE e attiva l'UPR come dimostrato in **Figura 17** dall'aumento di tutti i marcatori considerati. A differenza di ciò che è stato osservato per il BZM, lo stress del RE indotto dall'MG132 non risulta subire alterazioni in seguito all'aggiunta dell'EGCG, in particolare l'espressione di GRP78 si mantiene costante, così come i livelli di p-eIF2 α e di CHOP non subiscono variazioni significative in presenza di 5 o 50 μ M di EGCG. Nelle cellule trattate con BZM, invece, l'aggiunta di EGCG causa una riduzione dei marcatori di stress del RE e di UPR osservati (**Figura 17**).

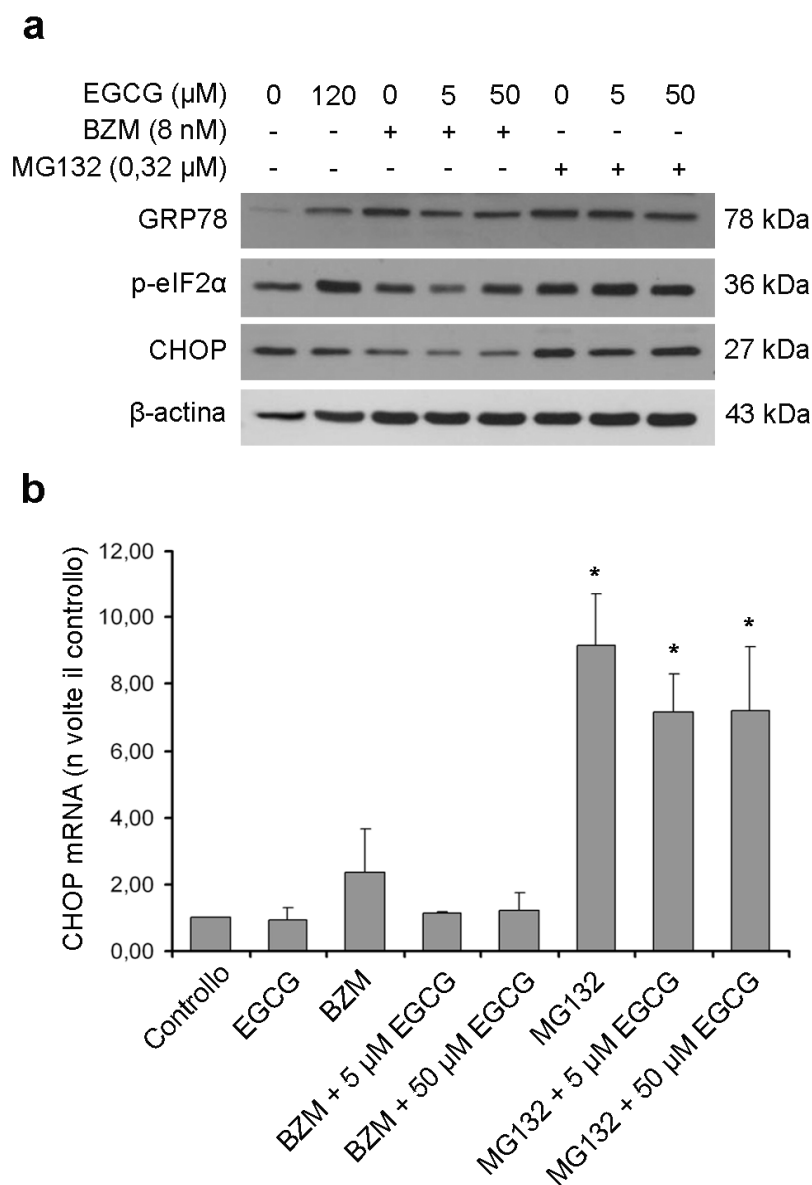


Figura 17 - L'EGCG previene l'induzione di stress del RE quando combinato con il BZM. Le cellule PC3 sono state trattate 48 ore con dosi pari all' IC_{50} di EGCG, BZM o MG132. Il BZM e l'MG132 sono stati inoltre testati in combinazione con l'EGCG (5 o 50 μM). **(a)** I livelli di espressione di marcatori di UPR, quali GRP78, CHOP e p-eIF2 α , sono stati determinati tramite Western blot, usando la β -actina come controllo di caricamento. **(b)** I livelli di espressione dell'mRNA di CHOP sono stati determinati tramite Real-Time PCR negli stessi campioni utilizzando la GAPDH come gene di riferimento. I risultati sono espressi come media \pm DS di tre determinazioni indipendenti. Il livello di espressione dell'mRNA di CHOP nel campione di controllo (PC3 non trattate) è posto uguale a 1. Per comparare i gruppi di trattamento è stata utilizzata la One-way ANOVA seguita dal test di comparazione multipla Holm-Sidak; * $P \leq 0,001$ rispetto al controllo.

20. EGCG ED INIBITORI DEL PROTEASOMA, ATTIVAZIONE DEL PROCESSO AUTOFAGICO

L'autofagia è un meccanismo compensatorio che spesso viene attivato in seguito all'inibizione dell'attività del proteasoma. Per questo abbiamo valutato se il trattamento con gli inibitori del proteasoma, da soli o in combinazione con l'EGCG, potesse indurre l'attivazione di questa via degradativa alternativa alla via proteasomale.

La proteina LC3B ha una funzione chiave nella formazione del fagoforo. Questa proteina è normalmente presente nel citosol ed in seguito a segnali pro-autofagici la forma citosolica LC3B-I viene convertita nella forma lipidata LC3B-II, la quale si associa alla membrana dell'autofagosoma in formazione facilitandone l'allungamento e la chiusura [25]. La conversione da LC3B-I a LC3B-II è quindi un marcatore di induzione di autofagia e di formazione di autofagosomi [107]. Essendo l'autofagia un processo dinamico, l'analisi della formazione di LC3B-II è stata effettuata, tramite Western blot, dopo 6, 24 e 48 ore dal trattamento.

In cellule PC3, il BZM e l'MG132 inducono la lipidazione di LC3B già dopo 6 ore dal trattamento, indipendentemente dalla presenza di EGCG (**Figura 18**). Nelle cellule trattate con MG132, sia in presenza che in assenza di EGCG (5 o 50 μ M), LC3B-II continua ad accumularsi fino a 48 ore dopo il trattamento, mentre nelle cellule PC3 trattate con BZM, in associazione o meno all'EGCG, i livelli di LC3B-II aumentano rispetto al controllo dopo 6 ore di trattamento, per ridursi dopo 12 ore e scomparire dopo 48 ore (**Figura 18**).

La proteina lipidata LC3B-II si localizza sia sulla faccia interna che sulla faccia esterna della membrana dell'autofagosoma, le molecole situate internamente subiscono la degradazione per via autolisosomiale nelle ultime fasi del processo autofagico, mentre quelle esterne si dissociano dalla membrana e possono essere riciclate [25]. La riduzione nel tempo di LC3B-II è indicativa quindi di un processo autofagico efficace, che si sviluppa lungo tutte le sue fasi, concludendosi con la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma e la degradazione del contenuto dell'autofagolisosoma [107].

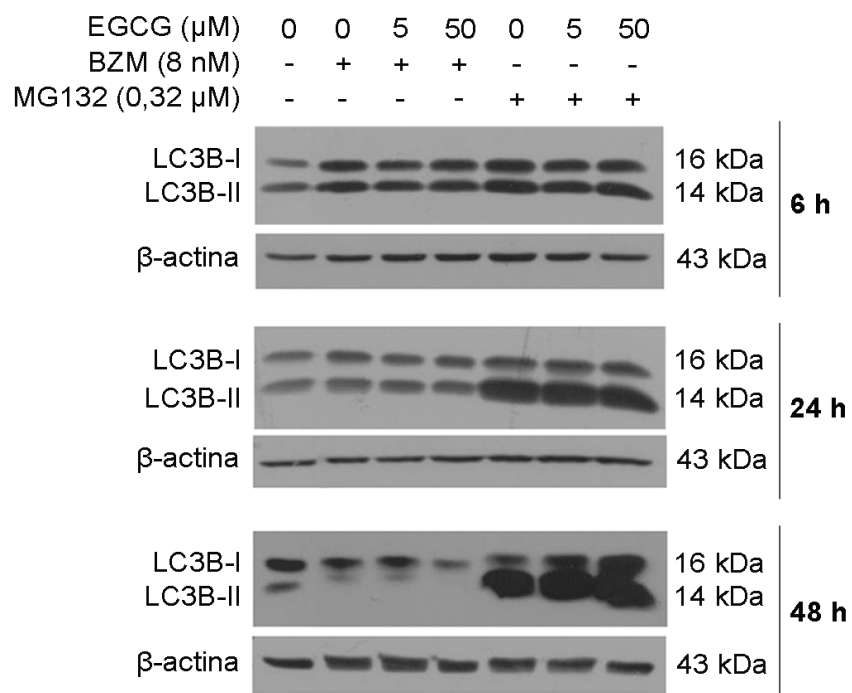


Figura 18 - Gli inibitori del proteasoma e l'EGCG promuovono la conversione di LC3B-I in LC3B-II. Le PC3 sono state trattate per 6, 24 e 48 ore con dosi pari all'IC₅₀ di EGCG, BZM o MG132. Il BZM e l'MG132 sono stati inoltre testati in combinazione con l'EGCG (5 o 50 μM). Tramite Western blot è stata valutata la conversione di LC3B-I a LC3B-II. La β -actina è stata utilizzata come controllo di caricamento.

Un altro marcatore di autofagia è la redistribuzione di LC3B da una localizzazione citoplasmatica diffusa ad una punteggiata associata agli autofagosomi [107]. Abbiamo quindi analizzato tale distribuzione utilizzando cellule PC3 trasfettate con DNA plasmidico chimerico codificante per LC3B fuso alla molecola EGFP. Le cellule trasfettate sono state trattate con gli inibitori del proteasoma, da soli o in associazione con l'EGCG, e la localizzazione della fluorescenza di EGFP-LC3 è stata osservata nel tempo. Già dopo 6 ore, le cellule trattate con BZM o MG132 presentano una fluorescenza di EGFP-LC3 diffusa a livello citoplasmatico, con pochissimi punti visibili; mentre l'espressione punteggiata di EGFP-LC3 aumenta notevolmente quando l'EGCG a una concentrazione pari a 50 μ M viene combinato con il BZM (**Figura 19**). Tale punteggiatura non risulta invece visibile quando l'EGCG (50 μ M) viene associato all'MG132 (**Figura 19**).

Sia l'induzione del flusso autofagico, che l'inibizione della degradazione autofagosomale può causare l'accumulo di LC3B-II e una distribuzione punteggiata di EGFP-LC3 [107]. Quindi, al fine di interpretare correttamente i nostri risultati, abbiamo valutato la conversione di LC3B-I in LC3B-II anche in presenza di cloroquina (20 μ M). La cloroquina è un agente lisosomotropico, si accumula cioè nel compartimento lisosomiale aumentandone il pH ed interferendo così con l'attività delle idrolasi acide. Questa azione della cloroquina causa l'inibizione dell'ultima fase dell'autofagia, ossia la degradazione del contenuto dell'autofagolisosoma. In caso vi sia un flusso autofagico efficiente, la somministrazione di cloroquina causa quindi un aumento dell'accumulo di LC3B-II dovuto all'inibizione della sua degradazione all'interno dell'autofagolisosoma [107]. I nostri risultati mostrano come, dopo 24 ore di trattamento, la cloroquina induca un aumento dei livelli di LC3B-II in particolare nelle cellule trattate con la combinazione di BZM ed EGCG (**Figura 20**). Questi risultati ci permettono di affermare che l'EGCG causa un aumento del flusso autofagico, soprattutto quando associato al BZM.

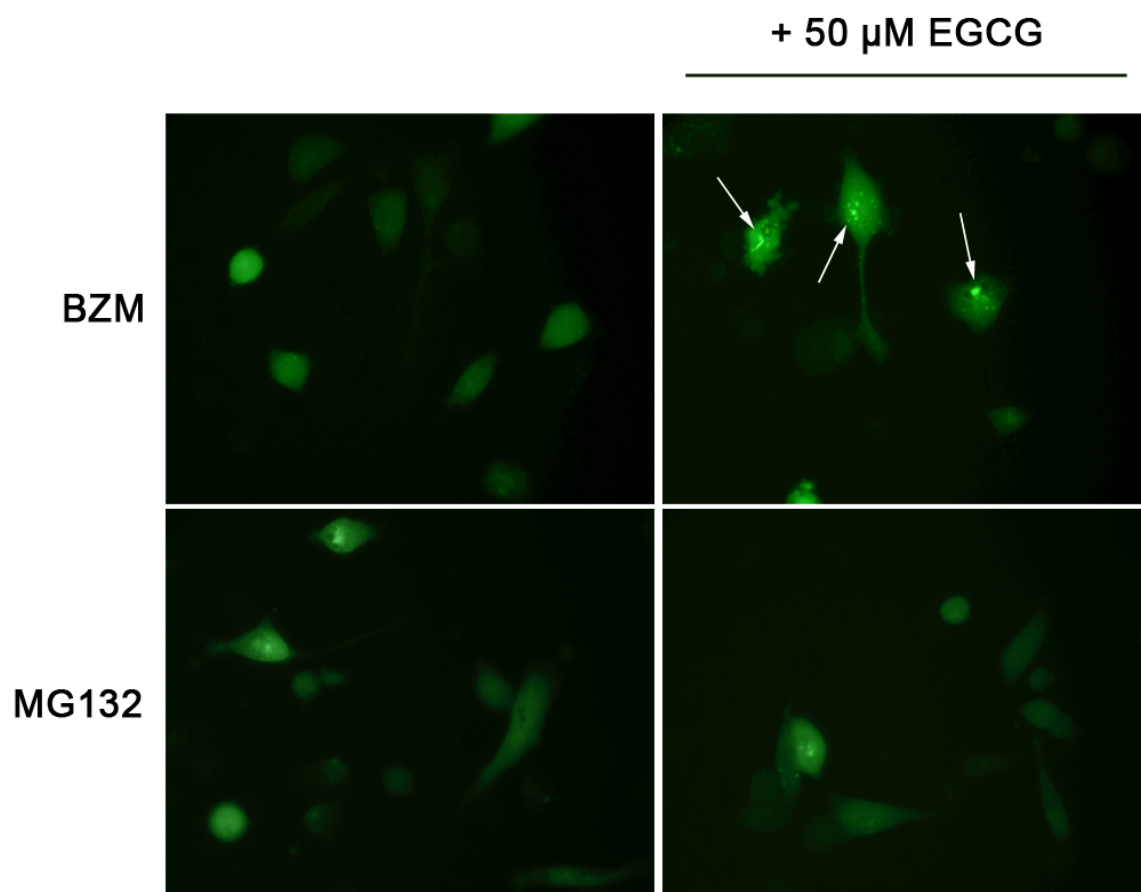


Figura 19 - L'EGCG aumenta la formazione di punti di EGFP-LC3 nelle cellule trattate con BZM, ma non in quelle trattate con MG132. Le cellule PC3 sono state trasfettate con EGFP-LC3 e successivamente sottoposte al trattamento con dosi pari all'IC₅₀ di EGCG, BZM o MG132. Il BZM e l'MG132 sono stati testati anche in associazione con l'EGCG (5 o 50 μM EGCG). La comparsa di punti fluorescenti di EGFP-LC3 è stata valutata per 48 ore tramite osservazione con microscopio fluorescente Zeiss Axiovert 200. Le immagini sopra riportate sono state acquisite dopo 6 ore dal trattamento con BZM o MG132, da soli o in combinazione con 50 μM EGCG (le frecce indicano i punti di EGFP-LC3).

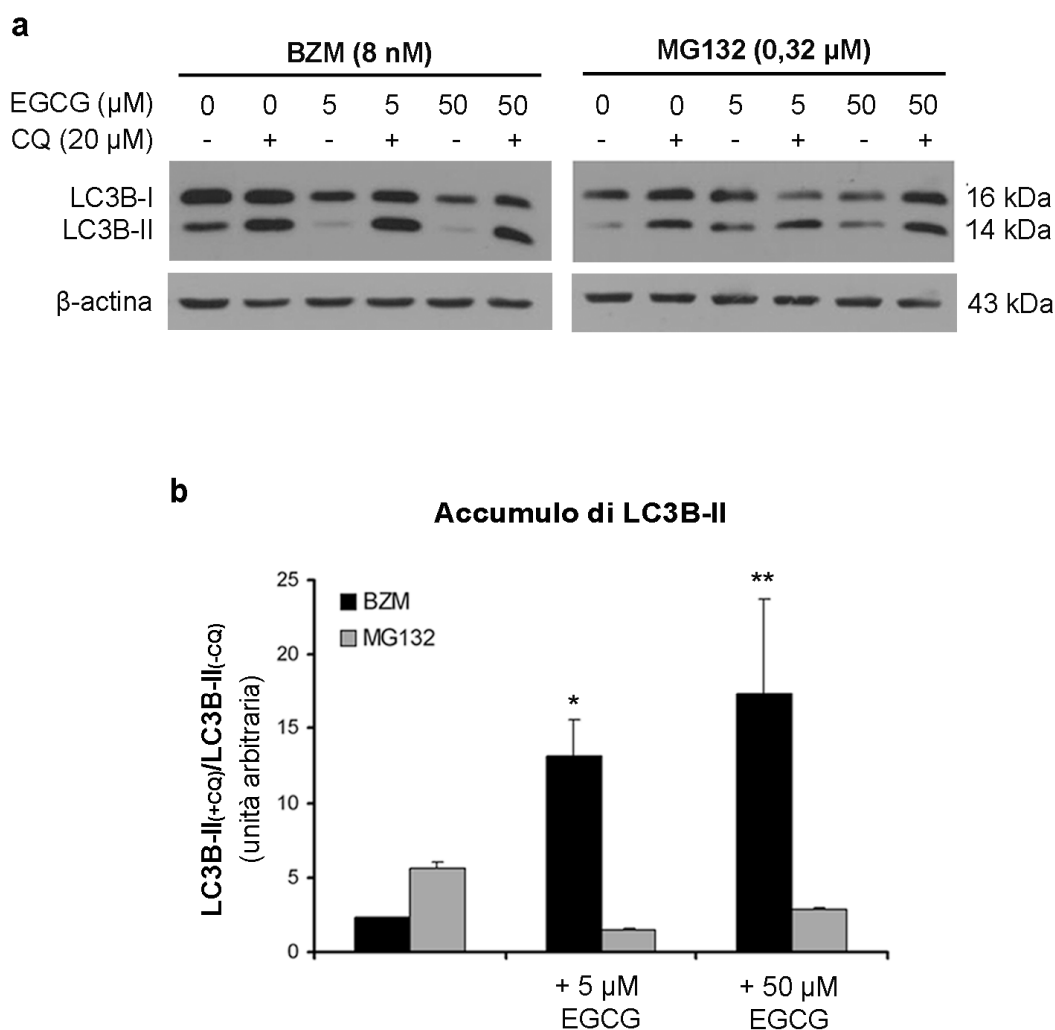


Figura 20 - La cloroquina produce un evidente accumulo di LC3B-II in cellule trattate con BZM in combinazione con EGCG. Le cellule PC3 sono state trattate per 24 ore come indicato in figura. (a) L'accumulo di LC3B-II è stato analizzato tramite Western blot, utilizzando la β -actina come controllo di caricamento. (b) L'intensità delle bande di LC3B-II (normalizzata sui livelli di β -actina) è stata valutata mediante analisi densitometrica con il programma Quantity One® 1-D (Bio-Rad). L'accumulo di LC3B-II è stato espresso come rapporto dei livelli normalizzati di LC3B-II tra i campioni trattati con cloroquina (CQ) e i rispettivi campioni in assenza di CQ. Il test One-way ANOVA seguito dal test di comparazione multipla di Holm-Sidak è stato usato per l'analisi statistica e la comparazione dei gruppi di trattamento: * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,001$ rispetto ai trattamenti con i singoli composti.

21. L'AUTOFAGIA COME MECCANISMO DI SOPRAVVIVENZA FAVORITO DALL'EGCG

L'autofagia è un meccanismo che può favorire la sopravvivenza cellulare così come la morte cellulare [36]. Abbiamo perciò valutato che impatto avesse l'autofagia sulla citotossicità indotta dagli inibitori del proteasoma, in assenza o in presenza di EGCG (5 o 50 μ M). Ciò è stato ottenuto analizzando la vitalità in seguito al blocco dell'autofagia mediante co-somministrazione di cloroquina (20 μ M). Dopo 24 ore di trattamento combinato, la vitalità cellulare è stata analizzata tramite saggio ATPlite. I risultati dimostrano come il blocco dell'autofagia indotto dalla cloroquina causi un aumento significativo della citotossicità indotta dal co-trattamento con BZM ed EGCG. L'aggiunta di cloroquina causa infatti una riduzione della vitalità di quasi il 50% nelle cellule trattate con BZM e 5 μ M di EGCG ($P \leq 0,05$, rispetto allo stesso trattamento combinato in assenza di cloroquina) e di oltre il 50% quando l'EGCG è co-somministrato alla concentrazione di 50 μ M ($P \leq 0,001$, rispetto allo stesso trattamento combinato in assenza di cloroquina) (**Figura 21a**). La cloroquina non risulta invece influenzare in modo significativo la vitalità delle cellule PC3 trattate con il solo BZM o con l'MG132 associato o meno all'EGCG (**Figura 21a e 21b**).

Una volta stabilito che l'autofagia gioca un ruolo importante nella sopravvivenza delle cellule sottoposte al trattamento combinato con BZM ed EGCG, abbiamo indagato che ruolo avesse il processo autofagico sull'induzione dello stress del RE e sulla modulazione dell'UPR. Abbiamo quindi analizzato, tramite Western blot, l'espressione di alcuni dei principali marcatori di stress del RE e di UPR. Come mostrato in **Figura 22**, l'inibizione dell'autofagia, tramite aggiunta di cloroquina, non determina una variazione nei livelli di p-eIF2 α o CHOP sia nelle cellule di controllo non trattate che nelle cellule PC3 trattate con il singolo BZM. Nelle cellule sottoposte al trattamento combinato con BZM ed EGCG, invece, l'inibizione dell'autofagia determina un incremento dei livelli di p-eIF2 α , i quali risultano addirittura superiori rispetto a quelli osservati con il singolo trattamento con BZM (**Figura 22**). Analogamente, il blocco dell'autofagia ripristina i livelli di CHOP soppressi dall'aggiunta dell'EGCG nel trattamento combinato con BZM. Ciò è particolarmente evidente nelle cellule trattate con BZM e 5 μ M di EGCG, dove, in assenza di cloroquina, si osserva una riduzione dei livelli di CHOP rispetto al trattamento col singolo BZM, mentre l'aggiunta di cloroquina determina un ripristino dei livelli di CHOP, corrispondenti a quelli osservati nelle cellule trattate col singolo BZM (**Figura 22**).

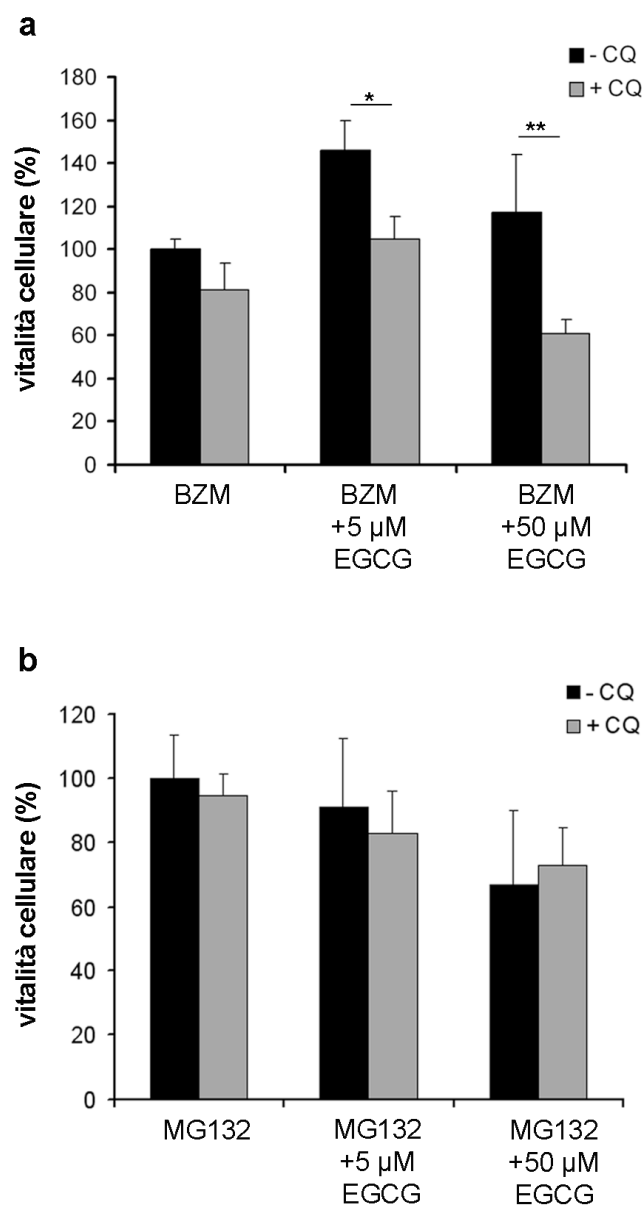


Figura 21 - L'inibizione dell'autofagia ripristina la citotossicità e lo stress del RE nelle cellule trattate con BZM ed EGCG. Le cellule PC3 sono state trattate per 24 ore come indicato in figura. La percentuale di vitalità cellulare, in presenza o in assenza di cloroquina (CQ), è stata determinata mediante saggio ATPlite. La vitalità delle cellule trattate con BZM (**a**) o MG132 (**b**) come singoli agenti è stata posta pari a 100%. I risultati sono espressi come media \pm DS di quattro determinazioni indipendenti. La One-way ANOVA, seguita dal test di comparazione multipla di Holm-Sidak, è stata usata per l'analisi statistica e la comparazione dei gruppi di trattamento: ** $P \leq 0,001$ e * $P \leq 0,05$.

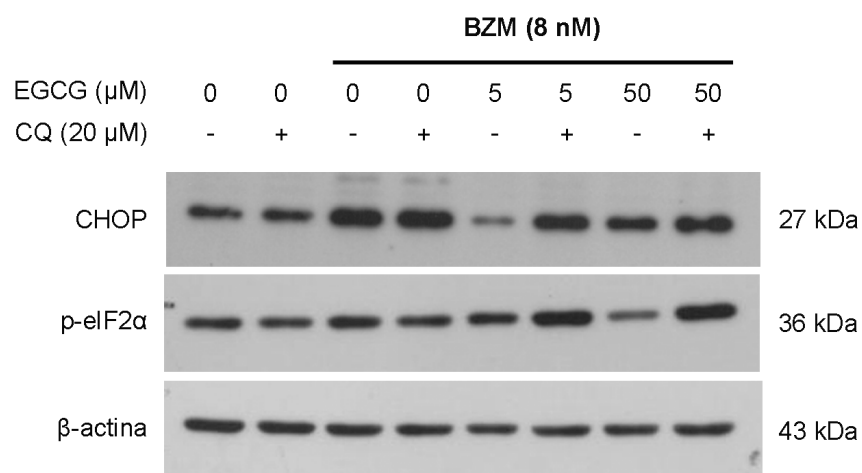


Figura 22 - *L'inibizione dell'autofagia ripristina lo stress del RE nelle PC3 trattate con BZM ed EGCG.* I livelli di espressione dei marcatori di stress del RE, CHOP e p-eIF2 α , sono stati determinati dopo 48 ore di trattamento tramite Western blot, usando la β -actina come controllo di caricamento.

DISCUSSIONE

Il CaP, una delle principali cause di morte per tumore nel maschio adulto, rappresenta una sfida per i clinici ed i ricercatori. Questa patologia è caratterizzata da un lento sviluppo, ma la sua progressione è difficile da fermare con le terapie oggi disponibili, soprattutto se il tumore viene diagnosticato in fasi già avanzate. Da una parte si rende necessaria una diagnosi precoce del CaP ed un monitoraggio continuo dei pazienti a rischio, dall'altra parte è fondamentale indagare nuove strategie terapeutiche volte sia a prevenire lo sviluppo e la progressione del CaP in soggetti a rischio, sia a trattare forme di CaP aggressive e resistenti alle attuali terapie. Le cellule di CaP, essendo cellule altamente secernenti, sono particolarmente suscettibili alla perturbazione della proteostasi soprattutto a livello del RE, principale organello intracellulare deputato alla sintesi e alle modificazione post-traduzionale della maggior parte delle proteine secrete dalla cellula. L'alterazione della proteostasi a livello del RE determina l'attivazione dell'UPR, un processo che ha primariamente un ruolo compensativo e di sopravvivenza cellulare essendo indirizzato a ripristinare la proteostasi tramite la regolazione della trascrizione genica, del ripiegamento proteico e della degradazione delle proteine alterate. Tuttavia, in caso di stress del RE irrisolvibile, la persistente attivazione delle vie di segnalazione dell'UPR causa l'induzione di processi di morte programmata che consentono l'eliminazione di cellule danneggiate irreparabilmente. Questa duplice funzione dell'UPR rende questo meccanismo cellulare un possibile bersaglio terapeutico per diversi tumori, tra cui il CaP.

Le catechine del tè verde hanno comprovati effetti benefici sulla salute umana. Le potenziali proprietà antitumorali di questi polifenoli, contenuti in una delle bevande più bevute al mondo, hanno attratto l'attenzione e l'interesse di numerosi gruppi di ricerca. Diversi studi scientifici hanno provato che le catechine del tè verde regolano diverse vie metaboliche e di segnalazione, riducendo la capacità di proliferazione e promuovendo la morte delle cellule tumorali, comprese le cellule di CaP. Data la scarsa tossicità dei polifenoli del tè verde, il loro utilizzo come agenti terapeutici singoli o in associazione con i più tradizionali agenti chemioterapici potrebbe costituire un considerevole vantaggio per il paziente, contribuendo a ridurre gli effetti collaterali dei trattamenti antitumorali. Per poter sfruttare questi composti naturali nelle strategie terapeutiche con una maggiore razionalità, è però necessaria una corretta e quanto più completa comprensione dei meccanismi d'azione che stanno alla base della capacità delle catechine del tè verde di modulare la proliferazione/vitalità delle cellule

tumorali. Per quanto concerne gli effetti sul CaP, recentemente è stata messa in evidenza un'alterazione del RE e dell'apparato del Golgi, con un conseguente deficit del processamento delle proteine secretorie, in seguito alla somministrazione di estratti di tè verde in topi TRAMP [96]. Questa ed altre evidenze [91-93] suggeriscono di inserire i processi coinvolti nel mantenimento della proteostasi nelle cellule di CaP tra i potenziali bersagli molecolari delle catechine del tè verde.

Nella prima parte di questo studio, abbiamo valutato gli effetti della somministrazione del Polyphenon E su due diverse linee cellulari di CaP al fine di capire se l'induzione dello stress del RE, già osservato nel nostro laboratorio in altri modelli in vitro di CaP, fosse un meccanismo attivato comunemente in questo tipo di cellule tumorali in seguito all'esposizione agli estratti di tè verde. Come modelli per il presente studio abbiamo utilizzato le cellule LNCaP, che mimano uno stadio precoce ancora androgeno-responsivo, e le DU145, che mimano invece uno stadio avanzato, androgeno-indipendente e metastatico. In entrambe le linee cellulari si è osservata una risposta citotossica dose-dipendente in seguito alla somministrazione di Polyphenon E. Le cellule LNCaP sono risultate essere maggiormente responsive, con una IC_{50} quasi otto volte inferiore rispetto a quella delle DU145. In generale, considerando anche i dati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio su cellule PNT1a (cellule epiteliali di prostata immortalizzate con l'antigene T grande di SV40) e su cellule PC3 (cellule di CaP metastatico androgeno-indipendenti e p53 negative), la sensibilità delle cellule mimanti i diversi stadi del CaP è la seguente: LNCaP ($IC_{50} = 17 \mu\text{g/mL}$) > PNT1a ($IC_{50} = 35 \mu\text{g/mL}$) > DU145 ($IC_{50} = 130 \mu\text{g/mL}$) > PC3 ($IC_{50} = 145 \mu\text{g/mL}$) [77]. Questo dato riflette risultati precedenti, ottenuti sia in vitro che in vivo, in cui è stato dimostrato che il Polyphenon E ed in generale le catechine del tè verde sono maggiormente efficaci negli stadi iniziali di sviluppo del CaP [44-46, 77]. Ciò è inoltre coerente con le principali evidenze cliniche in cui si riporta un effetto delle catechine del tè verde soprattutto quando usate come agenti chemiopreventivi [55, 56].

Al fine di valutare l'effetto del Polyphenon E, a concentrazioni pari all' IC_{50} , sull'induzione di stress del RE e di UPR, abbiamo valutato nel tempo i livelli di espressione di specifici marcatori, come GRP78, uno chaperon molecolare che assiste il corretto ripiegamento proteico a livello del RE, la forma fosforilata di eIF2 α , che causa un'attenuazione generale della traduzione proteica, ATF4, un importante fattore di trascrizione attivato dalla via PERK-p-eIF2 α , e CHOP, uno dei principali esecutori del braccio pro-apoptotico dell'UPR. Nelle cellule LNCaP trattate con Polyphenon E, abbiamo osservato un importante incremento dei

livelli di espressione di GRP78, p-eIF2 α e CHOP entro le 6 ore dall'inizio del trattamento; successivamente, però, si è registrato un calo nel tempo sia di GRP78 che di p-eIF2 α , proteine coinvolte nel ripristino della proteostasi, mentre i livelli di CHOP, componente pro-apoptotica, si sono mantenuti elevati fino alle 48 ore di trattamento. L'andamento di questi marcatori nel tempo suggerisce l'instaurarsi inizialmente di una risposta adattativa, mediata da fattori di sopravvivenza dell'UPR, come GRP78 e p-eIF2 α , la quale più tardivamente evolve verso una risposta di morte cellulare mediata da CHOP. Nelle cellule DU145, la somministrazione di Polyphenon E ha causato un'induzione di GRP78 a partire dalle 6 ore di trattamento, indicativa di una risposta allo stress del RE. Contemporaneamente si è osservata un'attivazione della via p-eIF2 α -ATF4-CHOP, come dimostrato dall'aumento significativo di questi marcatori. Questi risultati evidenziano l'induzione dello stress del RE e l'attivazione della via PERK-p-eIF2 α -ATF4-CHOP in cellule LNCaP e DU145 in seguito alla somministrazione di Polyphenon E, confermando ciò che era stato precedentemente osservato in cellule PNT1a e PC3 [77]. Tale meccanismo d'azione è indipendente dallo stato di attivazione di p53, così come anche i *pathway* di morte che si associano alla somministrazione di Polyphenon E. Infatti, le cellule PNT1a (con p53 funzionalmente inattivato) vanno incontro ad apoptosi [77] e in cellule DU145 (esprimenti una forma mutata ed inattiva di p53) si è osservata l'attivazione delle caspasi ed il clivaggio di PARP-1, mentre le cellule LNCaP (esprimenti p53 *wild type*) e le cellule PC3 (non esprimenti p53) vanno incontro a meccanismi di morte caspasi-indipendenti, in cui però si osserva sempre un certo grado di taglio della PARP-1 [77].

In sintesi, il Polyphenon E è in grado di indurre in cellule di CaP lo stress del RE con conseguente attivazione dell'UPR, la quale funge da iniziale risposta adattativa che può successivamente evolvere verso una risposta di tipo pro-apoptotico. L'UPR, in particolare l'attivazione della via PERK-p-eIF2 α -ATF4-CHOP, si configura quindi come uno dei possibili meccanismi attraverso il quale le catechine del tè verde contribuiscono ad indurre il processo di morte cellulare nel CaP.

Queste evidenze ci hanno portato a considerare lo stress del RE come un possibile bersaglio molecolare delle catechine del tè verde nel CaP e ci hanno spinto ad ipotizzare che la combinazione di questi polifenoli con farmaci capaci di indurre a loro volta lo stress del RE, come gli inibitori del proteasoma, potesse avere un effetto sinergico o additivo, causando un aggravamento dello stress del RE e un più efficace indirizzo verso l'attivazione del braccio pro-apoptotico dell'UPR. Nella seconda parte di questo studio abbiamo quindi valutato gli

effetti, su cellule PC3, di due diversi inibitori del proteasoma (BZM e MG132) in associazione con l'EGCG, la più attiva tra le catechine del tè verde ed il principale componente del Polyphenon E. In particolare, abbiamo valutato l'impatto di queste combinazioni, oltre che sulla vitalità cellulare, sui meccanismi molecolari coinvolti nel controllo della proteostasi e nell'induzione della risposta allo stress del RE.

Abbiamo confermato che anche l'EGCG, come il Polyphenon E [77], ha un effetto citotossico dose-dipendente sulla vitalità delle PC3, con un valore di IC_{50} , pari a 120 μ M, che attesta un certo grado di resistenza di queste cellule al trattamento con catechine del tè verde, rispetto ad altre cellule di CaP. Gli inibitori del proteasoma, quando utilizzati da soli, hanno dimostrato un effetto citotossico dose-dipendente, con valori di IC_{50} pari a 8 nM per il BZM e 0,32 μ M per MG132. Negli studi di associazione, gli inibitori del proteasoma, utilizzati a concentrazioni pari all' IC_{50} , sono stati combinati con dosi subletali di EGCG (5 o 50 μ M). I nostri risultati hanno mostrato come l'EGCG alla concentrazione pari a 5 μ M riduce l'effetto citotossico del BZM, causando uno spostamento della curva dose-risposta; innalzando il dosaggio dell'EGCG a 50 μ M si ha invece una completa sovversione dell'effetto letale del BZM, determinando un marcato effetto protettivo sulle PC3. In maniera analoga, analizzando alcuni marcatori di apoptosi, si è osservato che il BZM da solo causa, dopo 48 ore di trattamento, il taglio sia della caspasi 8 che di PARP-1, ma l'aggiunta di EGCG inibisce completamente l'attivazione della caspasi-8 e l'inattivazione della PARP-1. L'associazione dell'MG132 con l'EGCG, a una concentrazione di 5 o 50 μ M, non provoca invece nessuna modificazione sostanziale della curva dose-risposta dell'MG132. Allo stesso modo, l'attivazione della caspasi 9 e 8 ed il taglio della PARP-1, indotti in seguito al trattamento per 48 ore con MG132, sono mantenuti anche in presenza di EGCG.

Per meglio comprendere i meccanismi sottostanti la capacità dell'EGCG di contrastare la citotossicità del BZM, ma non dell'MG132, abbiamo approfondito i nostri studi valutando l'effetto della combinazione sia sull'inibizione del proteasoma, che sulla risposta allo stress del RE. L'inibizione del proteasoma è stata stimata valutando l'accumulo intracellulare delle proteine poliubiquitinate e di proteine a breve emivita notoriamente degradate e regolate attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma, come p21 e NF- κ B (p65) [104-106]. Sia il BZM che l'MG132, ed in misura minore l'EGCG (dose pari all' IC_{50}), hanno causato nelle PC3 un accumulo di proteine poliubiquitinate ed un incremento dei livelli di p21 ed NF- κ B, ascrivibile ad un effetto di inibizione del processo di degradazione proteasomale. Questi risultati convalidano la capacità di entrambi gli inibitori del proteasoma di bloccare l'attività

chimotriptica della subunità 20S del proteasoma in cellule PC3; inoltre, si conferma anche in questa linea cellulare, la capacità dell'EGCG di inibire il proteasoma, capacità già dimostrata in altri modelli di tumori umani [91, 108, 109]. In cellule trattate con la combinazione di MG132 ed EGCG, l'effetto sull'inibizione del proteasoma si mantiene forte, paragonabile a quello registrato col singolo trattamento con MG132. Invece, associando l'EGCG con il BZM, si osserva una marcata riduzione dell'accumulo di proteine dirette al proteasoma, indicando un'inibizione da parte dell'EGCG dell'effetto principe del BZM.

L'inibizione del proteasoma causa un accumulo di proteine poliubiquitinate e proteine *misfolded* nel RE, conseguentemente viene favorita una situazione di stress del RE che attiva i *pathway* dell'UPR. Notoriamente gli inibitori del proteasoma inducono UPR, così come diverse evidenze riportano l'attivazione di questa risposta in seguito al trattamento con lecatechine del tè verde (risultati parte 1 e [77, 93]). Nelle nostre condizioni sperimentali, l'EGCG (concentrazioni pari all'IC₅₀) ha causato, dopo 48 ore di trattamento, l'aumento nelle PC3 dei livelli di GRP78 e p-eIF2 α , marcatori di stress del RE e di UPR. L'UPR indotta dall'EGCG risulta essere prevalentemente una risposta di sopravvivenza cellulare, in quanto CHOP, il principale induttore del braccio di morte dell'UPR, rimane a livelli basali. In cellule PC3 trattate con MG132, sia in presenza che in assenza di EGCG, si è osservato, rispetto al controllo, un aumento sia di GRP78 e p-eIF2 α che di CHOP, indicando l'induzione della via pro-apoptotica dell'UPR; risposta in linea con l'osservazione dell'attivazione delle caspasi e del taglio proteolitico di PARP-1. Infine, nelle cellule trattate con BZM si è verificato un aumento di GRP78, mentre l'incremento di p-eIF2 α e CHOP risulta essere meno marcato rispetto a quello osservato in seguito a somministrazione di MG132. Queste variazioni nei marcatori dell'UPR indotte dal BZM sono completamente annullate quando viene co-somministrato l'EGCG, confermando un effetto simil-antagonistico anche a questo livello.

Quindi, nel nostro modello cellulare, l'EGCG contrasta l'azione citotossica del BZM inibendo la sua capacità di bloccare il proteasoma e riducendo conseguentemente gli effetti sullo stress del RE. Questi risultati confermano evidenze precedenti in cui viene riportato un effetto antagonista dell'EGCG nei confronti degli inibitori boronici del proteasoma, come il BZM, ma non di altri tipi di inibitori del proteasoma [110]. Questo effetto sembra essere dovuto principalmente ad un'interazione chimica diretta tra l'EGCG e la porzione boronica del BZM, come dimostrato da Golden E.B. e colleghi [110]. Tuttavia, siccome altri gruppi di ricerca non hanno osservato un effetto antagonista alle dosi che sono state utilizzate nel nostro studio [111] o hanno riportato invece un effetto sinergico di BZM ed EGCG [112], abbiamo voluto

approfondire il nostro studio al fine di comprendere se anche altri meccanismi, oltre alla possibile interazione diretta tra le due molecole, potessero essere responsabili dell'effetto di tipo antagonista da noi osservato.

L'autofagia ed il sistema ubiquitina-proteasoma collaborano e si compensano nel processo di degradazione delle proteine intracellulari, garantendo un'azione concertata volta al mantenimento della proteostasi [113]. L'inibizione del proteasoma, così come l'induzione dello stress del RE, attiva l'autofagia al fine di alleviare il carico di proteine *misfolded* e di aggregati proteici che potrebbero risultare tossici per la cellula. L'autofagia può agire infatti come un meccanismo di sopravvivenza che opera alleviando lo stress del RE, prevenendo così l'induzione delle vie di segnalazione pro-apoptotiche [113]. Oltre a diversi farmaci, come gli inibitori del proteasoma, anche numerosi composti naturali, tra cui i polifenoli del tè verde, sono in grado di indurre l'autofagia nelle cellule di CaP e spesso, in questi studi sui composti naturali, l'autofagia è risultata essere un meccanismo protettivo per le cellule tumorali [26].

In questo studio abbiamo osservato che il BZM induce nelle PC3 un flusso autofagico che è accentuato quando viene aggiunto l'EGCG. Infatti, il trattamento con BZM e ancor più la combinazione del BZM con l'EGCG determinano un incremento della conversione di LC3B-I in LC3B-II e la formazione di un *pattern* puntiforme in cellule trasfettate con EGFP-LC3, elementi indicativi di attivazione del processo autofagico e formazione di autofagosomi. In aggiunta, la co-somministrazione di cloroquina determina un accumulo di LC3B-II, segnale chiaro del fatto che questo agente lisosomotropico, bloccando l'ultima fase dell'autofagia, interrompe il flusso autofagico indotto dal BZM e ancor di più dal trattamento combinato con BZM ed EGCG. In cellule trattate con MG132, sia in presenza che in assenza di EGCG, si è osservata un'induzione dell'autofagia, come provato dall'incremento della conversione di LC3B-I in LC3B-II nel tempo, tuttavia, in questo caso, non si è instaurato un corretto flusso autofagico, infatti la cloroquina non incrementa l'accumulo di LC3B-II, segnale di un flusso autofagico inefficace e/o incompleto [107].

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che l'autofagia agisce come una risposta di sopravvivenza che contrasta lo stress del RE indotto dal Polyphenon E in cellule PNT1a [77]. In ultima analisi, abbiamo quindi valutato quale fosse il ruolo dell'autofagia nel determinare la vita o la morte delle PC3 e quale fosse l'effetto dell'inibizione dell'autofagia sui marcatori di stress del RE e UPR. L'inibizione dell'autofagia tramite la co-somministrazione della cloroquina ha permesso di verificare il ruolo significativo che l'autofagia esercita nel determinare la sopravvivenza indotta dall'EGCG quando combinato

con il BZM. Il blocco dell'autofagia ha ripristinato infatti la citotossicità del BZM inibita dall'associazione con l'EGCG; invece, nel caso del trattamento con MG132, l'inibizione dell'autofagia non ha modificato sostanzialmente la vitalità cellulare, indipendentemente dall'aggiunta o meno dell'EGCG. In cellule trattate con la combinazione di BZM ed EGCG, l'autofagia agisce come meccanismo di sopravvivenza atto a ridurre lo stress del RE e l'attivazione della via pro-apoptica dell'UPR, come dimostrato dal ripristino dei livelli aumentati di p-eIF2 α e CHOP quando viene bloccato il flusso autofagico.

In conclusione, i risultati di questo studio hanno apportato ulteriori evidenze sui meccanismi d'azione delle catechine del tè verde in cellule di CaP. In particolare, è stato comprovato che il RE rappresenta un bersaglio dell'azione citotossica delle catechine del tè verde in cellule di CaP: il Polyphenon E induce infatti precocemente una situazione di stress del RE che evolve successivamente verso l'attivazione del braccio pro-apoptico dell'UPR, tramite l'induzione della via p-eIF2 α -ATF4-CHOP. Ulteriori studi potranno essere condotti per valutare il coinvolgimento di altri *pathway* connessi allo stress del RE e all'UPR. L'approfondita conoscenza dell'effetto delle catechine del tè verde sui sistemi della proteostasi nel cancro può rappresentare la base di partenza per lo sviluppo di questi composti naturali come agenti farmacologici da associare ad altri composti sintetici o di origine naturale con meccanismi d'azione complementari sulla proteostasi, al fine di promuovere i meccanismi di morte cellulare mediati dall'UPR.

Nel nostro studio abbiamo inoltre valutato l'associazione dell'EGCG con due diversi inibitori del proteasoma, BZM ed MG132. Tale associazione non ha portato ad un effetto sinergico o additivo sulla vitalità cellulare delle PC3. Paradossalmente, nel caso dell'associazione con il BZM si è osservato un effetto simil-antagonistico dell'EGCG. In questo studio è stato messo in evidenza come l'attivazione dell'autofagia giochi un ruolo centrale nel meccanismo di resistenza al BZM indotto dall'EGCG. L'autofagia, nelle nostre condizioni sperimentali, agisce infatti come meccanismo volto ad alleviare lo stress del RE e a prevenire l'attivazione dell'UPR, favorendo in questo modo la sopravvivenza cellulare. I nostri risultati portano quindi a confermare la conclusione (già avanzata anche da Golden E.B. e colleghi [110]) di sconsigliare la somministrazione di catechine del tè verde a pazienti in trattamento con BZM. Recentemente inibitori del proteasoma di seconda generazione, con una struttura chimica diversa da quella del BZM, sono stati approvati per l'uso in clinica, come il carfilzomib (eposichetone tetrapeptide) ed il marizomib (noto anche come salinosporamide A, β -lattone-

γ -lattame biciclico) [114]. Sarà quindi eventualmente possibile valutare l'effetto della combinazione delle catechine del tè verde con questi nuovi inibitori non boronici del proteasoma. In aggiunta, sempre più composti vengono identificati come modulatori dello stress del RE, compresi diversi composti di origine naturale [114-116]. La possibilità di utilizzare combinazioni di queste molecole di sintesi e/o naturali, con lo scopo di favorire la morte cellulare tramite le vie mediate dall'UPR, è quindi un campo di ricerca ancora ampiamente da esplorare. Il presente studio ha messo in evidenza come, in ricerche volte alla caratterizzazione dell'effetto antitumorale di questi composti modulatori dell'UPR, si rende necessaria un'attenta valutazione del ruolo dell'autofagia come possibile meccanismo di resistenza e sopravvivenza cellulare.

BIBLIOGRAFIA

1. Chaturvedi, A.K., et al., *Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers*. J Clin Oncol, 2013. **31**(36): p. 4550-9.
2. Boccardo, F., et al., eds. *Linee guida CARCINOMA DELLA PROSTATA*. 2015 ed. 2015, AIOM -Associazione Italiana di Oncologia Medica.
3. Ploussard, G., et al., *The contemporary concept of significant versus insignificant prostate cancer*. Eur Urol, 2011. **60**(2): p. 291-303.
4. Epstein, J.I., et al., *The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(9): p. 1228-42.
5. Sobin, L.H., M. Gospodariwicz, and C. Wittekind, eds. *The TNM classification of malignant tumors*. 7 ed. 2009, UICC International Union Against Cancer & Wiley-Blackwell. pp. 243-248.
6. Ahmed, A., S. Ali, and F.H. Sarkar, *Advances in androgen receptor targeted therapy for prostate cancer*. J Cell Physiol, 2014. **229**(3): p. 271-6.
7. Craft, N., et al., *Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process*. Cancer Res, 1999. **59**(19): p. 5030-6.
8. Hathaway, A.R., M.K. Baker, and G. Sonpavde, *Emerging agents for the therapy of advanced prostate cancer*. Future Oncol, 2015.
9. Ting, H., et al., *The strategies to control prostate cancer by chemoprevention approaches*. Mutat Res, 2014. **760**: p. 1-15.
10. Schlesinger, C., D.G. Bostwick, and K.A. Iczkowski, *High-grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation: predictive value for cancer in current practice*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(9): p. 1201-7.
11. Diaz-Villanueva, J.F., R. Diaz-Molina, and V. Garcia-Gonzalez, *Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(8): p. 17193-230.
12. Hartl, F.U., A. Bracher, and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in protein folding and proteostasis*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 324-32.
13. Kim, Y.E., et al., *Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis*. Annu Rev Biochem, 2013. **82**: p. 323-55.
14. Ruggiano, A., O. Foresti, and P. Carvalho, *Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond*. J Cell Biol, 2014. **204**(6): p. 869-79.
15. Hetz, C., E. Chevet, and S.A. Oakes, *Proteostasis control by the unfolded protein response*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(7): p. 829-38.
16. Vandewynckel, Y.P., et al., *The paradox of the unfolded protein response in cancer*. Anticancer Res, 2013. **33**(11): p. 4683-94.
17. Lu, M., et al., *Cell death. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis*. Science, 2014. **345**(6192): p. 98-101.
18. Haze, K., et al., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3787-99.
19. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
20. Thrower, J.S., et al., *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal*. EMBO J, 2000. **19**(1): p. 94-102.

21. Dick, T.P., et al., *Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants*. J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25637-46.
22. Chowdhury, M. and C. Enenkel, *Intracellular Dynamics of the Ubiquitin-Proteasome-System*. F1000Res, 2015. **4**: p. 367.
23. Li, W.W., J. Li, and J.K. Bao, *Microautophagy: lesser-known self-eating*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(7): p. 1125-36.
24. Orenstein, S.J. and A.M. Cuervo, *Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(7): p. 719-26.
25. Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *The role of Atg proteins in autophagosome formation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 107-32.
26. Naponelli, V., et al., *Roles of autophagy induced by natural compounds in prostate cancer*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 121826.
27. Meijer, A.J. and P. Codogno, *Regulation and role of autophagy in mammalian cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2445-62.
28. Zhang, Z., et al., *The update on transcriptional regulation of autophagy in normal and pathologic cells: A novel therapeutic target*. Biomed Pharmacother, 2015. **74**: p. 17-29.
29. Russell, R.C., H.X. Yuan, and K.L. Guan, *Autophagy regulation by nutrient signaling*. Cell Res, 2014. **24**(1): p. 42-57.
30. Fu, L.L., Y. Cheng, and B. Liu, *Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(5): p. 921-4.
31. Kang, R., et al., *The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis*. Cell Death Differ, 2011. **18**(4): p. 571-80.
32. Boya, P., F. Reggiori, and P. Codogno, *Emerging regulation and functions of autophagy*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(7): p. 713-20.
33. Lianos, G.D., et al., *The role of heat shock proteins in cancer*. Cancer Lett, 2015. **360**(2): p. 114-8.
34. Higa, A. and E. Chevet, *Redox signaling loops in the unfolded protein response*. Cell Signal, 2012. **24**(8): p. 1548-55.
35. Wang, Y., et al., *The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway*. Cancer Res, 2012. **72**(20): p. 5396-406.
36. Chen, N. and V. Karantza-Wadsworth, *Role and regulation of autophagy in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(9): p. 1516-23.
37. White, E., *Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(6): p. 401-10.
38. Panda, P.K., et al., *Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **39**: p. 43-55.
39. Mukhtar, H. and N. Ahmad, *Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(6 Suppl): p. 1698S-702S; discussion 1703S-4S.
40. Belitz, H.-D., W. Grosch, and P. Schieberle, eds. *Food Chemistry* 4th ed. 2009, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1070.
41. Lambert, J.D., *Does tea prevent cancer? Evidence from laboratory and human intervention studies*. Am J Clin Nutr, 2013. **98**(6 Suppl): p. 1667S-1675S.
42. Balentine, D.A., S.A. Wiseman, and L.C. Bouwens, *The chemistry of tea flavonoids*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1997. **37**(8): p. 693-704.

43. Fei, X., et al., *The association of tea consumption and the risk and progression of prostate cancer: a meta-analysis*. Int J Clin Exp Med, 2014. **7**(11): p. 3881-91.
44. Gupta, S., et al., *Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10350-5.
45. Caporali, A., et al., *The chemopreventive action of catechins in the TRAMP mouse model of prostate carcinogenesis is accompanied by clusterin over-expression*. Carcinogenesis, 2004. **25**(11): p. 2217-24.
46. Kim, S.J., et al., *Safety and chemopreventive effect of Polyphenon E in preventing early and metastatic progression of prostate cancer in TRAMP mice*. Cancer Prev Res (Phila), 2014. **7**(4): p. 435-44.
47. Lee, S.C., et al., *Effect of a prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on the growth of androgen-independent prostate cancer in vivo*. Nutr Cancer, 2008. **60**(4): p. 483-91.
48. Ullmann, U., et al., *A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers*. J Int Med Res, 2003. **31**(2): p. 88-101.
49. Chow, H.H., et al., *Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. **10**(1): p. 53-8.
50. Chow, H.H., et al., *Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(12): p. 4627-33.
51. Chow, H.H., et al., *Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(9): p. 3312-9.
52. Choan, E., et al., *A prospective clinical trial of green tea for hormone refractory prostate cancer: an evaluation of the complementary/alternative therapy approach*. Urol Oncol, 2005. **23**(2): p. 108-13.
53. Jatoi, A., et al., *A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(6): p. 1442-6.
54. McLarty, J., et al., *Tea polyphenols decrease serum levels of prostate-specific antigen, hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor in prostate cancer patients and inhibit production of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in vitro*. Cancer Prev Res (Phila), 2009. **2**(7): p. 673-82.
55. Bettuzzi, S., et al., *Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1234-40.
56. Brausi, M., F. Rizzi, and S. Bettuzzi, *Chemoprevention of human prostate cancer by green tea catechins: two years later. A follow-up update*. Eur Urol, 2008. **54**(2): p. 472-3.
57. Kumar, N.B., et al., *Randomized, Placebo-Controlled Trial of Green Tea Catechins for Prostate Cancer Prevention*. Cancer Prev Res (Phila), 2015. **8**(10): p. 879-87.
58. Fujiki, H., et al., *Synergistic enhancement of anticancer effects on numerous human cancer cell lines treated with the combination of EGCG, other green tea catechins, and anticancer compounds*. J Cancer Res Clin Oncol, 2015. **141**(9): p. 1511-22.
59. Lecumberri, E., et al., *Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy*. Clin Nutr, 2013. **32**(6): p. 894-903.

60. Tachibana, H., et al., *A receptor for green tea polyphenol EGCG*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(4): p. 380-1.
61. Nelson, J., et al., *The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease*. Biosci Rep, 2008. **28**(1): p. 33-48.
62. Kumazoe, M., et al., *67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis*. J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 787-99.
63. Duhon, D., et al., *The polyphenol epigallocatechin-3-gallate affects lipid rafts to block activation of the c-Met receptor in prostate cancer cells*. Mol Carcinog, 2010. **49**(8): p. 739-49.
64. Adachi, S., et al., *The inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on activation of the epidermal growth factor receptor is associated with altered lipid order in HT29 colon cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6493-501.
65. Tsukamoto, S., et al., *Green tea polyphenol EGCG induces lipid-raft clustering and apoptotic cell death by activating protein kinase Cdelta and acid sphingomyelinase through a 67 kDa laminin receptor in multiple myeloma cells*. Biochem J, 2012. **443**(2): p. 525-34.
66. Hiipakka, R.A., et al., *Structure-activity relationships for inhibition of human 5alpha-reductases by polyphenols*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(6): p. 1165-76.
67. Liao, S. and R.A. Hiipakka, *Selective inhibition of steroid 5 alpha-reductase isozymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**(3): p. 833-8.
68. Ren, F., et al., *Tea polyphenols down-regulate the expression of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells*. Oncogene, 2000. **19**(15): p. 1924-32.
69. Chuu, C.P., et al., *Suppression of androgen receptor signaling and prostate specific antigen expression by (-)-epigallocatechin-3-gallate in different progression stages of LNCaP prostate cancer cells*. Cancer Lett, 2009. **275**(1): p. 86-92.
70. Werner, H., *Tumor suppressors govern insulin-like growth factor signaling pathways: implications in metabolism and cancer*. Oncogene, 2012. **31**(22): p. 2703-14.
71. Yu, H. and T. Rohan, *Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(18): p. 1472-89.
72. Li, M., et al., *Direct inhibition of insulin-like growth factor-I receptor kinase activity by (-)-epigallocatechin-3-gallate regulates cell transformation*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(3): p. 598-605.
73. Thomas, F., et al., *Dihydrotestosterone sensitises LNCaP cells to death induced by epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) or an IGF-I receptor inhibitor*. Prostate, 2009. **69**(2): p. 219-24.
74. Adhami, V.M., et al., *Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(23): p. 8715-22.
75. Adhami, V.M., et al., *Effective prostate cancer chemopreventive intervention with green tea polyphenols in the TRAMP model depends on the stage of the disease*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(6): p. 1947-53.
76. Gupta, S., T. Hussain, and H. Mukhtar, *Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells*. Arch Biochem Biophys, 2003. **410**(1): p. 177-85.

77. Rizzi, F., et al., *Polyphenon E(R), a standardized green tea extract, induces endoplasmic reticulum stress, leading to death of immortalized PNT1a cells by anoikis and tumorigenic PC3 by necroptosis*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(4): p. 828-39.
78. Hastak, K., et al., *Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(31): p. 4851-9.
79. Suh, J., et al., *Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells*. *Prostate*, 2002. **52**(3): p. 183-200.
80. Siddiqui, I.A., et al., *Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis*. *Oncogene*, 2008. **27**(14): p. 2055-63.
81. Boddy, J.L., et al., *The androgen receptor is significantly associated with vascular endothelial growth factor and hypoxia sensing via hypoxia-inducible factors HIF-1a, HIF-2a, and the prolyl hydroxylases in human prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(21): p. 7658-63.
82. Thomas, R. and M.H. Kim, *Epigallocatechin gallate inhibits HIF-1alpha degradation in prostate cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **334**(2): p. 543-8.
83. Sharif, M.R., et al., *Association of the serum vascular endothelial growth factor levels with benign prostate hyperplasia and prostate malignancies*. *Nephrourol Mon*, 2014. **6**(3): p. e14778.
84. Gray, A.L., et al., *The polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and luteolin synergistically inhibit TGF-beta-induced myofibroblast phenotypes through RhoA and ERK inhibition*. *PLoS One*, 2014. **9**(10): p. e109208.
85. Roomi, M.W., et al., *In vivo antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on human prostate cancer PC-3 xenografts in nude mice: evaluation of tumor growth and immunohistochemistry*. *In Vivo*, 2005. **19**(1): p. 179-83.
86. Knudsen, B.S., et al., *High expression of the Met receptor in prostate cancer metastasis to bone*. *Urology*, 2002. **60**(6): p. 1113-7.
87. Nakashiro, K., Y. Hayashi, and R. Oyasu, *Immunohistochemical expression of hepatocyte growth factor and c-Met/HGF receptor in benign and malignant human prostate tissue*. *Oncol Rep*, 2003. **10**(5): p. 1149-53.
88. Saleem, M., et al., *Prognostic significance of metastasis-associated protein S100A4 (Mts1) in prostate cancer progression and chemoprevention regimens in an autochthonous mouse model*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(1): p. 147-53.
89. Vayalil, P.K. and S.K. Katiyar, *Treatment of epigallocatechin-3-gallate inhibits matrix metalloproteinases-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinases, c-jun and NF-kappaB in human prostate carcinoma DU-145 cells*. *Prostate*, 2004. **59**(1): p. 33-42.
90. Smith, D.M., et al., *Synthetic analogs of green tea polyphenols as proteasome inhibitors*. *Mol Med*, 2002. **8**(7): p. 382-92.
91. Nam, S., D.M. Smith, and Q.P. Dou, *Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(16): p. 13322-30.
92. Connors, S.K., G. Chornokur, and N.B. Kumar, *New insights into the mechanisms of green tea catechins in the chemoprevention of prostate cancer*. *Nutr Cancer*, 2012. **64**(1): p. 4-22.

93. Revesz, K., et al., *Tea flavan-3-ols as modulating factors in endoplasmic reticulum function*. Nutr Res, 2011. **31**(10): p. 731-40.
94. Gamberucci, A., et al., *Green tea flavonols inhibit glucosidase II*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(5): p. 640-6.
95. Ermakova, S.P., et al., *(-)-Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9260-9.
96. Davalli, P., et al., *Chronic administration of green tea extract to TRAMP mice induces the collapse of Golgi apparatus in prostate secretory cells and results in alterations of protein post-translational processing*. Int J Oncol, 2011. **39**(6): p. 1521-7.
97. Li, X., K. Zhang, and Z. Li, *Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective*. J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 8.
98. Adams, J., et al., *Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids*. Bioorg Med Chem Lett, 1998. **8**(4): p. 333-8.
99. Adams, J., *Proteasome inhibitors as new anticancer drugs*. Curr Opin Oncol, 2002. **14**(6): p. 628-34.
100. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
101. Jackson, W.T., et al., *Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses*. PLoS Biol, 2005. **3**(5): p. e156.
102. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a008656.
103. Chaitanya, G.V., A.J. Steven, and P.P. Babu, *PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration*. Cell Commun Signal, 2010. **8**: p. 31.
104. Blagosklonny, M.V., et al., *Proteasome-dependent regulation of p21WAF1/CIP1 expression*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **227**(2): p. 564-9.
105. Chen, Z.J., *Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 758-65.
106. Hou, Y., et al., *Inhibitor of growth 4 induces NFkappaB/p65 ubiquitin-dependent degradation*. Oncogene, 2014. **33**(15): p. 1997-2003.
107. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes*. Autophagy, 2008. **4**(2): p. 151-75.
108. Kuhn, D., et al., *Synthetic peracetate tea polyphenols as potent proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 1010-23.
109. Landis-Piowar, K.R., et al., *Methylation suppresses the proteasome-inhibitory function of green tea polyphenols*. J Cell Physiol, 2007. **213**(1): p. 252-60.
110. Golden, E.B., et al., *Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors*. Blood, 2009. **113**(23): p. 5927-37.
111. Bannerman, B., et al., *Preclinical evaluation of the antitumor activity of bortezomib in combination with vitamin C or with epigallocatechin gallate, a component of green tea*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **68**(5): p. 1145-54.
112. Wang, Q., et al., *Potentiation of (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis by bortezomib in multiple myeloma cells*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2009. **41**(12): p. 1018-26.

113. Zhu, K., K. Dunner, Jr., and D.J. McConkey, *Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells*. *Oncogene*, 2010. **29**(3): p. 451-62.
114. Kubiczkova, L., et al., *Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma*. *J Cell Mol Med*, 2014. **18**(6): p. 947-61.
115. Pereira, D.M., et al., *Translating endoplasmic reticulum biology into the clinic: a role for ER-targeted natural products?* *Nat Prod Rep*, 2015. **32**(5): p. 705-22.
116. Farooqi, A.A., et al., *Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(8): p. 5743-52.